

DEPARTAMENT DE MEDICINA PREVENTIVA I SALUT
PÚBLICA

MODULACIÓN GENÉTICA Y AMBIENTAL DE
PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y CLÍNICOS EN
POBLACIÓN MEDITERRÁNEA DE ALTO RIESGO
CARDIOVASCULAR.

PAULA CARRASCO ESPÍ

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2011

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 5 de maig de 2011 davant un tribunal format per:

- Dr. José María Ordovas Muñoz
- Dr. Ramón Estruch Riba
- Dra. Rosa Lamuela Raventós
- Dr. Oscar Coltell Simon
- Dra. Guillermina Font Pérez

Va ser dirigida per:

Dra. Dolores Corella Piquer

Dra. Olga Portolés Reparaz

Dr. José Ignacio González Arráez

©Copyright: Servei de Publicacions
Paula Carrasco Espí

Dipòsit legal: V-501-2012

I.S.B.N.: 978-84-370-8150-2

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Arts Gràfiques, 13 baix

46010 València

Spain

Telèfon:(0034)963864115



Universitat de València

**Departament de Medicina Preventiva i Salut Pública,
Ciències de l'Alimentació, Toxicologia i Medicina Legal**

**Modulación genética y ambiental de
parámetros bioquímicos y clínicos en
población mediterránea de alto riesgo
cardiovascular**

Tesis doctoral presentada por:

Paula Carrasco Espí

Licenciada en Biología

Para la obtención del Grado de Doctora por la Universitat de València

Valencia, 2011

Dirigida por los profesores:

Dolores Corella Piquer

Olga Portolés Reparaz

José Ignacio González Arraez



Universitat de València

Dolores Corella Piquer, Catedrática de universidad, del Departament de Medicina Preventiva i Salut Pública, Ciències de l'Alimentació, Toxicologia i Medicina Legal. Universitat de València

Olga Portolés Reparaz, Profesora ayudante doctora, del Departament de Medicina Preventiva i Salut Pública, Ciències de l'Alimentació, Toxicologia i Medicina Legal. Universitat de València

José Ignacio González Arráez, Profesor titular de universidad, del Departament de Medicina Preventiva i Salut Pública, Ciències de l'Alimentació, Toxicologia i Medicina Legal. Universitat de València

CERTIFICAN:

Que la presente tesis doctoral con el título: “**Modulación genética y ambiental de parámetros bioquímicos y clínicos en población mediterránea de alto riesgo cardiovascular**”, ha sido realizada por **Paula Carrasco Espí**, bajo nuestra dirección, y reúne los méritos suficientes para que su autora obtenga el título de Doctora por la Universitat de València.

Y para que así conste, firman el presente certificado en

Valencia, a 18 Febrero de 2011

Dolores Corella Piquer

Olga Portolés Reparaz

José Ignacio González Arráez

Esta tesis doctoral se ha realizado durante el disfrute de las siguientes becas y contratos:

Beca de colaboración BC03-91 a cargo de Proyecto INBIOMED: “Plataforma de almacenamiento, Integración y análisis de datos clínicos, genéticos, epidemiológicos y orientada a la investigación sobre patologías”. Unidad de Epidemiología Genética y Molecular. Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Facultad de Medicina. Universidad de Valencia. 15 Julio 2003- 15 Enero 2004

Beca de investigación BI04-17 a cargo de Proyecto INBIOMED: “Plataforma de almacenamiento, Integración y análisis de datos clínicos, genéticos, epidemiológicos y orientada a la investigación sobre patologías”. Unidad de Epidemiología Genética y Molecular. Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Facultad de Medicina. Universidad de Valencia. 1 Mayo 2004- 31 Diciembre 2006.

Beca predoctoral V Segles. Unidad de Epidemiología Genética y Molecular. Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Facultad de Medicina. Universidad de Valencia. 1 Enero 2007-31 Diciembre 2007.

Contrato Investigador en Formación Grupo A. Unidad de Epidemiología Genética y Molecular. Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Facultad de Medicina. Universidad de Valencia. 1 Enero 2008- 14 Diciembre 2008.

Contrato Técnico Superior de Investigación Grupo A. Unidad de Epidemiología Genética y Molecular. Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Facultad de Medicina. Universidad de Valencia. 15 Diciembre 2008- 14 Diciembre 2009.

Contrato Personal Investigador. CIBER de Fisiopatología Obesidad y Nutrición. Desde 8 Marzo de 2010 hasta la actualidad.

Dedicatoria

A Carlos por estar a mi lado, por darle la importancia justa a las cosas y hacer que la vida sea mejor junto a ti. Gracias por cuidarme y velar siempre por mí. Vas a ser un papi increíble.

A mi hermana y a mis padres por ayudarme siempre a conseguir mis objetivos, por su cariño y su apoyo. Muchas gracias por todo lo que me habéis dado. Estoy muy orgullosa de vosotros.

Agradecimientos

Deseo agradecer la realización de este trabajo:

A mis directores por aceptarme para realizar esta tesis doctoral bajo su dirección. Les agradezco también el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis.

A Caro, mi fiel compañera. He tenido mucha suerte por tenerte a mi lado todos estos años ya que en tu compañía los momentos malos se convierten en buenos y la tristeza se transforma en alegría. Gracias por estar siempre a mi lado, por tu apoyo incondicional, por tu sinceridad y tu amistad.

A María Arregui por sus buenos consejos, su cariño y su bondad. He aprendido muchas cosas de ti, eres un ejemplo a seguir.

Quiero expresar también mi más sincero agradecimiento a Jesús Rico Sanz por su acogida en Orlando. Muchas gracias por tu amabilidad y por permitirme vivir una experiencia tan importante para mi formación como investigadora y como persona.

También a mis viejos compañeros de laboratorio Eva, Saray, Xelo, Titi, Quique, María por el apoyo, el cariño y el ánimo que siempre me han brindado.

A mis actuales compañeras PREDIMED, Patricia, Eva, Laura y Rosana. A Javi por sus conversaciones y sus consejos y a Vicente por su sinceridad. A Sorlí por su trabajo y por estar siempre dispuesto a prestar su ayuda. A los demás profesores de Medicina Preventiva, Carmen, Marisa y Toni.

A Paco por su paciencia y por estar siempre en el momento necesario y tener una solución para todo y a Gema por sus sabios consejos, su ayuda, su confianza y su sinceridad.

También me gustaría expresar mi agradecimiento a los participantes en el estudio PREDIMED y a todos los médicos y personal colaborador.

ÍNDICE

TERMINOLOGÍA	15
1. INTRODUCCIÓN	19
1.1 ENFERMADADES CARDIOVASCULARES	19
1.2 LIPOPROTEÍNAS CIRCULANTES Y METABOLISMO DEL COLESTEROL	23
1.3 LESIÓN ATEROSCLERÓTICA	29
1.4 FACTORES DE RIESGO DE ECV	37
1.4.1 <i>Edad y sexo</i>	37
1.4.2 <i>Fenotipos intermedios de ECV</i>	38
1.4.3 <i>Factores ambientales</i>	52
1.5 FENOTIPOS FINALES DE ECV	71
1.5.1 <i>Enfermedades vasculares periféricas</i>	71
1.5.2 <i>Enfermedades isquémicas del corazón</i>	72
1.5.3 <i>Enfermedades cerebrovasculares</i>	72
1.6 FACTORES GENÉTICOS	73
1.6.1 <i>Genes relacionados con el metabolismo lipídico</i>	74
1.6.2 <i>Genes relacionados con obesidad</i>	77
1.6.3 <i>Genes relacionados con DMT2</i>	78
1.6.4 <i>Genes relacionados con marcadores de inflamación</i>	79
1.6.5 <i>Genes relacionados con marcadores de estrés oxidativo</i>	80
1.6.6 <i>Otros</i>	80
1.6.7 <i>Desequilibrio de ligamiento entre loci polimórficos</i>	82
1.7 INTERACCIONES GEN-GEN	83
1.8 INTERACCIONES GEN-AMBIENTE.....	84
1.8.1 <i>Interacciones entre genes y tabaquismo</i>	86
1.8.2 <i>Interacciones entre genes y actividad física</i>	87
1.8.3 <i>Interacciones entre genes y dieta</i>	88

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	93
2.1 HIPÓTESIS.....	93
2.2 OBJETIVOS CONCRETOS.....	93
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	97
3.1 INTRODUCCIÓN.....	97
3.2 ESTUDIO PREDIMED.....	98
3.2.1 <i>Nodos participantes</i>	99
3.2.2 <i>Selección de participantes</i>	100
3.2.3 <i>Reclutamiento de participantes</i>	102
3.2.4 <i>Recopilación de datos</i>	105
3.2.5 <i>Determinaciones a partir de las muestras obtenidas</i>	114
3.2.6 <i>Protocolo de intervención dietética personalizada</i>	116
3.2.7 <i>Validación del cuestionario de frecuencia de consumo alimentario utilizado en el proyecto PREDIMED. Estudio VALFRECO.</i>	120
3.3 ESTUDIO EPIC.....	124
3.3.1 <i>Diseño del estudio</i>	124
3.3.2 <i>Sujetos del estudio</i>	125
3.3.3 <i>Recopilación de datos</i>	126
3.4 ANÁLISIS GENÉTICO.....	128
3.4.1 <i>Casas comerciales</i>	128
3.4.2 <i>Obtención de ADN</i>	129
3.4.3 <i>Reacción en cadena de la polimerasa</i>	131
3.4.4 <i>Análisis de polimorfismos de longitud en los fragmentos de restricción de los productos de la reacción en cadena de la polimerasa</i>	135
3.4.5 <i>Análisis de fluorescencia mediante sondas TaqMan</i>	137
3.5 MÉTODOS ESTADÍSTICOS.....	140
4. RESULTADOS.....	145
4.1 INTRODUCCIÓN.....	145
4.2 ESTUDIO PREDIMED.....	146
4.2.1 <i>Resultados obtenidos en el estudio piloto</i>	146
4.2.2 <i>Validación del cuestionario de frecuencia de consumo alimentario utilizado en el estudio PREDIMED. Estudio VALFRECO.</i>	152
4.2.3 <i>Estudio de asociación entre polimorfismos en genes candidatos y fenotipos intermedios de ECV.</i>	157

4.2.4 Estudio de posibles interacciones gen*ambiente sobre fenotipos intermedios	211
4.2.5 Estudio de combinaciones genotípicas de polimorfismos	237
4.2.6 Estudio de posibles interacciones gen*gen sobre fenotipos intermedios	244
4.3 ESTUDIO EPIC.....	247
4.3.1 Características de la población	247
4.3.2 Estudio de asociación entre polimorfismos en genes candidatos y fenotipos finales de ECV. Polimorfismo TaqIB de la CETP y riesgo de CI.	250
4.3.3 Estudio de posibles interacciones gen-ambiente sobre fenotipos finales. Modulación del efecto del polimorfismo TaqIB de la CETP sobre el riesgo de CI por el consumo de alcohol.	252
5. DISCUSIÓN.....	255
5.1 DISCUSIÓN DEL ESTUDIO PILOTO DEL PROYECTO PREDIMED.....	255
5.2 DISCUSIÓN DEL ESTUDIO VALFRECO.....	262
5.3 DISCUSIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA POBLACIÓN PREDIMED EN EL NODO DE VALENCIA Y POBLACIÓN EPIC E INFLUENCIA DE LOS FACTORES AMBIENTALES.....	265
5.3.1 Estudio PREDIMED	265
5.3.2 Estudio EPIC	268
5.4 DISCUSIÓN DE CADA UNO DE LOS POLIMORFISMOS Y LAS INTERACCIONES GEN*AMBIENTE.	269
5.4.1 Discusión los polimorfismos relacionados metabolismo lipídico y fenotipos intermedios y finales de ECV.	269
5.4.2 Discusión los polimorfismos relacionados con obesidad y fenotipos intermedios de ECV.	293
5.4.3 Discusión los polimorfismos relacionados con DMT2 y fenotipos intermedios de ECV.	296
5.4.4. Discusión los polimorfismos relacionados con marcadores de inflamación y fenotipos intermedios de ECV.	306
5.4.5. Discusión los polimorfismos relacionados con marcadores de estrés oxidativo y fenotipos intermedios de ECV.	308
5.4.6. Discusión de otros polimorfismos relacionados con fenotipos intermedios de ECV.	311
5.5 DISCUSIÓN DEL EFECTO SOBRE FENOTIPOS INTERMEDIOS DE LA COMBINACIÓN GENOTÍPICA ENTRE POLIMORFISMOS	319
5.6 DISCUSIÓN DE LAS INTERACCIONES GEN*GEN	324

6. CONCLUSIONES	327
7 BIBLIOGRAFÍA	331
8. ÍNDICE DE FIGURAS	413
9. ÍNDICE DE TABLAS	419

TERMINOLOGÍA

Las abreviaturas utilizadas en esta tesis son las siguientes:

8-oxo-dG:	8-oxo-2'-deoxiguanosina
A:	Adenina
ABCA1:	ATP-Binding Cassete 1
ACAT:	Acil- Coenzima A Colesterol Aciltransferasa
ACV:	Accidente Cerebrovascular
ADN:	Ácido Desoxirribonucleico
AG:	Ácidos Grasos
AGE:	Productos Avanzados de Glicación
AGM:	Ácidos Grasos Monoinsaturados
AGP:	Ácidos Grasos Poliinsaturados.
AGS:	Ácidos Grasos Saturados
AHA:	American Heart Association
AMPK:	Cinasa activada por Monofosfato de Adenina
AOVE:	Aceite de Oliva Virgen Extra
ApoA:	Apolipoproteína de tipo A
ApoC:	Apolipoproteína de tipo C
ApoE:	Apolipoproteína de tipo E
APOE:	Gen de la Apolipoproteína de tipo E
C:	Citosina
CETP:	Gen de la proteína de transferencia del éster de la colesteroína
CFCA:	Cuestionario de Frecuencia de Consumo Alimentario
c-HDL:	Colesterol HDL
CI:	Cardiopatía Isquémica
c-LDL:	Colesterol LDL
CML:	Células Musculares Lisas

COX-2:	Ciclooxigenasa 2
CT:	Colesterol Total
CYBA:	Gen de la proteína p22phox
DM:	Dieta Mediterránea
DMT2:	Diabetes Mellitus tipo 2
ECV:	Enfermedades Cardiovasculares
EDTA:	Ácido Etilendiaminotetraacético
EEUU:	Estados Unidos
ENDOL:	Lipasa endotelial
eNOs:	Óxido Nítrico Sintetasa Endotelial
EPIC:	European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition
ESC:	European Society of Cardiology
ESH:	European Society of Hypertension
EVP:	Enfermedad Vasculat Periférica
FR:	Factor de Riesgo
FS:	Frutos Secos
FTO:	Fat mass and obesity associated
G:	Guanina.
GSH:	Glutación reducido
GSSG:	Glutación oxidado
H ₂ O ₂ :	Peróxido de hidrógeno
HDL:	Lipoproteínas de alta densidad
HMG-CoA:	3 hidroxil-3 metilglutaril-coenzima A
HTA:	Hipertensión Arterial
IAM:	Infarto Agudo de Miocardio
IC:	Intervalo de Confianza
ICAM:	Moléculas de Adhesión Intercelular
IDL:	Lipoproteínas de densidad intermedia
IG:	Intolerancia a la glucosa
IL:	Interleucina
IMC:	Índice de Masa Corporal
INE:	Instituto Nacional de Estadística
INF- γ :	Interferón γ

LCAT:	Lecitina-colesterol Aciltransferasa
LDL:	Lipoproteínas de baja densidad
LDLox:	Lipoproteínas de baja densidad oxidadas
LH:	Lipasa Hepática
LIPC:	Gen de la lipasa hepática
Lp(a):	Lipoproteína a
LPL:	Lipoprotein Lipasa
LRP:	Proteína relacionada con el receptor de las lipoproteínas de baja densidad
MCP1:	Proteína 1 quimiotáctica de monocitos
MDA:	Malondialdehído
METs:	Equivalentes Metabólicos
MMP:	Metaloproteinasas
MTHFR:	Metilentetrahidrofolato reductasa
NADPH:	Fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NCEP:	National Cholesterol Education Program
NF- κ B:	Factor Nuclear Kappa Beta
NO:	Óxido Nítrico
O ₂ ⁻ :	Anión Superóxido
OMS:	Organización Mundial de la Salud
OR:	Odds Ratio
PAD:	Presión Arterial Diastólica
PAI-1:	Activador-inhibidor del plasminógeno
PAS:	Presión Arterial Sistólica
pb:	Par de bases.
PCR:	Proteína C Reactiva
PECAM-1:	Moléculas de adhesión plaquetar 1
PGI ₂ :	Prostaciclina
PLTP:	Proteína de transferencia de fosfolípidos
PON1:	Paraoxonasa 1
PPAR:	Gen de los receptores activados por el proliferador de peroxisomas
PPARGC1 γ :	Coactivador-1 del PPAR γ
PREDIMED:	PREvención con DIeta MEDiterránea
PRKAA:	Subunidad α de AMPK

PRKAB:	Subunidad β de AMPK
PRKAG:	Subunidad γ de AMPK
RFLP:	Polimorfismos de longitud en los fragmentos de restricción
rLDL:	Receptor de lipoproteínas de baja densidad
ROS:	Especies Reactivas de Oxígeno
SEC:	Sociedad Española de Cardiología
SENC:	Sociedad Española de Nutrición Comunitaria
SNP:	Single Nucleotide Polimorphism
SNS:	Sistema Nervioso Simpático
SOD:	Superóxido Dismutasa
SRBI:	Receptor antioxidante de clase BI
T:	Timina
TaqIB:	Enzima de restricción
TCF7L2:	Transcriptional factor 7- like 2
TG:	Triglicéridos o triaglicéridos
TNF- α :	Factor de necrosis tumoral α
t-PA:	Activador del plasminógeno tisular
USDA:	Departamento de Agricultura de EEUU
VCAM:	Moléculas de adhesión celular vascular
VLDL:	Lipoproteínas de muy baja densidad
VNTR:	Número variable de <i>tandem repeats</i>
VO _{2máx} :	Consumo Máximo de Oxígeno

1.1 Enfermedades cardiovasculares

Actualmente, las enfermedades crónicas, incluidas la obesidad, la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), las enfermedades cardiovasculares (ECV) y distintos tipos de cáncer, son causas cada vez más importantes de discapacidad y muerte prematura tanto en países desarrollados como en transición, y suponen una carga adicional para los presupuestos sanitarios nacionales. De hecho, causan aproximadamente un 60% del total de las muertes notificadas en el mundo y un 46% de la carga mundial de morbilidad. Además, se prevé que su proporción aumente a un 57% para 2020 (OMS, 2002). Por ello, representan un gran desafío para la Salud Pública, poniendo de manifiesto la necesidad de intensificar los esfuerzos en investigación para mejorar la prevención primaria y su tratamiento.

Casi la mitad del total de las muertes por enfermedades crónicas son atribuibles a las ECV, constituyendo un problema de Salud Pública de gran magnitud. Bajo el epígrafe de ECV se agrupa un conjunto de fenotipos diversos. En la Clasificación Internacional de Enfermedades 10ª Revisión (C.I.E.-10), las ECV se encuentran especificadas y codificadas en el capítulo IX como enfermedades del sistema circulatorio (100-199). Comprenden las siguientes afecciones o grupo de enfermedades: 1) Fiebre reumática aguda; 2) Enfermedad cardíaca reumática crónica; 3) Enfermedad hipertensiva; 4) Enfermedad isquémica del corazón; 5) Enfermedad cardiopulmonar y enfermedad de la circulación pulmonar y otras enfermedades del corazón; 6) Enfermedades cerebrovasculares; 7) Enfermedades de las arterias, arteriolas y capilares; 8) Enfermedades de las venas y de los vasos y ganglios linfáticos no clasificadas en otra parte; 9) otros trastornos y los no especificados del sistema circulatorio (OMS, 2007).

Este conjunto de enfermedades suponen la primera causa de mortalidad a nivel mundial, provocando un 30% del total de muertes anuales. La más importante es la cardiopatía isquémica (CI) puesto que causa el 43% de las muertes provocadas por ECV, seguido de las enfermedades cerebrovasculares (33%) y otros tipos (24%). Además, al menos 20 millones de personas al año, sobreviven en el mundo a infartos de miocardio (IAM) y accidentes cerebrovasculares (ACV), y

una proporción muy importante de los mismos requieren atención sanitaria costosa, lo cual supone una enorme carga, a largo plazo, sobre los recursos sanitarios (OMS, 2003).

Según el informe de 2005 del *European Cardiovascular Disease Statistics*, las ECV ocasionan más de 4 millones de muertes al año en Europa (1,9 millones en los 25 países de la Unión Europea) y genera un coste total de 169.000 millones de euros como consecuencia de la pérdida de productividad, costes asistenciales y tratamiento directo (Petersen S et al, 2005). Los costes totales representan aproximadamente el 12% de la totalidad del gasto sanitario de la Unión Europea. Las ECV son asimismo la causa principal de la pérdida de años de vida por muerte prematura y la responsable del 25% de la carga global de la enfermedad en Europa, según las estimaciones realizadas (Petersen S et al, 2005).

En España, según el *Informe de la Sociedad Española de Cardiología (SEC) de 2009* sobre la incidencia de las ECV basado en las estadísticas del Instituto Nacional de Estadística (INE) sobre defunciones en 2007, las ECV se consolidan como la primera causa de fallecimiento. Según las estadísticas de 2007, las ECV ocasionaron 124.126 muertes, lo que supone aproximadamente el 31% del total (el 28,6% varones y el 36,8% mujeres) (INE, 2007). Las dos grandes entidades que causan un mayor número de muertes de etiología cardiovascular son la CI y la enfermedad cerebrovascular. Ambas constituyen el 57% de la mortalidad cardiovascular total; el 30% por CI y el 27% por ictus. Además, la CI tiene una mayor repercusión en hombres que en mujeres (37 vs 24%) y, sin embargo, las enfermedades cerebrovasculares en mujeres con respecto a los hombres (28 vs 25%). La tercera ECV que más muertes produce en España son las arritmias y otras ECV en las que se incluyen las enfermedades vasculares periféricas (EVP), después la insuficiencia cardíaca, las hipertensivas y las reumáticas (Figura 1.1)



Figura 1.1 Porcentaje de muertes debidas a ECV y por sexo en España, Informe SEC 2009.

El Informe SEC 2009 también aporta datos acerca de la mortalidad por ECV en las distintas provincias españolas. En la figura 1.2 se observa que en Extremadura, Andalucía, Ceuta, Canarias, Murcia, Comunidad Valenciana, y Cantabria la tasa de mortalidad por 100.000 habitantes debida a CI es mayor.

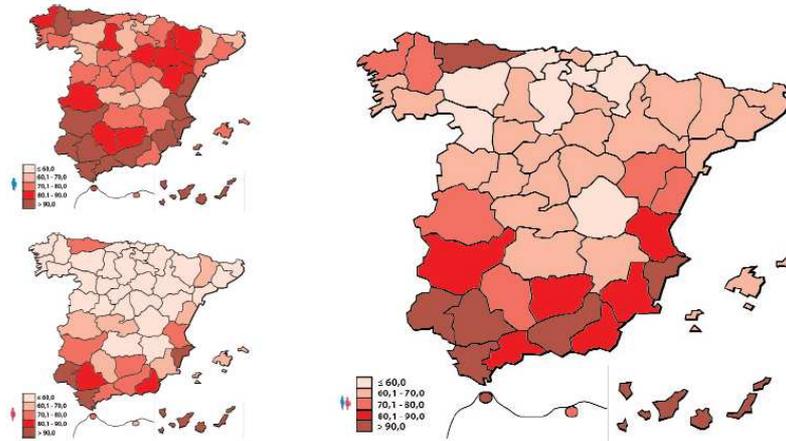


Figura 1.2. Tasa de mortalidad por CI por provincia en hombres (arriba izquierda); en mujeres (abajo izquierda); en la población total (derecha) según el Informe SEC 2009.

En la figura 1.3 destacan Extremadura, Andalucía, Ceuta, Murcia, Comunidad Valenciana, Aragón y Galicia por su mayor tasa de mortalidad por enfermedades cerebrovasculares.

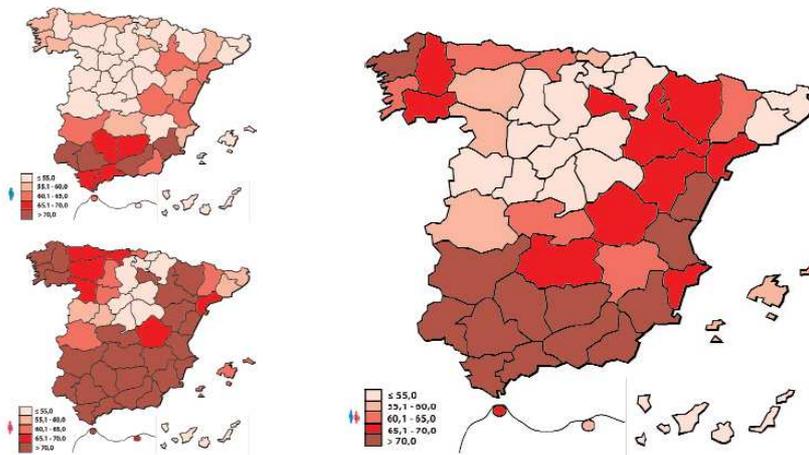


Figura 1.3. Tasa de mortalidad por enfermedad cerebrovascular por provincia en hombres (arriba izquierda); en mujeres (abajo izquierda); en la población total (derecha) según el Informe SEC 2009.

En las dos figuras se puede apreciar las diferencias en la tasa de mortalidad por CI y por enfermedades cerebrovasculares por sexo.

Debido a las repercusiones tanto económicas y sociales como de impacto en el sistema sanitario el abordaje preventivo de las ECV se ha convertido en una prioridad de política sanitaria al más alto nivel (Ministerio de Sanidad y Consumo, 2003).

Las ECV son enfermedades complejas en las que múltiples causas de origen genético o ambiental (no genético) pueden estar involucradas (Linton MF et al, 2003, Kardía SL et al, 2003). Dado el carácter estocástico de los eventos, se utiliza el concepto “factor de riesgo” (FR) en lugar de “causa” que entraña un significado más determinista (Beaty TH et al, 2000). El término FR se refiere a las circunstancias (variables genéticas o ambientales) que hacen que la probabilidad de desarrollar una enfermedad sea mayor en aquellas personas que los presenten. La investigación de los FR de las ECV constituye una labor compleja debido a la presencia de muchos factores que inciden y se interrelacionan, pero supone una herramienta fundamental en su prevención. No obstante, a partir de datos obtenidos de estudios epidemiológicos clásicos, los FR han podido ser identificados y clasificados, tradicionalmente, en modificables (consumo de tabaco, consumo de alcohol, sedentarismo, elevada ingestión de grasas saturadas en la dieta, dislipemia, DMT2, hipertensión (HTA), obesidad, hiperhomocisteinemia) y no modificables (sexo, edad, genética) en la medida en que se pueda influir o no en ellos (Posner BM et al, 1991, Haskell WL et al, 2003). Sin embargo, gracias al concepto de interacción gen*ambiente se ha revolucionado la visión clásica de factor modificable o no.

La epidemiología cardiovascular clásica no incorporaba en sus estudios el componente genético de la enfermedad a nivel molecular porque se carecía de información sobre ello. En la última década, y tras la secuenciación del genoma humano, ha surgido una nueva disciplina, epidemiología genómica cardiovascular, que tiene como objetivo la integración de la información genética y ambiental en el estudio de la etiología de las ECV (Little J et al, 2003). La epidemiología genómica cardiovascular se plantea generar nuevo conocimiento sobre la contribución genética y ambiental a los distintos fenotipos cardiovasculares. Estos fenotipos, pueden ser clasificados en dos grandes grupos: 1) los denominados *fenotipos intermedios*, que a su vez se consideran FR de los fenotipos finales de ECV. Entre estos fenotipos intermedios se incluyen las concentraciones de lípidos y lipoproteínas plasmáticas [colesterol total (CT), triglicéridos (TG), colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad (c-HDL), colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad (c-LDL)], glucemia, insulinemia, homocisteinemia, presión arterial sistólica (PAS), presión arterial diastólica (PAD), obesidad, sobrepeso,

metabolitos del estrés oxidativo, marcadores de inflamación o distintas concentraciones de hormonas, 2) los denominados *fenotipos finales*. Estos fenotipos finales son los distintos grupos de ECV (CI, enfermedades cerebrovasculares y EVP).

Es difícil definir con claridad la contribución que cada uno de los FR ejerce sobre los fenotipos cardiovasculares. De hecho, pueden darse efectos sinérgicos entre diferentes factores independientes, de manera que cuando varios de ellos concurren en un mismo individuo, el riesgo de desarrollar la enfermedad es más que aditivo (Kaplan NM, 1996). Además, existe evidencia de que el efecto que ejercen cambios en los diferentes factores ambientales o modificables sobre los fenotipos de ECV difieren de forma significativa entre individuos (Tiret L, 2002, Ordovas JM et al, 2007). Así pues, el estudio de la contribución genética y ambiental sobre fenotipos intermedios y finales de ECV permite caracterizar interacciones gen*ambiente y así, obtener conocimiento para poder realizar recomendaciones específicas a nivel individual que actúen sobre el riesgo de ECV. (Deckelbaum RJ et al, 1999, Ordovas JM et al, 2004(b)). De este modo, en la actualidad resulta crucial incorporar en la investigación las denominadas interacciones gen*ambiente en los estudios epidemiológicos ya que permitirá obtener nuevas evidencias para el abordaje preventivo de las ECV (Clayton D et al, 2001).

1.2 Lipoproteínas circulantes y metabolismo del colesterol

Está claramente demostrado el vínculo entre el colesterol sérico y el desarrollo de ECV, de hecho, constituye unos de los principales fenotipos intermedios de ECV y por ello es importante conocer su metabolismo.

Debido a la insolubilidad de los lípidos en el medio acuoso, y para facilitar su transporte en el plasma sanguíneo, estos se asocian con proteínas y forman una estructuras supramoleculares que se conocen con el nombre de lipoproteínas. Las lipoproteínas constan de un núcleo hidrofóbico formado por TG y ésteres de colesterol, rodeado de una envoltura organizada en una monocapa y formada por lípidos polares (fosfolípidos y colesterol libre) y por proteínas. Las proteínas que constituyen las lipoproteínas reciben el nombre de apoproteínas y cumplen una función estructural, solubilizando los lípidos, y además regulan la ruta metabólica de las diferentes lipoproteínas al servir de cofactores enzimáticos y por interaccionar y ser reconocidas por receptores específicos localizados en las membranas celulares (Mathews CK et al, 2000).

Las lipoproteínas pueden separarse según su densidad en cuatro familias diferentes (Gotto AM et al, 1986): quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL). Las lipoproteínas del plasma difieren entre sí respecto a su contenido lipídico y también según las apoproteínas que contienen (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Composición de las principales lipoproteínas del plasma humano (adaptada de Mathews CK et al, 2000).

	Quilomicrones	VLDL	LDL	HDL
Densidad (g/ml)	<0.95	0.95- 1.006	1.006-1.063	1.062-1.21
Diámetro (nm)	<70	30-90	18-22	5-12
Lípidos (%)	98	92	78	50
Triglicéridos (%)	86	55	6	4
Fosfolípidos (%)	7	18	22	22
Colesterol libre (%)	2	7	8	4
Colesterol éster (%)	3	12	42	20
Proteínas (%)	2	8	22	50
	A-IV, B-48 C-II, C-III, E	B-100, C-I, C-II, C-III, E	B-100	A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C- III,D, E

El colesterol es el esteroide predominante en animales y desempeña importantes funciones en el organismo: es precursor de la vitamina D, de hormonas esteroideas y sales biliares. Es también un componente importante de las membranas biológicas y forma parte de las lipoproteínas circulantes (Dietschy JM et al, 1993). El colesterol en nuestro organismo es aportado exógenamente (dieta) y es sintetizado en parte endógenamente mediante un proceso complejo y costoso energéticamente que permite complementar las concentraciones de colesterol procedentes de la dieta. El proceso biosintético del colesterol ocurre principalmente en el hígado a partir de la acetil-CoA y la etapa limitante de esta vía metabólica es el paso de 3hidroxi-3metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) a mevalonato, reacción catalizada por la HMG-CoA reductasa (Dietschy JM et al, 1993). Esta reacción está regulada por las concentraciones intracelulares de colesterol, ya que títulos altos de colesterol (o algún derivado suyo) inhiben la transcripción del gen que codifica para dicha enzima y promueven su rápida degradación. Dicha enzima existe en una forma fosforilada (inactiva) y en otra no fosforilada (activa). El

glucagón estimula la fosforilación (inactivación) y la insulina promueve la desfosforilación (activación) (McNamara DJ et al, 1987, Jones PJH et al, 1996).

1.2.1 Transporte en sangre del colesterol aportado por la dieta

El colesterol procedente de la dieta es transportado desde el intestino hasta el hígado a través de los quilomicrones. A continuación, se describe brevemente el metabolismo circulante del colesterol (Figura 1.4) (Mathews CK et al, 2000).

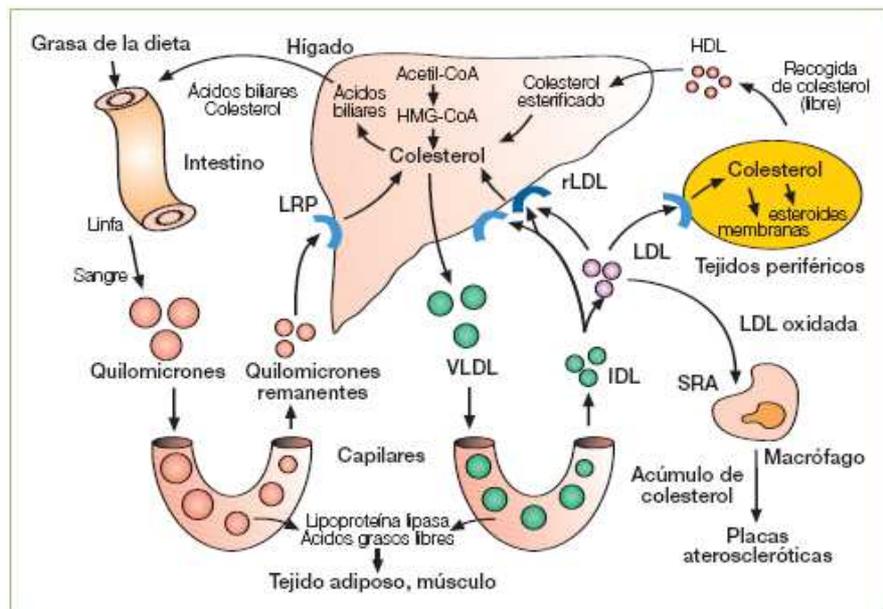


Figura 1.4. Metabolismo del colesterol circulante (Mathews CK et al, 2000).

Una dieta normal occidental proporciona unos 300 mg/día de colesterol. En el intestino confluye además el colesterol de origen biliar, que representa unos 1000 mg/día. Se estima que la absorción intestinal de colesterol es del 20% al 80% (Bosner SM et al, 1999). Una vez en el enterocito, dicho colesterol es esterificado por la acil-CoA colesterol aciltransferasa (ACAT) y es incorporado, junto con TG procedentes también de la dieta, a los quilomicrones, unas lipoproteínas de origen intestinal cuyo principal componente son los TG (Turley SD et al, 1993, Ros E, 2000).

Los quilomicrones pasan a los canales linfáticos del intestino y después a la circulación sanguínea. Dichas lipoproteínas van descargando durante la circulación sanguínea sus TG principalmente en el tejido adiposo (donde se almacenan como reserva) y en el músculo (aportándoles energía), debido a la presencia en el endotelio de los capilares que irrigan estos tejidos de la enzima lipoproteína lipasa (LPL) que hidroliza los TG, permitiendo la entrada de los ácidos grasos (AG) resultantes en el interior de dichos tejidos (el glicerol resultante es utilizado sobre todo por el hígado) (Turley SD et al, 1993, Ros E, 2000). La acción de la LPL sobre los quilomicrones produce un descenso del orden del 80% a 90% en su contenido en TG; como consecuencia, la superficie de la lipoproteína se distorsiona y se acompaña por la transferencia de la mayor parte de las apoproteínas A (ApoA) y C (ApoC) a las HDL (Turley SD et al, 1993, Ros E, 2000). De esta manera, los quilomicrones se transforman en otros remanentes, que tienen menor tamaño, mayor densidad y están proporcionalmente más enriquecidos en colesterol y en apoproteína E (ApoE). Esta configuración les permite ser reconocidos por receptores hepáticos específicos de las ApoE, denominados proteína relacionada con el receptor de las LDL (LRP) (Krieger M et al, 1994) y ser internalizados. Una vez en los hepatocitos, y por la acción de las enzimas hidrolíticas lisosómicas, se libera el colesterol que transportan. Parte del colesterol que la célula no utiliza es excretado por la vía hepatobiliar, bien sea como ácidos biliares o como colesterol *per se*, que puede a su vez ser reabsorbido por el intestino, reiniciándose el ciclo (Dietschy JM et al, 1993).

1.2.2 Transporte en sangre del colesterol de origen endógeno

Las células del hígado producen y secretan a la sangre VLDL. Éstas, además de gran cantidad de TG de síntesis endógena, transportan también colesterol tanto de síntesis propia como procedente de la dieta. Es necesario destacar que las células del hígado tienden a disminuir su propia fabricación de colesterol si la cantidad de colesterol alimentario que les llega es elevada, al inhibir la enzima clave en su fabricación, la HMG-CoA reductasa (McNamara DJ et al, 1987, Jones PJH et al, 1996).

Como se observa en la figura 1.4, las VLDL se metabolizan en dos etapas que implican la formación de las lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), que pueden considerarse “remanentes” de ellas, y que a continuación se convierten en LDL (Packard CJ et al, 1997). La transformación de las VLDL en IDL implica una serie de cambios semejantes a los que sufrían los quilomicrones. La LPL hidroliza los TG de las VLDL, haciendo disponibles los AG y el glicerol por los tejidos subyacentes, y las transforman en IDL, de menor tamaño, mayor densidad y más enriquecidas proporcionalmente en ésteres de colesterol y ApoE (Packard CJ et al, 1997).

Las IDL pueden seguir diferentes caminos. Una proporción de ellas, es captada del plasma, probablemente por los receptores de las LDL o también por los receptores LRP, presentes ambos en el hígado, y es internalizada. Otra, es transformada en LDL mediante un proceso dependiente de la actividad de la enzima lipasa hepática (LH), que requiere la hidrólisis del exceso de TG y fosfolípidos, y de la transferencia del exceso de apoproteínas a las HDL (Dietschy JM et al, 1993, Corella D et al, 2005).

Las LDL son de menor tamaño y mayor densidad que las VLDL, contienen una única apoproteína, la ApoB-100, y la fracción lipídica más abundante es el colesterol esterificado. Dado que las LDL transportan dos terceras partes del colesterol circulante en el plasma, estas partículas son las principales proveedoras de colesterol al hígado y a los demás tejidos del organismo. La vida media de las LDL es del orden de tres días. Son captadas por diversos tipos celulares por mediación del receptor de LDL (rLDL), que reconoce selectivamente las ApoB-100, en un proceso de endocitosis mediado por receptor, similar al del receptor LRP (Dietschy JM et al, 1993, Packard CJ et al, 1997).

El receptor de las LDL, descrito por Goldstein y Brown (Brown MS et al 1986), es una glicoproteína transmembrana, con cinco dominios funcionales diferentes. La translocación de las LDL a través de la membrana celular está facilitada por la existencia de unas vesículas endocíticas que dirigen su migración hacia los liposomas perinucleares donde serán metabolizadas. Una característica importante de estos receptores es que unas concentraciones elevadas de colesterol intracelular pueden regular tanto la síntesis endógena de colesterol como disminuir la expresión y actividad de este receptor (McNamara DJ et al, 1987, Jones PJH et al, 1996).

Los tejidos con mayor densidad de estos receptores son el hígado, la corteza adrenal y los ovarios, y utilizan el colesterol para la síntesis de lipoproteínas, ácidos biliares, vitamina D y hormonas esteroideas. La existencia de estos receptores en el hígado, único tejido capaz de eliminar colesterol por vía biliar, sugiere una función reguladora de las concentraciones plasmáticas de LDL mediante un incremento o una disminución en la expresión de estos receptores, y por tanto un aumento o una reducción en la metabolización hepática del colesterol circulante (Dietschy JM et al, 1993, Corella D et al, 2005).

Los macrófagos, además del rLDL, disponen de otro receptor conocido con el nombre de receptor *scavenger* (Kodama T et al, 1990), cuyo ligando natural no se ha identificado aún, que capta las partículas LDL modificadas por acetilación u oxidación (Freeman M et al, 1991); este último proceso, el de oxidación, es el que parece tener más importancia *in vivo*. A diferencia del rLDL, el receptor *scavenger*

no se regula por colesterol intracelular. Por este motivo, dicho receptor puede mediar la acumulación masiva de colesterol en los macrófagos cuando las concentraciones en sangre son elevadas y transformarlos en células espumosas. Dichas células espumosas desempeñan un papel crítico en el desarrollo de las placas ateroscleróticas y, por tanto, tienen una potencial trascendencia fisiopatológica (Steinberg D, 1997). Debe destacarse que un incremento en las concentraciones plasmáticas de c-LDL, al traducirse en una represión de la actividad y expresión del rLDL, y por tanto en una disminución de su metabolismo hepático, aumenta la vida media de las LDL en plasma, por lo que queda favorecida su oxidación y aterogénesis.

Además del receptor *scavenger* se han descrito otros receptores presentes en las membranas de los macrófagos capaces de unir y captar las LDL oxidadas (LDLox). Entre ellos, cabe destacar el receptor CD36 (Endemann G et al, 1993) y el CD68 (Ramprasad MP et al, 1995) por su probable implicación en dicho proceso *in vivo*.

Las HDL son las lipoproteínas de menor tamaño y mayor densidad. Constituyen una clase heterogénea, ya que existen distintas subfracciones que difieren en su composición y metabolismo (Von Eckardstein A et al, 2001, Rader DJ, 2002). Tienen un origen intestinal o hepático, en forma de lipoproteínas nacientes. Las HDL nacientes son partículas pequeñas en forma discoidal, ricas en fosfolípidos y contienen ApoA.

Las HDL participan en el transporte inverso del colesterol (Figura 1.5) (Sampietro T et al 2006). El papel de las HDL en el denominado transporte inverso del colesterol está claramente aceptado. Dicho término se refiere al transporte de colesterol desde los tejidos extrahepáticos hasta el hígado que es el único tejido capaz de eliminar, por vía biliar, un exceso de colesterol o metabolizarlo formando ácidos biliares (Sampietro T et al 2006).

Durante la circulación en el torrente sanguíneo, las HDL nacientes captan apoproteínas procedentes de otras lipoproteínas, y colesterol libre de otras lipoproteínas o de membranas celulares a través de un mecanismo mediado por el transportador ATP-Binding Cassete 1 (ABCA1). El enzima lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT), presente en el plasma sanguíneo, esterifica el colesterol captado por las moléculas de HDL y la partícula HDL₃ más pequeña se convierte en HDL₂ más grande. El colesterol esterificado de las HDL puede ser captado selectivamente por el hígado mediante la acción del receptor antioxidante de clase BI (SRBI). Los ésteres de colesterol pueden también ser transferidos a lipoproteínas que contengan ApoB (quilomicrones, VLDL, IDL, LDL), intercambiándolo principalmente por TG, a través de la acción de proteínas que

transfieren ésteres de colesterol (CETP). Además, la proteína de transferencia de fosfolípidos (PLTP) media la transferencia de fosfolípidos desde lipoproteínas que contengan ApoB a HDL. La LH y la lipasa endotelial (ENDOL) hidrolizan los TG de las HDL y generan partículas HDL más pequeñas (HDL₃) completando así el ciclo de HDL en el plasma (Assmann G et al, 2004, Corella D et al, 2005, Sampietro T et al, 2006).

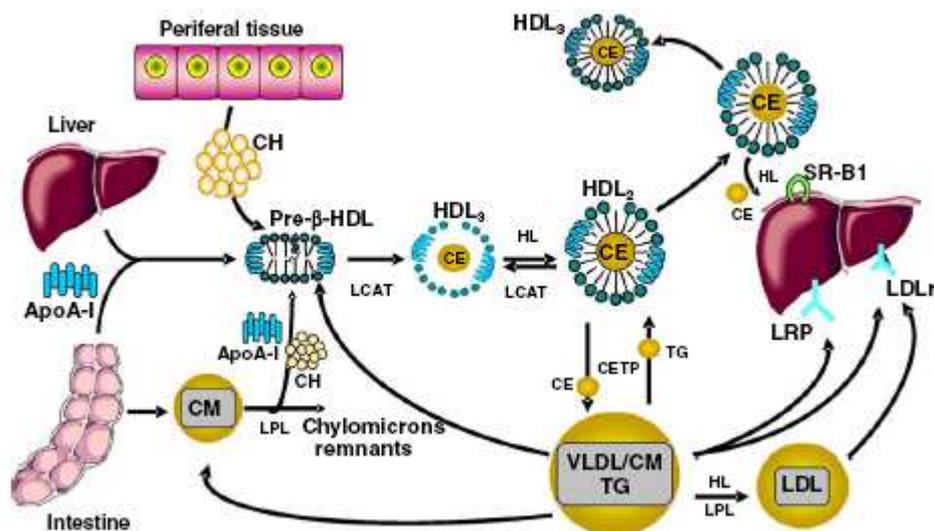


Figura 1.5. Transporte reverso de colesterol (Sampietro T et al, 2006)

1.3 Lesión aterosclerótica

La base patogénica común a la mayoría de las ECV es la arteriosclerosis. La arteriosclerosis es un término genérico que se refiere al engrosamiento y endurecimiento, con pérdida de elasticidad, de las arterias de diferentes lechos vasculares. Tiende a asentarse en las arterias que irrigan el corazón (coronarias), el cerebro (carótidas, vertebrales y cerebrales) y las extremidades inferiores (ilíacas y femorales). Su lesión básica es la placa de ateroma compuesta fundamentalmente de lípidos, tejido fibroso y células inflamatorias y pasa por diferentes estadios (Stary HC et al, 1995). La aterosclerosis generalmente se complica mediante la fisura, la erosión o rotura de la placa y la formación de un trombo en su superficie, lo que facilita su crecimiento y la aparición de isquemia o necrosis. Este hecho causa parte de las manifestaciones clínicas. De ahí que se utilice el término de

enfermedad aterotrombótica en un intento de incluir ambos procesos en una misma entidad (Lahoz C et al, 2007).

1.3.1 Pared arterial

Los vasos arteriales, con la excepción de los capilares, están compuestos por tres capas bien definidas: íntima, media y adventicia (Figura 1.6). Dichas capas están demarcadas por otras concéntricas de elastina conocidas como lámina elástica interna (que separa la íntima de la media) y lámina elástica externa (que separa la media de la adventicia) (Keaney JF, 2000).

La capa íntima constituye la superficie luminal de la arteria y está formada por una monocapa de células endoteliales, denominada endotelio, establecida sobre una matriz extracelular y bordeada por la lámina elástica interna. La capa media es la capa intermedia de la pared vascular y está compuesta por células musculares lisas (CML) organizadas en una o varias capas, dependiendo del tamaño de la arteria. Dichas células están embebidas en una matriz extracelular formada principalmente por fibras elásticas y colágeno. La adventicia es la capa más externa de la pared vascular. Su grosor depende del tipo y localización del vaso. Esta capa está formada por una matriz de elastina, CML, fibroblastos y colágeno, y está relacionada con la estabilidad y conexión de los vasos sanguíneos a los tejidos.

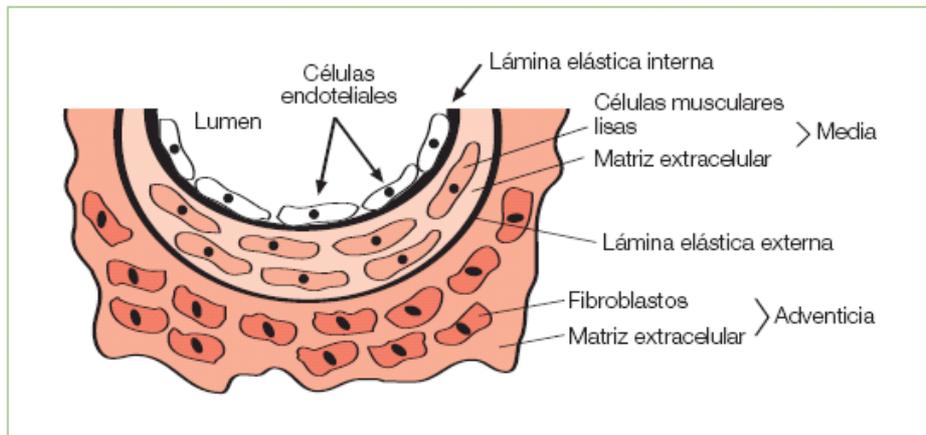


Figura 1.6. Sección transversal de una arteria normal

El endotelio, situado en la capa íntima, constituye un órgano dinámico que juega un papel clave en la homeostasis vascular al regular el tono vasomotor, la proliferación y crecimiento de las células de la pared celular, la adhesión de los leucocitos a las células endoteliales, los procesos de homeostasis y el balance fibrinolítico, el transporte de macromoléculas y otras sustancias entre los compartimentos extra e intravascular y la producción de una serie de moléculas biológicamente activas como respuesta a un serie de estímulos fisiológicos (Simón A et al, 2001, Cachofeiro V et al, 2006).

El mantenimiento del tono vascular va acompañado de la secreción de numerosas sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras. La vasodilatadora más importante es el óxido nítrico (NO), originalmente identificada como *factor de relajación derivado del endotelio* (Furchgott RF, 1980, Moncada S et al, 1991). El NO se forma a partir de L-arginina mediante la acción de la enzima NO sintetasa endotelial (eNOS). Además, intervienen diversos cofactores como la NADPH (fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido reducido) oxidasa (Behrendt D et al, 2002). El NO además de poseer una potente acción vasodilatadora, inhibe la agregación plaquetaria, la activación de moléculas de adhesión, frena el crecimiento de las CML y previene de la oxidación de c-LDL (Simón A et al, 2001, Rubbo H et al, 2002), considerado el mecanismo fundamental del inicio y progresión de las lesiones ateroscleróticas (Perugini C et al, 2000, Steinberg D et al, 2002). Otros agentes vasodilatadores son prostaciclina (PGI₂) y bradicinina (Drexler H, 1998). El endotelio también produce moléculas con actividad vasoconstrictora como endotelina-1 y angiotensina II que participa en el sistema renina-angiotensina-aldosterona responsable de la actividad vasomotora arterial (Yanagisawa M et al, 1988, Drexler H, 1998).

1.3.2 Procesos implicados en el desarrollo de la lesión aterosclerótica

La fisiopatología de la aterosclerosis se ha asociado tradicionalmente con el acúmulo de material lipídico, principalmente colesterol y ésteres de colesterol, en la pared arterial, constituyendo las denominadas placas ateroscleróticas. El mecanismo por el cual se forman dichas placas ha sido objeto de numerosos estudios y no está totalmente esclarecido.

En las últimas décadas, un número creciente de observaciones ha testificado el papel capital que desempeña la inflamación en la patogenia de la aterosclerosis y de sus complicaciones, hasta el punto de que, actualmente, la aterosclerosis debe considerarse una enfermedad inflamatoria a todos los efectos (Ross R, 1993, Ross R, 1999, Libby P et al, 2002(a), Libby P, 2002(b)). Los desencadenantes de la

inflamación en la aterogénesis incluyen FR como la hipercolesterolemia (Rajavashisth TB et al, 1990, Stemme S et al, 1995, Steinberg D, 1997) la HTA (Vanhoutte PM et al, 1995, Kranzhofer R et al, 1999, Tummala PE et al, 1999), la DMT2 (Schmidt AM et al 1999, Sánchez PL et al, 2004), la obesidad (Yudkin JS et al, 1999), la hiperhomocisteinemia (Harker LA et al, 1976, Majors A, 1997), el tabaquismo (Winkelmann BR et al, 2001, Puranik R et al, 2003, Nordskog BK et al, 2003), estrés oxidativo (Lum H et al, 2001, Madamanchi NR et al, 2005), infecciones crónicas, mecanismos inflamatorios. Estos estímulos aterogénicos provocan un daño en la pared vascular y, de acuerdo con la teoría de “respuesta al daño” propuesta por Ross R, la aterosclerosis es el resultado de una respuesta de tipo inflamatorio-fibroproliferativa (Ross R, 1993, Ross R, 1999). La respuesta inflamatoria no sólo promueve el inicio de un proceso aterosclerótico, sino que también contribuye al posterior crecimiento del ateroma y a la precipitación de sucesos trombóticos agudos (Ross R, 1993, Ross R, 1999, Libby P et al, 2002(a), Libby P, 2002(b), Libby P, 2001).

Así pues, los FR cardiovascular son capaces de activar y/o lesionar las células endoteliales y alterar sus múltiples funciones. En estas condiciones, se pierde el papel homeostático que ejerce el endotelio sobre la función vascular como consecuencia de un desequilibrio entre los factores derivados del endotelio, produciéndose lo que se denomina disfunción endotelial (Haller H, 1997). La disfunción endotelial deriva en reducción de la acción vasodilatadora como consecuencia de defecto en la producción o actividad de NO, aumento de la permeabilidad endotelial, agregación de plaquetas, adhesión de leucocitos a la pared vascular, liberación de factores de crecimiento con tendencia a la proliferación de CML, generación de citoquinas y perturbación del equilibrio trombótico-trombolítico (Egashira K et al, 1993, Ross R, 1999). La disfunción endotelial favorece el desarrollo del proceso inflamatorio al aumentar la expresión de moléculas de adhesión y citocinas, que inducen el reclutamiento de monocitos y linfocitos en el espacio subendotelial (Lau DCW et al, 2005). Así pues, la disfunción endotelial precede la aparición de la placa ateromatosa y desempeña un papel importante, no solo en la génesis de la placa de ateroma, sino también en la progresión rápida del proceso aterosclerótico.

Uno de los episodios más tempranos en la aterogénesis es la acumulación de c-LDL en la pared arterial. De este modo, en zonas donde existe una disfunción endotelial se facilita la infiltración de c-LDL al espacio subendotelial donde interactúan con proteínas de matriz extracelular y sufren procesos de modificación oxidativa incrementando su aterogenicidad (Steinberg D et al, 1997). Las LDLox alteran la producción de NO y, con ello, perturban todas las funciones protectores del NO sobre la pared vascular (Kinlay S et al, 2001). Se inicia la respuesta inflamatoria, de modo que células inflamatorias, como linfocitos T y

monocitos, liberan citocinas, como interleucinas (IL) 6 y 1 β , el factor necrosis tumoral alfa (TNF- α), que junto con las LDLox producen la activación del endotelio. Las células endoteliales activadas aumentan la expresión de varios tipos de moléculas de adhesión leucocitarias tales como molécula de adhesión intercelular (ICAM), molécula de adhesión celular vascular (VCAM), selectina P y selectina E, lo que favorece la adhesión de monocitos y linfocitos T al endotelio (Li H et al, 1993, Dong ZN et al, 1998, Nakashima Y, et al, 1998, Collins RG et al, 2000). Posteriormente, los monocitos y los linfocitos T atraviesan el endotelio a través de los espacios intercelulares donde participan otras proteínas especializadas como molécula de adhesión plaquetar-1 (PECAM-1) y penetran en la íntima atraídos por las LDLox y otras sustancias quimiotácticas sintetizadas por el endotelio activado como la proteína 1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1) (Ross R, 1999).

Una vez que los monocitos se instalan en la íntima adquieren características de macrófagos tisulares. La activación de los monocitos a macrófagos es estimulada por las LDL modificadas y diferentes moléculas producidas por los linfocitos T, células endoteliales y las CML. Los linfocitos T producen interferón- γ (INF- γ) y TNF- α que activan los monocitos, así como factores estimuladores de la formación de colonias que estabilizan los macrófagos y estimulan su proliferación (Ross R, 1993). Las LDLox también promueven la diferenciación de monocitos a macrófagos y modulan la activación, en estas células, de factores como el factor nuclear kappa β (NF- $\kappa\beta$) (Brand K et al, 1996). Se ha detectado que la activación de este factor se da por estrés oxidativo y estímulos inflamatorios como citocinas, tanto en macrófagos como células endoteliales y CML de lesiones ateroscleróticas (Brand K et al, 1997). Este factor regula numerosos genes entre los que se encuentran citocinas (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8), factores estimuladores de la formación de colonias de granulocitos y macrófagos, MCP-1, el factor tisular y varias moléculas de adhesión (ICAM, VCAM) (Baeuerle PA et al, 1994, Thanos D et al, 1995, Bourcier T et al, 1997). Por tanto, la activación de NF- $\kappa\beta$ parece ser un punto clave en la activación de múltiples efectos ligados al proceso aterosclerótico.

Tras la diferenciación de los monocitos a macrófagos, éstos captan LDL modificadas a través de receptores *scavenger* y se convierten en células espumosas (Ross R, 1993). Estas células presentan antígenos a linfocitos potenciando la respuesta inmune. La acumulación de células espumosas en la íntima conduce a la formación de la denominada estría grasa.

A medida que progresa la lesión, las CML de la capa media son activadas por moléculas secretadas por el resto de células presentes en las lesiones ateroscleróticas (Ross R, 1993), con lo que sufren una transformación fenotípica de modo que CML de fenotipo contráctil no proliferativo, se transforman en células que

proliferan activamente, que migran a la íntima atraídas por agentes quimiotácticos y que producen proteínas de matriz extracelular (colágeno, elastina y proteoglicanos) provocando la síntesis de ésta. Esta transformación activa la expresión de genes que codifican receptores de membrana para factores de crecimiento y además, se estimula la producción de factores de crecimiento y citocinas, a través de los cuales las CML modulan su propia actividad y la de otras células que intervienen en la aterogénesis. Así, las CML están implicadas en la formación de matriz extracelular y de la capa fibrosa que recubrirá el núcleo lipídico y el tejido necrótico provocado por la lisis de las células espumosas que ya han saturado su capacidad de neutralizar el colesterol libre (Guyton JR et al, 1996). Las CML activadas son capaces también de expresar receptores *scavenger* a través de los cuales captan LDL modificadas (Inaba T et al, 1992) y dan origen a células espumosas (Vijayagopal P et al, 1996).

Así en las placas de ateroma maduras se puede identificar 2 regiones diferentes: la cápsula fibrosa, rica en fibras de colágeno y CML, y el núcleo, rico en células espumosas, macrófagos y restos celulares necróticos (Ross R, 1993, Ross R, 1999, Libby P et al, 2002(a), Libby P, 2002(b)). Los macrófagos se pueden agrupar en un núcleo central formando una placa de ateroma típica, donde pueden sufrir apoptosis dando lugar al “núcleo necrótico” de la lesión aterosclerótica, o pueden liberar metaloproteinasas (MMP), produciendo la degradación de la matriz extracelular y promoviendo la rotura de la placa (Galis Z et al, 1994, Sukhoca GK et al, 1999, Herman MP et al, 2001). Esto permite que la sangre entre en contacto con el factor tisular, potente proteína procoagulante que también es producida por los macrófagos, lo que induce la aparición de complicaciones trombóticas (Leatham EW et al, 1995, Libby P et al, 2001, Martínez-González J et al, 2001). Incluso en ausencia de fisuras en la placa, las citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, TNF- α) pueden potenciar las propiedades procoagulantes de las células endoteliales y los neutrófilos, y contribuir así a las complicaciones trombóticas de la placa de ateroma (Libby P et al, 2001, Martínez-González J et al, 2001, Sambola A et al, 2003). De este modo, existe un vínculo claro entre inflamación y trombosis, influyéndose de forma recíproca (Loscalzo J, 1992). Numerosas moléculas influyen en el proceso trombogénico como fibrinógeno (Kadish JL et al, 1979, Ishida T et al, 1982), la trombina (Jones A et al, 1990), la plasmina, (Liotta LA et al, 1981, Gross JL et al, 1982), PAI-1 (Emeis J et al, 1986) t-PA (Hait PH et al, 1989), la Lp(a) (Loscalzo J, et al 1990, Etingen OR et al, 1991). Mientras que los desencadenantes inflamatorios y los mecanismos de las fases iniciales de aterogénesis son relativamente bien conocidos, los desencadenantes inflamatorios y los mecanismos de las complicaciones trombóticas agudas de las placas de ateroma son probablemente diferentes y todavía se desconocen.

La ruptura o erosión de la placa es la complicación más común siendo la causa que subyace en más del 70% de los IAM mortales y/o de la muerte coronaria súbita (Naghavi N et al, 2003). Entre las características de las placas vulnerables destaca una cápsula fibrosa fina sobre un núcleo lipídico grande, la ausencia de endotelio, lo que favorece la adhesión de plaquetas y, especialmente, un proceso inflamatorio activo con una importante infiltración de macrófagos y linfocitos (Moreno PR et al, 2004). La ruptura de la placa suele darse en las zonas de unión a la pared, regiones definidas como hombro de la placa, donde existe mayor estrés hemodinámico. En esta zona la cápsula fibrosa es más delgada, tiene un menor contenido de colágeno y células musculares y mayor cantidad de células inflamatorias (Rabbani R et al, 1999).

En la figura 1.7 se esquematiza el proceso de aterosclerosis.

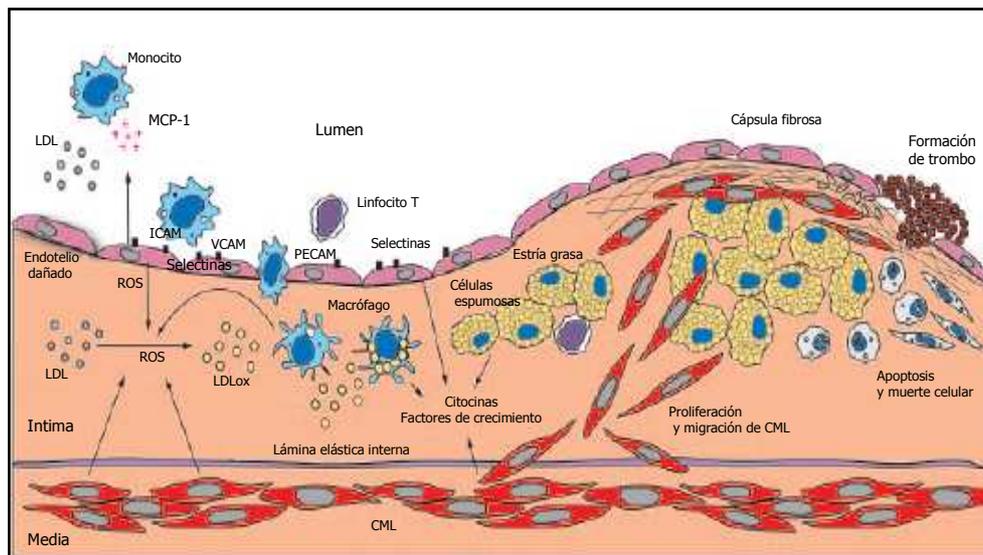


Figura 1.7. Proceso de aterosclerosis. LDL: lipoproteínas de baja densidad, ROS: especies reactivas de oxígeno, ICAM: molécula de adhesión intercelular, VCAM: molécula de adhesión celular vascular, PECAM: molécula de adhesión plaquetar-1 MCP-1: proteína 1 quimiotáctica de monocitos, CML: células del músculo liso. (adaptada de Madamanchi NR et al, 2005)

Por otro lado, si la respuesta inflamatoria queda confinada localmente se producirá una lesión menor, pero si el estímulo inflamatorio es importante generará una reacción sistémica generalizada denominada “respuesta de fase aguda” que,

posteriormente, disminuye y retorna a la normalidad. Cuando el estímulo inflamatorio es persistente o se repite continuamente se producirá una inflamación crónica, que puede llegar a destruir el tejido y/o producir la pérdida de funcionalidad del órgano afectado. Así pues, frente a un factor desencadenante se produce una reacción local con activación de macrófagos, monocitos y otras células productoras de citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-1 β , el TNF- α , iniciadoras del proceso de inflamación. Estas citocinas pueden actuar como mediadores desencadenando una reacción sistémica que incluirá una serie de alteraciones neurológicas, hematopoyéticas, metabólicas y hepáticas acompañadas de drásticas modificaciones en la síntesis de proteínas plasmáticas conocidas como proteínas o reactantes de fase aguda (Gabay C et al, 1999). Entre estas moléculas se incluyen la proteína C reactiva (PCR), el fibrinógeno, la proteína sérica A-amiloide, el ácido siálico, ceruloplasmina, albúmina.

La más estudiada es la PCR y se ha observado que produce numerosas alteraciones de la función endotelial asociadas al proceso inflamatorio, favoreciendo el desarrollo y las complicaciones de la lesión aterosclerótica. De este modo, se ha mostrado que la PCR induce la expresión de moléculas de adhesión como ICAM, VCAM y selectina E en el endotelio arterial (Pasceri V et al, 2000, Labarrere CA et al, 2004) así como la expresión MPC-1, que facilita el reclutamiento de monocitos (Torzewski M et al, 2000, Labarrere CA et al, 2004). Además, la PCR favorece la formación de un medio proinflamatorio en la subíntima, ya que estimula la liberación de diversas citoquinas, incluidas IL-6, IL1 β y TNF α , por los macrófagos y las células espumosas (Ballou SP et al, 1992, Labarrere CA et al, 2004). Es importante mencionar que la IL-6 es el principal estímulo para la producción de la PCR, por lo que de esta manera la PCR puede favorecer su propia producción. Todos estos efectos parecen estar mediados por la activación del factor NF-kB, por parte de la PCR, en las células endoteliales (Verma S et al, 2003). También, puede modular la función endotelial a través de la regulación de los valores de NO a distintos niveles (Verma S et al, 2002(a)). La proteína C reactiva no sólo reduce la expresión de la eNOS, sino que también reduce la estabilidad de la misma, disminuyendo su vida media de manera importante. Asimismo, la PCR favorece una menor actividad del NO al aumentar la producción de factores que antagonizan las funciones de éste, como la endotelina y la angiotensina II; en consecuencia, reduce todas las acciones beneficiosas que ejerce el NO sobre la función vascular (Verma S et al, 2002(b)). Finalmente, la PCR también favorece un estado de hipercoagulabilidad al estimular la producción del factor tisular tanto en macrófagos como en células endoteliales (Cermak J et al, 1993) y además, favorece la trombogenicidad del proceso al reducir la fibrinólisis, puesto que estimula la producción de PAI-1 en las células endoteliales (Devaraj S et al, 2003).

Es importante señalar que la evolución de la enfermedad no es uniforme entre los distintos individuos, probablemente debido a diferencias idiosincrásicas en la respuesta inflamatoria a los estímulos aterogénicos. Los individuos con una respuesta inflamatoria mayor a los estímulos aterogénicos tienen un riesgo más elevado de desarrollar manifestaciones clínicas de aterosclerosis. De hecho, los marcadores sistémicos de inflamación están asociados a un riesgo mayor, a largo plazo, de padecer IAM, ACV o EVP severa (Angiolillo et al, 2004).

1.4 Factores de riesgo de ECV

1.4.1 Edad y sexo

La aterosclerosis es una enfermedad asociada al envejecimiento. Con la edad se produce una acumulación de placas ateroscleróticas y además, aumenta la probabilidad de desarrollar un evento coronario adverso con independencia del sexo y la raza. De hecho, la mayoría de nuevos casos de CI y, casi el 85 % de las muertes ocasionadas por dicha enfermedad, se producen en hombres y mujeres mayores de 65 años (Glick M, 2002). Sin embargo, en las recomendaciones de *National Cholesterol Education Program* (NCEP) se considera como FR tener más de 45 años en varones y más de 55 años en mujeres (NCEP, 2002).

Además, los individuos de edad avanzada tienen un elevado riesgo de morir tras un evento de CI. El *British Regional Heart Study* permitió conocer que la tasa de mortalidad en hombres menores de 50 años, sin haber sufrido anteriormente un IAM o ACV, era del 50%, entre 65 y 69 años más del 50% y en mayores de 70 años del 80% (Wannamethee G, 1995).

Sin embargo, es excepcional la aparición de ECV por debajo de los 40 años aunque puede precipitarse de forma prematura si un individuo presenta además FR cardiovascular como hipercolesterolemia, DMT2, HTA u obesidad. Diversos FR aumentan también con la edad. Un reciente metanálisis, realizado en población española, mostró que la HTA, DMT2 y la hipercolesterolemia incrementan con la edad (Gabriel R et al, 2008), datos que coinciden con otros metanálisis en población española (Medrano JM et al, 2005). Con respecto a la HTA, datos del estudio Framingham, a los 38 años de seguimiento, mostraron que la PAS aumenta desde la década de los 35-44 años de edad hasta los 85-94 años. Este aumento es de aproximadamente 12 mmHg en hombres y de 26 mmHg en mujeres. Esta tendencia no se encontró en el caso de la PAD (Kannel WB et al, 1996). En el estudio de Gabriel R et al (2008), se mostró también, que la obesidad también aumenta con la

edad y se estabiliza a partir de los 65 años, y que el hábito tabáquico disminuye con la edad.

Por otro lado, según las estadísticas de 2007, el porcentaje de muertes por CI acontecidas en España es mayor en varones (37%) que en mujeres (24%) (INE, 2007). Sin embargo, el porcentaje de muertes por ictus e insuficiencia cardiaca es mayor en mujeres que en hombres (mujeres 28% vs varones 25%; mujeres 19% vs varones 12%) (INE, 2007). Además, el riesgo de arterioesclerosis coronaria es mayor en hombres que en mujeres hasta los 60 años. Sin embargo, con el desarrollo de la menopausia, el riesgo en mujeres aumenta rápidamente hasta igualarse al de los hombres (Jousilahti J, 1999). Las mujeres menopáusicas o postmenopáusicas tienen de 2 a 3 veces más riesgo que las mujeres premenopáusicas a la misma edad. En el metanálisis de Gabriel R et al (2008) se mostró que en el grupo de edad de 20-44 años, los varones muestran mayor prevalencia que las mujeres en HTA, obesidad, hipercolesterolemia, DMT2 y hábito tabáquico. En el grupo de 45-64 años de edad, excepto en el tabaquismo y la DMT2 que fue más frecuente entre los varones, las mujeres presentaron más obesidad y cifras similares de hipercolesterolemia e HTA que los varones. A partir de los 65 años de edad, en cambio, la carga de FR, excepto para el tabaco, fue mayor en las mujeres que en los varones.

1.4.2 Fenotipos intermedios de ECV

Los fenotipos intermedios definen el valor de indicadores, marcadores o factores relacionados con ECV que se manifiestan antes que el propio evento cardiovascular. Aportan información para la prevención. Los marcadores intermedios de mayor importancia para los trastornos cardiovasculares son las concentraciones plasmáticas de CT, TG, c-HDL, c-LDL, glucosa, insulina, homocisteína, marcadores de inflamación, marcadores de estrés oxidativo, marcadores de coagulación y marcadores de disfunción endotelial. También constituyen fenotipos intermedios las medidas antropométricas de peso, talla, perímetro de la cintura, porcentaje de masa grasa, PAS y PAD. Para todos estos fenotipos intermedios, excepto para los marcadores de inflamación y de estrés oxidativo, se han fijado valores de punto de corte que permiten determinar si el paciente se encuentra en una situación de normalidad o fuera de ella.

1.4.2.1 Lípidos y lipoproteínas plasmáticas

La hipercolesterolemia es un factor de riesgo de ECV reversible ampliamente aceptado. Ya en 1953, Ancel Keys describió una asociación entre las concentraciones de colesterol y la mortalidad por CI en diversas poblaciones (Keys

A, 1953). Diversos estudios epidemiológicos posteriores confirmaron una relación entre las cifras de CT en suero y el riesgo cardiovascular (The Pooling Project Research Group, 1978, Stamler J et al, 1986, Keys A et al, 1984, Anderson KM, 1987) y mostraron que el c-LDL presentaba también una asociación directa con la ECV (Gofman JW et al, 1966, Kannel WB, et al 1979). Además, la concentración de c-LDL en los adultos jóvenes predice la aparición de ECV en una fase posterior de la vida (Klag MJ et al, 1993, Stamler J et al, 2000) lo cual respalda la idea de que se debe considerar la relación entre el c-LDL y la aparición de ECV como un proceso continuo que se inicia como una etapa temprana de la vida. Las directrices actuales identifican el c-LDL como el objetivo principal del tratamiento de la hipercolesterolemia (NCEP, 2002). Teniendo en cuenta los datos obtenidos en estudios observacionales y experimentales, se ha estimado que los efectos beneficiosos de la reducción del colesterol sérico en cuanto al riesgo de CI están relacionados con la edad. Una reducción del 10% en el colesterol sérico produce una disminución del riesgo de CI de un 50% a la edad de 40 años, del 40% a los 50 años, del 30% a los 60 años y del 20% a los 70 años (Law MR et al, 1994).

Por otro lado, diversos estudios epidemiológicos han demostrado que la concentración sérica de c-HDL constituye un potente e independiente predictor de menor riesgo de ECV (Gordon T et al, 1977, Castelli WP et al, 1986, Assmann G et al, 1996, Sharret et al, 2001). Algunos autores consideran que cifras bajas de c-HDL puede predecir mejor el riesgo de ECV que altas de c-LDL, CT o TG (Gordon T et al, 1977, Sacks FM, 2002). También, se ha observado, en el estudio Framingham, que aquellos participantes con concentración de c-HDL elevadas presentaban un 50% menos de riesgo de sufrir un evento cardiovascular en comparación con los de baja concentración de c-HDL (Castelli WP et al, 1986). Además, en el estudio *Prospective Cardiovascular Munster* (PROCAM), participantes con niveles de c-HDL ≥ 35 mg/dL mostraban 4 veces menos riesgo que aquellos con c-HDL ≤ 35 mg/dL, tras 6 años de seguimiento (Assmann G et al, 1996). También, en el estudio *Atherosclerosis Risk in Communities* (ARIC) se observó un fuerte y continua asociación entre el incremento progresivo de los niveles de c-HDL y la paralela reducción del riesgo de ECV tanto en hombres como en mujeres, sin ECV inicial, y tras 10 años de seguimiento (Sharret et al, 2001). Por otro lado, se calcula que un aumento de 1 mg/dL en la concentración de HDL se asocia a una disminución del riesgo coronario de un 2% en los varones y un 3% en las mujeres (Gordon DJ et al, 1989(a)). De este modo, el aumento de las concentraciones de c-HDL ha pasado a ser una posible estrategia terapéutica para reducir la tasa de incidencia de enfermedad coronaria (Chapman MJ, 2006, Sampietro T, 2006).

Existen múltiples mecanismos mediante los cuales el c-HDL puede proteger frente al desarrollo de la aterosclerosis: participación en el transporte inverso del colesterol (Zhang Y et al, 2003), efecto antioxidante, que inhibe la oxidación de las

LDL (Assmann G et al, 2004, Chapman MJ et al, 2004), por lo que podrían interferir con la internalización de LDLox y formación de células espumosas (Klimov AN et al, 1993, Navab M et al 2001), propiedades antiinflamatorias, al inhibir la adhesión de leucocitos a la pared arterial mediante la atenuación de la expresión de moléculas de adhesión inducida por citocinas como ICAM, VCAM y selectina E (Cockerill GW et al, 1995, Cockerill GW et al, 2001, Barter PJ et al, 2002(a)), efectos antiplaquetarios y anticoagulantes reduciendo el desarrollo de trombosis (Griffin JH et al, 1999, Griffin JH et al, 2001), reduce la disfunción endotelial (Yuhanna IS et al, 2001, Spieker LE et al, 2002, Nofer JR et al, 2004) y efectos antiinfecciosos (Ulevitch RJ et al 1979, Hajduk SL et al 1989) (Figura 1.8).

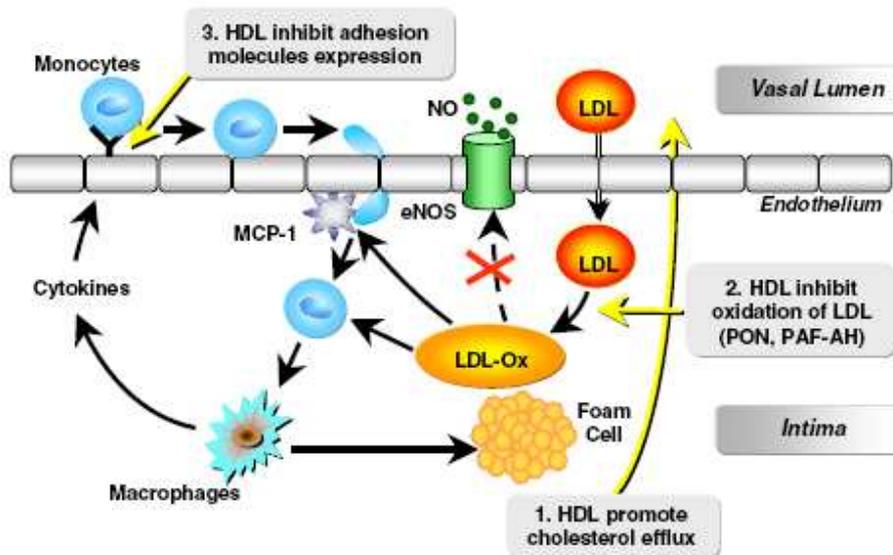


Figura 1.8. Efectos antiaterogénicos del c-HDL (Sampietro et al, 2006)

El papel de los TG como factor independiente de riesgo de CI ha sido siempre controvertido y, aunque se ha presentado alguna evidencia convincente, hay algunas dudas acerca del carácter independiente de la relación observada (Sarwar N et al, 2007). A pesar de ello, elevados niveles plasmáticos de TG se corresponden con elevaciones de remanentes de VLDL, IDL y quilomicrones que han mostrado ser aterogénicos (NCEP, 2002). Además, elevados niveles plasmáticos de TG también se han asociado con otros FR cardiovascular como sobrepeso u obesidad y DMT2. También se asocian con factores ambientales como inactividad física, tabaquismo, ingesta de alcohol o dietas ricas en carbohidratos (más del 60% del total de la energía). Las concentraciones de TG superiores a 150 mg/dL tienen significación clínica (NCEP, 2002).

En España, la prevalencia de la hipercolesterolemia también es elevada, y se estima que un 23% de la población adulta presenta un CT > 250 mg/dl (Medrano MJ et al, 2005, Gabriel R et al, 2008).

1.4.2.2 Obesidad

La obesidad es una enfermedad metabólica crónica, multifactorial y compleja que se caracteriza por un aumento del tejido adiposo acompañado de un peso superior al considerado normal para una persona con igual talla, sexo y edad (Comuzzie AG et al, 2001). El método de referencia para medir la obesidad es el Índice de Masa Corporal (IMC). Este índice establece una relación entre el peso y la altura de la persona. Según la OMS, el IMC de una persona con normopeso se encuentra entre 18,5 y 24,9 Kg /m², sobrepeso u obesidad grado I entre 25-29,9 Kg /m², y obesidad, cuando el IMC mayor a 30 Kg /m². Dentro de la obesidad existen varios grados (obesidad grado II IMC entre 30-34,9 Kg /m², obesidad grado III IMC entre 35-39,9 Kg /m², obesidad grado IV u obesidad mórbida IMC>40 Kg /m²) (OMS, 1998).

La cifra de personas obesas en España es el doble que la de hace 20 años y se sitúa en torno al 15%. Además, un 39% de los adultos tienen sobrepeso (Aranceta J et al, 2003), el 25% de los niños y los adolescentes están en sobrepeso o son obesos (Ministerio de Sanidad y Consumo, 2006). Además, un estudio reciente ha indicado que tener un IMC más alto durante la infancia se asocia a un aumento del riesgo de ECV en la edad adulta, lo cual respalda el concepto de que se debe considerar la progresión de la aterosclerosis como un proceso continuo que se inicia en una fase temprana de la vida (Baker JL et al, 2007). Esta asociación parece ser más intensa en los niños que en las niñas y aumenta con la edad en ambos sexos (Baker JL et al, 2007).

En los últimos años, se ha establecido que el vínculo existente entre la cantidad de grasa corporal y la ECV está más directamente relacionado con la distribución central de la grasa corporal (evaluada mediante el perímetro de cintura) que con la adiposidad total (Yusuf S et al, 2004, Pou KM et al, 2007). El estudio INTERHEART confirmó la importancia de la adiposidad abdominal como FR de IAM (Yusuf S et al, 2004).

Por otro lado, la obesidad tiene relaciones epidemiológicas estrechas con algunos FR cardiovascular como HTA (Masiera F et al, 2001), resistencia a la insulina, y como consecuencia, DMT2 (Hu FB et al, 2001, Zhao YF et al, 2006). En cambio, son pocos los datos que indican que en la obesidad se den modificaciones de la concentración plasmática de c-LDL. Sin embargo, si se ha asociado con otras alteraciones lipídicas como aumento de las concentraciones de

VLDL, CT, TG y la proporción de partículas LDL pequeñas y densas, así como concentraciones inferiores de c-HDL (Pi-Sunyer X, 2003). La obesidad también se asocia con inactividad física y consumo excesivo de comidas con alta densidad energética (Pi-Sunyer X, 2003, Martí A et al, 2004).

El tejido adiposo, además de ser responsable del almacenamiento efectivo de lípidos plasmáticos, actúa también como órgano endocrino activo implicado en el metabolismo lipídico y de la glucosa, así como en la secreción de numerosas hormonas y citoquinas (Tilg H et al, 2006, Hajer GR et al, 2008). Así pues, se ha mostrado que el aumento de la adiposidad, particularmente en depósitos viscerales (Pou KM et al, 2007), conduce al incremento del flujo de AG libres. Ello estimula un aumento de la producción, a nivel de adipocito, de factores proinflamatorios, reactivos de fase aguda y hormonas y un descenso de la concentración plasmática de la adiponectina dando lugar a un proceso inflamatorio de bajo grado y, como consecuencia, al desarrollo de aterosclerosis (Ross R, 1999, Despres JP et al, 2006). Puesto que las adipoquinas liberadas se relacionan con metabolismo de la glucosa (adiponectina y resistina), lipídico (CETP, LPL), inflamación (TNF- α , IL-6, PCR), coagulación y trombosis (PAI-1), presión arterial (angiotensinógeno, angiotensina II) e ingesta de alimentos (leptina), concentraciones plasmáticas de éstas en rangos diferentes a la normalidad originadas en estado de obesidad se relacionan con el desarrollo de DMT2, HTA, dislipemia, síndrome metabólico, aterosclerosis y ECV (Engeli S et al, 1999, Yamauchi T et al, 2001, Chu NF et al, 2001, Winkler G et al, 2003, Engeli S et al, 2005, Hajer GR et al, 2008). Además, niveles elevados crónicos de AG libres y de adipoquinas tales como leptina, TNF- α e IL-6 así como concentraciones bajas de adiponectina, se han asociado con baja secreción de insulina (Zhao YF et al, 2006) y resistencia a la insulina (Hotamisligil GS et al, 1995, Baskin DG et al, 1999, Zhao YF et al, 2006) que se relacionan con aumento de riesgo de desarrollar DMT2. La resistencia a la insulina contribuye también, a la dislipemia caracteriza por disminución de c-HDL y aumento de TG y c-LDL pequeñas y densas (Eckel RH et al, 1995), a la disfunción endotelial y la inflamación y a la respuesta inflamatoria (Wellen KE et al, 2005). Todos ellos factores también de aterosclerosis (Haslamm WC et al, 2005) (Figura 1.9).

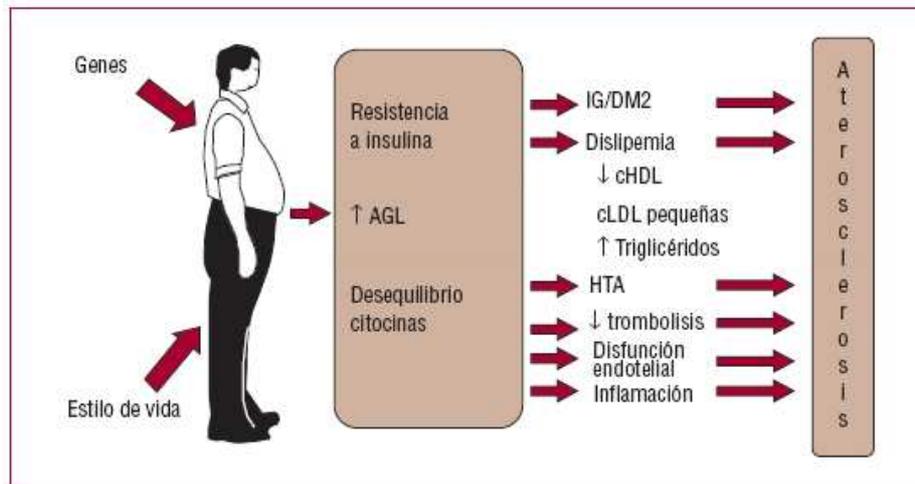


Figura 1.9. Esquema de la patogenia de aterosclerosis en la obesidad. Los tres mecanismos principales son el aumento de AG libres, resistencia a la insulina y desequilibrio de citocinas. AGL: AG libres, DM2: diabetes mellitus tipo 2, IG: intolerancia a la glucosa. (Alegría Ezquerria E et al, 2008).

Por otra parte, existen numerosos datos que indican que la reducción del consumo energético, el aumento de la actividad física y la reducción del peso pueden ser eficaces para reducir los niveles de adipocinas como PCR, TNF- α , IL-6, PAI-1 y aumento de los niveles de adiponectina y así mejorar el proceso inflamatorio de bajo grado inducido por la obesidad (Bays H et al, 2006, Jung SH et al, 2008). La prevención y el control del sobrepeso y la obesidad en los adultos y los niños ha pasado a ser un elemento clave para la prevención de las ECV (US Preventive Services Task Force, 2003, Lama More RA et al, 2006, Salas-Salvadó J et al, 2007).

1.4.2.3 Diabetes

La DMT2 es una enfermedad metabólica compleja de patogenia multifactorial y poligénica, en la que el factor dominante es una hiperglucemia crónica. Se ha mostrado que dos mecanismos subyacen en el desarrollo de la enfermedad. Por un lado, se produce un estado de resistencia a la insulina provocando una deficiente acción insulínica sobre la glucosa y por otro, una disfunción secretora de las células β pancreáticas que conduce a un defecto en la producción de insulina (Palma-Gámiz JL, 2007). Es probable que la resistencia a la insulina preceda al comienzo de la DMT2 en varios años. Implica a varios órganos, especialmente al tejido adiposo, al hígado y al músculo esquelético y suele acompañarse de otros FR cardiovascular como dislipemia cuyos principales componentes son aumento de

TG, descenso de c-HDL, y predominio LDL pequeñas y densas, obesidad, HTA y un estado protrombótico (Reaven GM et al, 1988, Grundy SM et al, 2005). Es un estado complejo en el que factores ambientales y genéticos están implicados (Grundy SM et al, 1999, Hu FB et al, 2001, Stumvoll M et al, 2005)

La DMT2 es una enfermedad con gran impacto en salud pública. En España se ha estimado una prevalencia, ajustada por edad, próxima al 10% y oscila entre el 6,1% y el 13,3% con un gradiente Norte-Sur (Bueno H et al, 2008). La prevalencia es mayor en varones (12%) que en mujeres (8%) (Goday A, 2002). Según la OMS, se prevé que aumente un 40% en España al llegar al 2025, en comparación con el año 2000 (OMS, 2000). La prevalencia de DMT2 aumenta de manera paralela al incremento de la edad poblacional y a la incidencia de obesidad e inactividad física (Grundy SM et al, 1999 Hu FB et al, 2001).

Por otro lado, la DMT2 se asocia a un aumento de dos a cuatro veces de riesgo de ECV (Fox C et al, 2004, Eckel RH et al, 2006), y este aumento es mayor en las mujeres que en varones (Goldschmid M et al, 1994, Sowers JR et al, 1998). De hecho, las ECV, sobretudo CI, ictus y EVP, son las complicaciones numérica y clínicamente más importantes de DMT2, siendo la principal causa de morbimortalidad en diabéticos (Lebovitz HE et al, 2006, Thomas JE et al, 2007).

Estudios epidemiológicos han demostrado que la resistencia a la insulina y las alteraciones metabólicas asociadas, como la dislipemia, la HTA, la obesidad y la hipercoagulabilidad, influyen en la prematuridad y severidad de la aterosclerosis que desarrollan los pacientes con DMT2 (Festa A et al, 1999, Sheu WH et al, 2000, Pyorala M et al, 2000, Haffner SM et al, 2000, Bansilal S et al, 2007). Se ha constatado que mecanismos inmunológicos e inflamatorios subyacen al proceso de la resistencia a la insulina y de la aterosclerosis (Gabay C et al 1999, Ross R 1999). Estudios epidemiológicos han demostrado que la PCR y otros marcadores de inflamación se asocian independientemente con la resistencia a la insulina y con marcadores de disfunción endotelial (Yudkin JS et al, 1999). Es importante reseñar el papel que desempeña el tejido adiposo y, por tanto, la obesidad, en el mantenimiento de un estado de inflamación crónico, al secretar una variedad de moléculas como IL-6, TNF- α , la leptina y la adiponectina, que son determinantes en la regulación del proceso aterogénico y la resistencia a la insulina (Zhao YF et al, 2006, Hajer GR et al, 2008). Además, la hiperglucemia disminuye la disponibilidad de NO provocando disfunción endotelial (Giugliano D et al, 1997), aumenta la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales (Marfella R et al, 2000). Esto se debe a que la hiperglucemia induce un incremento en la producción de radicales libres y favorece la glicación no enzimática de proteínas y lipoproteínas, con la subsiguiente producción de productos avanzados de la glicación (AGE). Los AGE promueven la expresión de moléculas de adhesión

(Vlassara H et al. 1995), la inactivación de NO (Bucala R et al, 1991), la migración de macrófagos (Kirstein M et al, 1990) y la oxidación de LDL glicadas en su interior (Fuster V et al, 1996), procesos relacionados con la formación de la placa de ateroma.

Por otro lado, varios estudios han demostrado que es posible frenar o incluso revertir hasta la normalidad, en aproximadamente un tercio de los casos, los estados prediabéticos, mediante cambios en el estilo de vida (Tuamiletho J et al, 2001, Diabetes Prevention Program Research Group, 2002), la corrección mediante fármacos (Chiason JL et al, 1998, UK Prospective Diabetes Study Group, 1998, Buchanan Ta et al, 2001), o la modificación de otros factores asociados como HTA, dislipemia u obesidad (Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators, 2000).

1.4.2.4 Hipertensión

La HTA se define como una PAS o PAD superiores a 140 o 90 mmHg respectivamente (*Joint National Committee on Detection*, 1993). Supone uno de los FR más importantes de la ECV, y concretamente se ha observado que se asocia con la enfermedad cerebrovascular, la CI, la insuficiencia cardíaca, la insuficiencia renal y la EVP. En los individuos de 40 a 70 años, cada 20 mmHg de incremento de la PAS o 10 mmHg de incremento de la PAD se duplica el riesgo de ECV en todo el intervalo de presión arterial que va de 115/75 a 185/115 mmHg (Lewington S et al, 2002). Es un FR fuertemente asociado a la edad (*Joint National Committee on Detection*, 1993)

La HTA es el FR más frecuente en España, con una prevalencia superior al 40% en individuos mayores de 35 años (Banegas JR, 2005). Parte del problema se debe al desconocimiento de la enfermedad por parte del hipertenso y escaso control sanitario. En este sentido, un estudio poblacional mostró que dos tercios de los pacientes mayores de 60 años son hipertensos, que el 65% no conoce su estado, que el 45% de los hipertensos diagnosticados no recibe tratamiento y que el 16% de los pacientes que reciben tratamiento tienen un buen control terapéutico (Benegas JR et al, 2002). Estudios más recientes han mostrado una mejora en los últimos 10 años aunque la proporción de HTA controlada continúa estando lejos de lo que sería ideal (Llisterri JL, 2004, González-Juanatey JR et al, 2006, Bertomeu V et al, 2007, Grau M et al, 2007).

Varios estudios epidemiológicos, entre ellos el estudio Framingham, demostraron que la PAS y la PAD tienen una asociación continua, independiente,

gradual y positiva con los parámetros de evaluación de ECV (Stamler J et al, 1993, Kannel WB, 1996, O'Donnell CJ et al, 1997, Van den Hoogen PCW et al, 2000). A la vista de estos estudios, en el VII Informe del *Joint National Committee* se define un nuevo estadio de prehipertensión en aquellos individuos con cifras de PAS entre 120 y 139 mmHG y/o de PAD entre 80 y 89 mmHg, puesto que estos individuos presentan un aumento del riesgo de progresión de HTA y muestran un aumento de riesgo de ECV. Sin embargo, en 2007, the *European Society of Hypertension* and the *European Society of Cardiology* (ESH-ESC) categorizó este estadio en "presión arterial normal" (PAS entre 120 y 129 mmHg y PAD entre 80 y 84 mmHg) y "presión arterial normal-alta" (PAS entre 130 y 139 mmHg y PAD entre 85 y 89 mmHg) (Mancia G et al, 2007).

El papel de la HTA en la aterosclerosis no está totalmente claro. Además de los efectos que ejerce el estrés mecánico sobre el endotelio provocados por la alta tensión arterial (Goldby FS et al, 1972), evidencia creciente, ha puesto de manifiesto que la HTA induce y acelera la aterosclerosis vía inflamación. De hecho, se ha observado que individuos hipertensos presentan concentraciones elevadas de LDL oxidada, PCR, TNF- α , IL6, ICAM, VCAM y otros marcadores de inflamación (Ruiz-Ortega M et al, 2001, Bautista LE et al, 2003, Assadpoor-Piranfar M et al, 2009). Ello se debe a que diversos componentes del sistema de regulación de la presión arterial, renina-angiotensina-aldosterona están implicados en el desarrollo de un estado proinflamatorio (Suzuki Y et al, 2003). En el estado de HTA se produce una secreción excesiva de estos componentes. Entre ellos, el agente vasoactivo angiotensina II es el principal, y regula el proceso inflamatorio (Ruiz-Ortega M et al, 2001, Ferrario CM, et al 2006). Este agente provoca disfunción endotelial al favorecer el estrés oxidativo ya que aumenta la actividad de NADPH oxidasa (Griendling KK et al, 1994) y reduce la actividad de eNOS, reduciendo la biodisponibilidad de NO (Harrison DG et al, 1997). Además, la NADPH oxidasa también provoca la oxidación de LDL estimulando el proceso de inflamación (Ross R et al, 1993). También, la angiotensina II activa las células (como células endoteliales, CML) que regulan la expresión de moléculas como citocinas (IL-6, TNF- α), moléculas de adhesión (selectina P, VCAM, ICAM), quimiocinas (MCP-1), factores de crecimiento y otras como COX-2, que están implicadas tanto en el crecimiento y apoptosis celular, fibrosis e inflamación (Sadoshima J et al, 2000, Ruiz-Ortega RI, 2001, Weiss et al, 2001, Graninger M et al, 2004). Los efectos de la angiotensina II pueden estar mediados en parte por las acciones sobre el endotelio de la PCR ya que la PCR incrementa la expresión del receptor AT1 para la angiotensina II en las CML (Wang CH et al, 2003). Además, la angiotensina II estimula la inflamación de forma indirecta ya que provoca la activación del factor NF- κ B (Ruiz-Ortega RI, 2001).

Otros componentes vasoactivos como la aldosterona, receptor mineralcorticoide y endotelina 1 inducen estrés oxidativo y participan en la inflamación vascular (Androulakis ES et al, 2009).

Por otra parte, se disponen de métodos terapéuticos para corregir la HTA. Ensayos clínicos han puesto de manifiesto que el tratamiento antihipertensivo se ha asociado a una reducción de un 35-40% de la incidencia de ictus, una reducción de un 20-25% de incidencia de IAM y una reducción del más del 50% en la insuficiencia cardíaca (Neal B et al, 2000).

1.4.2.5 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se origina por un desequilibrio causado por la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) y/o un defecto en los sistemas de defensa antioxidantes de las células. El desequilibrio prolongado provoca daños funcionales y estructurales en las células, desencadenados por una sucesión de reacciones, causada por la acción oxidativa de las ROS sobre lípidos, proteínas y ADN pudiendo llegar a la destrucción oxidativa o muerte celular (Tuteja N et al, 2001(a), Tuteja N et al, 2009) cuyos efectos, se ha mostrado, tiene un papel relevante en la patogénesis y desarrollo de ECV (Madamanchi MR et al, 2005, Misra MK et al, 2009). Este desequilibrio por exceso en la producción de ROS puede darse en circunstancias patofisiológicas como las que originan los diferentes FR de ECV como hipercolesterolemia, DMT2, HTA, tabaquismo, edad o exposición a contaminantes (Gopaul NK et al, 1995, Morow GD et al, 1995, Griendling KK et al, 2000, Heitzer T et al, 2001, Madamanchi MR et al, 2007).

Las ROS son producidas por varias enzimas oxidasas como NADPH oxidasa, xantina oxidasa, óxido nítrico sintasa, ciclooxigenasa (COX), glucosa oxidasa, lipooxigenasa y el transporte de electrones mitocondrial. La NADPH oxidasa es la principal responsable de la generación de ROS en las paredes vasculares (Dzau VJ et al, 2001). Entre las ROS se incluyen el anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo (OH), ácido hipocloroso (HOCl), NO, peroxinitrito ($ONOO^-$). O_2^- , OH y NO son clasificados como radicales libres ya que contienen electrones desapareados y, por tanto, potente capacidad de oxidación. H_2O_2 , HOCl y $ONOO^-$ son clasificados como especies de oxígeno no radicales y también tienen capacidad de oxidación (Higashi Y et al, 2009). En la oxidación de lípidos y ADN se generan productos como malondialdehído (MDA) y 8-oxo-2' deoxiguanosina (8-oxo-dG) respectivamente, que pueden ser cuantificados sirviendo como indicadores de estrés oxidativo (Sáez GT et al, 2004, Dalle-Donne I et al, 2006, Espinosa O et al, 2007). Por otro lado,

las células están equipadas con excelentes mecanismos de defensa antioxidantes para neutralizar los efectos tóxicos de ROS. Uno de ellos es el sistema glutatión peroxidasa/glutatión reductasa. La glutatión reductasa es un flavoenzima dependiente de NADPH que cataliza la reducción de glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH), el cual será utilizado por la glutatión peroxidasa para la reducción de H_2O_2 y de lipoperóxidos, los cuales son elementos tóxicos. Otros sistemas pueden ser no enzimáticos como glutatión, vitamina A, C, E y tiorredoxina, o enzimáticos como superóxido dismutasa (SOD), catalasa. SOD cataliza la dismutación de O_2^- y se produce H_2O_2 que es convertido en agua por la catalasa y la glutatión peroxidasa (Tuteja N et al, 2001(b), Misra MK et al, 2009). Los componentes de estos sistemas antioxidantes también pueden utilizarse como biomarcadores de estrés oxidativo y daño tisular (Polidori MC et al, 2003).

En respuesta a diversos estímulos como angiotensina II, trombina, IL-1, TNF- α , IFN- γ , las células vasculares incrementan la producción de ROS a través de la activación de las enzimas oxidativas (Stocker R et al, 2004). Tanto las células endoteliales como CML, células de la capa adventicia, células mononucleares y macrófagos incrementan la producción de ROS según los estímulos presentes y en diferentes momentos y condiciones (Gozin A et al, 1998, Antoniades C et al, 2007).

Son múltiples los efectos que causa el exceso de ROS relacionados con el desarrollo de aterosclerosis. Entre ellos, se ha mostrado que las ROS inducen la modificación oxidativa de c-LDL, principal mecanismo de progresión de aterosclerosis, que conduce a su captación por macrófagos y formación de células espumosas (Ross R, 1993, Channon KM, 2002). Además, se ha observado que la producción de radicales libres origina disfunción endotelial ya que la peroxidación lipídica causada por ROS provoca daño en las membranas celulares y en las de sus orgánulos y aumenta la permeabilidad (Lum H et al, 2001). Además, el estrés oxidativo altera la producción y actividad endotelial de NO lo que conduce a vasoconstricción, agregación plaquetaria y adhesión de neutrófilos al endotelio, siendo así un importante factor para el desarrollo de HTA (Lum H et al, 2001, Vepa S et al, 1999). También, las ROS inducen la activación del factor de transcripción NF- κ B y la proteína activadora 1, que participan en la expresión de moléculas de adhesión, ICAM, VCAM, selectina E y otras citocinas. Además, las ROS están implicadas en la proliferación y migración de CML, la activación de metaloproteinasas y la apoptosis de células endoteliales y CML a través de LDLox, modulando así la estabilidad de las placas de ateroma (Rajalopagan S et al, 1996, Lum H et al, 2001, Azumi H et al, 2002, Madamanchi MR et al, 2005). Todo ello, demuestra un estrecho vínculo entre estrés oxidativo e inflamación en el desarrollo de aterosclerosis.

1.4.2.6 Marcadores de inflamación

La inflamación es una reacción adaptativa beneficiosa en la mayoría de casos puesto que supone un intento de mantener la homeostasis por parte de un organismo afectado. Sin embargo, el mantenimiento de esta respuesta y la producción excesiva de mediadores de inflamación puede tener efectos negativos y conducir a alteraciones metabólicas que favorezcan la aparición de enfermedades crónico-degenerativas (Gabay C et al, 1999, Ceciliani F et al, 2002). De hecho, como se ha mostrado en apartados anteriores, un estado inflamatorio sistémico de bajo grado se ha relacionado con diversos FR cardiovascular como la obesidad, la resistencia a la insulina, la DMT2, la dislipemia, la HTA y la arterioesclerosis. Además, varios estudios han mostrado que marcadores circulantes de inflamación predicen futuras ECV como IAM, ictus o EVP (Lind L, 2003, Tzoulaki I et al, 2005). Dentro del conjunto de estos marcadores se incluyen reactantes de fase aguda como PCR, citocinas como IL-6 y moléculas de adhesión celular como VCAM e ICAM.

Proteínas de fase aguda. Se han definido como aquellas sustancias cuya concentración aumenta (proteínas de fase aguda positivas) o disminuye (proteínas de fase aguda negativas) tras un estímulo proinflamatorio a nivel hepático (Ceciliani F et al, 2002). Entre ellas, la PCR constituye el marcador de inflamación que atrae más la atención de los investigadores alrededor del mundo. Es una proteína de fase aguda que se sintetiza en los hepatocitos tras ser estimulados por citocinas como IL-6 (Gauldie J et al, 1989, Castell JV et al, 1990).

Varios estudios han confirmado la asociación entre niveles elevados de PCR y riesgo cardíaco; así, el estudio ECAT, en pacientes con CI preexistente, se observó que la incidencia de eventos coronarios, en los dos años de seguimiento, era mayor en aquellos pacientes que presentaban niveles plasmáticos más elevados de PCR (Thompson S et al, 1995). Esta incidencia aumentaba aún más cuando los niveles elevados de PCR se asociaban a una elevada concentración plasmática de CT.

Es importante señalar que el valor pronóstico de la PCR se ha observado también en sujetos sanos. Uno de los primeros estudios en demostrar esta asociación fue el ensayo MRFIT, en el que se observó una asociación significativa entre los niveles de PCR y la mortalidad por CI (Kuller LH et al, 1996). De manera similar, el *Physicians' Health Study* observó que los niveles plasmáticos basales de PCR eran inferiores en aquellos individuos que no desarrollaron CI o ACV (Ridker PM et al, 1997). Una situación similar se ha observado en mujeres, como ha demostrado el *Women's Health Study* (Ridker PM et al, 2000(a)). En este estudio se observó que los 4 marcadores de inflamación evaluados (PCR, IL-6, ICAM-1 y amiloide sérico A) eran mayores en aquellas mujeres que sufrieron eventos

cardiovasculares durante el seguimiento, siendo la PCR el de mayor poder predictor de riesgo cardiovascular.

Se ha observado que FR como tabaco, edad, sexo, lípidos, presión arterial, influyen en los niveles de PCR (Kushner I et al, 2006). Probablemente el FR que más afecta es la obesidad y niveles elevados de PCR predicen desarrollo de DMT2 y de síndrome metabólico (Pradhan AD et al, 2001, Laaksonen DE et al, 2004). Además, los niveles elevados de PCR también se asocian con resistencia a la insulina (Haffner SM et al, 2006) y se ha observado que la pérdida de peso puede reducir la concentración de PCR (Esposito K et al, 2003).

El aumento de la concentración plasmática de PCR tras un daño tisular es fuerte y rápido. De hecho, puede aumentar 1000 veces con respecto a su nivel basal tras 24 horas. Por ello, constituye un buen marcador clínico en individuos con un estado general de salud bueno (van Leeuwen MA et al, 1994).

Citocinas. Son proteínas sintetizadas en respuesta a estímulos inflamatorios o antigénicos, actuando de forma autocrina, endocrina o paracrina, modulando algunas funciones de proliferación y diferenciación celular, quimiotaxis o modulación de la secreción de inmunoglobulinas. Fundamentalmente son producidas por los linfocitos y los macrófagos activados. Sin embargo, también pueden ser producidas por leucocitos polimorfonucleares, células endoteliales, células epiteliales, adipocitos y miocitos entre otras.

Entre ellas destaca la IL-6 que, junto con la IL-1 y TNF- α , inician la respuesta inflamatoria, tiene funciones autocrinas, paracrinas y endocrinas y además, es un importante regulador de la síntesis de proteínas de fase aguda (Gauldie J et al, 1989, Castell JV et al, 1990). Así es una citocina multifuncional producida en diferentes tipos celulares incluyendo células del sistema inmune, endoteliales, fibroblastos, miocitos y adipocitos.

Se ha observado que la IL6 es un consistente predictor de futuros eventos cardiovasculares como CI, insuficiencia cardíaca e ictus en importantes estudios prospectivos (Ridker PM et al, 2000(b), Cesari M et al, 2003, Lowe GD et al, 2004). Además, la concentración circulante de IL-6 se asocia significativamente con el IMC y otras medidas de adiposidad (Fried SK et al, 1998). También se relaciona con la acción de la insulina (Vozarova B et al, 2001, Kern PA et al, 2001) e incluso tiene capacidad predictiva del desarrollo de DMT2 (Pradhan AD et al, 2001) y, en varios estudios, se ha asociado con HTA (Fernández-Real JM et al, 2001).

Moléculas de adhesión celular. Las moléculas de adhesión celular son expresadas por células endoteliales y leucocitos circulantes en respuesta a numerosos estímulos inflamatorios (Springer TA, 1990). Estas moléculas son selectinas, integrinas o inmunoglobulinas y median el reclutamiento de células inflamatorias de la circulación y su migración a través del endotelio (Price DT et al, 1999). ICAM y VCAM son miembros de la superfamilia de la inmunoglobulinas cuya expresión está regulada por citocinas proinflamatorias (Chen H et al, 2001) y han sido observadas en placas ateroscleróticas (De Graba TJ et al, 1998). Dado que sus formas solubles pueden aparecer en el plasma, diversos trabajos han relacionado sus concentraciones con el riesgo de eventos cardiovasculares.

Varios estudios epidemiológicos han mostrado que la concentración plasmática elevada de ICAM es un predictor de ECV (Hwuang SJ et al, 1997, Ridker PM et al, 1998, Ridker PM et al, 2000(a), Luc G et al, 2003) en individuos sanos. Sin embargo, con la VCAM no se obtuvieron datos similares (Hwuang SJ et al, 1997, de Lemos GA et al, 2000, Luc G et al, 2003) aunque niveles marcadamente elevados de VCAM se han observado en síndromes coronarios agudos (Mulvihill NT et al, 2001) y pueden ser predictores de muerte en individuos que presentan CI (Blankenberg S et al, 2001). Así pues, se ha propuesto que ICAM es un marcador de estado proinflamatorio en población sana y VCAM es expresada fundamentalmente en un estado de aterosclerosis avanzado (Mulvihill NT et al, 2002).

Además, otro estudio mostró que el aumento de riesgo de ECV asociado a ICAM dependía de los niveles de VCAM y que los individuos que presentaban niveles elevados de VCAM e ICAM tenían 2,5 veces más riesgo de ECV que los individuos que presentaban niveles elevados de uno de ellos y no de ambos (Shai I et al, 2006).

Por otro lado, los resultados obtenidos por Malik et al en 2001 en el *British Regional Heart Study* son poco alentadores en cuanto al valor pronóstico de las moléculas de adhesión. Las concentraciones de ICAM, VCAM y no añadieron valor pronóstico al que proporcionaban los FR clásicos.

Elevadas concentraciones de ICAM y VCAM también se han asociado con consumo de tabaco, hipercolesterolemia, DMT2, niveles de homocisteína (Price DT et al, 1999, Demerath E, et al, 2001) IMC, razón cintura cadera (Rodhe LE et al, 1999, Demerath E, et al, 2001, Shai I et al, 2006), presión arterial (Demerath E, et al, 2001) , c-HDL y TG (Rodhe LE et al, 1999, Shai I et al, 2006) y niveles de IL-6 y PCR y otras citocinas (Rodhe LE et al, 1999, Shai I et al, 2006).

1.4.3 Factores ambientales

Los factores ambientales influyen sobre los fenotipos intermedios y finales de ECV. Entre los factores ambientales asociados a ECV destacan por su efecto la dieta, el sedentarismo y el hábito tabáquico.

1.4.3.1 Tabaquismo

Numerosos estudios epidemiológicos han demostrado claramente que el consumo de cigarrillos aumenta el riesgo de CI, IAM, angina de pecho (Willett WC et al, 1987, Waters D et al, 1996, Jacobs DR et al, 1999, Teo KK et al, 2006) ictus (Goldstein LB et al, 2006), EVP (Prince JF et al, 1999) aneurisma aórtico (Lederle FA et al, 2003) y muerte súbita (Wannamethee G et al, 1995). Existe una relación lineal entre el consumo de cigarrillos y el riesgo de CI y angina de pecho (Willett WC et al, 1987), IAM (Teo KK et al, 2006), aneurisma en la aorta abdominal (Vardulaki KA et al, 2000) e ictus (Hart CL et al, 2007). Sin embargo, no existe una dosis mínima segura de modo que las tasas de consumo diario más bajas (menos de 5 cigarrillos) se asocian de todos modos a un aumento del riesgo de mortalidad relacionada con ECV (Bjartveit K, et al. 2005). Además, los cigarrillos bajos en nicotina aumentan de igual manera el riesgo cardiovascular. El efecto del tabaco sobre el riesgo de ECV es mayor en los fumadores más jóvenes (edad < 40 años) (Teo KK et al, 2006). El riesgo de ECV es también mayor en fumadores de cigarrillos en comparación a otros tipos de tabaco como puros o pipa (Chen Z et al, 2002). Además, los fumadores pasivos tienen aumentado su riesgo de ECV entre un 10 y un 30% (He J et al, 1999, Whincup PH et al, 2004).

Por otro lado, cuando se abandona el hábito tabáquico, el riesgo de CI decrece en un 50% durante el primer año, y se aproxima al de los no fumadores al cabo de 2 años (Rosenberg L et al, 1995). Disminuye también el riesgo de IAM (Teo KK et al, 2006), ictus (Robbins AS et al, 1994) y se reduce la progresión de EVP (Jonason T et al, 1987).

La Encuesta Nacional de Salud del año 2006, confirma un descenso de la prevalencia de fumadores en la población mayor de 16 años (Ministerio de Sanidad y Consumo, 2006). Según la encuesta, el 31,6% de los hombres y el 21,5% de las mujeres se declaran fumadores lo que contrasta con las cifras de hace casi dos décadas: el 55% de la población española fumaba. Además, se ha abortado el incremento del hábito entre las mujeres iniciado a finales de los años ochenta. Sin embargo, varios estudios han puesto de manifiesto una elevada prevalencia de fumadores entre menores de 25 años (Villar-Álvarez ZF et al, 2003, Baena JM et al, 2005). El hábito tabáquico es claramente más frecuente en varones que en mujeres excepto en edades comprendidas entre 16-24 años (32,7% mujeres y

31,1% hombres), disminuye con la edad (Figura) y tiene mayor prevalencia en regiones del sur y del este de España (Bellido Casado J et al, 2001, Fernández A et al, 2003, Gabriel R et al, 2008).

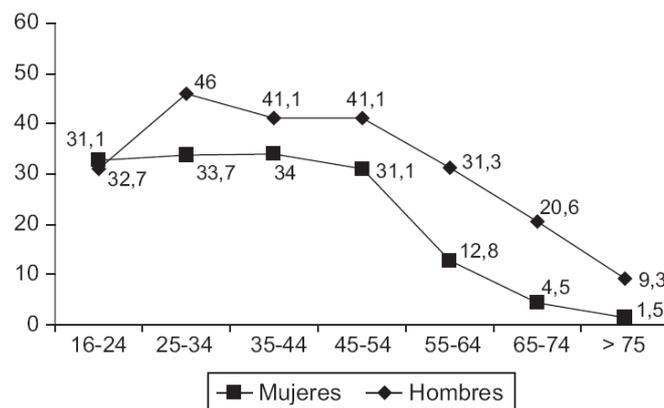


Figura 1.10. Prevalencia de tabaquismo en España según las edades y el sexo. Datos de la Encuesta Nacional de Salud 2006.

Los mecanismos a través de los cuales el tabaco favorece la aterotrombosis son múltiples y entre ellos destacan el aumento de la adherencia y la agregabilidad de las plaquetas que conduce a un estado de hipercoagulabilidad, la disminución del aporte de oxígeno, la vasoconstricción coronaria y el aumento del trabajo miocárdico. Los componentes del humo del tabaco inducen también disfunción endotelial (Lavi S et al, 2007), se cree que a través de la reducción de la producción basal de NO que afecta a la vasodilatación (Zeiber AM et al, 1995, Rahman MM et al, 2007), aumentan la trombogenicidad de la sangre ya que incrementa la concentración de fibrinógeno y factor tisular (Sambola A et al, 2003), causan estrés oxidativo aumentando la oxidación de LDL (Monow JD et al, 1995) y, además, afectan negativamente al perfil lipídico ya que provocan reducción de la concentración de c-HDL, condicionando un incremento del desarrollo de aterosclerosis (Lavi S et al, 2007). El humo de otros fumadores o humo de tabaco del entorno es también importante FR de ECV. El humo del entorno deteriora la función plaquetaria y endotelial, aumenta la rigidez arterial, el estrés oxidativo, la inflamación y acelera la aterosclerosis (Barnoya J et al, 2005).

1.4.3.2 Actividad física

Actividad física es cualquier movimiento corporal producido por los músculos esqueléticos que tiene como resultado un gasto de energía. Ejercicio físico es un concepto diferente, ya que es un tipo de actividad física planificada,

estructurada y repetitiva que tiene como finalidad el mantenimiento o la mejora de uno o más componentes de la forma física. Por aptitud física o forma física se entiende la capacidad de desempeñar una actividad física de intensidad ligera-moderada sin fatiga excesiva. Este concepto incluye diferentes variables de aptitud cardiovascular, respiratoria, de composición corporal, fortaleza y elasticidad muscular y flexibilidad (US Department of Health and Human Services, 1996).

El tipo de actividad física se puede definir con distintos criterios: según el tipo de metabolismo utilizado para la obtención de energía se distingue entre aeróbica (el aporte energético proviene del oxígeno) y anaeróbica (el aporte energético no proviene del oxígeno, sino de otros sustratos), y, según el tipo de contracción muscular, se distingue entre dinámica-isotónica, en la que existe contracción y relajación sucesivas de las fibras musculares (por ejemplo, correr o nadar) y suelen ser de larga duración y aeróbicas, y estática-isométrica en la que se genera tensión en las fibras musculares sin cambios importantes en la longitud muscular (por ejemplo, levantamiento de pesas), suelen ser intensas, de corta duración y anaeróbicas (Boraita A, 2008).

Por otro lado, el término dosis se utiliza frecuentemente cuando se define la actividad física o ejercicio. La dosis se refiere a la cantidad total de energía gastada en la que están implicadas la intensidad, la duración y la frecuencia (Thompson PD et al, 2003, Haskell WL et al, 2007). La intensidad es la tasa de gasto energético durante la actividad. Se puede expresar en términos relativos, refiriéndose al porcentaje de capacidad aeróbica utilizada en el ejercicio y se expresa como porcentaje de la frecuencia cardíaca máxima o del consumo máximo de oxígeno ($VO_{2máx}$), o absolutos cuando se refleja la tasa de gasto energético y se expresa en equivalentes metabólicos (METs) (Pate RR et al, 1995). Un MET representa el consumo de oxígeno en ml/min en estado de reposo por kg de peso, lo que equivale al número de calorías que consume un cuerpo en la situación de reposo, y a partir de ese estado se incrementan los METs en la medida que aumenta la intensidad de la actividad física (Hu FB et al, 1999). De esta manera, se han clasificado las diferentes actividades físicas según intensidades para favorecer la comparación entre los distintos estudios científicos (Ainsworth BA et al, 2000). Se ha aceptado como actividad ligera aquella que tiene una intensidad <3 METs o $<30\%$ de $VO_{2máx}$, actividad moderada entre 3 y 6 METs o entre 30-60% de $VO_{2máx}$, actividad intensa <6 METs o $>60\%$ de $VO_{2máx}$ (Haskell WL et al, 2007), aunque se debe tener en cuenta las características de la población (Nelson ME et al, 2007). De hecho, en varios estudios, se ha demostrado que, en las personas mayores de 65 años, caminar se asocia con un menor riesgo de CI. Por lo tanto, al menos en este subgrupo de individuos que, además, es el que más casos de CI aporta a la población, hay datos que apoyan la recomendación de caminar como una actividad cardiosaludable (Manson JE et al, 1999).

Diferentes estudios han mostrado una relación inversa entre el ejercicio habitual y el riesgo de CI, eventos cardíacos y muerte (Paffenbarger RS et al, 1993, Blair SN et al, 1995, Blair SN et al, 1996, Kujala UM et al, 1998, Lee IM et al, 2001, Tanasescu M et al, 2002, Manson JE, 2002, Wessel TR et al, 2004, Myers J et al, 2004, Yusuf S et al, 2004). En 1994, la OMS reconoció el sedentarismo como un FR independiente de CI (Bijnen FC et al, 1994). Se ha estimado que el riesgo relativo de muerte por CI en un individuo sedentario en comparación con un individuo activo es 1,9 (Berlin JA et al, 1990, Bijnen FC et al, 1994). También se ha observado que la práctica regular de actividad física se asocia con un menor riesgo de presentar enfermedad cerebrovascular (Lee CD et al, 2003).

Por otro lado, la mala forma física parece asociarse con el desarrollo de DMT2, HTA, obesidad y síndrome metabólico tanto en sujetos jóvenes como de mediana edad (Carnethon MR et al, 2003, LaMonte MJ et al, 2005). Sin embargo, el ejercicio previene y ejerce efectos beneficiosos sobre FR de aterosclerosis ya establecidos. Así pues, mejora el perfil lipídico (reducción de c-LDL, TG, aumento de c-HDL) (Leon AS et al, 2000, Leon AS et al, 2001), la circulación sanguínea y la actividad fibrinolítica, con lo que disminuye el riesgo de trombosis, la función endotelial (Hambrecht R et al, 2000), favorece la producción de citocinas protectoras de aterosclerosis (Smith JK, 2001) y reduce el estrés oxidativo (Arquer A et al, 2010). También aumenta la sensibilidad a la insulina y la utilización de la glucosa, con lo que disminuye el riesgo de desarrollo de DMT2 (Thompson PD et al, 2001, Weinstein AR et al, 2004), reduce o previene la obesidad (Wing RR et al, 2001, Slentz CA et al, 2004) y la HTA (Fagard RH, 2001). Además, estudios de intervención han puesto de manifiesto que el aumento de actividad física se relaciona con el abandono del hábito tabáquico (Paffenbarger RS et al, 1993, Marcus BH et al, 1999). También ejerce efectos en la calidad de vida y la supervivencia ya que mejora la fuerza y la resistencia muscular, favorece el manejo del estrés, ayuda a conciliar el sueño, a combatir la ansiedad o la depresión (Boraita A, 2008). Además, varios estudios han señalado que el ejercicio disminuye la incidencia tanto de muerte por cualquier causa como la de origen cardiovascular en pacientes con CI (Wannamethee SG et al, 2000, Clark AM et al, 2005).

Los mecanismos mediante los cuales la actividad física reduce el riesgo de ECV no están esclarecidos. Un estudio reciente ha llegado a la conclusión de que la relación inversa entre la actividad física y el riesgo de ECV se explica, en gran parte (59%), por las diferencias en FR conocidos. Concretamente, los marcadores de inflamación/hemostáticos (PCR, fibrinógeno, ICAM) contribuyen en mayor medida a reducir el riesgo (32,6%), seguido de la presión arterial (27,1%), lípidos (CT, c-HDL, c-LDL) (19,1%), factores lipídicos emergentes (Lp(a), apoA1, apoB100) (15,5%), IMC (10,1%) y la glucohemoglobina/DMT2 (8,9%) (Mora S et al, 2007).

Así pues, la recomendación de realizar ejercicio físico ha pasado a ser un elemento importante en las políticas preventivas en los adultos (Haskell WL et al, 2007), en mayores de 65 años o adultos entre 50 y 64 años con condiciones crónicas clínicamente relevantes (Nelson ME et al, 2007) y los niños (Pate RR et al, 2006). Estas recomendaciones, realizadas por la *American College of Sport Medicine* y la *American Heart Association*, están basadas en la amplia evidencia científica existente acerca de la relación entre las variables que definen la actividad física (tipo, duración, frecuencia, intensidad, energía consumida, forma física) y los beneficios sobre la salud y constituyen una puesta al día de las realizadas en 1995 (Pate RR et al, 1995). Así pues, se trata de recomendaciones mínimas en cuanto a tipo de actividad, intensidad, duración y frecuencia para promover y mantener la salud, reducir el riesgo de enfermedades crónicas y mortalidad prematura según las características de los diferentes grupos de edad poblacionales. Estos manuscritos informan también de que, según los estudios científicos realizados, un incremento de la cantidad de actividad física por encima de estas recomendaciones mínimas mejora los beneficios sobre la salud y reducen todavía más el riesgo de enfermedades crónicas y mortalidad. Sin embargo, con la evidencia científica existente, no ha sido posible todavía establecer la relación dosis-respuesta entre cantidad de actividad física y salud y, por tanto, hallar la forma de la curva de dicha relación y obtener resultados óptimos. Esto puede deberse a varios motivos como la escasez de ensayos clínicos aleatorizados con un adecuado diseño (la mayor parte de evidencia científica proviene de estudios observacionales) (Oja P, 2001, Haskell WL et al, 2007, Boraita A et al, 2008), a la variabilidad en los métodos de medición de la actividad física en los distintos estudios, a las diferencias genéticas, de edad, sexo, estado de salud, composición corporal de los participantes de los diferentes estudios (Haskell WL et al, 2007) y a que los diferentes indicadores de salud como CI, DMT2, obesidad, HTA tengan un patrón de relación diferente con la actividad física (Blair SN et al, 2004). Así, actualmente, las investigaciones están encaminadas a estudiar la naturaleza de esta relación dosis-respuesta ya que su existencia ya ha sido ampliamente mostrada.

1.4.3.3 Dieta

La dieta es el factor ambiental que posee un mayor impacto sobre el metabolismo lipídico, estrés oxidativo y el desarrollo del proceso de aterosclerosis (Grundy SM, 2001). Sin embargo, existe una amplia controversia acerca de cuál es la dieta óptima para la prevención y tratamiento de las ECV (Chahoud G et al, 2004).

En 1992, el Departamento de Agricultura de EEUU (USDA), diseñó una guía dietética, en forma de pirámide, con el fin de trasladar los objetivos nutricionales a un lenguaje que la población estadounidense pudiera entender y

llevar a la práctica (USDA, 1995). En ella se recomendaba el tipo y la frecuencia de consumo de cada alimento para llevar a cabo una dieta saludable (Figura 1.11 izquierda). Esta pirámide oficial del gobierno de EEUU tuvo gran influencia sobre otros gobiernos, incluso en España. Sin embargo, diversas premisas en las que se basa esta pirámide han sido ampliamente discutidas, de hecho, no se distingue entre los diferentes tipos de grasa y además se recomienda un consumo mínimo de éstas. Se considera, también todos los carbohidratos iguales y se indica que se consuman en grandes cantidades, el origen de las proteínas es indiferente y no contiene una guía para la ingesta de alcohol y la realización de ejercicio físico.

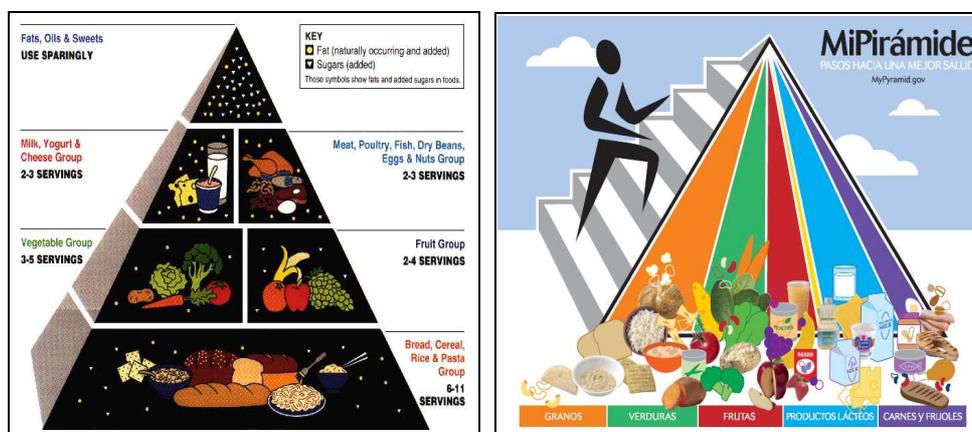


Figura 1.11. Pirámide nutricional del USDA1995 (izquierda) y Pirámide nutricional del USDA 2005 (derecha).

En este contexto, tradicionalmente, la *American Heart Association* (AHA) ha basado sus recomendaciones dietéticas para la prevención primaria de riesgo cardiovascular en una dieta baja en grasa (Krauss MR et al, 2000). Esta dieta también se basa en la reducción de todos los tipos de grasa de modo que la contribución de la grasa al total de calorías ingeridas debe ser \leq al 30% y de la grasa saturada \leq al 10%, y, además, una ingesta de colesterol diaria \leq a 300 mg. También el 55% del total de calorías debe provenir de los carbohidratos y el 15% de las proteínas. Además, en las guías de la AHA se recomienda el consumo de cereales bajos en grasa e integrales, vegetales, fruta y legumbres, lácteos desnatados, pescado blanco o marisco, carnes de aves o cortes de carne bajos en grasa, y se limita el consumo de grasas adicionales, dulces y snacks con alto contenido en grasa (Krauss MR et al, 2000). Estudios realizados para analizar los efectos de esta dieta han mostrado que produce una reducción de CT y c-LDL pero, sin embargo, también disminuye o no varía la concentración de c-HDL y aumenta o no cambia las concentraciones de TG (Mensik RP et al, 1992, Ginsberg HN et al, 1998, Obarzanek U et al, 2001, Lichtenstein AH et al, 2002, Howard BV et al,

2006). También, aumenta la carga glicémica lo que puede influir en el desarrollo de DMT2 y obesidad (Mensik RP et al, 1992). Además, en un estudio de intervención realizado en 48835 mujeres postmenopáusicas, a las que se recomendó una dieta baja en grasa total, se observó que la dieta no mostraba efectos significativos sobre incidencia de CI, ictus o ECV total (HR= 0,97 IC95% 0,90-1,06, HR= 1,02 IC95% 0,90-1,15, HR= 0,98 IC95% 0,92-1,05). Además, se observó que ingestas bajas en grasa saturada o grasa *trans* y altas en vegetales y frutas se asociaban con mayor reducción en el riesgo de CI (Howard BV et al, 2006). También se ha observado que esta dieta es eficaz en la pérdida de peso pero solo a corto plazo puesto que el cumplimiento a este tipo de dieta es bajo ya que su composición es poco apetecible (McManus K et al, 2001).

Así surgió una nueva versión en 2005, con un nuevo formato, de la pirámide de la USDA, en el que los grupos de alimentos se presentan en vertical (Figura 1.11 derecha) y que incorpora el concepto de que la dieta debe adecuarse a la necesidades individuales, de modo que permite la variación en la cantidad de alimentos según el sexo, la edad y la cantidad de actividad física que la persona realice. Además, tiene en cuenta el tipo de grasa, incentiva el consumo de carnes magras frente a carnes rojas, recomienda el consumo de cereales integrales (USDA, 2005).

También, posteriormente a las recomendaciones realizadas por la AHA han surgido numerosos tipos de dieta tales como dietas ricas en proteínas, dietas bajas en carbohidratos, Dieta Mediterránea (DM) entre otras, todas ellas promovidas por la adquisición de conocimientos, modas, demandas o intereses comerciales. Entre ellas, la DM ha despertado gran interés, de hecho, tras unas décadas en que la prevención y el tratamiento de las ECV y sus fenotipos relacionados estaban dominados por las recomendaciones dietéticas basadas en una dieta baja en grasa, en los últimos años el concepto de DM, como alternativa más saludable a la dieta baja en grasas, se está imponiendo con fuerza en la investigación biomédica internacional.

1.4.3.3.1 Dieta Mediterránea

La DM se originó en Grecia y se refiere a los patrones tradicionales de alimentación propia de los países del norte del mar Mediterráneo en los años sesenta. Ha sido definida en numerosas ocasiones (Helsing E et al, 1989, Serra Majem L, 1993, Nestle M, 1995, Willet WC, 1995). Aunque existen distintas variedades, los componentes principales de este patrón de alimentación son: a) elevado consumo de cereales, frutas, verduras, frutos secos y legumbres, b) el aceite de oliva como fuente principal de grasa, y además, se considera el principal nexo de unión entre los países mediterráneos c) consumo moderado de pescado,

pollo, leche y productos lácteos (especialmente en forma de queso y yogurt, d) bajo consumo de carne y productos cárnicos e) menos de 4 huevos por semana, f) consumo moderado de vino. Además, la DM expresa un modo y hábitos de vida puesto que va acompañada de un consumo habitual de alimentos poco procesados, frescos y de temporada. La fruta fresca se utiliza como postre diario, disminuyendo así el consumo de pasteles y dulces. Además, se caracteriza por el consumo diario de vino durante las comidas y el alto grado de actividad física (Serra-Majem L et al, 2004).

Diferentes investigadores de Estados Unidos han sido fundamentales en la valoración y difusión de este concepto. Así pues, Ancel Keys, profesor de la Universidad de Minnesota (1936-1975) fue el descubridor y difusor del concepto de DM y de su asociación con una menor mortalidad cardiovascular. Ello fue posible gracias al desarrollo del estudio de los Siete Países (Keys A et al, 1986), iniciado por Keys en los años sesenta. El objetivo de dicho estudio fue comparar la frecuencia de CI en países con diferente dieta. Se incluyó una cohorte de 13.763 hombres de entre 40-59 años pertenecientes a siete países: Finlandia, Italia, Grecia, Yugoslavia, Japón, EEUU y Holanda, a los que se les realizó varias evaluaciones transversales. Tras 15 años de seguimiento, los resultados intuyeron, por primera vez, las características saludables de la dieta consumida, en la época del estudio, en los países mediterráneos al constatar que la esperanza de vida en estos países era mayor y la mortalidad coronaria menor. Además, se observó que la principal característica diferencial de la DM era la relación entre ácidos grasos monoinsaturados y ácidos grasos saturados (AGM/AGS) ya que a mayor consumo de AGM y menor consumo de AGS, menor mortalidad cardiovascular. Por otro lado, A. Keys definió por primera vez el concepto de DM como: *“La Dieta Mediterránea se caracteriza por un elevado consumo de pan, de legumbres, de arroz, de frutas y verduras. Es fundamental la utilización de aceite de oliva, así como típico un consumo moderado de vino en las comidas. Abundante en frutos secos y pescado, la Dieta Mediterránea es escasa en carnes rojas y grasas de la leche”*. Además, Keys reconoce la importancia del *“estilo de vida mediterráneo”* que se caracteriza por: personalidad más tranquila libre de estrés, uso frecuente de la siesta, alto grado de comunicación entre los habitantes de los pueblos y elevado apoyo social, tradiciones culinarias como comidas en casa y consumo habitual de alimentos poco procesados, frescos y de temporada, alto grado de ejercicio físico, y clima suave que favorece los paseos todo el año.

Con posterioridad al estudio de Siete Países, investigadores de la Universidad de Harvard, como Jean Mayer y Walter Willet entre otros, contribuyeron al relanzamiento del concepto de DM y la revisión de la pirámide del USDA. De hecho, en 1993, en la *Conferencia Internacional sobre las Dietas del Mediterráneo* realizada para revisar las investigaciones científicas publicadas hasta el momento

sobre la composición de la DM y sus efectos sobre la salud, científicos de Oldways (Escuela de Salud Pública de Harvard) y de la Oficina Europea de la OMS elaboraron la *pirámide Tradicional de Dieta Mediterránea* (Willet W et al, 1995) como alternativa a la pirámide de USDA. Esta pirámide (Figura 1.12) representa el patrón dietético encontrado en las regiones mediterráneas en las que se observó mayor esperanza de vida en el estudio de A. Keys (Willet W et al, 1995).

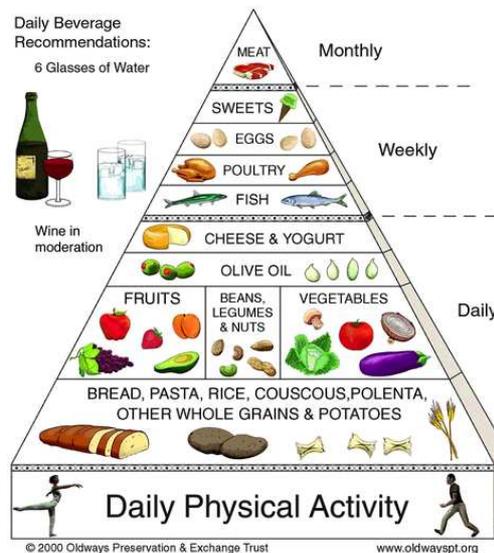


Figura 1.12. Pirámide de Dieta Mediterránea Tradicional (Willet W et al, 1995)

En ella queda reflejada la importancia, no solo de la cantidad de grasa que se consume, sino también del tipo, de modo que se recomienda el aumento del consumo de grasas insaturadas (“grasas saludables”) procedentes del pescado, y algunas fuentes vegetales como frutos secos y aceite de oliva y se limita el de grasas saturadas encontradas principalmente en productos de origen animal diferentes del pescado. También se recomienda cereales integrales y se diferencia el consumo de proteínas según su origen (pescado, aves, carne roja, huevos, legumbres, frutos secos) reduciendo el consumo de carnes rojas. Además, añade recomendaciones para el consumo moderado de vino, agua y ejercicio físico.

Posteriormente, numerosos países elaboraron sus propias guías dietéticas (OMS, 1998). Entre ellos, el gobierno de Grecia vio la necesidad de establecer unas guías dietéticas para la población griega, para promover los patrones de alimentación tradicionales y saludables (*Supreme Scientific Health Council, Ministry of Health and Welfare of Greece, 1999*). Así, elaboraron una versión

griega de la pirámide de DM desarrollada por Harvard basándose en la evidencia de estudios científicos realizados en dicha población (Figura 1.13). Esta pirámide es más específica con respecto a la frecuencia de consumo de cada alimento y se diferencia de la pirámide de Harvard en las recomendaciones para el consumo de patatas.

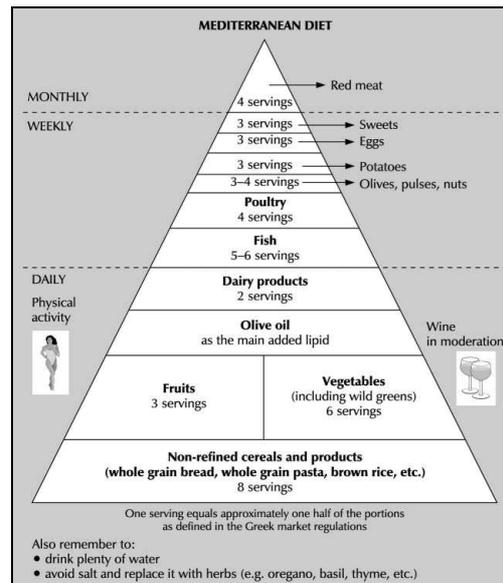


Figura 1.13. Pirámide de Dieta Mediterránea desarrollada para la población griega (Supreme Scientific Health Council, Ministry of Health and Welfare of Greece, 1999).

En España, la *Sociedad Española de Nutrición Comunitaria* (SENC) elaboró una Guía de Alimentación Saludable (SENC, 2004) que incluye una Pirámide de la Alimentación (Figura 1.14), la cual se ha convertido en la principal referencia en materia de nutrición. Integra los alimentos propios de la dieta española característicos de una DM.

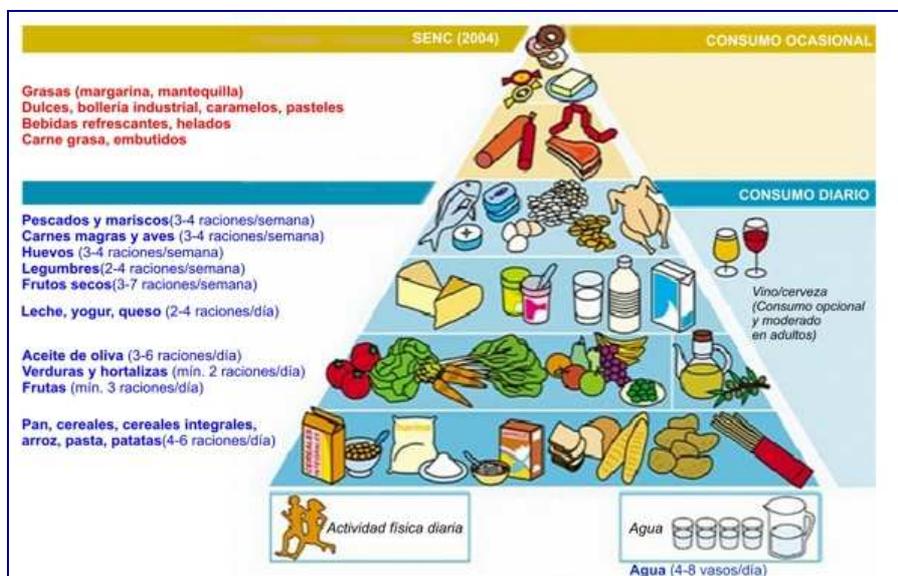


Figura 1.14. Pirámide de la Alimentación Saludable (SENC, 2004)

La Pirámide muestra en la base los alimentos que deben ser ingeridos diariamente como son los derivados de los cereales y patatas, verduras, hortalizas, frutas, leche y derivados lácteos y aceite de oliva. Otros alimentos, concretamente legumbres, frutos secos, pescados, huevos y carnes magras, se deben tomar alternativamente varias veces a la semana. Por último, y en la cúspide de la pirámide, se aconseja moderar el consumo de carnes grasas, pastelería, bollería, azúcares y bebidas refrescantes. La SENC también recomienda ingerir como mínimo dos litros de agua diarios y la realización de, al menos, 30 minutos de actividad física. Como novedad incluye las bebidas fermentadas de baja graduación como la cerveza y el vino, recomendando un consumo opcional y moderado en adultos.

Tras el estudio de los Siete Países, se llevaron a cabo múltiples estudios básicos, clínicos y epidemiológicos de casos y controles, cohortes y de intervención que han puesto de manifiesto los efectos beneficiosos del patrón dietético de la DM sobre fenotipos intermedios y finales. Así pues, varios estudios transversales han mostrado efectos favorables de la DM sobre el perfil lipídico (Panagiotakos DB et al, 2006, Tzima N et al, 2007, Pitsavos C et al 2007), la presión arterial (Pasaltopoulou T et al, 2004, Álvarez-León EE et al, 2006, Alonso A et al 2004, Panagiotakos DB et al, 2006, Tzima N et al, 2007), la glucemia (Panagiotakos DB et al, 2007), obesidad (Schroder H et al, 2004), marcadores de inflamación (Chrysohoou C et al, 2004, Fung TT et al, 2005, Panagiotakos DB et

al, 2006). También, estudios de cohorte prospectivos han mostrado beneficios sobre el perfil lipídico (Polychronopoulos E et al, 2005) y sobre la obesidad (Trichopoulou A et al, 2005(a), Méndez MA et al, 2006). Además, la mejora del perfil lipídico también se ha puesto de manifiesto en algunos ensayos clínicos de intervención (Goulet J et al, 2003, Ambring A et al, 2004, Vicent-Baudry S et al, 2005). También, sobre la glucemia (Vicent-Baudry S et al, 2005, Shai I et al, 2008), obesidad (McManus K et al, 2001), estrés oxidativo (Fito M et al, 2007) y marcadores de inflamación (Esposito K et al, 2004).

Por otro lado, diversos estudios también han mostrado un menor riesgo de ECV y otras enfermedades crónicas, reducción de mortalidad por ECV, y mortalidad total asociado a la DM (Tunstall-Pedoe H, 1999, Singh et al, 2002, Trichopoulou A et al, 2003, Mancini et al, 2004, Knoops et al, 2004, Panagiotakos et al, 2005; Trichopoulou A et al, 2005(b), Mitrou PN et al, 2007, Fung TT et al, 2009). Sofi F et al (2008) realizaron un metanálisis de estudios de cohortes prospectivos publicados hasta junio de 2008, en los que se analizaba la asociación entre la adherencia a la DM y la mortalidad por cualquier causa o por enfermedades crónicas como ECV. Los resultados mostraron que el incremento en 2 puntos en el índice de la adherencia a la DM se asociaba con menor riesgo de mortalidad total (Riesgo Relativo (RR)=0,91 IC95%(0,89-0,94)) (Figura 1.15) y de mortalidad por ECV (RR=0,91 IC95%(0,87-0,95)) (Figura 1.15). Así, se observó que mayor adherencia a la DM se asociaba con un estado más saludable y un descenso del 9% en la mortalidad total y un 9% también en la mortalidad por ECV.

No obstante, estos efectos beneficiosos deben atribuirse a la DM tradicional puesto que, la globalización y el desarrollo económico han afectado el patrón de dieta en la cuenca del Mediterráneo y se han modificado ciertos indicadores de salud a los que estaba asociada. La constatación de dichos cambios condujo a analizar la situación en la que se halla la DM y las necesidades de su redefinición (Serra-Majem L et al, 2004).

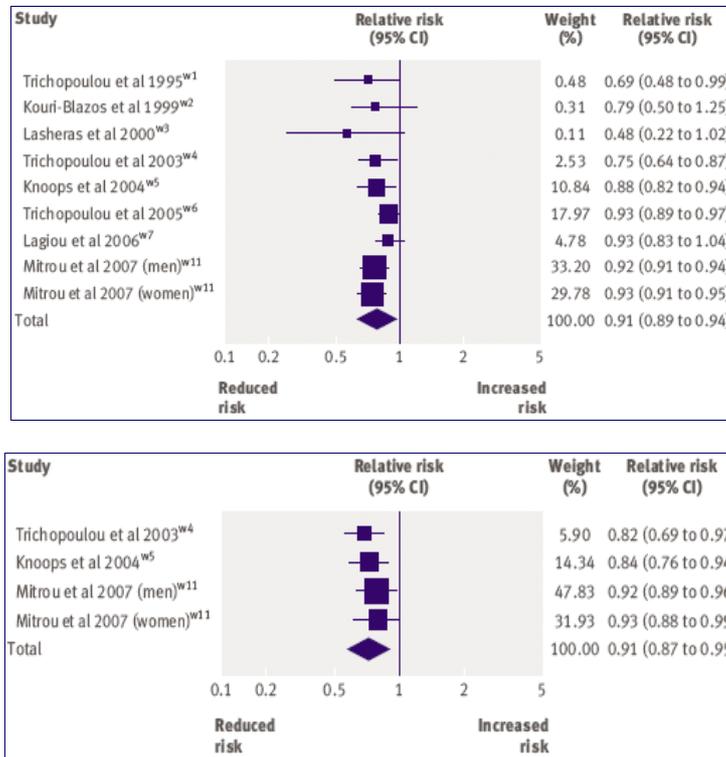


Figura 1.15. Riesgo de mortalidad total (arriba) y mortalidad por ECV (abajo) asociado al incremento de 2 puntos en la adherencia a la Dieta Mediterránea. Los cuadradados representan el tamaño del efecto en cada estudio, las líneas muestran el intervalo de confianza al 95% y el rombo representa el tamaño total del efecto. (Sofi F et al, 2008).

Muchos de los beneficios de la DM se han atribuido a su elevado contenido en AGM y diversas sustancias antioxidantes. De hecho, el aceite de oliva es uno de los elementos más emblemáticos de esta dieta y sus efectos beneficiosos se han relacionado con su alto contenido en AGM (provenientes principalmente del ácido oleico), así como en los compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva virgen extra (AOVE). Respecto a los AGM como intervención dietética única, no existen estudios controlados con distribución aleatoria que hayan analizado su eficacia en la prevención primaria de ECV u otras patologías crónicas prevalentes. Únicamente se dispone de estudios observacionales de cohorte cuyos resultados han sido discrepantes. Así, en el *Nurses Health Study* (Hu FB et al, 1997) y en el *Alpha Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Preventive Study* (Pietinen P et al, 1997) se observó una cierta eficacia protectora del consumo de AGM sobre las complicaciones cardiovasculares, pero en otros estudios con el *Zuphten Study*

(Kromhout D et al, 1984), no se halló ninguna asociación significativa, probablemente por falta de ajuste con otras variables de confusión (otros componentes de la dieta o actividad física). Tampoco se encontraron resultados significativos en los estudios epidemiológicos realizados por Gramenzi A et al (1990) en Italia y por Tzonou A et al (1993) en Grecia.

Sin embargo, un estudio de casos y controles realizado en España, ha encontrado que un consumo elevado de aceite de oliva (media 54 g/día) se asocia con una reducción relativa del 74% en el riesgo de primer IAM. Esta reducción llegaba a ser del 82% (OR=0,18 IC95% (0,06-0,63)) tras ajustar por energía y por los posibles factores de confusión dietéticos y no dietéticos (Fernández-Jarne E et al, 2002). Estos datos proporcionan evidencias de que el aceite de oliva puede reducir el riesgo de CI, pero requieren confirmación por medio de ensayos clínicos de intervención, con asignación aleatoria que proporcionan una evidencia más firme.

Por otro lado, hay evidencias limitadas de estudios experimentales y clínicos de que las dietas altas en AGM, a base de aceite de oliva, tienen efectos saludables sobre la presión arterial, el estrés oxidativo, la hemostasia, la activación endotelial, la inflamación y la termogénesis (Ferrara LA et al, 2000, Larsen LF et al, 1999, Fuentes F et al, 2001, Tsimikas S et al, 1999, Rodríguez VM et al, 2002). Muchos de los efectos observados han sido atribuidos, no solamente a los AGM, sino a los compuestos fenólicos y otras sustancias antioxidantes presentes en el aceite. Compuestos, muchos de ellos, presentes en el AOVE y ausentes en el aceite refinado debido al proceso de refinación.

Otro componente importante de la DM son los frutos secos (FS) ya que son muy ricos en grasa insaturada (AGM en almendras y avellanas, y AGP en nueces y piñones). Además de contener abundante ácido linoleico (AGP de la serie n-6), las nueces y piñones tienen cantidades apreciables de ácido α -linolénico (AGP de la serie n-3), un ácido graso al que se le supone un notable efecto antiaterogénico (Kris-Etherton PM et al, 1999). Los FS también son ricos en otros componentes beneficiosos para la salud cardiovascular, como arginina (precursor del óxido nítrico, vasodilatador endógeno), ácido fólico (contribuye a reducir la homocisteinemia), vitamina E y polifenoles antioxidantes, fitoesteroles y otros compuestos fitoquímicos (Kris-Etherton PM et al, 1999, Sabaté J et al, 2006, Salas-Salvadó J et al, 2006).

Existen evidencias epidemiológicas en estudios prospectivos de seguimiento de cohortes de que el consumo frecuente de FS reduce el riesgo de CI (Fraser GE et al, 1992, Kushi LH et al, 1996, Hu RB et al, 1998). Por otro lado, por su alto valor calórico, existe preocupación de que el consumo de FS provoque un aumento del

peso corporal, pero en estudios preliminares de corta duración se ha comprobado que su incorporación a la dieta en cantidades de hasta 50 g diarios no incrementa el peso (García-Lorda P et al, 2003).

Estudios clínicos de intervención dietética a corto y medio plazo en voluntarios sanos han mostrado que el consumo diario de una cantidad razonable de FS tiene un efecto reductor de la colesterolemia (Kris- Etherton PM et al, 1999, Kris- Etherton PM et al, 2001). En un estudio controlado con nueces en pacientes hipercolesterolémicos de ambos sexos (Zambón D et al, 2000), se observó una reducción significativa del CT y cLDL con la dieta de nueces (alrededor de 50 g al día) en comparación con una dieta control, isoenergética y con la misma proporción de grasa total y de AGS. Por lo tanto, el efecto hipocolesteromiante de las nueces es aditivo al de la DM (Zambón D et al, 2000).

Otro alimento que se incluye en la pirámide de la DM es el vino. Numerosos estudios han mostrado que el consumo moderado de bebidas alcohólicas tendría un efecto protector sobre el sistema cardiovascular. De hecho, en un meta-análisis en el que se incluyeron 51 estudios, se ha calculado una reducción del 20% en el riesgo de CI cuando el consumo es de 0 a 20 gramos de alcohol al día (Corrao G et al, 2000). Estos efectos beneficiosos del consumo moderado de alcohol frente a la CI se han atribuido a un incremento c-HDL, a una disminución de la agregación plaquetaria, a un incremento de la actividad fibrinolítica y/o a una reducción en la resistencia a la insulina. También se ha observado que el consumo moderado de alcohol reduce el riesgo de otras complicaciones vasculares como los ACV o la EVP, e incluso se ha asociado a una menor incidencia de DMT2 y una reducción de casi un 50% en el riesgo de desarrollar una insuficiencia cardiaca. Queda, no obstante, por determinar si existen realmente diferencias atribuidas a las diferentes tipos de bebidas alcohólicas. En muchos estudios, no se ha observado ninguna relación entre los efectos observados y el tipo de bebida consumida, por lo que los efectos beneficiosos del consumo moderado de bebidas alcohólicas se atribuyen al etanol (Hines LM et al, 2001; Mukamal KJ et al, 2003). No obstante, en otros estudios que incluyen un meta-análisis (Di Castelnuovo A et al, 2002), numerosos estudios epidemiológicos (Rodríguez F et al, 1998; Estruch R, 2000), ensayos clínicos (Blanco-Colio LM et al, 2000) y trabajos de laboratorio (Corder R et al, 2001) se ha observado que el vino tinto podría tener efectos beneficiosos adicionales sobre el sistema cardiovascular. Estos efectos beneficiosos se han atribuido especialmente a su alto contenido en polifenoles.

Por otro lado, los cereales constituyen también uno de los alimentos básicos de la DM tradicional, contribuyendo en gran medida al aporte calórico total. Son una excelente fuente de carbohidratos, fibra dietética y proteína, y son ricos en vitaminas del grupo B, vitamina E y un gran número de minerales principalmente

hierro, zinc, magnesio y fósforo. En el caso de los cereales integrales se han identificado un gran número de sustancias fotoquímicas como fitoestrógenos y diferentes antioxidantes. En los cereales refinados el contenido de todos estos micronutrientes disminuye como resultado del proceso de desprendimiento del germen y salvado (Slavin J et al, 2000). Estudios que evalúan la relación entre el consumo de cereales integrales y ECV, han observado que los individuos que consumen mayor cantidad de este grupo de alimentos presentan un menor riesgo (del orden del 20%-40%) de padecer estas enfermedades. También, el consumo de cereales integrales se ha asociado a un menor IMC y una mayor sensibilidad a la insulina. La evidencia indica que este efecto protector podría explicarse por su contenido en antioxidantes, fitoestrógenos y especialmente su alto contenido en fibra (Jacobs J et al, 2004).

También las frutas y las verduras son alimentos bajos en grasas y ricos en nutrientes y fibra cuyo consumo debe ser diario (Willet W et al, 1995, SENC, 2004). Existe evidencia de que personas que consumen más frutas y verduras tienen una menor prevalencia de FR cardiovascular como HTA, obesidad y DMT2 y descensos de c-LDL y oxidación de las partículas de LDL (Bazzano LA et al, 2003, Djousse L et al, 2004, Liu RH 2003) y menor riesgo de CI e ictus (Liu S et al, 2000, Lock K et al, 2005). Este beneficio puede derivarse de su compleja composición y de la riqueza de sustancias que contienen como son la fibra soluble e insoluble, esteroides, indoles, carotenoides, vitamina C, flavonoides, folatos, magnesio y potasio. Se han detectado efectos beneficiosos de algunos nutrientes presentes en frutas y verduras de manera aislada, como el magnesio sobre la DMT2 (López-Ridaura R et al, 2004) o el nitrato inorgánico sobre la capacidad vasodilatadora y antiaterogénica del endotelio (Lunberg JO et al, 2006), pero se ha propuesto que la acción protectora frente a la aparición FR cardiovascular y ECV es debido al efecto sinérgico de los nutrientes y fotoquímicos presentes en frutas y verduras (Liu RH 2003).

Las legumbres que incluyen lentejas, garbanzos, judías, guisantes y habas (en los países mediterráneos), son ricas en proteína, siendo mayor su contenido que en el de los cereales. Esta fuente importante de carbohidratos y proteínas de origen vegetal también aporta cantidades considerables de fibra, niacina y ácido fólico. Además, se ha visto que dado su alto contenido en fitosteroides e isoflavonas podría contribuir a reducir los niveles de colesterol y reducir el riesgo de ciertas enfermedades crónicas. Por ejemplo, el consumo frecuente de legumbres se ha relacionado con un menor riesgo de desarrollar CI (Flight I et al, 2006).

Por otro lado, se ha observado una relación inversa entre el consumo de pescado y la aparición de ECV (He K et al, 2004, Panagiotakos DB et al, 2005) y un efecto beneficioso sobre los marcadores de inflamación (Zampelas A et al,

2005). En un análisis cuantitativo, el consumo de pequeñas cantidades de pescado se asoció a un 17% de reducción del riesgo de mortalidad por causa coronaria, con una disminución adicional de un 3,9% por cada ración de pescado añadida semanalmente (Konig A et al, 2005). El pescado aporta una cantidad importante de AGP n-3 (ácido eicosapentaenoico y ácido docosahexaenoico), que se han asociado con una reducción de la concentración plasmática de TG, la lipemia postprandial y la concentración de LDL pequeñas y densas, la presión arterial, obesidad, resistencia a la insulina, DMT2 y con un efecto antiagregante plaquetario (Roche HM et al, 2000, Alonso A et al, 2003, Flachs P et al, 2009, Kopecky J et al, 2009, Nettleton JA et al, 2005, Rudkowska I, 2010).

Otros alimentos, aunque se incluyen en el patrón de DM, deben consumirse de manera prudente o excepcional. Las carnes son alimentos ricos en proteínas de alto valor biológico, de modo que, deben formar parte de una dieta sana y equilibrada, pero su consumo debe ser prudente debido a su alto contenido en AGS (Willet W et al, 1995, SENC, 2004). Se ha mostrado que los AGS aumentan los niveles de CT y c-LDL, la oxidación de las LDL, la tensión arterial y el riesgo de enfermedad aterotrombótica (Lahoz C et al, 2000, Mensik RP et al, 2003). Pero no todas las carnes presentan la misma composición grasa. Las carnes con menor aporte grasa (entre un 13%-15%) y, por tanto, más recomendables son las de pollo, pavo y conejo (Plaz Pérez I et al, 2000, Mata P et al, 1994). Las carnes rojas, como la de cerdo o ternera, contienen entre un 22-26% de grasa y los embutidos derivados del cerdo (chorizos, longanizas, morcilla, salchichón) por su elevado aporte grasa y calórico deben consumirse de manera excepcional (Mata P et al, 1994). De hecho, se ha mostrado que un consumo elevado de carnes rojas y/o procesadas puede incrementar el riesgo de ictus (Fung TT et al, 2004(b)) de HTA (Stefen LM et al, 2005) y de DMT2 (Murakami K et al, 2005, Fung TT et al, 2004(a), van Dam RM et al, 2002).

La repostería, pastelería y bollería industrial debe consumirse de manera ocasional por su alto contenido en AGS y azúcares simples (Willet W et al, 1995, SENC, 2004). Los AGS provienen de mantequillas o margarinas, así como de la utilización de aceites de palma o coco para su elaboración. En la pastelería y bollería industrial y, en otros alimentos como margarinas duras, productos fritos tipo aperitivo u otros alimentos precocinados, se han detectado cantidades considerables de grasas trans, producidas a partir de la hidrogenación parcial de los ácidos grasos (Carbajal A et al, 2000). Las grasas trans han mostrado múltiples efectos perjudiciales relacionados con el riesgo cardiovascular. Aumentan los niveles plasmáticos de c-LDL y TG y reducen del c-HDL (Mensink RP et al, 2003, Katan MB et al, 1995), deterioran la función endotelial (De Roos NM et al, 2002) e incrementan la producción de citocinas inflamatorias (Han SN et al, 2002). También promueven la resistencia a la insulina (Bray GA et al, 2002) e

incrementan el riesgo de desarrollar DMT2 (Salmeron J et al, 2001). Además, la pastelería y bollería industrial, así como bebidas carbonatadas y/o azucaradas contienen carbohidratos simples o azúcares que pueden contribuir al desarrollo de sobrepeso y obesidad y al aumento del riesgo cardiovascular cuando se incrementa su consumo (Flight I et al, 2006).

Por otro lado, un aspecto importante que se ha constatado en estudios de intervención es que la DM posee mayor palatabilidad y aceptación que una dieta baja en grasa, característica esencial a la hora de su cumplimiento a largo plazo (McManus K et al, 2001). Así pues, este aspecto, junto con los efectos beneficiosos que posee, cabría plantearse la necesidad de considerar la alimentación mediterránea clásica o, al menos, una alimentación tipo mediterráneo como una *Intervención Preventiva de Salud Pública*. Para poder realizar recomendaciones a la población se precisan estudios con el mayor grado de evidencia científica. El mayor grado de evidencia científica se obtiene en los ensayos clínicos con distribución aleatoria. Los estudios de series basadas en controles coetáneos o históricos, los estudios de casos y controles y los análisis de bases de datos existentes tienen menor valor (Sackett DL et al, 1995).

Hasta el momento actual, predominan los estudios observacionales y muy pocos estudios han analizado la eficacia de una intervención con una alimentación de tipo mediterráneo. Entre ellos merece destacar el *Lyon Diet Heart Study* (de Lorgeril et al, 1999). Es un estudio aleatorizado de intervención en el que se demuestra la eficacia de una DM más clásica frente a una dieta occidental prudente, en la prevención secundaria de la ECV. A pesar de ello, fueron puestas de relieve limitaciones metodológicas al interpretar y tratar de generalizar los resultados de este ensayo puesto que el grupo de intervención con DM recibió una margarina rica en ácido α -linolénico, alimento no tradicional de los países mediterráneos (Kris-Etherton P et al, 2001, Roberston RM et al, 2001). Algo parecido ocurre con el Indo-Mediterranean Diet Heart Study otro prestigioso estudio en prevención secundaria (Singh RB et al, 2002). Entre los estudios realizados en prevención primaria destaca el Medi-Rivage (Mediterranean Diet, cardiovascular Risks, Gene Polymorphism). Se trata de un ensayo clínico aleatorizado llevado a cabo en Francia, en 212 mujeres y varones con, al menos, un FR cardiovascular, y su objetivo es evaluar el efecto de 2 tipos de dieta, la DM tradicional y la dieta baja en grasa prescrita por la AHA en la prevención de las ECV, además de investigar mecanismos biológicos en relación con polimorfismos genéticos y metabolismo (Vicent-Baudry S et al, 2005). Con este diseño se están logrando grandes resultados, sin embargo, el tamaño de muestra es limitado.

Así pues, todavía son necesarios más estudios a gran escala que demuestren los beneficios de la DM en comparación con las recomendaciones actuales

centradas en una dieta baja en grasas capaces de proporcionar por su diseño experimental evidencia científica de primer nivel para efectuar recomendaciones dietéticas en la prevención primaria de la ECV.

Con este objetivo se inició, en Octubre del 2003, el reclutamiento de participantes para un ensayo clínico de prevención primaria, el estudio PREDIMED (Estruch R et al, 2006). PREDIMED es el acrónimo de PREvención con DIeta MEDiterránea y responde a un ambicioso proyecto a gran escala, aleatorizado, multicéntrico, de grupos paralelos, financiado por el Instituto de Investigación Carlos III (referencia G03/140), y dirigido a estudiar los efectos sobre el riesgo de complicaciones cardiovasculares mayores, de dos intervenciones dietéticas suplementadas con AOVE o FS, comparado con el efecto de una dieta baja en todo tipo de grasa. Fue diseñado con el propósito de que proporcione evidencias de primer nivel sobre el efecto de la DM en la prevención primaria cardiovascular. El presente trabajo se basa en los datos obtenidos a partir de este proyecto.

Uno de los principales problemas en los estudios epidemiológicos es que la dieta es el factor ambiental más difícil de medir y requiere una metodología bien validada para poder explorar asociaciones entre dieta y enfermedad (Willet C, 1998). En el estudio PREDIMED se utiliza un cuestionario de frecuencia de consumo alimentario (CFCA), uno de los métodos más utilizados en los estudios epidemiológicos (Willet WC, 1998, Jiménez LG et al, 2006) ya que permite obtener información del consumo habitual a largo plazo, incluyendo la influencia de la variabilidad estacional, en poblaciones grandes y, además, es relativamente barato, rápido y fácil de aplicar (Willet WC, 1998, Cade J et al, 2002). Sin embargo, para cuantificar la ingesta absoluta de los alimentos y nutrientes específicos es limitado (Sullivan BL et al, 2008, Ishihara J, et al, 2009). Además, un CFCA debe ser diseñado de manera apropiada para obtener una medida fiable de la dieta en la población específica que va a ser estudiada. De esto modo, el CFCA debe ser sometido a un proceso de validación con el fin de conocer la validez y la reproducibilidad de sus mediciones en la población específica para la que se ha diseñado (Willet WC, 1998)

La reproducibilidad se refiere a la medida en que un instrumento produce iguales resultados cuando se usa repetidamente ante una misma situación teniendo en cuenta que estas condiciones nunca son iguales. Para valorar la reproducibilidad de un cuestionario o la capacidad para medir lo mismo en diferentes momentos es necesario comprobar que existe similitud entre los resultados obtenidos en dos momentos diferentes. La validez se refiere al grado en que un cuestionario mide realmente el aspecto de la dieta para el cual ha sido diseñado. La validez se estudia comparando los resultados obtenidos con el CFCA con los obtenidos por otros

métodos considerados como referencia como son los registros dietéticos y los recordatorios de 24 horas (Willet WC, 1998, Cade J et al, 2002, Jiménez LG et al, 2006)

Así pues, en el estudio PREDIMED se ha realizado la validación del CFCA (Fernández- Ballart JD et al, 2010) y será presentada en este trabajo.

Por otro lado, para evaluar la adherencia a la DM de una población, se utilizan índices de DM en los estudios epidemiológicos. Se trata de índices formados por una serie de ítems que hacen referencia a un alimento o grupos de alimentos seleccionados según la evidencia científica, para obtener el grado de cumplimiento de un patrón de DM tradicional de referencia definido a priori. Los diferentes ítems puntúan de 0 a 1. La máxima puntuación (todos los ítems igual a 1) corresponde con la máxima adherencia al patrón de DM y la puntuación mínima (todos los ítems igual a 0) la mínima adherencia. El número de ítems varía de unos índices a otros, lo que dificulta la comparación entre los diferentes estudios epidemiológicos y, ha puesto de manifiesto la necesidad de consenso (Bach A et al, 2006). En el estudio PREDIMED se ha seleccionado un cuestionario de adherencia a la DM de 14 ítems y se trata de una extensión del cuestionario validado por Martínez-González MA et al (2004)(b).

1.5 Fenotipos finales de ECV

Los fenotipos finales corresponden al propio evento cardiovascular. La aterosclerosis tiende a asentarse en las arterias que irrigan el corazón (coronarias), el cerebro (carótidas, vertebrales y cerebrales) y las extremidades inferiores (ilíacas y femorales) dando lugar a enfermedades isquémicas del corazón, enfermedades cerebrovasculares y enfermedades vasculares periféricas respectivamente. La presencia de afectación vascular en un localización concreta se asocia con un mayor riesgo de desarrollarla en otros lechos vasculares (Viles-González JF et al, 2004).

1.5.1 Enfermedades vasculares periféricas

Corresponden a trastornos de la circulación en los vasos sanguíneos (arterias o venas) que irrigan las piernas y los brazos. Enlentecen el flujo sanguíneo y provocan estrechamiento de los vasos, hinchazón y dolor. Puede causar isquemia.

La formación de trombos es consecuencia de una lesión vascular, la activación del proceso de coagulación y disturbios de la corriente sanguínea. La trombosis

arterial produce trombos ricos en plaquetas (placas ateroscleróticas). La trombosis venosa se produce por el éxtasis sanguíneo y la consecuente activación de la coagulación. Los trombos son ricos en fibrina y hematíes.

La trombosis arterial tiene sus más importantes manifestaciones a nivel del sistema cardiovascular (síndromes isquémicos coronarios) y neurovascular (accidentes cerebrovasculares isquémicos). Si se produce en las extremidades, la expresión clínica es la claudicación intermitente (cuando se presenta de forma crónica) o la isquemia aguda de los miembros inferiores.

Cuando afecta a las venas se forman coágulos de sangre, o trombos, que provocan oclusión y dan lugar a trombosis venosa. Si el trombo formado se desprende, puede transportarse a los vasos de los pulmones y causar defunción por embolia pulmonar.

1.5.2 Enfermedades isquémicas del corazón

Se deben a un estrechamiento progresivo de la luz de las arterias coronarias, causado por la formación de la placa de ateroma. La obstrucción total de la arteria provoca la interrupción de la circulación de la sangre o isquemia. Si este estado se prolonga, se destruye el tejido cardíaco, que da lugar a la zona de necrosis o infarto.

La CI es la base de la casi totalidad de las enfermedades isquémicas del corazón. La CI se puede manifestar como muerte súbita, IAM, angina de pecho, insuficiencia cardíaca congestiva y arritmias. Puede presentarse de forma crónica, por estenosis de la luz arterial, como en el caso de una angina estable o aguda, por la súbita rotura de la placa y la formación de un trombo como ocurre en los síndromes coronarios agudos como IAM o muerte súbita.

1.5.3 Enfermedades cerebrovasculares

Se deben a las alteraciones de la circulación cerebral, también llamadas ACV porque a menudo se presentan de forma súbita provocando un déficit neurológico focal debido a una perturbación del aporte sanguíneo al cerebro.

Se clasifican en isquémicas o hemorrágicas. En las isquémicas se produce una disminución del flujo sanguíneo que llega a alguna región del cerebro, lo que produce necrosis tisular por daño neuronal irreversible dando lugar a infarto cerebral. En las hemorrágicas, existe una extravasación de sangre por rotura de

algún vaso. Las hemorrágicas se dan en aproximadamente 15% de los casos y las isquémicas en el 85%.

1.6 Factores genéticos

La etiología de la CI ha sido objeto de intenso estudio durante las últimas décadas. Dado que los FR clásicos sólo explican a lo sumo la mitad de los casos, se están buscando nuevos factores etiológicos en el ámbito de la genética molecular. La identificación de los genes responsables del aumento del riesgo, sin embargo, está siendo un proceso lento y difícil, acelerado en el última década gracias a los avances de la biotecnología, que han facilitado la detección de los cambios en la secuencia del ADN que pueden tener un efecto patógeno (Eckardstein AV, 2001). Estos cambios, que llamamos mutaciones o polimorfismos, pueden ser muy sutiles: unas veces se trata de la sustitución de un simple nucleótido (un simple aminoácido en la proteína codificada) entre miles (SNP o *single nucleotide polymorphism*); en otras se produce la inserción o deleción de un segmento, o la repetición de unas secuencias en tándem (VNTR, número variable de *tandem repeats*). Puede ocurrir en el exón o segmento codificante, en el intrón o en la zona del promotor del gen. Mutaciones y polimorfismos son, en realidad, palabras sinónimas. Ambos se caracterizan por la coexistencia de dos variedades o alelos del mismo gen, el alelo natural o salvaje (*wild type*) y el alelo mutante. Pero suele reservarse el término de mutaciones para los cambios que alteran gravemente la función de la proteína o enzima codificada y basta un gen para provocar una enfermedad (enfermedad monogénica o mendeliana), como es el caso de la hipercolesterolemia familiar. Son raras y siguen las leyes de la herencia mendeliana, dominante o recesiva. En cambio, se denominan polimorfismos si las variaciones son comunes (por definición ocurren en más del 1% de la población) y la afectación funcional es modesta o mínima, pero supone una minusvalía (un FR genético) cuando el organismo debe enfrentarse con un mayor esfuerzo metabólico o un problema ambiental, como puede ser una dieta rica en colesterol, el estrés, el tabaco, inactividad física (FR ambiental). Muchos polimorfismos, sin embargo, no tienen consecuencia funcional alguna.

Existen 3 formas principales de identificar genes involucrados en el desarrollo de una enfermedad. Por una parte, los estudios de asociación de un gen candidato (una variante genética específica) y una variación fenotípica, con el fin de determinar mediante el análisis estadístico si la enfermedad se relaciona con algún alelo en particular (Clement K, 2002 et al; Rankinen T et al, 2002). El otro método se conoce como el escaneo genómico amplio (genom-wide scan), es un método de genética cuantitativa que intenta detectar regiones cromosómicas (QTL) con significación estadística correlacionada con dicha enfermedad, y finalmente genes

dentro de dichas regiones cromosómicas que son secuenciados para poder identificar la alteración o alteraciones genéticas presentes en individuos con dicha enfermedad y que están ausentes en individuos sanos (Comuzzie AG et al, 2001; Rogers J et al, 1999). La tercera forma de identificar estos genes consiste en el estudio del perfil de expresión génica de los tejidos basándose en la obtención del ARN mediante biopsia de dicho tejido, y comparándola entre individuos sanos y enfermos (Walder K et al, 2003).

Teniendo en cuenta que actualmente se describen cada vez un mayor número de genes candidatos relacionados con el riesgo cardiovascular, así como de polimorfismos en los mismos, resulta complejo realizar una selección de las variantes a analizar. Por ello, se ha realizado una selección muy rigurosa de las variantes a estudiar, fundamentada en un conocimiento exhaustivo de la literatura previa. Este selección se ha centrado fundamentalmente en genes relacionados con metabolismo lipídico, obesidad, DMT2, marcadores de estrés oxidativo y de inflamación y riesgo de ECV. En la elección de variantes genéticas concretas, se ha atendido a su funcionalidad y prevalencia. Así, se propone el estudio de los genes CETP, LPC, LPL, APOE, APOA1, PON1, FTO, PPARG2, PPARGC1 γ , TCF7L2, COX-2, IL-6, MTHFR, NADPH y AMPK. Seguidamente se realiza una breve descripción de cada uno de los genes propuestos y de las variantes genéticas a analizar.

1.6.1 Genes relacionados con el metabolismo lipídico

Gen de la CETP. La CETP es una glicoproteína que facilita el intercambio de TG y ésteres de colesterol entre las partículas lipoproteicas (VLDL y LDL principalmente) estimulando la recuperación de colesterol (Sampietro T et al, 2006). El gen de la CETP se localiza en el cromosoma 16. La variante más común, TaqIB (alelos B1 y B2) (rs708272) está asociada con el descenso de la actividad de la CETP, de sus niveles plasmáticos y con un incremento de HDL (Ordovás JM et al, 2000, Boekholdt SM et al, 2005). Los individuos portadores del alelo B2 son los que presentan menor actividad CETP y por tanto mayores concentraciones de c-HDL. Esta variante está situada en el intrón 1 del gen, por lo que se considera que se encuentra en desequilibrio de ligamiento con la verdadera variante funcional. Se han realizado trabajos de secuenciación y estudios funcionales para lograr caracterizar la variante funcional pero a pesar del descubrimiento de otros polimorfismos en el promotor o que inducen cambio de aminoácido (Tai ES et al, 2003(b)), ninguno ha llegado a explicar al 100% el efecto de la variante Taq1B. Thompson JF et al (2007) mostraron en su estudio que la variante rs183130, en el promotor del gen de CETP, era la más importante para determinar la concentración plasmática de c-HDL y, sin embargo, pocos estudios han analizado el efecto de esta

variante sobre c-HDL. Así pues, en este trabajo se estudiará también la variante -4502 C/T (rs183130) en la región promotora del gen de la CETP.

Gen de la lipoproteinlipasa (LPL). La LPL es la principal enzima del catabolismo de las lipoproteínas ricas en TG, quilomicrones, VLDL e IDL. Tiene dos funciones principales: *a)* cataliza la liberación de los TG de los quilomicrones y VLDL cuando pasan por los capilares y las degrada a remanentes o IDL, y luego a LDL, y *b)* una vez realizada su función enzimática, se desprende de su anclaje en el endotelio y actúa de ligando de las IDL para su captación y eliminación por los receptores hepáticos (Beisiegel U et al, 1991, Otarod JK et al, 2004). El gen que codifica para la LPL se encuentra localizado en el cromosoma 8 y se expresa principalmente en el músculo y en el tejido adiposo. El polimorfismo más estudiado ha sido el HindIII en el intrón 8 del gen, aunque el funcional parece ser la variante Ser447X (rs328) en el exón 9 (Jemaa R et al, 1995). En este polimorfismo se produce un cambio de citosina (C) por guanina (G) lo que provoca la introducción en la secuencia de un codón de parada prematuro en el terminal-C, afectando a la función de la proteína. El alelo 447X ha sido consistentemente asociado con elevada concentración de c-HDL y baja concentración de TG, sin embargo, sus efectos protectores sobre la CI son objeto de mayor variación en la literatura (Rip J et al, 2006). Se considera que ello puede deberse a efectos de género (Wittrup HH et al, 2002) o de la dieta (Ukkola O et al, 2002).

Gen de la apolipoproteína E (APOE). La ApoE es una glicoproteína que interviene en el catabolismo de las proteínas ricas en TG (quilomicrones remanentes y VLDL) actuando como ligando para receptores de LDL (Mahley RW et al, 1984) y en la homeostasis del colesterol (Utermann G, 1987). El gen de ApoE se encuentra en el cromosoma 19 y presenta un polimorfismo común que da lugar a tres variantes principales: la ApoE 3 es la isoforma natural, la más común y se distingue por presentar una cisteína (Cys) en la posición 112 (rs429358) y una arginina (Arg) en la posición 158 (rs7412), la ApoE 2 en la que se ha sustituido Arg por Cys en la posición 158, y la ApoE 4 que cambia Cys por Arg en posición 112 (Weisgraber et al, 1981). El alelo E2 se ha asociado con menor concentración de c-LDL y el E4 se asocia con mayor concentración de c-LDL y de sufrir ECV (Davignon J et al, 1988; Wilson PWF et al, 1994; Gerdes LU et al, 2000). La relación entre el alelo E4 y la CI es de las más firmes (Wilson PWF et al, 1996, Gerdes LU et al, 2000, Frikke-Schmidt R et al, 2000). Las asociaciones de estos alelos con HDL y TG son controvertidas y dependientes de la población estudiada (Frikke-Schmidt R et al, 2000).

Gen de la lipasa hepática (LIPC). La lipasa hepática (LH) es un enzima clave en el metabolismo del c-HDL. El gen de LH se localiza en el cromosoma 15q21 y en la región promotora de dicho gen se han detectado cuatro polimorfismos (-763 A/G,

-710 T/C, -514 C/T, -250 G/A) que se encuentran en desequilibrio de ligamiento. La variante -514C/T (rs1800588) es la que se utiliza para estudiar este haplotipo y se ha asociado el alelo T con menor actividad LH y mayores concentraciones de c-HDL, lo que confiere un perfil lipoproteico más cardioprotector (Janse H et al, 1997, Guerra R et al, 1997, Zambón A et al, 1998). Sin embargo, también se ha descrito que una menor actividad LH puede ser considerado un nuevo FR cardiovascular, a pesar de su asociación con concentraciones elevadas de c-HDL (Dugi KA et al, 2001). Esta aparente controversia podría ser explicada por la interacción con algún factor ambiental o genético. De hecho, se han encontrado importantes resultados acerca del efecto de la dieta sobre la relación entre el polimorfismo -514C/T y las concentraciones plasmáticas de c-HDL (Ordovás et al, 2002(b), Tai et al, 2003).

Gen de ATP-Binding Cassete 1 (ABCA1). La proteína ABCA1 pertenece a la familia de los transportadores de membrana e interviene en la salida del colesterol de las células al exterior donde se transfiere a las partículas de HDL nacientes en el transporte reverso del colesterol (Assmann G et al, 2004, Corella D et al, 2005, Sampietro T et al, 2006). La confirmación de que la enfermedad de Tangier, una enfermedad mendeliana rara que cursa con niveles muy bajos de c-HDL y CI prematura, se debe a una mutación del gen de ABCA1 propició la búsqueda de polimorfismos comunes que puedan influir en el riesgo coronario (Lusis AJ et al, 1998). El gen de ABCA1 se encuentra en el cromosoma 9 y en el se ha descrito la variante R219K (también G1051A, rs2230806), que implica un cambio de aminoácido arginina por lisina y se ha asociado con menores concentraciones de TG, mayores concentraciones de c-HDL y menor riesgo de ECV en población europea (Clee SM et al, 2001).

Gen de paraoxonasa 1 (PON1). La PON1 es una enzima antioxidante presente en la partícula de HDL. Concretamente, es una éster hidrolasa capaz de frenar el proceso oxidativo de las LDL, por lo que se piensa que puede desempeñar un papel relevante en la etiopatogenia de la aterosclerosis (Hegele RA, 1999). El gen de la PON1 se encuentra en el cromosoma 7 y presenta algunas variantes de interés: una de ellas es originada por la sustitución arginina por glutamina en el codón 192 (Q192R, rs662) (Adkins M et al, 1993), y es considerada como el determinante mayor de la actividad sérica de la paraoxonasa (Mackness B et al, 1999). Varios estudios se han centrado que analizar la asociación entre este polimorfismo y riesgo de ECV y los resultados son contradictorios (Mackness B et al, 2001, Lawlor DA et al, 2004, Wheeler JG et al, 2004, Tomas M et al, 2004). Aunque 3 metaanálisis han concluido que el alelo R del polimorfismo Q192R tiene relación, débil pero significativa, con incremento del riesgo de CI, (Mackness B et al, 2001, Wheeler JG et al, 2004, Tomas M et al, 2004) otros estudios llevados a cabo en Europa (Aubó C et al, 2000), EEUU (Turban S et al, 2001) y Japón (Suehiro T et al, 1996)

mostraron una tendencia aumentada de CI en los individuos con genotipo QQ. Esta discrepancia hace necesario el estudio de posibles factores que puedan influir en la actividad de PON1 y en el efecto del polimorfismo Q192R.

Gen de la apolipoproteína A1 (APOA1). La ApoA1 es la apolipoproteína mayoritaria de la molécula de HDL y es el principal activador de la LCAT. Por lo tanto, el locus de ApoA1 es candidato para estudiar la variabilidad genética de los niveles de c-HDL. El gen de ApoA1 está situado en el cromosoma 11 y forma un cluster con los loci de ApoCIII y ApoAIV (Karathanasis SK et al, 1985). La proteína ApoA1 juega un papel central en el metabolismo lipídico y en el riesgo de ECV (Segrest JP et al, 2000). Se ha descrito el polimorfismo -75G/A (rs670) en el promotor del gen de ApoA1 y ha sido ampliamente estudiado. En 1990, se mostró que esta variante se asociaba con niveles plasmáticos de ApoA1 y de c-HDL (Jeenah M et al, 1990) y que los individuos portadores del alelo A presentaban mayores niveles que los homocigotos GG (Pagani F et al, 1992). Posteriores estudios que han examinado esta asociación han mostrado resultados contradictorios. Juo SHH et al (1999) mostró esta falta de consistencia en un metaanálisis. La influencia de factores ambientales que modulen el efecto de este polimorfismo pueden explicar estas discrepancias.

1.6.2 Genes relacionados con obesidad

Gen de FTO (fat mass and obesity associated). El gen de FTO, descubierto recientemente, se localiza en el cromosoma 16 y codifica para la 2-oxoglutarato demetilasa dependiente de ácido nucleico, que se expresa en el hipotálamo y en el tejido adiposo y cuyas funciones in vivo no son bien conocidas (Gerken T et al, 2007). Diversos estudios, entre los que se incluyen estudios de asociación a escala genómica, han mostrado una fuerte asociación entre obesidad y fenotipos relacionados con la obesidad tales como porcentaje de grasa corporal, IMC, perímetro de cintura y cadera, peso corporal y diversos polimorfismos en el gen de FTO (Frayling TM et al, 2007, Dina C et al, 2007, Scuteri A et al, 2007). La variante más estudiada es rs9939609 y representa a un cluster de 10 polimorfismos localizados en el primer intrón del gen de FTO (Frayling TM et al, 2007). Los polimorfismos rs1861868 y rs3751812 del gen de FTO también se estudiarán en este trabajo. Ambos han mostrado una fuerte influencia sobre IMC y obesidad dentro del locus de FTO (Grant SFA et al, 2008, Dina C et al, 2007, Rampersaud E et al, 2008).

1.6.3 Genes relacionados con DMT2

Receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPAR). Son una familia de receptores nucleares que, una vez activados por ligandos específicos, actúan como factores de transcripción que modulan la expresión de diversos genes. Dicha familia incluye tres subtipos α , β y γ (G). El gen del PPARG, localizado en el cromosoma 3, se expresa fundamentalmente en tejido adiposo y se han identificado tres isoformas. Una de ellas, PPARG2, está implicada en la modulación de la homeostasis de la glucosa y adipogénesis y su variante Pro12Ala (rs1801282), ha despertado un gran interés por su asociación con lípidos plasmáticos, obesidad, DMT2 y síndrome metabólico (Deeb SS et al, 1998, Ek J et al, 1999, Meirhaeghe A et al, 2000, Robitaille J et al, 2003, Ochoa MC et al, 2004(b)). La variante 12Ala se ha propuesto como protectora frente a DMT2 pero los resultados son muy heterogéneos, de modo que se ha realizado diversos estudios para analizar la posible modulación ambiental en dicha asociación (Luan J et al, 2001, Scachi R et al, 2007). También el alelo 12Ala se ha asociado con un menor riesgo de IAM en el *Physicians Health Study* (Ridker PM, 2003).

Gen del coactivador-1 del PPAR γ (PPARGC1 γ). PPARGC1 γ es un coactivador transcripcional potente de receptores nucleares como PPAR α y PPAR γ y controla la transcripción de genes implicados en la termogénesis adaptativa, adipogénesis, metabolismo oxidativo, la gluconeogénesis hepática (Puigserver P et al, 1998, Wu Z et al, 1999, Yoon JC et al, 2001, Puigserver P et al, 2003). También, se ha observado que el gen PPARGC1 γ tiene un papel importante en la respuesta metabólica al ejercicio (Baar K et al, 2002). Dada su función en el metabolismo energético este gen se ha propuesto como gen candidato para la DMT2 y fenotipos intermedios. En este sentido, la asociación entre el polimorfismo Gly482ser (rs8192678) descrito en este gen y la DMT2 ha sido ampliamente estudiada dando resultados conflictivos (Ek J et al, 2001, Hara K et al, 2002, Lacquemant C et al, 2002, Muller YL et al, 2003, Barroso I et al, 2003, Nelson TL et al, 2007(b)). En el metanálisis realizado por Barroso I et al (2006) se muestra un efecto modesto del polimorfismo Gly482Ser sobre el riesgo de DMT2. Esta variante también ha sido asociada con resistencia a la insulina (Hara K et al, 2002), obesidad en mujeres (Esterbauer H et al, 2002), HTA en hombres (Oberkofler H et al, 2003), metabolismo lipídico y secreción de insulina (Muller YL et al, 2003, Vohl MC et al, 2005).

Gen de transcriptional factor 7- like 2 (TCF7L2). Este gen se ha descubierto recientemente (Grant SF et al, 2006), se encuentra localizado en el cromosoma 10 y se expresa en diferentes órganos como intestino, páncreas (Lyssenko V et al, 2007, Jin T et al, 2008) y tejido adiposo (Ahlzem M et al, 2008). Codifica para TCF4, un factor de transcripción que contiene la caja HMG (High Mobility Group)

y que está implicado en la ruta de señalización mediada por Wnt. TCF4 se une a β -catenina y este complejo induce la expresión de genes diana implicados en el desarrollo pancreático (Papadopoulou S et al, 2005) y en la homeostasis de la glucosa, tales como genes que expresan incretinas en células enteroendocrinas, que potencian la secreción de insulina en células β pancreáticas (Yi F et al, 2005, Lyssenko V et al, 2007). Variaciones en el gen TCF7L2 como rs7903146, rs7901695, rs12255372 han sido consistentemente asociadas con DMT2 en diferentes poblaciones de origen caucásica (Grant SF et al, 2006, Scott LJ et al, 2006, Groves CJ et al, 2006, Humphries SE et al, 2006, Zhang C et al, 2006), asiática (Chandak GR et al, 2007, Horikoshi M et al, 2007, Hayashi T et al, 2007) y africana (Humphries SE et al, 2006, Helgason A et al, 2007). Los 3 polimorfismos se encuentran en zona intrónica. De todos ellos, el polimorfismo rs7903146 es el que más fuertemente se asocia (Cauchi S et al, 2007). El efecto de la mutación sobre la función y regulación de TCF7L2, que conduce a mayor susceptibilidad de DMT2, no está claramente definido. Se ha observado que este polimorfismo se asocia con el efecto sobre la capacidad de secreción de insulina por parte de las células β y no tanto con la resistencia a la insulina (Saxena R et al, 2006, Florez JC et al, 2006).

1.6.4 Genes relacionados con marcadores de inflamación

Gen de la ciclooxigenasa 2 (COX-2). La COX-2 es un enzima clave en el metabolismo de los eicosanoides, particularmente en la conversión de ácido araquidónico a metabolitos como prostaciclina, tromboxano A2 y prostaglandina, los cuales tienen múltiples funciones implicadas en la homeostasis vascular (Bishop-Bailey et al, 1998). La isoforma 2 se expresa fundamentalmente en los lugares de inflamación y sus concentraciones están aumentadas en los estados patológicos de inflamación crónica (Vane Jr et al, 1994, Mitchell JA et al, 1995). Papafili A et al (2002) y Cipollone F et al (2002) identificaron una nueva variante en la región promotora del gen de COX-2, -765G/C (rs20417) que provoca un cambio de guanina a citosina en la posición -765 y un marcado descenso (30%) de actividad del promotor en comparación con el alelo -765G (Papafili A et al, 2002). El alelo -765C también se ha asociado con menor concentración de PCR, IL-6 y otros marcadores de inflamación y menor riesgo de ECV (Papafili A et al, 2002, Cipollone F et al, 2004, Orbe J et al, 2006, Colaizzo D et al, 2006, Kohsaka S et al, 2008).

Gen de la interlequina 6 (IL-6). La IL-6 es un citocina implicada en el inicio de la respuesta inflamatoria ante un estímulo dañino y además, es un importante regulador de la síntesis de proteínas de fase aguda como PCR (Gauldie J et al, 1989, Castell JV et al, 1990). Así pues, alteraciones en el gen de IL-6 pueden

contribuir a variaciones en la concentración plasmática de marcadores de inflamación. El gen de IL-6 se localiza en el cromosoma 7 y se ha descrito un polimorfismo, -174G>C (1800795), en el promotor, que ha sido ampliamente estudiado y se ha asociado con incremento de IL-6 y PCR, incremento de resistencia a la insulina y mayor riesgo de ECV en portadores del alelo C en varios estudios (Humphries SE et al, 2001(a), Mayosi BM et al, 2005, Herbert A et al, 2005, Mysliwska J et al, 2006). Sin embargo, los resultados son controvertidos sugiriendo que factores ambientales pueden influir en el efecto de dicho polimorfismo (Sie MP et al, 2006, Qi L et al, 2006).

1.6.5 Genes relacionados con marcadores de estrés oxidativo

Gen de la proteína p22phox (CYBA). La proteína p22phox es componente del sistema NADPH oxidasa en las células endoteliales y desempeña un papel muy relevante en la producción de O_2^- (Ushio-Fukai M et al, 1996). El incremento de la producción de ROS y de la actividad de p22phox se ha asociado con desarrollo de aterosclerosis (Sorescu D et al, 2002). El gen que codifica para p22phox se localiza en el cromosoma 16. Se ha descrito un polimorfismo en el exón 4 de este gen, C242T (rs4673), que es considerado relevante por los cambios funcionales que produce en la proteína ya que implica un cambio de aminoácido histidina por tirosina en la posición 72 (Soccio M et al, 2005). Se ha observado que el alelo T disminuye la producción de O_2^- en la pared vascular y mejora la función endotelial, por lo que reduce el riesgo de ECV (Inoue N et al, 1998, Schächinger V et al, 2001) aunque los resultados realizados en otros estudios, en diferentes poblaciones, son contradictorios (Di Castelnuovo A et al, 2008). Esta variante también ha mostrado influencia en las concentraciones de marcadores del estrés oxidativo (Nakano T et al, 2003, Arca M et al, 2008) y se ha asociado con menor riesgo de HTA (Moreno MU et al, 2006).

1.6.6 Otros

Gen de la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR). La MTHFR cataliza la reducción de 5,10 metileno tetrahidrofolato (THF) a 5-metil THF, forma primaria de folato sérico y cosustrato para la remetilación de homocisteína a metionina. Si falla la enzima, se produce un incremento de homocisteína, aminoácido con propiedades aterogénicas y protrombóticas, con el consiguiente aumento de riesgo de trombosis venosa o arterial (Boushey CJ et al, 1995). El gen de la MTHFR, instalado en el cromosoma 1, consta de 11 exones. En el exón 4, en la posición 677, existe un polimorfismo que implica un cambio C por T (C677T, rs1801133) y, por lo tanto, un cambio de aminoácido alalina por valina en la posición 222 de la

proteína (Frosst P et al, 1995). La alteración produce una versión termolábil de la enzima que presenta menor actividad con lo que se incrementa los niveles plasmáticos de homocisteína (Kang SS et al, 1988). En estudios epidemiológicos se ha observado que los individuos homocigotos TT presentan mayor riesgo de hiperhomocisteinemia y de ECV, sobretodo en aquellos que tienen una ingesta baja de ácido fólico (Kluijtmans LAJ et al, 1996, Ma J et al, 1996). Esta modulación del riesgo de ECV por el aporte de ácido fólico en la dieta puede explicar los inconsistentes resultados obtenidos al estudiar el riesgo de IAM (Klerk M et al, 2002).

Genes de AMP-activated protein kinase (AMPK). La AMPK es un enzima clave en la regulación del balance energético a nivel sistémico ya que actúa en varios órganos como músculo esquelético, hígado, tejido adiposo, corazón e hipotálamo (Miranda N et al, 2007). Se activa por un aumento en la relación AMP/ATP indicativo de que la energía celular está comprometida como puede ocurrir cuando se realiza ejercicio físico o se produce estrés celular por diferentes motivos como privación de glucosa, isquemia o estrés oxidativo (Winder WW et al, 1996, Hardie DG et al, 2004). Cuando se activa la AMPK se fosforilan una serie de enzimas involucradas en procesos de anabolismo para prevenir el consumo de ATP como síntesis de AG, de colesterol, de proteínas y gluconeogénesis, y en procesos de catabolismo para aumentar la generación de ATP como captura y oxidación de AG, glucólisis y captura de glucosa (Miranda N et al, 2007). La AMPK es un complejo heterotrimérico que consta de subunidades α , β y γ . La subunidad α es catalítica y reguladora y presenta dos isoformas $\alpha 1$ y $\alpha 2$, y las subunidades β y γ son únicamente reguladoras y presentan 2 ($\beta 1$ y $\beta 2$) y 3 ($\gamma 1$, $\gamma 2$, y $\gamma 3$) isoformas respectivamente (Gao G et al, 1996, Stapleton D et al 1997). Las diferentes subunidades están codificadas por diferentes genes localizados en cromosomas diferentes (Stapleton D et al 1997). Las subunidades $\alpha 2$ y $\beta 2$ se encuentran en el cromosoma 1, $\beta 1$ y $\gamma 1$ en el cromosoma 12, $\gamma 2$ en el cromosoma 7 y $\gamma 3$ en el cromosoma 2. Dado el papel de la AMPK en el control de la homeostasis energética, alteraciones en los genes de las diferentes subunidades pueden alterar la función de AMPK y predisponer a enfermedades como obesidad, resistencia a la insulina o DMT2 (Winder WW et al, 1999). Existen pocos estudios que hayan analizado la asociación entre variantes en los genes de subunidades de AMPK y obesidad, DMT2 o metabolismo lipídico y los resultados que se han obtenido son contradictorios (Xu N et al, 2005 Sun MW et al, 2006, Horikoshi M et al, 2006, Spencer-Jones NJ et al 2006, Weyrich P et al, 2007, Keshavarz P et al, 2008). En este trabajo se estudiarán diversos polimorfismos de genes de subunidades de AMPK: rs2796495 de la subunidad $\alpha 2$ (PRKAA2), rs4213 de la subunidad $\beta 1$ (PRKAB1), rs1036852 de la subunidad $\beta 2$ (PRKAB2), rs2293445 de la subunidad $\gamma 1$ (PRKAG1), rs8961 de la subunidad $\gamma 2$ (PRKAG2) y rs1467320 de la subunidad $\gamma 3$ (PRKAG3).

1.6.7 Desequilibrio de ligamiento entre loci polimórficos

Con frecuencia son varios los polimorfismos que se analizan simultáneamente en un gen o región candidata de un gen. El motivo es que el polimorfismo realmente responsable de influir o modificar el riesgo de la enfermedad puede ser desconocido, por ello se analizan varios polimorfismos para intentar identificarlo. Entre diferentes polimorfismos localizados en el mismo cromosoma y relativamente próximos entre sí suele observarse cierto grado de correlación o asociación estadística denominada desequilibrio de ligamiento (*linkage disequilibrium*) (Costa J, 2005, Iniesta R et al, 2005). Ello es debido a que en el proceso de meiosis que genera los gametos, los cromosomas que se transmitirán serán copias exactas de los del progenitor, a excepción de los entrecruzamientos que generan recombinación. Es decir, cada cromosoma transmitido a la descendencia estará formado por una composición de fragmentos largos que son una copia exacta de los del progenitor, pero combinando partes del cromosoma paterno y del materno. La frecuencia de entrecruzamientos por cromosoma es pequeña, de 1 a 4, y depende de su tamaño. La probabilidad de que entre 2 loci cercanos se dé una recombinación es baja y, por ello, se observa el desequilibrio de ligamiento, que tiende a disminuir en sucesivas generaciones hasta llegar al equilibrio (independencia estadística) (Iniesta R et al, 2005).

El desequilibrio de ligamiento es muy útil, pues permite localizar polimorfismos relacionados con la enfermedad. Si aparece una mutación que genera un polimorfismo responsable de la enfermedad, es posible que otros polimorfismos cercanos también estén asociados con ella. De hecho, como lo que se transmite de padres y madres a sus hijos son cromosomas, suele ser interesante identificar el conjunto de alelos que se transmiten conjuntamente en cada cromosoma, de manera que sea más fácil así identificar el polimorfismo causal. A este conjunto de alelos que se transmiten conjuntamente se le denomina haplotipo (Costas J, 2005, Iniesta R et al, 2005).

Existen varias medidas de desequilibrio de ligamiento entre un par de polimorfismos (Weiss KM et al, 2002, Zondervan Kt et al, 2004). La más simple es D (coeficiente de desequilibrio) que mide la diferencia entre las frecuencias de haplotipos observadas y las esperadas a partir de las frecuencias individuales de cada alelo. Así, considerando el SNP A con variantes A1 y A2 con frecuencias $f(A1)$ y $f(A2)$ y el SNP B con variantes B1 y B2 con frecuencias $f(B1)$ y $f(B2)$:

$$D = f(A1B1) - f(A1)f(B1)$$

siendo $f(A1B1)$ la frecuencia del haplotipo constituido por los marcadores A1 y B1.

Sin embargo, D tiene el inconveniente de que depende de las frecuencias de los distintos alelos, por lo que no es útil para comparar el desequilibrio de ligamiento entre distintas regiones. Por este motivo se han diseñado nuevas medidas entre dos polimorfismos, siendo las más usadas D' y r^2 . D' se calcula ajustando el valor de D en función del máximo o mínimo valor que puede alcanzar a las frecuencias alélicas concretas: $D' = D/D_{\max}$ si $D > 0$, o $D' = D/D_{\min}$ si $D < 0$. Su valor oscila entre -1 y 1. r^2 es el coeficiente de correlación entre los dos loci y se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$r^2 = D^2 / f(A1) f(B1) f(A2) f(B2)$$

Su valor está comprendido entre 0 y 1. r^2 es una medida más restrictiva que D' (Balding DJ, 2006). Así, si el alelo de menor frecuencia de un polimorfismo está siempre asociado a uno de los dos alelos del otro polimorfismo, el valor de D' será de 1. En cambio, r^2 sólo será 1 si cada uno de los alelos de un polimorfismo está asociado a un único alelo del otro polimorfismo. Por tanto, las frecuencias del alelo menor son idénticas en los dos polimorfismos y, además se encuentran siempre en el mismo haplotipo (están en fase de acoplamiento). Además, el incremento en tamaño muestral necesario para mantener la potencia estadística si se emplea un polimorfismo marcador en lugar del polimorfismo causal es inversamente proporcional a r^2 . Así, por ejemplo, si en lugar de genotipar el polimorfismo causal, se genotipara un polimorfismo marcador que presentase un valor de $r^2 = 0,5$ con el causal, se precisaría el doble de muestras para mantener la potencia estadística (Zondervan Kt et al, 2004).

Otra medida también utilizada es LOD. Es una medida de la existencia o no de ligamiento entre dos loci. Concretamente, es el logaritmo en base 10 de la probabilidad (*Odds*) de ligamiento entre dos loci. Cuando el valor de LOD ≥ 3 se considera ligamiento establecido (Balding DJ, 2006).

1.7 Interacciones gen-gen

Como se ha mostrado, las ECV y trastornos relacionados con ella como HTA, obesidad y DMT2, son enfermedades poligénicas ya que varios genes influyen sobre un mismo fenotipo. De este modo, se pueden producir interacciones gen*gen que pueden influir en la aparición o no de la enfermedad (Navarro-López F et al, 2002).

Las interacciones gen*gen en la herencia poligénica pueden ser simplemente aditivas o mucho más complicadas. De este modo, los genotipos pueden ejercer una amplificación sinérgica de la susceptibilidad en múltiples *loci*, o el efecto de un

genotipo sobre un *locus* puede ser amortiguado por genotipos en otros *loci*. Así pues, la dificultad en la detección de interacciones gen*gen es un problema común en estudios epidemiológicos (Yang W et al, 2007).

Un ejemplo de interacción gen*gen se ha observado entre el gen de la APOE y la CETP, donde se puede apreciar que el efecto del polimorfismo E2/E3/E4 de APOE en los niveles de HDL, vienen determinados según la variante B1 o B2 del polimorfismo TaqIB de la CETP. Los individuos B1B1-E2 presentan mayores niveles de HDL que los B1B1-E3, y éstos mayores que los B1B1-E4, pero cuando los sujetos son portadores de B2 esta relación se invierte, siendo los B2-E4 los que presentan mayores concentraciones de HDL (Sorlí JV et al, 2006).

Por otro lado, también se han encontrado interacciones gen*gen entre variantes del gen de la CETP (TaqIB y I405V) y el polimorfismo -514 C/T de LIPC (Isaacs A et al, 2007, van Acker BAC et al, 2008). De este modo, se ha observado que los individuos homocigotos de los alelos que se asocian con mayor concentración de c-HDL para los polimorfismos de ambos genes, presentan un marcado aumento en los niveles de c-HDL dando lugar a una interacción gen*gen estadísticamente significativa. Además, curiosamente, dichos individuos no han mostrado menor riesgo de ECV (Isaacs A et al, 2007), e incluso su genotipo ha sido asociado con mayor riesgo de ECV (van Acker BAC et al, 2008).

Descubrir las interacciones gen*gen que modulan un fenotipo concreto propocionará un conocimiento más completo del ámbito metabólico a la vez que una nueva prespectiva respecto a la patogenia de la enfermedad (Ordovás JM et al, 2009).

1.8 Interacciones gen-ambiente

Además de la influencia de las variantes genéticas, la manifestación de la enfermedad requiere a menudo la presencia de un marco ambiental propicio. Así que nos encontramos ante una enfermedad multifactorial como es el caso de la mayoría de las ECV y otros ejemplos que incluyen la obesidad, la HTA, la DMT2 o el cáncer.

Así pues, factores genéticos y ambientales influyen en la etiología de las ECV tanto a nivel de fenotipo intermedio como de fenotipo final (Willett CV et al, 2002). Estos factores no son independientes, sino que actúan de una manera interactiva, lo que da lugar al área de investigación conocida como el estudio de las interacciones gen*ambiente. Las ECV constituyen un buen modelo de estudio de dichas interacciones, no solo a nivel de fenotipos intermedios sino

también de fenotipos finales. El modelo de interacción gen*ambiente propuesto por Talmud PJ (2004) se presenta en la figura 1.16. Este modelo se basa en que en la población existe un rango de perfiles de riesgo genético y cada individuo ocupa una posición en el espectro de riesgo genético que va desde bajo a alto riesgo genético. Igualmente cada individuo ocupa una posición en el espectro de riesgo ambiental según el estilo de vida que elija (ej. Dieta baja en grasa, no fumador hasta fumador con alto consumo de grasa). Sin embargo, los FR ambientales son modificables pero los genéticos no. Este modelo propone que el riesgo de ECV solo ocurre cuando un individuo con elevado riesgo genético adquiere un elevado riesgo ambiental y el riesgo genético y el ambiental por si solos no provocan un evento cardiovascular.

Actualmente, el estudio de las interacciones gen*ambiente es muy importante ya que permite aumentar el conocimiento respecto a la patogenia de las ECV y obtener nuevas evidencias para desarrollar estrategias de prevención individualizadas basadas en la constitución genética de una persona (Subbiah MT et al, 2007).

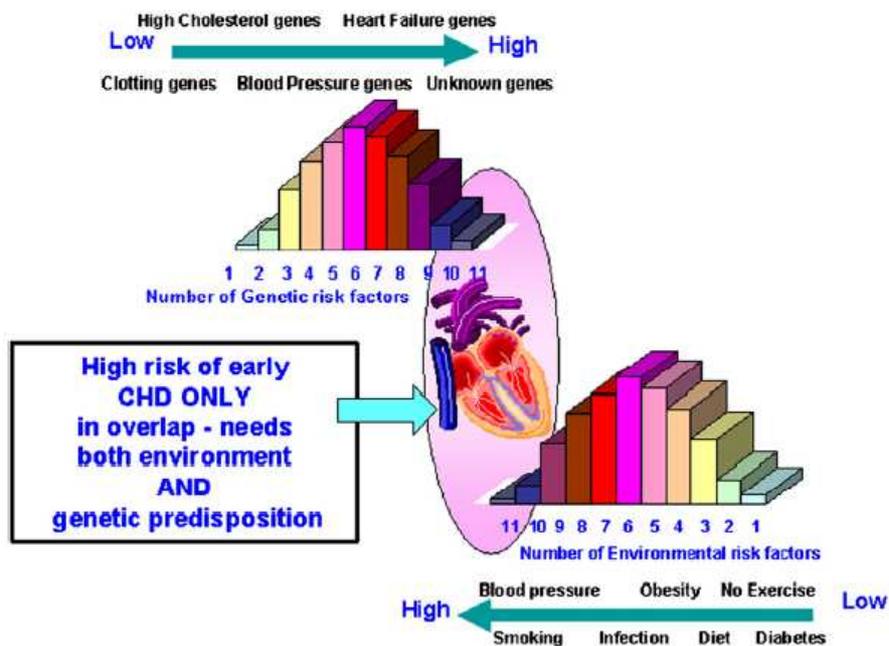


Figura 1.16. Modelo de interacción gen*ambiente propuesto por Talmud PJ, 2004 (figura de Talmud PJ, 2007).

1.8.1 Interacciones entre genes y tabaquismo

El estudio de las interacciones entre los factores genéticos y el tabaquismo ha sido un campo de intensa investigación, principalmente en el ámbito del cáncer y el de las enfermedades neurodegenerativas (Wang XL et al, 2005, Elbaz A et al, 2007) pero, también, ha atraído rápidamente la atención de los investigadores en el campo cardiovascular (Kondo I et al, 1989).

Todos los estudios están respaldados por datos observacionales (Ordovas JM, 2009), como es obvio, y no existen estudios de intervención aleatorizada al respecto. Sin embargo, de entre los diversos factores ambientales, el tabaquismo puede ser el más fiable en cuanto a la validez de lo notificado.

A continuación, se muestran algunos estudios dedicados a analizar interacciones gen-tabaco:

APOE: La interacción entre el polimorfismo E2/E3/E4 del gen de ApoE y el consumo de tabaco ha sido ampliamente estudiada. Así, Humphries SE et al (2001)(b) observaron que el alelo E4 aumentaba de forma relevante el riesgo de CI en hombres fumadores de mediana edad. Además, observaron que en los individuos E4 exfumadores el riesgo de CI era menor poniendo de manifiesto el beneficio de abandonar el hábito tabáquico. También Talmud PJ (2005) mostraron que el aumento de riesgo de CI asociado al alelo E4 solo se observaba en hombres fumadores, sin embargo, en hombres no fumadores no existían diferencias en cuanto al riesgo de CI según el genotipo de ApoE. Se han encontrado también interacciones entre el alelo E4 y el consumo de tabaco sobre el desarrollo de aterosclerosis en la carótida (Djousse L et al, 2002) y el grosor de la capa íntima-media (Karvonen J et al, 2002).

CETP: Goldenberg I et al, (2007), mostraron una interacción entre tabaco y el polimorfismo TaqIB del gen de CTEP y, concretamente, obtuvieron que el tabaquismo fue un FR de primer IAM para individuos B1B1 y B1B2, pero no para los portadores de B2B2.

APOA1: Los investigadores del estudio EARS mostraron que la asociación del polimorfismo -75G/A de este gen con APOA1 y c-HDL, estaba modulada por el consumo de tabaco (Talmud PJ et al, 1994).

LPL: se encontró una interacción entre el polimorfismo S447X y el consumo de tabaco sobre la concentración de c-HDL en mujeres (Lee J et al, 2004).

IL-6: Se encontró una asociación entre el polimorfismo -174G/C del gen de IL-6 y el consumo de tabaco, de modo que, el riesgo de CI asociado al alelo -174C aumentaba de manera significativa en hombres fumadores (Humphries SE et al, 2001(a)).

CYBA: En un estudio realizado por Niemiec P et al (2007), se observó que el riesgo de CI asociado al consumo de tabaco y a la hipercolesterolemia fue mayor en individuos portadores del alelo 242T del polimorfismo C242T de este gen. Además, He MA et al (2007) mostraron que la asociación entre el polimorfismo C242T y riesgo de ECV dependía del hecho de ser fumador o no.

No obstante, aunque la identificación de interacciones entre genes y tabaquismo puede revelar mecanismos fisiológicos interesantes, la utilidad práctica de este conocimiento se ve limitada por el hecho de que la recomendación de salud pública de dejar de fumar, debe hacerse para todas las personas, independientemente de su genotipo (Ordovas JM, 2009).

1.8.2 Interacciones entre genes y actividad física

Durante miles de años, la actividad física ha sido necesaria para la supervivencia; en consecuencia, las vías metabólicas seleccionadas durante la evolución del genoma humano están inevitablemente ligadas a la actividad física. Sin embargo, puede producirse una respuesta de nuestra base genómica ancestral mal adaptada al estilo de vida sedentario actual, que conduzca a una disfunción metabólica y a muchas enfermedades crónicas (Ordovas JM, 2009). La cuestión de las interacciones entre genes y actividad física ha recibido una atención creciente. Algunos ejemplos son los siguientes:

APOE: los resultados obtenidos por Bernstein MS et al (2002) indicaron que un aumento de la actividad física podría compensar los efectos negativos del alelo E4 sobre el perfil lipídico en una población del este de Europa.

CETP: Mukherjee M et al (2004) mostraron que el aumento de c-HDL debido a la actividad física fue mayor en casos y controles con genotipo B1B1 que con B1B2 o B2B2 del polimorfismo TaqIB.

LIPC: Resultados del *Heritage Family Study* (Terán-García M et al, 2005) mostraron que los efectos beneficiosos de 20 semanas de entrenamiento físico sobre la sensibilidad a la insulina fueron mayores en individuos homocigotos CC que en individuos TT para el polimorfismo -514 C/T.

PPARG2: Kahara T et al, (2003) mostraron que el alelo 12Aa del polimorfismo Pro12Aa se asociaba con una mejora en la resistencia a la insulina tras 3 meses de entrenamiento físico en hombres sanos. También, Nelson TL et al (2007)(a) encontraron una interacción entre el polimorfismo Pro12Aa del gen de PPARG con los niveles de actividad física y observaron que en individuos blancos no hispanicos los portadores del alelo Pro12 mostraban un nivel bajo de actividad física lo que da lugar a un aumento del riesgo de DMT2.

PPARGC1A: Ridderstrale M et al (2006) mostraron una interacción entre el polimorfismo Gly482Ser y la actividad física que modulaba el riesgo de obesidad asociado a dicho polimorfismo. Concretamente, el alelo 482Ser se asociaba con un riesgo de obesidad solo en individuos sedentarios, y no en individuos que realizaban alto nivel de actividad física.

FTO: estudios en la población danesa han mostrado que la actividad física puede atenuar el efecto que ejerce la variante rs9939609 del gen de FTO sobre el incremento de IMC (Andreasen CH et al, 2008). Otro estudio reciente ha mostrado resultados similares para el polimorfismo rs1861868 localizado en este mismo gen (Rampersaud E et al, 2008).

1.8.3 Interacciones entre genes y dieta

El efecto que ejercen cambios en los hábitos dietéticos sobre diferentes fenotipos difiere de forma significativa entre individuos (Jacobs DR et al, 1983, Katan MB et al, 1986, Katan MB et al, 1997). Algunos individuos parecen ser relativamente insensibles (hiporrespondedores) mientras que otros presentan una sensibilidad elevada (hiperrespondedores) (Katan MB et al, 1986). Este fenómeno ha sido ampliamente estudiado en el caso de cambios en la grasa de la dieta y concentraciones de lípidos en plasma para prevenir ECV en comparación a otras patologías. Una interacción gen-dieta se produce cuando, mediante una modificación en la cantidad o en la composición de los alimentos ingeridos, podemos regular el riesgo de enfermedad conferido por una mayor susceptibilidad genética (Ordovás JM et al, 2004(b)).

Actualmente, se concede un gran importancia a los componentes de la dieta como moduladores de los efectos genéticos sobre los fenotipos intermedios y finales hasta el punto de desarrollarse una nueva disciplina dedicada al estudio de las interacciones gen*dieta, la nutrigenómica, término utilizado como tal por primera vez por DellaPenna D en 1999. Posteriormente, se distingue entre nutrigenómica, y nutrigenética (Ordovás JM et al, 2004(a), Ordovás JM et al, 2004(c), Corella D et al, 2005). La **Nutrigemónica**, más general, se centra en el

estudio de los mecanismos moleculares y celulares que explican la distinta respuesta fenotípica a la dieta de cada individuo en función de las variaciones en el genoma (genotipo). Así, estudia la interacción entre nutrientes y la expresión génica, la caracterización de nuevas proteínas, sus funciones fisiológicas, así como de sus interacciones con las diferentes concentraciones de nutrientes y de las respuestas específicas a nivel celular y sistémico. La Nutrigenómica incluye la Metabolómica y Biología de Sistemas, la Proteómica, la Genómica comparada, y la Transcriptómica. También, esta ciencia combina distintas tecnologías de la biología molecular, genómica funcional, bioinformática, epidemiología, bioquímica y de la nutrición (Palou A et al, 2004). La **Nutrigenética**, más específica, estudia la distinta respuesta de los individuos a la dieta en función del genotipo. Incluye la identificación y caracterización de variantes genéticas que se relacionen con una respuesta diferente a los componentes de la dieta o a la terapia nutricional para los fenotipos de interés. Su objetivo es generar recomendaciones específicas sobre la mejor composición de la dieta tras la identificación de variantes genéticas para el óptimo beneficio de cada individuo. Se ha denominado también como “nutrición personalizada” o “dieta a la carta”.

Los estudios sobre interacciones entre genes y dieta incluyen investigaciones tanto observacionales como de intervención. El principal problema en los estudios observacionales es el uso de instrumentos que pueden no informar adecuadamente sobre el consumo dietético real del individuo y aunque, normalmente el tamaño muestral es elevado, el nivel de evidencia es menor que el de los estudios experimentales. En cambio, en los estudios de intervención es el número muy reducido de individuos incluidos en cada estudio (Ordovas JM et al, 2006, Mackenbach JP et al, 2007). En el caso de la modulación genética de los efectos de la DM, actualmente, la mayoría de estudios tiene un tamaño muestral pequeño (Ordovas JM et al, 2007), sin embargo, se están desarrollando estudios de intervención que proporcionarán información clave a este respecto (Butriss J et al, 2005, Vicent-Baudry S et al, 2005, Estruch R et al, 2006).

A continuación, se muestran diversos ejemplos de interacción gen*dieta encontradas en varios genes de interés:

MTHFR: estudios han descrito que el riesgo de ECV asociado a la variante C677T es modulado por el aporte de ácido fólico en la dieta, pudiendo explicar esta interacción gen-dieta los inconsistentes resultados obtenidos al estudiar el riesgo de IAM (Klerk M et al, 2002). Además, un estudio mostró que la adherencia a la Dieta Mediterránea se asociaba a la reducción de la concentración de LDL-ox en individuos con genotipo TT y CT pero no con CC para el polimorfismo C677T (Pitsavos C et al, 2006).

CETP: en el estudio ECTIM (Fumeron F et al, 1995) se describió una interacción gen*dieta con el consumo de alcohol modulando el riesgo de ECV en los portadores B2 del polimorfismo TaqIB. Varios estudios posteriores han mostrado dicha interacción sobre c-HDL, c-LDL y riesgo de ECV (Volcik K et al, 2007, Jensen MK et al, 2008, Zhou Y et al, 2008). También, Li TY et al (2007) hallaron una interacción entre el polimorfismo TaqIB y el consumo de grasa en la dieta respecto a la concentración de c-HDL.

LIPC: Se ha descrito una importante interacción entre el polimorfismo -514C/T con la grasa de la dieta en el metabolismo del c-HDL y TG en el Framingham Study (Ordovás JM et al, 2002(b)) y en Singapur (Tai ES et al, 2003(a)). Según la interacción con la grasa de la dieta, los homocigotos TT, sólo presentarían un perfil lipoproteico más cardioprotector cuando la ingestión de grasa en la dieta fuera baja, sin embargo, superado el 30% del aporte calórico por este macronutriente, los homocigotos TT serían los que presentarían un perfil con mayor riesgo cardiovascular. Además, el grupo de Santos JL (2006) realizó una interesante revisión de trabajos europeos en los que se analizan interacciones entre polimorfismos genéticos y nutrientes, pero destaca sobre todo la interacción entre el polimorfismo LH -514C/T y la ingesta de fibra que podría actuar sobre el metabolismo del colesterol y la obesidad (Stefan N et al, 2005). También, Volcik K et al (2007) mostraron que la interacción entre el consumo de alcohol y el polimorfismo -514C/T sobre el metabolismo del c-HDL influye en el riesgo de ECV incidente, en varones negros.

LPL: Los efectos protectores de S447X sobre la CI son objeto de mayor variación en la literatura, sugiriéndose importantes interacciones gen*dieta con esta variante (Ukkola O et al, 2002). Además, se encontró una interacción entre este mismo polimorfismo y el consumo de alcohol sobre la concentración de c-HDL en mujeres (Lee J et al, 2004). También, Volcik K et al (2007) mostraron que la interacción entre el consumo de alcohol y el polimorfismo S447X sobre el metabolismo del c-HDL influye en el riesgo de ECV incidente en varones negros.

APOE: Tras observar la asociación del alelo E4 con mayores concentraciones de c-LDL y riesgo de ECV (Wilson PWF et al 1994), se han descrito distintas interacciones gen*dieta en dicho gen, incluyendo tanto el consumo de alcohol (Corella D et al, 2001(b)), como el aporte de grasa (Masson LF et al, 2003). Así, en una revisión sistemática, se sugería que los portadores del alelo E4 tendrían una mayor respuesta lipídica a la grasa de la dieta, por lo que serían los más respondedores a su aumento o disminución (Masson LF et al, 2003).

APOA1: Se ha descrito, en la cohorte de Framingham, una importante interacción gen*dieta entre los AGP y el polimorfismo -75G/A en el promotor de este gen,

determinando las concentraciones de c-HDL y de ApoA-I (Ordovás JM et al, 2002(a)).

PON-1: La variante Q192R en PON1 ha mostrado interacción con el ácido oleico de la dieta, así en un estudio en España (Tomás M et al, 2001), se concluyó que los homocigotos RR (menor actividad paraoxonasa), experimentaban un mayor efecto protector asociado un mayor consumo de aceite de oliva. También, Volcik K et al (2007) mostraron que la interacción entre el consumo de alcohol y el polimorfismo Q192R sobre el metabolismo del c-HDL influye en el riesgo de ECV incidente en varones negros.

IL-6: Jerrard-Dunne P et al (2003) observaron que el consumo de alcohol modula el efecto del polimorfismo -174 G/C sobre el desarrollo prematuro de aterosclerosis en la carótida.

PPARG2: Este gen es ampliamente modulado por factores nutricionales, y su variante Pro12Ala, además de asociarse con lípidos plasmáticos, presenta una importante interacción con los AGP de la dieta determinando insulina y peso (Luan J et al, 2001). Paralelamente, en un estudio de intervención dietética, los portadores de la variante 12Ala fueron los que presentaron una mayor disminución en las concentraciones de TG cuando su dieta se enriquecía con AG omega-3 sugiriendo importantes modulaciones dietéticas en el riesgo cardiovascular asociado a este gen (Lindi V et al, 2003). También, se ha observado que en individuos obesos portadores del alelo 12Ala presentan mayor resistencia a la insulina cuando consumen una dieta baja en AGM (Soriguer F et al, 2006). Scacchi R et al (2007), mostraron que el efecto protector del alelo Ala sobre la DMT2 está presente sólo en poblaciones con una dieta rica en lípidos. Además, Brand-Hermann SM et al (2005), encontraron una interacción entre el polimorfismo Pro12Ala y la ingesta de alcohol que modulaba los niveles de c-HDL.

Hasta ahora las guías de alimentación planteadas no han considerado las marcadas diferencias en la respuesta individual a cambios en la ingesta de nutrientes (Ordovas JM et al, 2004(b), Lefevre M et al, 2005). El estudio de las interacciones gen*dieta proporcionará un conocimiento crucial para la prevención, ya que se dispondrá de evidencias para recomendar consumos específicos de alimentos que modulen el riesgo de CI en aquellos individuos genéticamente más susceptibles (Talmud P et al, 2001, Stephens JW et al, 2003). Todavía no se dispone hoy en día del suficiente nivel de evidencia científica para que los resultados de estos estudios tengan aplicación en la práctica clínica, pero se contempla su aplicación a largo plazo en prevención primaria. Además, la importancia de las replicaciones de los hallazgos en nutrigenómica es crucial ya que actualmente, este es uno de los mayores problemas con los que se encuentran

los investigadores del área y que limita la aplicación de los resultados de la investigación (Ordovas JM et al, 2004(a), Hunter DJ, 2005).

Se están desarrollando dos proyectos independientes que permiten profundizar en la caracterización de los efectos de la DM en los distintos fenotipos intermedios y finales de ECV, incorporando la modulación por polimorfismos genéticos. Estos dos proyectos fueron titulados, “*Modulación genética de los efectos de la dieta mediterránea en la prevención primaria de la enfermedad cardiovascular (ECV): Análisis transversal y prospectivo sobre fenotipos intermedios y finales de ECV en el estudio PREDIMED*” (ref. PI042239) y “*Modulación por polimorfismos genéticos de los efectos de la adherencia a la dieta mediterránea en la incidencia de la enfermedad isquémica del corazón en la cohorte EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) de España*” (ref. PI041224). El presente trabajo también se enmarca en estos dos proyectos.

El primero de ellos se incluye en el estudio PREDIMED. Con el objetivo de investigar las interacciones gen*dieta sobre fenotipos intermedios (concentraciones plasmáticas de lípidos, marcadores de inflamación, marcadores de estrés oxidativo, parámetros antropométricos, tensión arterial,) y finales (CI, ictus,) dentro del estudio PREDIMED, el nodo de Valencia realiza análisis genéticos de diversos polimorfismos de interés. En este trabajo únicamente se analizarán interacciones gen*ambiente sobre fenotipos intermedios puesto que el proyecto PREDIMED no ha finalizado. Las interacciones gen*ambiente sobre fenotipos finales se analizarán mediante la cohorte EPIC de España ya que supone una magnífica oportunidad para investigar los efectos moduladores de los polimorfismos genéticos en el riesgo de CI en función de la mayor o menor adherencia de los participantes a la DM. Para ello, se ha realizado un estudio de casos y controles anidado en el nodo de Valencia. Los casos son eventos fatales y no fatales de IAM que hayan ocurrido tras diez años de seguimiento de la cohorte. Los controles son personas sanas reclutadas dentro de la misma cohorte y apareadas por edad, sexo y región de procedencia de los casos. El nodo de Valencia realizó el análisis genético y los resultados serán presentados en este trabajo.

2

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

La hipótesis conceptual general es la siguiente:

El riesgo de ECV es el resultado de la interacción entre factores genéticos y ambientales tales como dieta, la actividad física y el consumo de tabaco. Los efectos de los factores ambientales sobre fenotipos intermedios de ECV y fenotipos finales no son homogéneos, en los participantes asintomáticos con alto riesgo de ECV, sino que están modulados por polimorfismos genéticos entre los cuales, variaciones en genes candidatos relacionados con el metabolismo lipídico, obesidad, DMT2, marcadores de estrés oxidativo e inflamación, desempeñarán un papel esencial en dicha respuesta. Concretamente los polimorfismos TaqIB y rs183130 en CETP, -514C/T en LIPC, S447X en LPL, E2/E3/E4 en APOE, -75G/A en APOA1, R219K en ABCA1, Q192R en PON1, C242T en p22phox, , C677T en MTHFR, -174 G/C en IL6, -765 G/C en COX-2, rs9939609, rs3751812 y rs1861868 en FTO, Pro12Ala en PPARG2, G482S en PPARGC1A, rs7903146, rs7901695 y rs12255372 de TCF7L2 y variantes de las subunidades de AMPK, concretamente, rs2796495 de PRKAA2, rs4213 PRKAB1, rs1036852 PRKAB2, rs2293445 PRKAG1, rs8961 PRKAG2 y rs1467320 PRKAG3 presentarán importantes interacciones gen*ambiente

Esta hipótesis general puede expresarse a su vez a través de los objetivos que se plasman en la sección que viene a continuación.

2.2 Objetivos concretos

1. Obtención de los resultados preliminares en cuanto a eficacia de la intervención dietética en los patrones de consumo alimentario en el estudio PREDIMED, y la repercusión de estos cambios sobre parámetros antropométricos, concentraciones plasmáticas de lípidos, glucosa y marcadores

de inflamación, tras tres meses de estudio en la población del nodo Valencia y en la del estudio PREDIMED general.

2. Extensión de la validación del cuestionario de frecuencia de consumo alimentario (CFCA) en una población de características similares a los participantes del estudio PREDIMED, en colaboración con los nodos de Reus y Pamplona.
3. Determinar la prevalencia de los polimorfismos TaqIB y rs183130 en CETP, -514C/T en LIPC, S447X en LPL, E2/E3/E4 en APOE, -75G/A en APOA1, R219K en ABCA1, Q192R en PON1, C242T en p22phox, , C677T en MTHFR, -174 G/C en IL6, -765 G/C en COX-2, rs9939609, rs3751812 y rs1861868 en FTO, Pro12Ala en PPARG2, G482S en PPARGC1A, rs7903146, rs7901695 y rs12255372 de TCF7L2 y variantes de las subunidades de AMPK, concretamente, rs2796495 de PRKAA2, rs4213 PRKAB1, rs1036852 PRKAB2, rs2293445 PRKAG1, rs8961 PRKAG2 y rs1467320 PRKAG3 en individuos, de población mediterránea, con alto riesgo cardiovascular.
4. Estimar la asociación de los polimorfismos anteriores, con fenotipos intermedios de riesgo cardiovascular (concentraciones plasmáticas de lípidos, glucosa, marcadores de estrés oxidativo y de inflamación, presión arterial, peso, IMC, perímetro de cintura).
5. Estimar la prevalencia de obesidad, diabetes, hipercolesterolemia e hipertensión, (OR) asociado a la presencia de cada una de las variantes de susceptibilidad genética.
6. Estudiar las interacciones gen*gen entre el polimorfismo TaqIB del gen de CETP y el polimorfismo E2/E3/E4 del gen de ApoE, así como, la interacción entre las variantes TaqIB y rs183130 de CETP y -514 C/T de LIPC en población de elevado riesgo cardiovascular.
7. Conocer las variables de estilo de vida con posible efecto sobre fenotipos intermedios de riesgo cardiovascular (concentraciones plasmáticas de lípidos, glucosa, marcadores de estrés oxidativo y de inflamación, presión arterial, peso, IMC, perímetro de cintura).
8. Estudiar la modulación gen*ambiente sobre parámetros bioquímicos antropométricos y clínicos. Fundamentalmente, se estudiará si los cambios en dichos parámetros, asociados a los polimorfismos mencionados anteriormente están modulados por factores ambientales (dieta, actividad física y tabaquismo).
9. Estudiar la asociación entre el polimorfismo TaqIB en CETP y riesgo de IAM en la cohorte EPIC-España.

10. Estudiar las interacciones gen*dieta entre este polimorfismo y el riesgo de IAM contemplando tanto la modulación por este polimorfismo del riesgo de de IAM asociado a los distintos patrones de adherencia a la dieta mediterránea y a sus componentes específicos, como la modulación por la dieta de las asociaciones entre este polimorfismo y el riesgo de IAM.

3.1 Introducción

El estudio realizado en esta tesis es fruto de un trabajo multidisciplinar para la obtención de las conclusiones generales. Para llevar a cabo esta tesis, la doctoranda ha tenido la oportunidad de participar en todas y cada una de las tareas que forman parte del protocolo de la investigación genómica. A lo largo de seis años, se realizó el reclutamiento de voluntarios en diversos centros de salud de la Comunidad Valenciana, se recopiló la información y se realizaron las mediciones necesarias para realizar este estudio. Además, la doctoranda se ha familiarizado con las técnicas de laboratorio incluyendo, desde la extracción de ADN, hasta el análisis de los polimorfismos estudiados mediante distintas técnicas. Además, ha tenido que crear una base de datos para el tratamiento y análisis estadístico de datos, así como en la participación y presentación de los resultados y redacción de los manuscritos o comunicaciones a congresos que se han realizado con la información que se ha ido obteniendo durante este período de investigación.

Tal como se ha expuesto en el apartado de introducción, y con el objeto de obtener un mayor grado de evidencia en base a la replicación de resultados y profundización de mecanismos, en esta tesis se incluirán participantes de dos estudios diseñados para investigar los efectos de la dieta mediterránea sobre el riesgo cardiovascular. Uno de ellos es el estudio PREDIMED ensayo multicéntrico de intervención dietética en pacientes de alto riesgo cardiovascular pero libres de eventos cardiovasculares al inicio, y el otro, es un diseño anidado de casos y controles dentro de la cohorte EPIC-España. En este apartado se describe el diseño, las características de los participantes y la recopilación de variables de interés de ambos proyectos. Posteriormente, se presenta el material utilizado, los aparatos, equipos, los reactivos del laboratorio, así como los procesos empleados en la extracción y amplificación de ADN y en el análisis de polimorfismos mediante diversas técnicas. Finalmente, se abordan los métodos estadísticos esenciales para el análisis de los datos obtenidos en el estudio.

3.2 Estudio PREDIMED

PREDIMED es proyecto multicéntrico en el que participan dieciséis grupos españoles de varias comunidades autónomas con el objeto de realizar un ensayo de intervención aleatorizado que proporcione evidencias de primer nivel sobre el efecto de la DM en la prevención primaria cardiovascular. Esta red recibió financiación por el Instituto de Salud Carlos III en el año 2003 (referencia G03/140). El grupo EPIGEM, cuyos integrantes desarrollan labor docente e investigadora en la Facultad de Medicina de Valencia, participa en dicha red desde el denominado nodo de Valencia.

En el estudio PREDIMED se pretende reclutar 10.500 pacientes con alto riesgo de sufrir complicaciones vasculares (pero sin evento cardiovascular al inicio del estudio) a través de centros de atención primaria de 8 Comunidades Autónomas. Cada nodo participante tiene asignado el reclutamiento de 1000 participantes que cumplan los criterios de inclusión que más adelante se detallarán. A estos sujetos reclutados se les asigna aleatoriamente a tres grupos, dos de ellos son grupos con una intervención nutricional con DM y un tercer grupo (grupo control) recibe intervención de educación nutricional con una dieta tradicional baja en grasa según las recomendaciones de la AHA (Krauss RM et al, 2000). Además, los dos grupos de intervención con educación sobre DM reciben suplementos: AOVE o FS. A todos ellos se les debe seguir durante un periodo de 3 a 5 años para detectar la aparición de complicaciones cardiovasculares mayores y menores. De todos los participantes, tras obtener el consentimiento informado, se recopilan variables demográficas, de dieta y de estilo de vida mediante una serie de cuestionarios estandarizados y se realiza una exploración física, con determinación de la presión arterial y determinación de datos antropométricos (peso, altura, y cintura y cadera, y recogida de muestras biológicas) tanto en la visita basal como en las de seguimiento.

Un proyecto tan ambicioso como el propuesto requiere un metodología bien definida y herramientas de obtención, procesamiento y de gestión de datos, así como técnicas de laboratorio bien estudiadas y validadas, para optimizar su funcionamiento y obtener resultados fiables. Por ello, se realizó un estudio piloto con los primeros 100 participantes de cada nodo a los que se les realiza un seguimiento de tres meses, con el que, además de comprobar los efectos de la DM sobre los fenotipos intermedios de riesgo cardiovascular incluyendo marcadores clásicos (lípidos, tensión arterial, obesidad), así como nuevos marcadores (marcadores de inflamación o estrés oxidativo), también, se pretendió validar instrumentos y herramientas, optimizar protocolos y procesos, llevar a cabo puestas a punto de técnicas de laboratorio, seleccionar las técnicas de análisis estadístico

apropiadas, así como elaborar un sistema de gestión que ayude al buen funcionamiento del proyecto.

El estudio piloto comenzó en Junio de 2003 y finalizó en Marzo de 2004. Se incluyeron 769 participantes de los cuales 150 pertenecen al nodo de Valencia. Tras los resultados obtenidos (Estruch R et al, 2006) se prosiguió y completó el reclutamiento hasta Diciembre de 2008. En el nodo de Valencia se han incluido definitivamente en el estudio 1049 participantes. El estudio PREDIMED fue diseñado para seguir a los participantes una media de 3 años, prorrogable hasta 5 años de modo que se ha previsto que el estudio finalice en el 2011.

3.2.1 Nodos participantes

En este estudio existen 11 centros de campo que son nodos que se ocupan de reclutar a participantes y 10 unidades de laboratorio especializadas donde se realiza estudios con muestras recogidas por los nodos reclutadores. En la Tabla 3.1 se exponen los centros y grupos participantes en el estudio PREDIMED y sus funciones.

Tabla 3.1. Centros de campo (CC) y unidades de laboratorio especializadas (ULE) participantes en el estudio PREDIMED.

NODOS PARTICIPANTES	FUNCIÓN
Universidad Barcelona Hospital Clínic IDIBAPS	CC 1 y ULE 1
Barcelona Institut Municipal de Investigació Mèdica (IMIM)	CC 2 y ULE 2
Universidad Navarra Pamplona	CC 3
Universidad Valencia EPIGEN	CC 4 y ULE 3
Universidad Málaga NUTR_ANDAL	CC 5 y ULE 4
Sevilla Centro de Atención Primaria	CC 6
Sevilla-CSIC	ULE 5
Mallorca Universidad Baleares	CC 7
Tarragona NURETA Universidad Rovira y Virgili	CC 8 y ULE 6
Vitoria Hospital Txagorritxu	CC 9
Las Palmas Universidad Gran Canaria	CC 10
Barcelona Hospital Bellvitge	CC 11
Universidad de las Islas Baleares	ULE 7
Universidad de Barcelona Facultad Farmacia An_UB	ULE 8
Universidad de País Vasco Facultad Farmacia	ULE 9
Universidad de Barcelona Facultad de Ciencias	ULE 10

3.2.2 Selección de participantes

3.2.2.1 Criterios de inclusión

Se incluyen en el estudio todos aquellos hombres entre 55 y 80 años y mujeres entre 60 y 80 años, sin ECV documentada (CI, angina de pecho o IAM reciente o antiguo, ACV o vasculopatía periférica) y que presenten además:

- **Diabetes Mellitus tipo 2:** Paciente tratado con insulina o hipoglucemiantes orales; glicemia basal > 126 mg/dl, o glicemia casual > 200 mg/dl con síntomas de DMT2 o un Test de Tolerancia Oral a la Glucosa con glicemias > 200 mg/dl en dos determinaciones.

o reúnan tres o más de los siguientes factores:

- **Tabaquismo:** Fumadores de más de 1 cigarrillo al día. A efectos de criterio de inclusión en este estudio se consideran como fumadores aquellas personas que hayan dejado de fumar en el último año.
- **Hipertensión arterial:** sujetos con presiones arteriales superiores o iguales a 140/90 mm Hg sin tratamiento o aquéllos que siguen tratamiento hipotensor independientemente de sus cifras tensionales.
- **Hipercolesterolemia:** sujetos con cifras de LDL-colesterol superior a 160 mg/dl sin tratamiento o aquellos que siguen un tratamiento hipolipemiente independientemente de sus cifras de LDL-colesterol.
- **Cifras de HDL-colesterol** superiores a 40 mg/dl, con o sin tratamiento hipolipemiente. En caso de HDL-colesterol superior a 60 mg/dl, se resta uno al número total de FR vascular.
- **Sobrepeso u Obesidad:** IMC superior a 25 kg/m².
- **Historia familiar de cardiopatía isquémica precoz :** familiares de primer orden varones menores de 55 años o mujeres menores de 65 años.

Asimismo, el participante debe firmar voluntariamente el impreso de consentimiento informado después de que se le haya explicado la naturaleza del estudio, antes del inicio de cualquier procedimiento relacionado con el mismo.

3.2.2.2 Criterios de exclusión

Se excluyen todos aquellos sujetos que no cumplan con los requisitos del protocolo o que presenten alguno de los siguientes criterios:

- Dificultad para cambiar los hábitos alimentarios
- Baja probabilidad de realizar cambios dietéticos, según el modelo de estados de cambio de Prochaska et al (1983).
- Imposibilidad de seguir una DM controlada (incluidos los motivos religiosos) o de poder masticar o tragar los alimentos (por ejemplo, dificultad para consumir FS)
- Pacientes institucionalizados, que no realicen una vida autónoma o no puedan mantenerse en pie.
- Pacientes sin residencia fija en los últimos años o con imposibilidad de poder atender a los controles semestrales.
- Antecedentes de hipersensibilidad o reacciones alérgicas a algún componente del aceite de oliva o de las nueces.
- Enfermedad médica grave que limite su capacidad de participación en un estudio de intervención dietética (por ejemplo, enfermedades gastrointestinales con intolerancia a las grasas, neurológicas, psiquiátricas, endocrinas descompensadas, tumorales) o que se suponga una esperanza de vida inferior a 1 año. Los pacientes con patología inflamatoria aguda (por ejemplo, neumonía) pueden participar en el estudio transcurrido 3 meses a la curación de su enfermedad.
- Pacientes con un IMC superior a 35 kg/m².
- Enfermos inmunodeprimidos o con infección por el VIH.
- Enfermos alcohólicos crónicos o adictos a drogas.
- Pacientes que han recibido fármacos en fase de investigación durante el último año.
- Analfabetismo

Este estudio ha sido aprobado por los Comités de Ética de los Centros participantes y se ha redactado de acuerdo con la Declaración de Helsinki.

3.2.2.3 Retirada del estudio

Todos los participantes tienen derecho a retirarse del estudio en cualquier momento sin que ello les suponga perjuicio alguno. Los investigadores pueden retirar a un sujeto del estudio si considera que es necesario por cualquier motivo, como reacciones adversas o incumplimiento del protocolo.

3.2.3 Reclutamiento de participantes

El reclutamiento de participantes se realiza en Centros de Atención Primaria. Los facultativos de dichos centros, durante la realización de la consulta médica presentan el proyecto PREDIMED a posibles participantes que cumplan con los criterios de inclusión. Tras el consentimiento de dichos participantes, facilitan los teléfonos de contacto de los participantes reclutados a los investigadores del proyecto PREDIMED. Éstos contactan con ellos para citarles en su propio centro de atención primaria para realizar la visita inicial.

En el estudio piloto a nivel nacional, el reclutamiento se llevó a cabo entre Junio de 2003 y Marzo de 2004. Se seleccionaron previamente 930 participantes de los cuales se excluyeron 86 por no cumplir los criterios de inclusión, 33 participantes no quisieron iniciar el estudio, 18 presentaron dificultad para cambiar la dieta, 14 alcoholismo crónico, 4 enfermedades gastrointestinales y 3 alergias alimentarias. Tras excluir a todos ellos (n=158) quedaron 772 que fueron asignados a los 3 grupos de intervención: 257 al grupo de intervención con DM con suplemento de AOVE (DM+AOVE), 258 al grupo de intervención con DM con suplemento de FS (DM+FS) y 257 al grupo control. Tras los 3 meses de duración del estudio piloto, se excluyeron 3 participantes más, 1 por intolerancia a los FS en el grupo de DM+FS y 2 en el grupo control, 1 por no querer continuar con el estudio y otro por cáncer de mama, quedando finalmente 769 participantes, 257 en el grupo DM+AOVE, 257 en el grupo DM+FS y 255 en el grupo control.

Por otro lado, en la tabla 3.2 se exponen el número de participantes reclutados en cada Centro de Atención Primaria que ha colaborado en el estudio piloto del nodo de Valencia y que fueron incluidos definitivamente en este estudio.

Tabla 3.2 Número de participantes incluidos en el estudio piloto del proyecto PREDIMED en cada Centro de Atención Primaria que ha colaborado con en nodo de Valencia

Centro de salud	Número de participantes n (%)
1. CS Godella	27 (18,0)
2. CS Silla	10 (6,7)
3. CS Torrente	26 (17,3)
4. CS Meliana	24 (16,0)
5. CS Ingeniero Joaquin Benlloch (Valencia)	2 (1,3)
6. CS C/ Alboraya (Valencia)	2 (1,3)
7. CS Xirivella	4 (2,7)
8. CS Palleter (Castellón)	37 (24,7)
9. CS San agustín (Castellón)	11 (7,3)
10. CS Alboraya	7 (4,7)

De los 769 participantes incluidos en el estudio piloto general, 150 pertenecen al nodo de Valencia. Inicialmente se seleccionaron 177 individuos de los cuales 4 se excluyeron previamente por no cumplir los criterios de inclusión. De los 173 incluidos en el estudio piloto, 17 participantes no asistieron a la visita a los 3 meses porque quisieron abandonar el estudio (4 de ellos pertenían al grupo DM+FS y 13 al grupo control) y 6 fueron ilocalizables. De este modo, quedaron 150 participantes de los cuales 38 fueron asignados al grupo DM+AOVE, 67 al grupo DM+FS y 45 al grupo control.

A los participantes que aceptaron y firmaron el consentimiento para participar en el estudio se les asignó un código. Este código se compone de 10 dígitos en el que los dos primeros hacen referencia al nodo reclutador, los dos siguientes al centro de salud en el que está adscrito el participante, los dos siguientes al médico de cabecera del participante, los dos siguientes al número de participante y los dos últimos a la visita correspondiente (Figura 3.1). Así pues, los únicos dos dígitos del código del participante que varían a lo largo del estudio son los dos últimos, de manera que si se trata de la primera visita (basal) el código acaba con los dígitos 01, si se trata de los 3 primeros meses, en el caso del estudio piloto, el código acaba en 02, si se trata de la visita del primer año, el código acaba en 03, en el segundo año, 04 y así sucesivamente.

El código asignado a cada participante se coloca en todos los cuestionarios realizados así como, en todas las muestras biológicas para poder identificarlas.

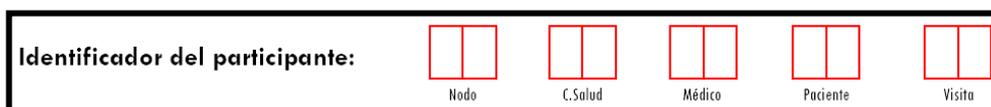


Figura 3.1. Identificador de los participantes incluido en cada cuestionario.

Tras el estudio piloto continuó el reclutamiento hasta Diciembre de 2008. Durante este periodo de tiempo se reclutaron 1098 participantes en el nodo de Valencia. De ellos, 4 finalmente no quisieron participar, 41 no cumplían los criterios de inclusión, 1 estaba diagnosticado de esquizofrenia y 3 mostraron imposibilidad para cambiar la dieta. De este modo, se incluyeron definitivamente 1049 participantes en el nodo de Valencia a los que se les asignó igualmente un código.

En la tabla 3.3 se exponen el número de participantes reclutados en cada Centro de Atención Primaria que ha colaborado en el estudio PREDIMED a nivel global en el nodo de Valencia y que fueron incluidos definitivamente en el estudio.

Tabla 3.3 Número de participantes incluidos en el estudio PREDIMED en cada Centro de Atención Primaria que ha colaborado con en nodo de Valencia

Centro de salud	Número de participantes n (%)
1. CS Godella (Valencia)	90 (8,6)
2. CS Silla (Valencia)	14 (1,3)
3. CS Torrente (Valencia)	57 (5,4)
4. CS Meliana (Valencia)	39 (3,7)
5. CS Ingeniero Joaquin Benlloch (Valencia)	7 (0,7)
6. CS C/ Alboraya (Valencia)	2 (0,2)
7. CS Xirivella (Valencia)	261 (24,9)
8. CS Palleter (Castellón)	54 (5,1)
9. CS San Agustín (Castellón)	15 (1,4)
10. CS Alboraya (Valencia)	18 (1,7)
11. CS Artana (Castellón)	12 (1,1)
12. CS Guardia Civil (Valencia)	21 (2,0)
13. CS Alfafar (Valencia)	9 (0,9)
14. CS Grao de Castellón (Castellón)	5 (0,5)
15. CS Vall d'Uixó (Castellón)	13 (1,2)
16. CS Gran Vía (Castellón)	28 (2,7)
17. CS Picassent (Valencia)	47 (4,5)
18. CS Paterna (Valencia)	27 (2,6)
19. Hospital Clínico (Valencia)	81 (7,7)
20. CS Alcudia (Valencia)	37 (3,5)
21. CS Monteolivete (Valencia)	10 (1,0)
22. CS Fuente San Luís (Valencia)	7 (0,7)
23. CS Manises (Valencia)	51 (4,9)
24. CS Nápoles y Sicilia (Valencia)	15 (1,4)
25. CS Malvarrosa (Valencia)	3 (0,3)
26. CS Serrería (Valencia)	6 (0,6)
27. Hospital General (Valencia)	2 (0,2)
28. CS Barrio del Cristo (Valencia)	2 (0,2)
29. CS La fábrica Alcoy (Alicante)	46 (4,4)
30. CS Plaça Dins Alcoy (Alicante)	7 (0,7)
31. CS La Bassa Alcoy (Alicante)	4 (0,4)
32. Manises Xiprerets (Valencia)	13 (1,2)
33. CS Guillem de Castro (Valencia)	12 (1,1)
34. CS Trinitat (Valencia)	2 (0,2)
35. CS Burjassot (Valencia)	5 (0,5)
36. CS Gátova (Valencia)	6 (0,6)
37. CS Algemesí (Valencia)	21 (2,0)

3.2.4 Recopilación de datos

La obtención de variables demográficas socio-económicas, de estilo de vida, antropométricas, clínicas, bioquímicas, así como la obtención de muestras biológicas se realiza en el centro de atención primaria.

Las variables son recogidas de todos los participantes al inicio (basal) y, a continuación, se les realiza un seguimiento una vez al año durante un periodo de 3 a 5 años (prorrogable) para detectar la aparición de complicaciones cardiovasculares mayores y menores. En el caso del estudio piloto, se recogieron al inicio y a los tres meses, de 150 participantes en el nodo de Valencia.

Durante este periodo se realizan reuniones cada 3 meses para recordar a los participantes las recomendaciones dietéticas que deben seguir, y para realizar, en su caso, reparto de AOVE o FS.

3.2.4.1 Recopilación de datos mediante cuestionarios

Los cuestionarios utilizados para recoger las variables de interés son: cuestionario de inclusión, cuestionario general, cuestionario de frecuencia de consumo alimentario (CFCA), cuestionario de adherencia a la DM de 14 puntos, cuestionario de actividad física. En el caso de una visita de seguimiento se administra un cuestionario de seguimiento, sustituyendo al cuestionario general.

Los cuestionarios son de lectura óptica, el CFCA es enviado al nodo de Pamplona y el resto al nodo de Barcelona IDIBAPS.

Así pues, según se trate de visita inicial o de seguimiento, el protocolo de actuación varía. La tabla 3.4 resume dicho protocolo.

Tabla 3.4. Cuestionarios que son administrados en la visita inicial y posteriores visitas de seguimiento a cada participante en el estudio PREDIMED.

	BASAL	AÑO-1	AÑO-2	AÑO-3	AÑO-4	AÑO-5
CUESTIONARIO INCLUSIÓN	X					
CUESTIONARIO GENERAL	X					
CUESTIONARIO DE FRECUENCIA CONSUMO ALIMENTARIO	X	X	X	X	X	X
CUESTIONARIO ADHERENCIA 14 PTOS	X	X	X	X	X	X
CUESTIONARIO ACT. FÍSICA	X	X	X	X	X	X
CUESTIONARIO SEGUIMIENTO		X	X	X	X	X

En este trabajo se utilizarán los datos de la visita basal y los recopilados a los 3 meses de inicio del estudio para realizar el estudio piloto. A los 3 meses, los cuestionarios administrados fueron los mismos que en una visita de seguimiento, es decir, CFCA, cuestionario de adherencia a la DM de 14 puntos, cuestionario de actividad física y de seguimiento.

3.2.4.1.1 Cuestionario de inclusión

Mediante este cuestionario se comprueba si el participante cumple los criterios de inclusión y además, no presenta ningún motivo de exclusión. Así pues, incluye preguntas a partir de las cuales se puede valorar especialmente la capacidad del participante para poder seguir un determinado tipo de dieta como la mediterránea, interés de participación en el estudio, su grado de compromiso y disponibilidad para acudir a las visitas de seguimiento y sesiones de intervención que se le indiquen, así como, si el participante ha sufrido, en el pasado, algún evento cardiovascular. Por otro lado, incluye preguntas relacionadas con todos los factores de inclusión, edad, sexo, DMT2, niveles de colesterol, presión arterial, historia familiar de CI precoz, tabaquismo y sobrepeso u obesidad.

3.2.4.1.2 Cuestionario general

Este cuestionario recoge datos demográficos y socio-económicos de los participantes, tales como, lugar de nacimiento, estado civil, grado de escolarización y situación laboral. También incluye antecedentes familiares de CI, de hipercolesterolemia, de HTA y de cáncer, consumo de alcohol, enfermedades sufridas y medicaciones recibidas, especialmente aspirina, antiinflamatorios, tranquilizantes, vitaminas o minerales, medicamentos para el corazón, antihipertensión, fármacos hipolipemiantes, insulina, antidiabéticos orales, tratamiento hormonal. Por otro lado, introduce dos ítems relacionados con la última ingesta de AOVE y la última ingesta de bebida alcohólica o vino.

3.2.4.1.3 Cuestionario de frecuencia de consumo alimentario

El objetivo de este cuestionario es calcular la frecuencia de consumo de alimentos en un año. Esta compuesto por 139 preguntas. La frecuencia de consumo va de “nunca o casi nunca” hasta “más de 6 veces al día”. Incluye la frecuencia diaria, semanal o mensual durante el último año de consumo de un listado de alimentos comunes, como productos lácteos, cereales u féculas, verduras y hortalizas, legumbres, huevos, carnes, embutidos, pescados y mariscos, aceites y grasas, *fast food*, alimentos enlatados, frutas, FS, dulces, pastelería y bollería industrial y bebidas no alcohólicas y alcohólicas. Además, añade la toma de

vitaminas y/o minerales (incluyendo calcio) o productos dietéticos especiales (salvado, aceite de onagra, leche con ácidos omega-3, flavonoides) en el último año. Este cuestionario es una adaptación del cuestionario realizado por Martín-Moreno JM et al (1993) y ha sido validado (Fernández-Ballart J et al, 2010). Para el cálculo de energía y nutrientes a partir de este cuestionario se utilizaron las tablas de composición de alimentos de Mataix J (2003). De ello se encarga el nodo de Pamplona.

3.2.4.1.4 Cuestionario de adherencia a la Dieta Mediterránea de 14 puntos

Mediante este cuestionario se evalúa el grado de cumplimiento de la DM (Figura). Está formado por 14 ítems de manera que si el participante consigue 14 puntos significa que consume una dieta tipo mediterráneo calificada como óptima. Los diferentes ítems hacen referencia al consumo de aceite de oliva, verduras, hortalizas, frutas, carnes rojas, blancas y embutidos, grasas, bebidas carbonatadas y/o azucaradas, vino, legumbres, pescados y mariscos, repostería comercial, FS, cereales y de condimentos con tomate, ajo, cebolla y hierbas aromáticas. A partir de este cuestionario se clasificaron los participantes en aquellos que consumen una dieta con alta adherencia a la DM e individuos con una dieta con baja adherencia a la DM. El punto de corte para realizar esta clasificación fue la media del total de puntos hallada en el total de la población. Dicha media fue de 9 ± 2 puntos, de modo que aquellos que obtuvieron 9 o más puntos en el cuestionario se incluyeron en el grupo de alta adherencia a la DM. Los individuos que presentaron puntuaciones por debajo de 9 se incluyeron en el grupo de baja adherencia a la DM. Este cuestionario es una extensión del cuestionario validado por Martínez-González MA et al (2004)(b).



ESTUDIO PREDIMED

Cumplimiento de la dieta

Identificador del participante:

Nodo	C. Salud	Médico	Paciente	Visita
------	----------	--------	----------	--------

Nodo: anotar el número de nodo correspondiente.
 01. Andalucía - Málaga / 02. Andalucía - Sevilla - S.Pablo / 03. Andalucía - Sevilla - V.Rocío / 04. Baleares /
 05. Cataluña - Barcelona norte / 06. Cataluña - Barcelona Sur / 07. Cataluña - Reus - Tarragona / 08. Madrid Norte /
 09. Madrid Sur / 10. Navarra / 11. País Vasco / 12. Valencia

C.Salud: anotar el número del centro de salud correspondiente.
 Médico: anotar el número del médico correspondiente.
 Paciente: anotar el número del paciente correspondiente.
 Visita: anotar el número de visita correspondiente.
 00. Inclusión - exclusión / 01. Visita Inicial / 02. Visita 3 meses / 03. Visita 1 año / 04. Visita 2 años / 05. Visita Suños

Fecha del examen

/ / 200

Día Mes Año

- | | | |
|--|--------------|--------------------------|
| 1. ¿Usa usted el aceite de oliva como principal grasa para cocinar? | Si = 1 punto | <input type="checkbox"/> |
|--|--------------|--------------------------|
- | | | |
|---|------------------------------|--------------------------|
| 2. ¿Cuanto aceite de oliva consume en total al día (incluyendo el usado para freír, comidas fuera de casa, ensaladas, etc.)? | 4 o más cucharadas = 1 punto | <input type="checkbox"/> |
|---|------------------------------|--------------------------|
- | | | |
|--|--|--------------------------|
| 3. ¿Cuántas raciones de verdura u hortalizas consume al día?
<small>(las guarniciones o acompañamientos = 1/2 ración) 1 ración = 200g.</small> | 2 o más (al menos una de ellas en ensalada o crudas) = 1 punto | <input type="checkbox"/> |
|--|--|--------------------------|
- | | | |
|--|--------------------------|--------------------------|
| 4. ¿Cuántas piezas de fruta (incluyendo zumo natural) consume al día? | 3 o más al día = 1 punto | <input type="checkbox"/> |
|--|--------------------------|--------------------------|
- | | | |
|---|-----------------------------|--------------------------|
| 5. ¿Cuántas raciones de carnes rojas, hamburguesas, salchichas o embutidos consume al día?
<small>(ración: 100 - 150 g)</small> | menos de 1 al día = 1 punto | <input type="checkbox"/> |
|---|-----------------------------|--------------------------|
- | | | |
|---|-----------------------------|--------------------------|
| 6. ¿Cuántas raciones de mantequilla, margarina o nata consume al día?
<small>(porción individual: 12 g)</small> | menos de 1 al día = 1 punto | <input type="checkbox"/> |
|---|-----------------------------|--------------------------|
- | | | |
|--|-----------------------------|--------------------------|
| 7. ¿Cuántas bebidas carbonatadas y/o azucaradas (refrescos, colas,ónicas, bitter) consume al día? | menos de 1 al día = 1 punto | <input type="checkbox"/> |
|--|-----------------------------|--------------------------|
- | | | |
|--|-------------------------------------|--------------------------|
| 8. ¿Bebe usted vino? ¿Cuánto consume a la semana? | 7 o más vasos a la semana = 1 punto | <input type="checkbox"/> |
|--|-------------------------------------|--------------------------|
- | | | |
|---|-------------------------------|--------------------------|
| 9. ¿Cuántas raciones de legumbres consume a la semana?
<small>(1 plato o ración de 150 g)</small> | 3 o más a la semana = 1 punto | <input type="checkbox"/> |
|---|-------------------------------|--------------------------|
- | | | |
|--|-------------------------------|--------------------------|
| 10. ¿Cuántas raciones de pescado-mariscos consume a la semana?
<small>(1 plato pieza o ración: 100 - 150 de pescado o 4-5 piezas o 200 g de marisco)</small> | 3 o más a la semana = 1 punto | <input type="checkbox"/> |
|--|-------------------------------|--------------------------|
- | | | |
|---|----------------------------------|--------------------------|
| 11. ¿Cuántas veces consume repostería comercial (no casera) como galletas, flanes, dulce o pasteles a la semana? | menos de 2 a la semana = 1 punto | <input type="checkbox"/> |
|---|----------------------------------|--------------------------|
- | | | |
|---|-------------------------------|--------------------------|
| 12. ¿Cuántas veces consume frutos secos a la semana?
<small>(ración 30 g)</small> | 3 o más a la semana = 1 punto | <input type="checkbox"/> |
|---|-------------------------------|--------------------------|
- | | | |
|--|--------------|--------------------------|
| 13. ¿Consume usted preferentemente carne de pollo, pavo o conejo en vez de ternera, cerdo, hamburguesas o salchichas?
<small>(carne de pollo: 1 pieza o ración de 100 - 150 g)</small> | Si = 1 punto | <input type="checkbox"/> |
|--|--------------|--------------------------|
- | | | |
|--|-------------------------------|--------------------------|
| 14. ¿Cuántas veces a la semana consume los vegetales cocinados, la pasta, arroz u otros platos aderezados con salsa de tomate, ajo, cebolla o puerro elaborada a fuego lento con aceite de oliva (sofrito)? | 2 o más a la semana = 1 punto | <input type="checkbox"/> |
|--|-------------------------------|--------------------------|



Figura 3.2. Cuestionario de adherencia a la DM utilizado en el estudio PREDIMED.

3.2.4.1.5 Cuestionario de actividad física.

El cuestionario utilizado es una adaptación española del Cuestionario de Actividad Física durante el Tiempo Libre de Minnesota (CAFTLM) y validada (Elosua R et al, 1994). Incluye las actividades físicas realizadas en el último mes y

en el último año, y el tiempo de práctica de cada una de ellas. Las actividades que componen este cuestionario se dividen en diferentes grupos: andar, ejercicios de mantenimiento general, actividades acuáticas, actividades de invierno como esquí, deportes, actividades de jardín, reparaciones caseras (bricolaje) y caza y pesca. Cada actividad está perfectamente definida para asegurar una correcta evaluación del ejercicio físico que realiza el paciente. Además, para asegurar la uniformidad de la información recogida se considera que un mes tiene 4 semanas, un año tiene 48 semanas, cada año tiene 240 días laborables, un mes tiene 22 días laborables, un año tiene 100 días de fin de semana. Por otro lado, se ha establecido un tiempo estandarizado para las siguientes actividades: subir escaleras, cada piso = 1/2 minuto, una partida de billar = 10 minutos, un set de tenis individual = 20 minutos, un set de tenis dobles = 15 minutos, golf 9 hoyos = 90 minutos. A partir de este cuestionario se clasificaron los participantes en sedentarios y no sedentarios. El criterio de clasificación se basó en las recomendaciones realizadas por la *American College of Sport Medicine* y la AHA para mayores de 65 años o para adultos entre 50 y 64 años con condiciones crónicas clínicamente relevantes (Nelson ME et al, 2007). Estas recomendaciones consideran que se mejora o mantiene la salud cuando se realiza actividad aeróbica de moderada intensidad al menos 30 minutos 5 días a la semana o actividad de intensidad alta 20 minutos, 3 días a la semana, sin incluir las tareas domésticas cotidianas. Puesto que se trata de individuos de avanzada edad en las actividades de moderada intensidad se incluyen actividades como pasear o caminar deprisa, ejercicio en casa y, son consideradas actividades de alta intensidad ejercicios como nadar, trotar, aeróbic, aquagym, andar campo a través, cavar en el huerto, ir en bicicleta (Nelson ME et al, 2007).

3.2.4.1.6 Cuestionario de seguimiento.

Este cuestionario es similar al cuestionario general pero se incluyen variables específicas sobre los cambios producidos desde la última visita como cambios en el hábito de fumar, nuevos diagnósticos de DMT2, hiperlipemia, HTA u otros problemas médicos o cambios en la medicación, y recogida de eventos de ECV.

3.2.4.2 Obtención de datos antropométricos

La última parte del cuestionario general está dedicada a la exploración física en la que se recogen datos antropométricos tales como, peso, altura, cintura y cadera, además de la presión arterial sistólica, la diastólica y la frecuencia cardíaca. A continuación, se explica el protocolo para realizar estas medidas

3.2.4.2.1 Medición de la talla

La medición de la talla se realiza con un tallímetro estándar, preferiblemente de brazo móvil. Se descalza previamente al participante, y debe quitarse su chaqueta. Los participantes deben estar en una superficie firme y lisa. Se coloca de espaldas al tallímetro, apoyando los talones, nalgas y brazos. La cabeza debe estar en el plano horizontal y con los pies/tobillos juntos. Se desplaza el brazo móvil del tallímetro hasta que se apoye sobre la superficie de la cabeza, formando un ángulo recto con el brazo móvil del tallímetro. Los valores se expresarán en centímetros, redondeando a 1 cm.

3.2.4.2.2 Medición del peso

Se utiliza una báscula calibrada previamente, que debe estar colocada en una superficie firme y lisa. El participante se sitúa en el centro de la misma y debe vestir ropa ligera sin peso superfluo, sin zapatos, chaquetas o abrigos. El peso se expresa en Kg con un decimal, redondeando al valor de 100 gramos.

3.2.4.2.3 Medición del perímetro de la cintura

Se utiliza una cinta métrica. El participante se coloca en bipedestación y mantiene la cabeza recta, con los brazos a ambos lados del cuerpo. Se mide el perímetro abdominal en espiración en el punto intermedio de la línea trazada entre la última costilla y la cresta ilíaca. Se asegura que la cinta está al mismo nivel por delante y por detrás. Se anota en escala de 0.1 cm.

3.2.4.2.4 Obtención de Índice de Masa Corporal.

El IMC se ha calculado mediante la fórmula:

$$\text{IMC (Kg/m}^2\text{)} = \text{peso (Kg)} / (\text{talla(m)})^2$$

Se considera un individuo obeso con $\text{IMC} \geq 30 \text{ Kg/m}^2$.

3.2.4.2.5 Medición de la presión arterial

Los participantes permanecen en una silla con la espalda y brazos apoyados en una situación que permita que el brazal se halle a la altura del corazón. Se les pide que eviten fumar o tomar cafeína durante los 30 minutos previos a la determinación de la presión arterial. Se inicia tras al menos 5 minutos de reposo. La cámara del manguito debe rodear como mínimo al 80% del brazo. Las

determinaciones de la presión arterial se toman con un esfigmomanómetro automático (Omron 705 IT Intelli sense, Susaka Co. LTD, Japón). Se promedian 2 o más lecturas separadas por 2 minutos. Si las dos primeras difieren más de 5 mmHg se obtienen y promedian lecturas adicionales. Se considera HTA presiones arteriales superiores o iguales a 140/90 mm Hg.

3.2.4.3 Obtención de muestras biológicas

El tipo y la frecuencia de recogida de muestras biológicas según la visita que corresponda al participante se resume en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5. Obtención de muestras biológicas según la visita en el estudio PREDIMED

	BASAL	AÑO-1	AÑO-2	AÑO-3	AÑO-4	AÑO-5
SANGRE	X	X		X		X
ORINA	X	X		X		X
UÑAS	X					

Cuando se contacta con el participante se le informa de que debe asistir al centro de salud en ayunas, con una muestra de la primera orina de la mañana y una muestra de las uñas del pie (solo visita inicial), en recipientes esterilizados apropiados. La extracción de sangre la realiza personal cualificado en el centro de salud. El volumen de sangre extraída es de 34,5 ml distribuida en 4 tubos K3E con EDTA de 4,5, 1 tubo 9NC con citrato de 4,5 ml y 3 tubos SST de 4 ml con gel separador. Uno de los tubos K3E permanece en frío constantemente y uno de de los tubos SST está protegido de la luz. En el nodo de Valencia se extrae cinco tubos K3E y un tubo SST más. Con un tubo K3E se realiza una extracción de ADN de cada participante para posteriores análisis genéticos (solo visita inicial). Con otro de ellos y el tubo SST se realiza un análisis bioquímico en la Clínica Quirón de Valencia. Los otros tres tubos K3E son destinados al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de Valencia para obtener mediciones de marcadores de estrés oxidativo.

Una vez obtenidas las muestras, son introducidas en una nevera portátil para no romper con la cadena de frío, y son rápidamente transportadas al laboratorio en la Facultad de Medicina de Valencia. Allí sufren un protocolo de fraccionamiento en alícuotas para ser almacenadas a -80°C y posteriormente son distribuidas a cada nodo que participa en el proyecto PREDIMED según las determinaciones que en ellos se vaya a efectuar.

3.2.4.3.1 Material necesario para la obtención de muestras y almacenamiento

- Tubos de extracción sangre (BD Vacutainer Systems): a) Tubo cristal 4,5 mL con EDTA como aditivo (tapa violeta) (REF 367654), destinado a conseguir plasma-EDTA y interfase celular (buffy coat); b) Tubo cristal 4,5 mL con citrato como aditivo (tapa azul) (REF 367704), destinado a conseguir plasma-citrato y interfase celular (buffy coat); c) Tubo cristal 4 mL con gel (tapa amarilla) (REF 367783), destinado a conseguir suero; d) Equipos y agujas (BD Vacutainer Systems).
- Contenedor orina 100 mL (Soria Genlab SA), para recolección de orina reciente.
- Viales de 650 μ L (NIRCO SA, REF 915530).
- Viales de 1,7 mL (NIRCO SA, SORENSEN: Skirted vial 1.7mL TWISTTOP, ref 15570)
- Tapones de colores para los criotubos (NIRCO SA), según los códigos: a) “rojo” para el plasma-EDTA (NIRCO SA, ref 915410); b) “azul” para el plasma-citrato (NIRCO SA, ref 915470); c) “amarillo” para el suero (NIRCO SA, ref 915400); d) “blanco” para buffy-coat (NIRCO SA, ref 915480); e) “verde” para plasma-EDTA refrigerado (NIRCO SA, ref 915460); f) “transparente” para orina (NIRCO SA, ref 915490).
- Criocajas contenedores de criotubos GLW 2mL para 81 tubos, ref B50
- Pipetas Gilson 1000 μ L, Pasteur, puntas pipetas, y demás fungibles.

3.2.4.3.2 Protocolo de fraccionamiento en alícuotas

El protocolo de fraccionamiento en alícuotas se esquematiza en la figura 3.3. Cada uno de los tubos de extracción de sangre se centrifuga a 1500g durante 20 minutos. A continuación, se aspira con una pipeta Pasteur estéril y se obtienen: 5 alícuotas de 200 μ l y 10 de 500 μ l de plasma EDTA, 5 alícuotas de buffy-coat de 500 μ l a partir de tubos EDTA y citrato, 1 alícuota de 200 μ l y otra de 500 μ l de plasma EDTA refrigerado, 3 alícuotas de 200 μ l y 2 de 500 μ l de plasma citrato, 4 alícuotas de 200 μ l y 6 de 500 μ l de suero, 2 alícuotas de 500 μ l de suero protegido de la luz. A partir de la muestra de orina, se realizan 14 alícuotas de 650 μ l. Todas las alícuotas y las muestras de uñas se introducen en criotubos que se indentifican con el código asignado al participante. Cada tipo de alícuota tiene asignado un color de tapón diferente.

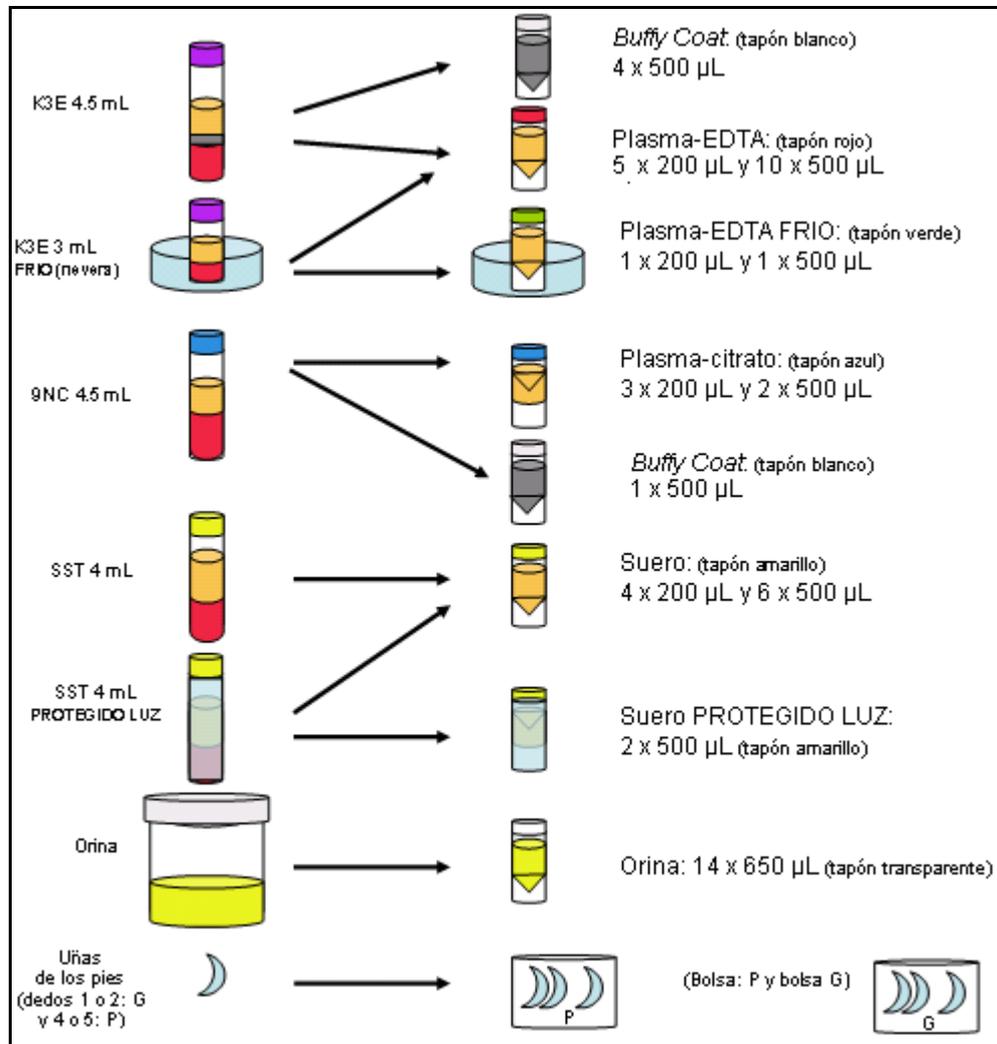


Figura 3.3. Protocolo de fraccionamiento en alícuotas de las muestras biológicas obtenidas en el estudio PREDIMED.

3.2.4.3.3 Protocolo de almacenamiento, conservación y distribución de muestras biológicas

Las alícuotas se introducen en criocajas y son almacenadas a -80°C hasta que son enviadas, cada seis meses, a los nodos correspondientes encargados de realizar determinaciones específicas a partir de las muestras. Las alícuotas de un

participante se distribuyen en criocajas separadas según deban ser enviadas a uno u otro nodo.

Los nodos receptores de muestras son IDIBAPS, IMIM, EPIGEN, NURETA, NUTR_ANDAL y AN_UB. El nodo de Valencia (EPIGEN) recibe 2 alícuotas de 500µl de interfase celular (buffy-coat) de cada nodo reclutador para extracción de ADN y análisis genético.

3.2.5 Determinaciones a partir de las muestras obtenidas

Con las muestras biológicas se obtienen pruebas básicas, como es un análisis bioquímico, y pruebas específicas a partir de las alícuotas para determinar variables intermedias de importancia pronóstica en la ECV. Cada nodo que figura como Unidad de Laboratorio Especializada se encarga de realizar las diferentes determinaciones específicas. Nos centraremos en las que se van a utilizar en este estudio.

3.2.5.1 Análisis bioquímico

A partir del análisis bioquímico se obtienen las concentraciones plasmáticas de glucosa, CT, c-HDL, c-LDL y TG. Las determinaciones se realizan en el laboratorio bioquímico de la Clínica Quirón de Valencia en el nodo de Valencia. La determinación del CT, c-HDL y TG se realizó por métodos enzimáticos en un analizador Beckman CX-7. La glucemia se determinó por método enzimático de adaptación de deshidrogenasa de la hexoquinasa-glucosa 6 fosfato. El c-LDL se obtuvo mediante la aplicación de la fórmula de Friedwald WT et al, (1972) válida siempre que la trigliceridemia no exceda los 300 mg/dl. Para calcularlo en mg/dl la fórmula es:

$$LDL\ colestero\ l = Colesterol\ total - \left(HDL\ colestero\ l + \frac{Triglicéridos}{5} \right)$$

Para poder calcularlo en mmol/L la cifra de TG debe dividirse entre 2,2.

Por otro lado, el nodo IDIBAPS se ocupa de realizar las determinaciones de glucosa, CT, c-HDL, c-LDL y TG a partir de las alícuotas enviadas por otros nodos entre ellos el nodo de Valencia.

3.2.5.2 Pruebas específicas a partir de las alícuotas

A partir de las alícuotas de plasma, suero, buffy-coat y orina se realizan las siguientes determinaciones:

- **Grado de adherencia a la ingesta de AOVE mediante determinación de los polifenoles tirosol e hidroxitirosol en orina y de ingesta de FS mediante la determinación de ácido α -linolénico en plasma.** El tirosol e hidroxitirosol son los polifenoles mayoritarios en el AOVE y pueden ser determinados en orina, así que pueden servir como marcadores del grado de cumplimiento de la intervención dietética en el grupo de DM+AOVE (Miró-Casas E et al, 2003). Estos dos polifenoles se midieron mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas con un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard HP5980 y un sistema de detección mediante espectrometría de masas HP5973. El ácido α -linolénico, presente en nueces, se utiliza como biomarcador del grado de cumplimiento de la intervención dietética en el grupo de DM+FS (Kris-Etherton PM et al, 1999). Se determinó mediante cromatografía de gases mediante el equipo Shimadzu GC-2010 (Shimadzu). Las determinaciones se realizaron en el nodo de Barcelona-IMIM (Estruch R et al, 2006).
- **Lípidos.** Se miden los niveles plasmáticos CT, c-HDL, c-LDL, TG, en el nodo IDIBAPS. La glucosa se ha determinado por el método de la glucosa oxidasa, CT y TG mediante métodos enzimáticos y c-HDL mediante precipitación con ácido fosfotúngstico y cloruro de magnesio (Estruch R et al, 2006).
- **Parámetros de inflamación y de función endotelial.** Se determinaron las concentraciones periféricas de ICAM-1, VCAM-1 e IL-6 mediante ELISA (kits BLK, Barcelona, España), y de PCR mediante inmunonefelometría en el aparato Synchron Lxi725-Synchron Access Clinical system (Beckman Coulter). Todas las determinaciones se realizaron por duplicado. Los coeficientes de variación intra e interensayo para la PCR, ICAM-1, VCAM-1 e IL-6 fueron de 1.8% hasta 5.4% y de 0.9 hasta 9.9% respectivamente. Las determinaciones se realizaron en el nodo IDIBAPS (Estruch R et al, 2006).
- **Marcadores de estrés oxidativo.** Se determinaron las concentraciones de un marcador de daño oxidativo del ADN (8-oxo-dG), un marcador de peroxidación lipídica (MDA), componentes del sistema antioxidante glutatión peroxidasa/glutatión reductasa (concentración de GSH, GSSG, cociente GSSG/GSH) y enzimas antioxidantes (actividad de la catalasa). Se analizaron en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de Valencia. Se midieron a partir de células mononucleares de la

sangre total que fueron aisladas mediante la centrifugación Ficoll-Hypaque (Boyum A et al, 1968). La enzima antioxidante catalasa y también el GSH fueron analizados según la metodología descrita por Greewald RA et al (1987), con las modificaciones específicas de Redón J et al (2003). Para el análisis de GSSG, las muestras fueron tratadas con N-etilmaleimida y ácido disulfónico batonantrolina y analizadas por cromatografía líquida de alta resolución (Muñiz P et al, 1995, Asensi MD et al, 1994). MDA fue cuantificado por el método de Wong SHY et al (1987) y el 8-oxo-dG por el método descrito por Fandos M et al (2010).

- **Determinación de polimorfismos de marcadores genéticos de riesgo de ECV.** Se realiza en el nodo de Valencia EPIGEN y se describe en el apartado de análisis genético.

3.2.6 Protocolo de intervención dietética personalizada

3.2.6.1 Asignación a un grupo de intervención

A los sujetos reclutados se les asigna individualmente a un grupo de los siguientes:

1) *Intervención Dietética Personalizada con DM + AOVE*

Este grupo recibe una intervención nutricional con DM más un suplemento de AOVE. Así pues, a los participantes que forman parte de este grupo se les solicita que utilicen AOVE como única fuente de grasa cruda y para cocinar. Ello implica evitar el consumo de mantequilla, margarina, aceites vegetales no de oliva y aceites de oliva común y de orujo. Para asegurar este punto se les facilita cierta cantidad de AOVE, en concreto, 1 litro a la semana para su utilización en el cocinado de alimentos y en su aliño.

2) *Intervención Dietética Personalizada con Dieta Mediterránea + FS*

Los participantes incluidos en este grupo reciben una intervención nutricional con DM y un suplemento de FS. Se les proporciona de una cantidad de 30 g al día de una mezcla de nueces (15 g), almendras (7,5 g) y avellanas (7,5g), y se les solicita que los añadan a su dieta. Se les explica cómo y cuando deben comerlas, así como alternativas para su consumo.

3) *Grupo control*

A los participantes en este grupo se les solicita que sigan las recomendaciones dietéticas tradicionales de una dieta baja en grasa tanto de origen animal como vegetal, tal y como recomienda la AHA para la prevención de las ECV (Krauss et al, 2000).

El AOVE es donado por la Fundación Patrimonio Comunal Olivarero, España, las nueces de California Walnut Commission, Sacramento CA, las almendras de Borges SA Reus, España, y las avellanas por La Morella Nuts SA, Reus, España.

3.2.6.2 Intervención dietética

Grupos de intervención con DM. A partir de los resultados de evaluación del grado de adscripción a la DM mediante el cuestionario de 14 puntos se delimitan aquellos aspectos en los que cada uno de los participantes se desvía respecto a la definición preestablecida de DM. Con dicha información se priorizan los cambios a obtener en la alimentación de los participantes en el estudio. Con ello, se pactan metas con el paciente a fin de aumentar la puntuación total de adherencia a la DM, estableciéndose unos objetivos mínimos a cumplir en la siguiente visita.

Algunos de los instrumentos que se utilizan para el cambio conductual son:

a) la valoración de la disponibilidad para el cambio de hábitos dietéticos, b) la valoración de las motivaciones de cada persona para el cambio, c) el establecimiento de objetivos concretos de acuerdo con el participante y, d) motivación del establecimiento de cambios mediante refuerzos positivos.

Se les explica a los participantes el concepto de DM y de las recomendaciones dietéticas a seguir a partir de su inclusión en el estudio. Dichas recomendaciones, previamente establecidas, están basadas en los hábitos alimentarios característicos mediterráneos de los años 60 según se resume en la tabla 3.6.

Además, se realizan reuniones trimestrales con los participantes que tienen como objetivo intentar la adscripción a estas recomendaciones y de suministrar el AOVE o FS según corresponda. En estas reuniones trimestrales grupales se les entrega por escrito diversa información para que el participante pueda adherirse mejor a las recomendaciones propuestas (tabla 3.7).

Tabla 3.6. Hábitos alimentarios característicos mediterráneos.

-
- Tomar dos comidas principales al día.
 - Utilizar aceite de oliva como fuente principal de grasa visible tanto para cocinar como para alinar.
 - Consumir 2 o más raciones de verduras u hortalizas al día, siendo al menos una de estas de forma cruda. Se considera una ración de verduras 150g.
 - Consumir 3 o más porciones de fruta al día (incluyendo zumos naturales).
 - Ante el consumo habitual de vino, se recomienda continuar bebiendo un vaso de vino tinto al día. Para los hombres se sugiere un vaso de 150cc y para mujeres uno de 100cc. Ante el consumo exagerado de vino o alcohol, se recomienda reducir el consumo a las cantidades preestablecidas. Ante el no consumo de alcohol, no recomienda su ingesta.
 - Consumir legumbres al menos 3 veces a la semana.
 - Consumir al menos 3 veces por semana pescado o mariscos, incluyendo al menos una vez pescado azul.
 - Consumir al menos 3 veces por semana frutos secos y/o semillas.
 - Preferir la carne de aves de corral y/o conejo a las carnes rojas, embutidos u otros productos cárnicos.
 - Utilizar al menos 2 veces por semana sofritos caseros realizados a fuego lento a base de tomate, ajo, cebolla o puerro y aceite de oliva, para condimentar pasta, arroz u otros platos. Condimentar al gusto con especias.
 - Mantener un consumo moderado del grupo de cereales, prefiriendo seleccionar los integrales.
 - Reducir el consumo de carnes rojas y embutidos a menos de 2 veces por semana (excepto jamón tradicional).
 - Evitar o eliminar el consumo de nata, mantequilla, margarina, bebidas carbonatadas y/o azucaradas (refrescos), repostería, bollería industrial y pre-cocinada, pasteles y dulces.
-

Basándose en estos principios concretamente se recomienda a los participantes:

- Utilizar aceite de oliva generosamente en la cocina y en la mesa como única grasa culinaria.
- Consumir diariamente: frutas, verduras, hortalizas y legumbres.
- En caso de que se beba vino se recomienda ingerir un vaso al día (150cc hombres y 100cc mujeres) acompañando las comidas.
- Consumo ilimitado: FS crudos (en el grupo de frutos secos), huevos, pescado, marisco, carnes blancas, cereales.

- Consumo limitado (<3 veces por semana): jamon tradicional, carnes rojas, chocolate (menos del 50% de cacao), quesos.
- No recomendados: mantequilla, nata, margarina, embutidos, pates, pato, repostería comercial, postres comerciales, patatas fritas de bolsa, bebidas endulzadas y productos precocinados.

Tabla 3.7. Material de apoyo entregado en las reuniones grupales trimestrales para reforzar el cumplimiento de la intervención en el estudio PREDIMED.

- Información sobre los alimentos básicos mediterráneos, según estación del año.
 - Listas de la compra adaptadas a la estación del año.
 - Plan de alimentación (menús orientativos) para una semana según la lista de la compra.
 - Recetas de los menús para 1 semana (almuerzos y cenas).
 - Instrucciones sobre la selección y conservación de los alimentos.
 - Entrega de AOVE para los siguientes tres meses de seguimiento de la intervención, o entrega de FS para los siguientes tres meses de seguimiento de la intervención.
 - Refuerzo individual de objetivos en caso necesario.
-

Grupo Control. Uno de los objetivos esenciales de las recomendaciones dietéticas de este grupo es la reducción de la ingesta de grasa total, tanto aquella de origen animal como la de origen vegetal (tabla 3.8).

Tabla 3.8. Recomendaciones para el grupo Control en el estudio PREDIMED.

- Preferir: pan, pasta, arroz, frutas, verduras, ensalada, legumbres, lácteos desnatados, pescado blanco y marisco, aves o cortes de carne bajos en grasa.
 - Cocinar con la menor cantidad de grasa posible, evitando estofados, guisados, fritos, rehogados, sofritos y rebozados. Utilizar preparaciones como hervir, hornear y a la plancha, evitar condimentar los platos con embutidos u otras fuentes de grasa.
 - Eliminar la grasa visible de los alimentos, por ejemplo no untar pan con aceite u otra fuente de grasa, quitar grasa a las carnes antes de cocinarlas.
 - Evitar el consumo de alimentos como bebidas alcohólicas (cuanto menos alcohol mejor), mantequilla o manteca de cerdo, leche entera o derivados lácteos ricos en grasa, como nata o helados, carnes con mucha grasa y embutidos, salchichas, longaniza, tocino, chistorra o chicharrones, hígado, riñones u otras vísceras, pasteles, dulces y alimentos precocinados.
-

Los participantes de este grupo también tienen reuniones grupales trimestrales, y de igual forma se les entrega material de apoyo para reforzar la adherencia a la

intervención. Este material de apoyo es el mismo que en la tabla 3.7 pero adaptado a una dieta baja en grasa. A estos voluntarios se les entregó ocasionalmente un regalo como, por ejemplo, un dosificador de aceite, manoplas, delantales, relojes, tazas, entre otros.

Tanto en los grupos de intervención como en el grupo control, a los pacientes con sobrepeso u obesidad se les aconseja que reduzcan su peso mediante las oportunas recomendaciones dietéticas y un mayor ejercicio físico. A los diabéticos, se les aconseja que fraccionen sus comidas y que eviten la toma de alimentos, que aislados, puedan producir marcadas elevaciones de la glucemia postprandial.

3.2.7 Validación del cuestionario de frecuencia de consumo alimentario utilizado en el proyecto PREDIMED. Estudio VALFRECO.

Para validar el CFCA utilizado en el estudio PREDIMED, se estimó su validez y reproducibilidad, y para ello se realizó un estudio denominado estudio VALFRECO que se llevó a cabo por tres nodos participantes en el estudio PREDIMED, el nodo de Pamplona, Reus y Valencia.

Para evaluar la validez del CFCA, se empleó como método de referencia el registro dietético de 3 días. De este modo, los sujetos seleccionados cumplimentaron un CFCA inicial (CFCA1), posteriormente cuatro registros dietéticos de tres días cada uno y finalmente un segundo CFCA (CFCA2), transcurrido un año desde la administración del primero. Se pidió a los participantes que no cambiarán sus hábitos dietéticos durante el año de seguimiento. En la figura 3.4 se expone el orden cronológico de administración de los CFCA y de los registros dietéticos.

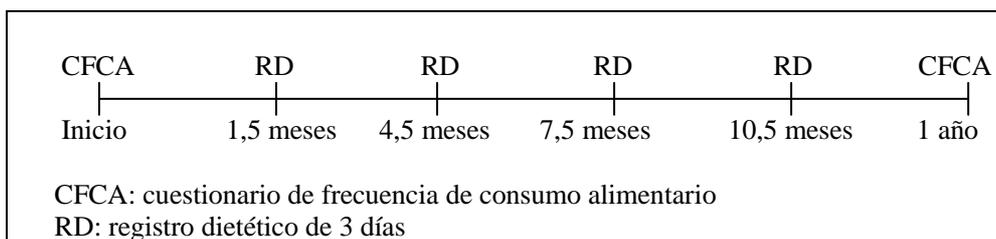


Figura 3.4. Cronograma de administración de los CFCA y registros dietéticos

Se incluyeron hombres y mujeres entre 55-80 años de edad, excluyéndose aquellos sujetos que presentan déficit intelectual (incluyendo demencias), participantes con enfermedades graves o terminales y sujetos que presentan modalidades de nutrición enteral domiciliaria o alimentación por sonda nasogástrica y parenteral.

Se seleccionó una muestra de conveniencia compuesta por 50 individuos, en cada una de las tres áreas participantes, con una razón hombres/mujeres de 1:1 (150 individuos: 50 en Reus, 50 en Pamplona y 50 individuos en Valencia). Inicialmente, se incluyó alrededor de 60 individuos en cada grupo para compensar posibles pérdidas durante el período de realización de las encuestas alimentarias (registro dietético y CFCA). Concretamente, la relación de participantes que se incluyeron inicialmente en el estudio, así como los posteriores abandonos registrados en cada nodo, se expone en la tabla 3.9. Finalmente, se incluyeron 158 participantes de los cuales 51 fueron reclutados en el nodo de Valencia. La tasa de cumplimiento fue del 85%.

Tabla 3.9. Número de CFCA y registros dietéticos contestados por nodo en el estudio VALFRECO.

Nodo	CFCA1	RD 1	RD 2	RD 3	RD 4	CFCA2
Pamplona	60	50	46	45	44	44
Tarragona	63	63	63	63	63	63
Valencia	62	53	51	51	51	51
Total	185	176	160	159	158	158

CFCA: Cuestionario de frecuencia de consumo alimentario; RD: registro dietético

Además, todos los participantes también cumplimentaron un cuestionario general breve con el que se recogieron datos sociodemográficos, antropométricos tales como edad, sexo, peso (kg), talla (m), IMC (kg/m²), enfermedades sufridas por el participante, antecedentes familiares de ECV, DMT2, cáncer, insuficiencia renal, y variables relacionadas con el estilo de vida (dieta, hábito tabáquico y actividad física que realiza).

El proceso de recopilación de datos comenzaba con la citación de cada sujeto seleccionado para una primera visita en la que se explicaba las características, finalidad y procedimiento del estudio VALFRECO. Una vez que el sujeto seleccionado se interesaba por el estudio y aceptaba participar se obtenía constancia escrita de su consentimiento informado. A continuación, se le ayudaba a cumplimentar el primer CFCA y el cuestionario de datos generales. Seguidamente, se le suministraba el primer formulario de registro dietético de 3 días y se le indicaba los días de la semana y la fecha en que debía realizar dicho registro. Además, se programaba la segunda visita, en la que se entregaba el primer registro

dietético rellenado y se aclaraban dudas y corregían posibles errores. Este proceso se repetía 3 veces más hasta conseguir los 4 registros dietéticos y posteriormente, se citaba de nuevo al participante para cumplimentar el segundo CFCA tras el periodo de un año.

El CFCA, explicado anteriormente en el apartado 3.2.4.1.3, es una adaptación del cuestionario desarrollado y validado en población española por Martín-Moreno JM et al (1993). El cuestionario original consta de 118 preguntas. Para realizar el estudio PREDIMED se añadieron 19 nuevas preguntas incluyendo alimentos que han sido introducidos recientemente en España como kiwi y cereales all-bran, frutas, vegetales y cereales integrales de especial interés para realizar un estudio de DM (por ejemplo, ajos, cebollas, hierbas aromáticas, champiñones y otras variedades de setas). Además, para poder medir ingesta de flavonoides, fitosteroles y polifenoles, se introdujeron preguntas sobre variedades de aceite de oliva, FS, cacao, té y vinos. También, se añadió una pregunta acerca de la frecuencia de ingesta de fruta como postre y se rectificaron algunos tamaños de porción con respecto al cuestionario original. Así el CFCA definitivo quedó con 139 preguntas y mide la frecuencia diaria, semanal y mensual de 9 grupos de alimentos en un período de 1 año. Para cada alimento se presenta el tamaño típico de la ración y se ofrecen 9 opciones de frecuencia de consumo (nunca o casi nunca, 1-3 veces al mes, 1 vez por semana, 2-4 veces por semana, 5-6 veces por semana, 1 vez por día, 2-3 veces por día, 4-6 veces por día y más de 6 veces por día). La información que se recoge es semicuantitativa, ya que la incorporación para cada alimento de la ración habitual estimada, permite cuantificar el consumo de alimentos y nutrientes. Se puede descargar en http://www.unav.es/departamento/preventiva/predi_educationals.

El registro dietético que se utilizó recoge la información dietética de 3 días, eligiéndolos de modo que estén representados proporcionalmente todos los días de la semana. En él se recoge de forma detallada los alimentos que ingiere el participante durante los 3 días establecidos, así como, horario (desayuno, almuerzo, comida, merienda y cena), lugar donde se realizan las diferentes comidas (restaurante o casa) y cantidad o ración ingerida de cada alimento en gramos. Además, se requiere también información acerca de los ingredientes utilizados para preparar los platos o descripción de recetas, el método que ha utilizado para cocinar (ej: hervido, frito, a la brasa), las grasas que utiliza (ej: aceite de oliva, aceite de girasol, margarina, mantequilla), así como de las marcas y etiquetas comerciales de los productos utilizados. Se realizaron 4 registros dietéticos de 3 días de modo que se obtuvo información de 12 días.

La estimación de las raciones de los diferentes alimentos anotados por los participantes en los registros dietéticos suponía una de las tareas más complicadas ya que, a menudo, los participantes presentaban dificultad para determinar el peso en gramos de los alimentos ingeridos. Puesto que una adecuada estimación de las raciones de alimentos es uno de los aspectos determinantes para realizar una validación del CFCA fiable, se establecieron unos criterios comunes a seguir para los 3 nodos. Dichos criterios se exponen a continuación:

- 1) En primer lugar, en el caso de que el participante proporcionase los gramos de las porciones de cada alimento por pesada en báscula, se asumían estos valores como válidos.
- 2) En el caso de que el participante desconociese el peso de las raciones de los alimentos registrados se utilizaba un libro que exhibe fotografías de varias raciones de platos comunes y su peso, así como medidas de capacidad de diferentes utensilios de cocina como vasos, tazas, tazones, platos, de varias formas. Se trata del libro *Portions alimentaires: Manuel photos pour l'estimation des quantités* realizado por SU-VI-MAX (2002). Este libro de referencia se complementó con las raciones elaboradas por Gema Salvador y descritas en el anexo 4 del libro *Nutrición y Dietética Clínica* (Salas-Salvado J et al, 2002).
- 3) En el caso de que el participante desconociese la receta empleada en la elaboración de algún plato, se acordó aplicar por defecto una receta estándar obtenido del libro *1080 Recetas de Cocina* de Simone Ortega (2005). A partir, de la receta tomada como estándar se expresa el porcentaje que representa cada alimento con respecto al peso global del plato para posteriormente, calcular el peso de cada alimento que compone el plato. El peso global se obtenía a partir del libro de fotografías de raciones citado en el punto anterior.

Otro aspecto conflictivo era determinar la cantidad de grasa absorbida por los alimentos según la técnica culinaria utilizada. Para unificar criterios entre los 3 nodos se acordó utilizar la tabla de absorción de grasa elaborada por el nodo de Reus (Tabla 3.10).

Tabla 3.10. Absorción de grasa durante la cocción. Estudio VALFRECO.

Alimento	Absorción de grasa (% del peso)
Buñuelos de bacalao	15-20%
Calamares a la romana	10-15%
Croquetas	8-12%
Huevo frito	10-15%
Patatas fritas	12-18%
Pollo rebozado	5-10%
Tortilla de calabacín	8-15%
Tortilla francesa	8-15%

Por otro lado, el peso en gramos de las porciones de alimentos hace referencia a los alimentos en bruto y, en el caso de legumbres y cereales como la pasta y el arroz, a alimentos crudos. En el supuesto de que fuese necesario emplear el peso del alimento cocinado el criterio a seguir se expone en la tabla 3.11.

Tabla 3.11. Criterios de corrección para alimentos crudos y cocidos. Estudio VALFRECO.

Alimento	Criterio
Legumbres, arroz	Multiplicar por 3
Pasta	Multiplicar por 2,5

Tras la cumplimentación correcta de los dos CFCA y los 4 registros dietéticos con el peso de las diferentes raciones, se calculó la ingesta alimentaria y los alimentos registrados se transformaron en energía y nutrientes para evaluar la validez y la reproducibilidad del CFCA. La validez se obtuvo al comparar los resultados entre el CFCA2 y la media de los 4 registros dietéticos y la reproducibilidad al comparar el CFCA1 con el CFCA2.

Así pues, para calcular la energía total y la ingesta de nutrientes a partir de los CFCAs y de los registros dietéticos se utilizaron las tablas de composición de alimentos españolas de Moreiras O et al de (2005). Se calcularon las medias por día de energía total (KJ y Kcal), proteínas (g), carbohidratos (g), grasas (g), AGS (g), AGM (g), AGP (g), colesterol (mg), fibra (g), ácidos grasos omega-3 de origen marino (g) y de origen no marino (g) y ácido α -linoléico (g).

Por otro lado, se acordó que ingestas dietéticas mayores de 16790 KJ/día (4013Kcal/día o menores de 3360 KJ/día (803 Kcal/día) para hombres y mayores de 14690 KJ/día (3511Kcal/día o menores de 2100 KJ/día (502 Kcal/día) para mujeres fueran excluidas. Sin embargo, no se encontraron valores de ingesta dietética extremos o inverosímiles.

3.3 Estudio EPIC

3.3.1 Diseño del estudio

EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) es un estudio prospectivo llevado a cabo en 10 países europeos (Riboli E et al, 2002). En este trabajo se realiza un estudio de casos y controles anidado dentro de la cohorte

EPIC española (Gozález CA et al, 1994). Dicha cohorte está constituida por 25.814 mujeres y 15.635 varones entre 35-65 años reclutados entre 1992-1996 en provincias de 5 comunidades autónomas: Granada (7.879), Murcia (8.516), Navarra (8.084), Guipúzcoa (8.417) y Asturias (8.544). El porcentaje de mujeres oscilo entre 50,6-77,2% según la región.

A partir de la cohorte EPIC española, se seleccionaron 1940 individuos de los cuales 642 eran casos incidentes de IAM fatal y no fatal, tras diez años de seguimiento de la cohorte, y 1298 controles sanos apareados por edad, sexo y región de procedencia con los casos.

3.3.2 Sujetos del estudio

Los individuos eran, en el momento del reclutamiento, voluntarios sanos de diversos sectores sociales del medio rural y urbano. Mayoritariamente, donantes activos de sangre y en menor proporción trabajadores de empresas, funcionarios o individuos de la población general. La participación fue de aproximadamente un 50% de los individuos seleccionados.

El nodo de Valencia no participó directamente en la selección de los casos. Los casos son los eventos fatales y no fatales de IAM que se produjeron en la cohorte. Se identificaron todos los eventos fatales hasta el 31/12/2003 y los no fatales hasta el 31/12/2004, lo que supone entre 8 y 12 años de seguimiento según la fecha de reclutamiento (entre 1992-1996) y se obtuvieron 642 casos. La identificación de los eventos de CI en sus diferentes formas de expresión se realizó mediante un seguimiento mixto (activo y pasivo). El primer seguimiento se realizó entre 1996-1998, mediante un cuestionario telefónico con objeto de conocer cambios en la exposición (consumo de tabaco y alcohol, peso y actividad física) y nuevos procesos clínicos y quirúrgicos de interés diagnosticados tras el reclutamiento. Concretamente, se les preguntaba sobre si habían tenido un IAM, el año y el centro hospitalario de ingreso. Las pérdidas de seguimiento fueron solo del 1%. Se realizaron nuevos seguimientos a partir del año 2000. En todos aquellos casos en que los participantes informaron sobre diagnósticos de angina o IAM se revisaron las historias clínicas de los hospitales para confirmar los diagnósticos. Además de los eventos autoreportado por los participantes en las encuestas telefónicas, se investigaron los posibles episodios de CI registrados en tres sistemas de información sanitaria: registros poblacionales de IAM, registros de Conjunto Mínimo Básico de Datos (CMBD) de altas hospitalarias y registro nacional de defunciones del INE. La recogida y validación de los casos se realizó por un equipo autorizado para la revisión de las historias clínicas y entrenado en la aplicación de los algoritmos diagnósticos tanto de IAM como de angina. Se

utilizaron criterios y definiciones estandarizadas. El número esperado de eventos coronarios no fatales se ha estimado a partir de los registros de altas hospitalarias de Navarra y del estudio IBERICA sobre incidencia de IAM en 7 regiones de España, mientras que las muertes esperadas por CI se han obtenido a partir de las estadísticas de mortalidad del año 2000 publicadas para España por el INE.

Para cada caso, se eligieron dos controles dentro de la misma cohorte (1298 controles) libres de ECV y apareados por sexo, edad y región de procedencia con los casos. De todos los participantes en este estudio anidado se obtuvo una muestra de material biológico (leucocitos) a partir de los cuales se aislará el ADN para el análisis de los polimorfismos genéticos propuestos. De todos estos participantes se dispuso del consentimiento informado para la realización de este estudio.

3.3.3 Recopilación de datos

Las variables a estudiar son las siguientes: caso-control, sexo, edad, otras variables sociodemográficas (nivel socio-económico, estudios, región), ejercicio físico, tabaco, fármacos, composición de la dieta, expresada tanto en términos de alimentos, nutrientes o como patrones de adherencia a la DM. Nuestro grupo se centró en la obtención de variables de susceptibilidad genética incluyendo el polimorfismo TaqIB en el gen de CETP.

En la fase de reclutamiento de la cohorte EPIC se recogió información sobre actividad física mediante un cuestionario de estilo de vida validado (Wareham NJ et al, 2003), antecedentes médicos incluyendo diagnóstico de HTA, hiperlipemia, DMT2 o ECV, y se tomaron medidas antropométricas (talla, peso y cintura) mediante métodos estandarizados. La información sobre consumo alimentario se obtuvo por entrevista personal, mediante un cuestionario informatizado especialmente diseñado (EPIC Group of Spain, 1997), basado en el método de la historia de dieta, estructurado por ocasiones de ingesta, en la que se recogió información muy detallada sobre frecuencia y cantidad de consumo de unos 600 ítems alimentarios y 150 recetas regionales. El consumo de calorías y nutrientes fue estimado mediante una tabla de composición de alimentos recopilada especialmente para el estudio y contenida en una base informatizada de más de 700 ítems alimentarios (Slimani N et al, 1991). La ingesta de alcohol fue clasificada en 2 (bebedor y no bebedor) o 3 categorías: no bebedor (0 g/d), ingesta moderada (<26,4 g alcohol/d) para hombres y <13,2 g alcohol/d para mujeres (Pearson TA, 1996). Cuando las variables de consumo alimentario fueron tratadas como continuas, ingestas medias por encima de 3 veces la desviación típica fueron excluidas. La adherencia a la DM se evaluó mediante una versión modificada por investigadores del grupo EPIC de España de las escalas desarrolladas por

A. Trichopoulou en Grecia (Trichopoulou A et al, 1995, Trichopoulou A et al 2003). Esta escala considera 9 componentes característicos en esta dieta, agrupados en “beneficiosos” y “perjudiciales”. Para los componentes considerados beneficiosos (vegetales, legumbres, frutas y nueces, cereales y pescado) las personas que en cada sexo, consumen por debajo de la mediana se les asigna 0 y las personas que se encuentra por encima se les asigna 1. En cuanto a los componentes de la dieta considerados perjudiciales (carne, pollo y productos lácteos) las personas cuyo consumo estaba debajo de la media puntúan 1 y las personas que consumen por encima de la media puntúan 0 puntos. En cuanto al consumo de etanol asigna 1 punto cuando el consumo se encuentra entre 10-50 gramos al día en los hombres y entre 5–25 en las mujeres.

Durante la fase de reclutamiento también se realizó la extracción de una muestra de sangre a partir de la cual se obtuvo plasma, suero y células plasmáticas. Las muestras biológicas se almacenaron congeladas a -180°C con nitrógeno líquido hasta su uso. La concentración de lípidos plasmáticos se determinó en 1584 individuos. El CT y los TG se analizaron mediante métodos enzimáticos. Los TG se obtuvieron en 996 individuos. El c-HDL se cuantificó tras precipitación con ácido fosfotúngstico y cloruro de magnesio. El c-LDL se calculó como $(\text{CT}-(\text{c-HDL}+\text{TG}/5))$ cuando el nivel de TG era ≤ 300 mg/dL y para muestras de individuos que permanecían en ayunas, y por el método homogéneo de Daiichi Pure Chemicals Company (N-geneous®LDL, Genzyme Diagnostics, Cambridge, MA) cuando el nivel de TG era > 300 mg/dL o en muestra de individuos que no estaban en ayunas. Para todo ello se utilizó el analizador de química clínica ADVIA 1800 (Siemens Healthcare Diagnostics, Madrid, España). Las determinaciones se realizaron en plasma y se expresaron en los valores correctos. Esta corrección se llevó a cabo para compensar la dilución del plasma con EDTA, mediante ecuaciones de regresión, para comparar con niveles de lípidos de muestras de suero obtenidas de forma similar en otro subestudio EPIC (Agudo A et al, 2009).

Para el análisis de las variables de susceptibilidad genética se obtuvo el ADN, a partir de leucocitos aislados de sangre venosa periférica de cada participante, que se conservaron congelados a -180°C en pajuelas. De cada pajuela se obtuvo aproximadamente 50 μg de ADN. Se determinó la concentración real y la calidad del ADN aislado y a partir del ADN de cada individuo, se determinó el polimorfismo TaqIB del gen de CTEP.

3.4 Análisis genético

En el estudio PREDIMED se determinaron los polimorfismos de los genes: APOE, CETP, LIPC, LPL, PON1, ABCA1, APOA1, PPARGC1, PPARG2, MTHFR, COX-2, CYBA, FTO, IL-6, AMPK y TCF7L2. En el estudio EPIC se determinó el polimorfismo TaqIB del gen de CETP.

El proceso de extracción del ADN, así como el análisis de los distintos polimorfismos estudiados, se realizó en el laboratorio del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Facultad de Medicina de Valencia. Ambos procesos se realizaron bajo las condiciones óptimas y en salas distintas para impedir la contaminación de las muestras.

Para el análisis genético se utilizaron dos técnicas según el polimorfismo: técnica de RFLPs (Restriction fragment length polymorphism) y discriminación alélica mediante análisis de fluorescencia con sondas TaqMan. Los polimorfismos que se analizaron por la técnica de RFLPs fueron los de los genes: APOE, variante TaqIB de CETP, LIPC, LPL, PON1, ABCA1, APOA1, PPARGC1, COX-2, CYBA y con la utilización de sondas TaqMan FTO, CTEP (variante rs183130), IL-6, AMPK, TCF7L2. Los polimorfismos de los genes de PPARG2 y MTHFR se genotiparon mediante las dos técnicas.

3.4.1 Casas comerciales

Amersham International, Amersham, Bucks, Reino Unido.

Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos.

BlueMarine, Serva Electrophoresis, Heidelberg, Alemania.

Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, Estados Unidos.

Boehringer, Mannheim, Alemania.

Clinical Chemistry System, de Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania.

Eppendorf, Hamburgo, Alemania

Gibco BRL - Life Technologies, Paisley, Escocia.

Heraeus Sepatech, Osterode, Alemania.

Hewlett Packard, Palo Alto, CA, Estados Unidos.

IZASA S.A. División Bioquímica, Barcelona, España.

Merck, Darmstadt, Alemania.

Millipore Corporation, Bedford, MA, Estados Unidos.

Mitsubishi Electric Corporation, Tokyo, Japón.

MoBio Laboratorios, Inc

National Electronics, Estados Unidos.

New England Biolabs, Beverly, MA, Estados Unidos.

OWL Scientific Inc., Woburn, MA, Estados Unidos.

Panreac, Barcelona, España.

Perkin Elmer, Buckinghamshire, Reino Unido.

Pharmacia Biotech, Sollentuna, Suecia.

Polaroid, St. Albans, Reino Unido.

Promega Corporation, Madison, WI, Estados Unidos.

Pronadisa, Madrid, España.

Riedel-de Haën, Seelze, Alemania.

Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania.

Sigma Chemical Co., St Louis, MO, Estados Unidos.

Whatman International Ltd., Maidstone, Reino Unido.

3.4.2 Obtención de ADN

Se emplearon 3 técnicas para la extracción de ADN:

Purificación con fenol-cloroformo: método descrito por Miller et al (Ordovás JM et al, 1987). Es un método manual que consiste en la obtención de ADN a partir de leucocitos de sangre periférica. Brevemente, en un primer paso se lisan los hematíes con una solución hipotónica. A continuación, se utiliza una solución detergente para romper las membranas de los leucocitos y liberar el ADN. Por último, se purifica el ADN con una mezcla fenol-cloroformo y se precipita con acetato amónico 10M y etanol 70%. El ADN obtenido se resuspende en tampón TE (Tris EDTA) y se guarda a 4°C. Se utiliza con muestras de sangre total fresca aunque también puede obtenerse ADN a partir de muestras de buffy-coat.

Kit de extracción de ADN manual. Concretamente, se ha utilizado el kit Ultraclean BloodSpin de MoBio Laboratorios, Inc. Consiste en un kit de extracción de ADN manual que se basa en la utilización de filtros de sílica para aislar el ADN previa lisis de células y degradación de proteínas en presencia de Proteínasa K. Permite extraer ADN genómico a partir de sangre total (fresca, congelada o almacenada a 4°C) y buffy-coat. Este kit contiene todos los reactivos, filtros de sílica y tubos requeridos para llevar a cabo todo el proceso sobre 250 muestras.

Método automatizado con el robot MagNA Pure Compact Instrument de Roche. Este robot (Figura 3.5) integra la tecnología necesaria para la purificación de ácidos nucleicos de manera automatizada. Esta preparado para procesar de 1 a 8 muestras en paralelo al mismo tiempo. Las muestras pueden proceder de sangre fresca, congelada o buffy-coat. Funciona en combinación con kits que contienen todos los componentes ya optimizados necesarios para llevar a cabo el aislamiento de ADN suministrados también por Roche.



Figura 3.5. MagNA Pure Compact Instrument de Roche utilizado para extracción de ADN

Para la extracción de ADN de las muestras del estudio PREDIMED se utilizaron las tres técnicas según las características de la muestra. Si se trataba de sangre fresca el ADN se obtuvo a partir de la técnica de extracción mediante fenolcloroformo (muestras obtenidas en el nodo de Valencia) y si trataba de buffy-coat congelado se utilizaban las otras dos técnicas (muestras procedentes de otros nodos). En el caso del estudio EPIC la extracción de ADN siempre se realizó con el robot Magna Pure Compact Instrument de Roche puesto que solo se disponía de buffy-coat congelado.

3.4.3 Reacción en cadena de la polimerasa

La amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa se realizó en los genes: APOE, CETP, LIPC, LPL, PON1, ABACA1, APOA1, PPARG2, PPARGC1, COX-2, MTHFR y CYBA. Para la amplificación de fragmentos de ADN se utilizaron oligonucleótidos sintetizados por Pharmacia Biotech, Taq polimerasa de la casa comercial Promega, dNTP's procedentes de Boehringer Mannheim y MgCl₂ 25mM de Promega. Los oligonucleótidos se muestran en la tabla 3.12. Todas las amplificaciones se efectuaron en un volumen de 50 µl (para 300 y 600 ng de ADN de la muestra) y la mezcla de reacción que se utilizó fue: 1 pg de dNTP's, 25 pg de Mg₂Cl, 2pg de cada primer y 2.5 U de Taq Polimerasa (5U/µl) (Orita M et al, 1989, Glavac D et al, 1993). Para la amplificación se utilizó un termociclador Eppendorf Mastercycler. Las condiciones de los ciclos de amplificación para el estudio de las diferentes variantes genéticas fueron similares:

- para el polimorfismo de la **ApoE (E2/E3/E4)** después de una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, se realizaron los ciclos indicados para cada variante con el siguiente protocolo: 40 segundos a 94°C, 30 segundos a la correspondiente temperatura de anillamiento y 60 segundos a 72°C. Para la extensión del amplificado se utilizó una temperatura de 72°C durante 10 minutos (Salah D et al, 1997, Corella D et al, 2000(a)).
- para el polimorfismo de la **CETP (Taq1B)** después de una desnaturalización inicial a 94°C durante 4 minutos, se realizaron los ciclos indicados para cada variante con el siguiente protocolo: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a la correspondiente temperatura de anillamiento y 40 segundos a 72°C. Para la extensión del amplificado se utilizó una temperatura de 72°C durante 5 minutos (Agerholm-Larsen B et al, 2000, Noone E et al, 2000, Ordovás JM et al, 2000).
- para el polimorfismo de la **LIPC (-514C/T)** después de una desnaturalización inicial a 95°C durante 3 minutos, se realizaron los ciclos indicados para cada variante con el siguiente protocolo: 60 segundos a 95°C, 30 segundos a la correspondiente temperatura de anillamiento y 30 segundos a 72°C. Para la extensión del amplificado se utilizó una temperatura de 72°C durante 5 minutos (Deeb SS et al, 2000).
- para el polimorfismo de la **LPL (S447X)** después de una desnaturalización inicial a 96°C durante 3 minutos, se realizaron los ciclos indicados para cada variante con el siguiente protocolo: 30 segundos a 95°C, 30 segundos a la correspondiente temperatura de anillamiento y 60 segundos a 72°C. Para la

extensión del amplificado se utilizó una temperatura de 72°C durante 10 minutos (Humphries SE et al, 1998, Gagne SE et al, 1999).

- para el polimorfismo del **PPARG2 (Pro12Ala)** después de una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, se realizaron los ciclos indicados para cada variante con el siguiente protocolo: 45 segundos a 94°C, 45 segundos a la correspondiente temperatura de anillamiento y 45 segundos a 72°C. Para la extensión del amplificado se utilizó una temperatura de 72°C durante 7 minutos (Mori H et al, 2001).
- para el polimorfismo de **PPARGC1 (Gly482Ser)** después de una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, se realizaron los ciclos indicados para cada variante con el siguiente protocolo: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a la correspondiente temperatura de anillamiento y 30 segundos a 72°C. Para la extensión del amplificado se utilizó una temperatura de 72°C durante 5 minutos (Esterbauer H et al, 2002).
- para el polimorfismo de **ABCA1 (R219K)** después de una desnaturalización inicial a 94°C durante 6 minutos, se realizaron los ciclos indicados para cada variante con el siguiente protocolo: 45 segundos a 94°C, 45 segundos a la correspondiente temperatura de anillamiento y 45 segundos a 72°C. Para la extensión del amplificado se utilizó una temperatura de 72°C durante 5 minutos (Sussana M et al, 2001).
- para el polimorfismo de **PON1 (Q192R)** después de una desnaturalización inicial a 94°C durante 6 minutos, se realizaron los ciclos indicados para cada variante con el siguiente protocolo: 45 segundos a 94°C, 45 segundos a la correspondiente temperatura de anillamiento y 45 segundos a 72°C. Para la extensión del amplificado se utilizó una temperatura de 72°C durante 6 minutos (Motti C et al, 2001).
- para el polimorfismo de **APOA1 (-75G/A)** después de una desnaturalización inicial a 94°C durante 6 minutos, se realizaron los ciclos indicados para cada variante con el siguiente protocolo: 45 segundos a 94°C, 45 segundos a la correspondiente temperatura de anillamiento y 45 segundos a 72°C. Para la extensión del amplificado se utilizó una temperatura de 72°C durante 5 minutos (Ordovas JM et al, 2002(a)).
- para el polimorfismo de **COX-2 (-765G/C)** después de una desnaturalización inicial a 94°C durante 6 minutos, se realizaron los ciclos indicados para cada variante con el siguiente protocolo: 45 segundos a 94°C, 45 segundos a la correspondiente temperatura de anillamiento y 30 segundos a 72°C. Para la

extensión del amplificado se utilizó una temperatura de 72°C durante 5 minutos (Papafili A et al, 2002).

- para el polimorfismo de **MTHFR (C677T)** después de una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, se realizaron los ciclos indicados para cada variante con el siguiente protocolo: 40 segundos a 94°C, 30 segundos a la correspondiente temperatura de anillamiento y 1 minuto a 72°C. Para la extensión del amplificado se utilizó una temperatura de 72°C durante 10 minutos (Skibola CF et al, 1999).
- para el polimorfismo de **CYBA (C242T)** después de una desnaturalización inicial a 94°C durante 6 minutos, se realizaron los ciclos indicados para cada variante con el siguiente protocolo: 45 segundos a 94°C, 45 segundos a la correspondiente temperatura de anillamiento y 45 segundos a 72°C. Para la extensión del amplificado se utilizó una temperatura de 72°C durante 5 minutos (Inoue N et al, 1998).

La verificación de las amplificaciones se realizaba cargando 5 µl de la reacción en geles horizontales de agarosa 2% en 1X TAE. El ADN se visualizaba mediante tinción con bromuro de etidio y exposición a luz UV, el tamaño del fragmento obtenido se obtenía por comparación con el marcador XIII.

El marcador de pares de bases que se utilizó fue el XIII de la casa Boehringer Mannheim. La agarosa para la realización de los geles para la electroforesis horizontal fue de Pronadisa, y el TAE (triz-acetato-EDTA) de Gibco BRL. Las electroforesis horizontales en geles de agarosa se realizaron utilizando aparatos de la casa comercial BlueMarine, y para su visualización se manejó un sistema transiluminador de National Electronics M900X. La impresión de las fotografías de dichos geles se realizó con un sistema fotográfico de Mitsubishi P91.

En la tabla 3.12 se observan los oligonucleótidos empleados en la amplificación para cada uno de los polimorfismos estudiados.

Tabla 3.12. Oligonucleótidos empleados para el análisis genético

Oligonucleótido	Localización del gen	Secuencia
F4	19q13.2	ACAGAATTCGCCCCGGCCTGGTACAC
F6	19q13.2	TAAGCTTGGCACGGCTGTCCAAGGA
CETP1	16q21	CACTAGCCCAGAGAGAGGAGTGCC
CETP2	16q21	CTGAGCCCAGCCGCACACTAAC
LH1	15q21-q23	TCTAGGATCACCTCTCAATGGGTCA
LH2	15q21-q23	GGTGGCTTCCACGTGGCTGCCTAAG
LPL ST1	8p22	CATCCATTTTCTTCCACAGGG
LPL ST2	8p22	TAGCCCAGAATGCTCACCAGACT
PPARG1	3p25.2	TCTGGGAGATTCTCCTATTGGC
PPARG2	3p25.2	CTGGAAGACAACACTACAAGAG
482F	4p15.1	GAGCCGAGCTGAACAAGCAC
482R	4p15.1	GGAGACACATTGAACAATGAATAGGATTG
ABCA1F	9q31.1	GTATTTTGCAAGGCTACCAGTTACATTTGACAA
ABCA1R	9q31.1	GATTGGCTTCAGGATGTCCATGTTGGAA
PON1F	7q21.3	TTGAATGATATTGTTGCTGTGGGACCTGAG
PON1R	7q21.3	CGACCACGCTAAACCCAAATACATCTCCCAGA
APOA1F	11q23-q24	AGGGACAGAGCTGATCCTTGAACTCTTAAG
APOA1R	11q23-q24	TTAGGGGACACCTACCCGTCAGGAAGAGCA
COX-2F	1q25.2-q25.3	CATTTAGCGTCCCTGCAAAT
COX-2R	1q25.2-q25.3	CTCCTTGTTTCTTGGAAGAGAGT
MTHFR1	1p36.3	TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA
MTHFR2	1p36.3	AGGACGGTGCGGTGAGAGTG
CYBA1	16q24	TGCTTGTGGGTAAACCAAGGCCGGTG
CYBA2	16q24	AACACTGAGGTAAGTGGGGGTGGCTCCTGT

En la tabla 3.13 se muestran los ciclos de amplificación, temperatura de anillamiento y tamaño esperado de los diferentes fragmentos de ADN para los genes analizados en este trabajo.

Tabla 3.13. Ciclos de amplificación, temperatura de anillamiento y tamaño esperado de los fragmentos de ADN estudiados en los genes de interés

Variante genética	Oligos	T ^a anillamiento	NºCiclos	Tamaño
E2→A472C (Arg158Cys)	F4-F6	62°C	37	244 pb
E4→C334A (Cys112Arg)				
277 (mutación silente)	CETP1-CETP2	60°C	29	535 pb
-514 C/T	LH1-LH2	68°C	35	285 pb
C1595G (Ser447Stop)	LPL ST1- LPL ST2	53°C	40	137 pb
Pro12Ala	PPARG1-PPARG2	50°C	30	154 pb
Gly482Ser (+1564 G/A)	482F-482R	54°C	35	239 pb
R219K	ABCA1F-ABCA1R	59°C	39	177pb
Q192R	PON1F-PON1R	58,5°C	39	111pb
-75G/A	APOA1F-APOA1R	64,2°C	39	432pb
-765G/C	COX-2F-COX-2R	58,5°C	39	175pb
C677T	MTHFR1-MTHFR2	66,7°C	40	198pb
C242T	CYBA1-CYBA2	61,4°C	39	348pb

3.4.4 Análisis de polimorfismos de longitud en los fragmentos de restricción de los productos de la reacción en cadena de la polimerasa

Las digestiones de restricción se realizaron siguiendo las indicaciones de cada fabricante para cada enzima.

Los productos de digestión fueron sometidos a electroforesis en geles horizontales de agarosa al 2% en 1X TAE para CETP, en geles al 2,5% para LIPC y CYBA, PPARGC1 en geles al 3% y en geles al 4% para APOE, LPL S447X, PON1, PPARG2, COX-2 y MTHFR. Posteriormente, el ADN se visualizaba mediante tinción con bromuro de etidio y exposición a luz UV, el tamaño del fragmento obtenido se obtenía por comparación con el marcador XIII.

Las distintas enzimas de restricción utilizadas procedían de la casa comercial Promega. El marcador de pares de bases que se utilizó fue el XIII de la casa Boehringer Mannheim. La agarosa para la realización de los geles para la electroforesis horizontal fue de Pronadisa, y el TAE (triz-acetato-EDTA) de Gibco BRL.

Las electroforesis horizontales en geles de agarosa se realizaron utilizando aparatos de la casa comercial BlueMarine, y para su visualización se manejó un sistema transiluminador de National Electronics M900X. La impresión de las fotografías de dichos geles se realizó con un sistema fotográfico de Mitsubishi P91. Las lecturas se realizaron por dos observadores independientemente repitiendo las discrepancias. Los sitios de restricción, los exones donde se localizan, la enzima que se utiliza para su detección y los fragmentos que se originan se señalan en la siguiente tabla (Tabla 3.14).

Tabla 3.14. Enzimas utilizadas, secuencia de corte y fragmentos obtenidos tras la digestión del producto de amplificación para el cribado de las variantes en los genes de interés

Gen / variante	Enzima	Secuencia de corte	Fragmentos
APOE	Hha I	GCG↓C	alelo E2: 91 pb, 83 pb alelo E3: 91 pb, 48 pb alelo E4: 72 pb, 48 pb
CETP TaqIB	Taq I	T↓CGA	alelo B1: 361 pb, 174 pb alelo B2: 535 pb
LIPC -514 C/T	NlaIII/Hspl	G↓CGTC	alelo T: 215 pb, 70 pb alelo C: 285 pb
LPL Ser447Stop	Hinf I	G↓ANTC	alelo S447: 137 pb alelo X447: 114 pb, 23 pb
PPAR-γ Pro12Ala	HhaI	GCG↓C	alelo Ala: 134 pb, 20 pb alelo Pro: 154 pb
PPARGC1 G482S	Msp I	C↓CGG	alelo G: 172 pb, 67 pb alelo A: 239 pb
ABCA1 R219K	EcoNI	CCTNNNNNAGG	alelo 219K: 107pb, 70pb alelo R219: 177 pb
PON1 Q192R	Hinf I	G↓ANTC	alelo 192R: 77 pb, 34 pb alelo Q192: 111 pb
APOA1 -75G/A	Msp I	C↓CGG	alelo A: 119 pb, 96 pb alelo G: 217 pb
COX-2 -765G/C	Hinf I	G↓ANTC	alelo C: 151 pb, 24 pb alelo G: 175 pb
MTHFR C677T	Hinf I	G↓ANTC	alelo T: 175 pb, 23 pb alelo C: 198 pb
CYBA C242T	Rsa I	GT↓AC	alelo T: 188 pb, 160 pb alelo C: 348 pb

3.4.5 Análisis de de fluorescencia mediante sondas TaqMan

La sonda Taqman es un oligonucleótido que contiene fluorocromos en los dos extremos y que es capaz de hibridar en regiones internas y específicas de los productos de la reacción en cadena de la polimerasa. Esta sonda presenta un fluorocromo unido en el extremo 5' ó *reporter* (FAM_{TM}, o VIC_{TM}) y otro unido en el extremo 3' ó *quencher* (NFQ). Cuando la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el *reporter* es absorbida por el *quencher* mediante un proceso conocido como FRET (transferencia de energía de resonancia de Förster o transferencia de energía de resonancia fluorescente), que se traduce en la anulación de la fluorescencia de la sonda (Didenko VV et al, 2001). Si la secuencia de DNA complementaria a la sonda está presente, se produce la unión entre ambos. Cuando la polimerasa inicia el proceso de copiado desde el extremo 3' del cebador degrada la sonda gracias a su actividad 5' exonucleasa. Esta degradación hace que el *reporter* y el *quencher* se separen, produciéndose un incremento en la fluorescencia que es recogido y almacenado por el secuenciador. La separación de la sonda del ADN posibilita que el proceso de extensión del primer continúe hasta el final. Este proceso se repite en cada ciclo, dando lugar a un incremento en la intensidad de la fluorescencia proporcional a la cantidad de producto generado. Así, se diseña una sonda Taqman con la secuencia que correspondería al alelo Y unido a un fluorocromo (FAM_{TM} o VIC_{TM}), y otra sonda con la secuencia que correspondería al alelo X (FAM_{TM} o VIC_{TM}). Cada sonda se unirá de manera específica a su secuencia complementaria, y al unirse será cuando la polimerasa separe el *reporter* del *quencher* y la fluorescencia que se emite será específica de la secuencia a la que era complementaria (Figura 3.6).

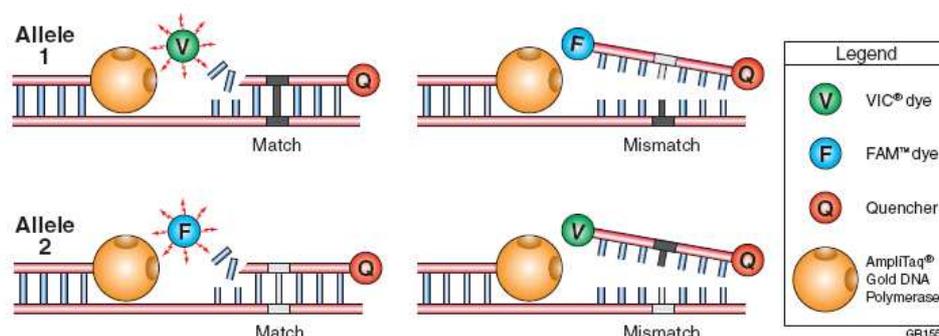


Figura 3.6. Funcionamiento de una sonda TaqMan. En esta figura se muestra como cada sonda, unida a un fluorocromo diferente, se une de manera específica a cada secuencia, y al ejercer la polimerasa su actividad 5' exonucleasa permite la liberación del fluorocromo y consecuentemente la emisión de fluorescencia (Livak KJ et al, 1995).

Para hacer la determinación del genotipo se utilizaron el analizador 7900HT Fast Real-Time PCR de Applied Biosystems. A continuación, se describe y se mencionan las determinaciones que se realizaron.

7900HT Fast Real-Time PCR: Mediante esta técnica se analizaron los polimorfismos de los genes: FTO, la variante rs183130 de CETP, IL-6, AMPK, TCF7L2, PPARG2 y MTHFR. Para cada polimorfismo se utilizaron soluciones prediseñados por Applied Biosystem, las *SNP Genotyping Assay Mix*, que contienen la pareja de cebadores para la reacción de amplificación y las sondas TaqMan específicas para cada uno de los polimorfismos. En la Tabla 3.15 se señalan las *SNP Genotyping Assay Mix* para cada uno de ellos.

Tabla 3.15 Código de *SNP Genotyping Assay* de Applied Biosystems para cada polimorfismo.

Polimorfismo	SNP Genotyping Assay
rs9939609 (FTO)	C_30090620_10
rs1861868 (FTO)	C_11717119_10
rs3751812 (FTO)	C_27476887_10
rs183130 (CETP)	C_2381420_10
- 174 G/C (IL6)	Sonda customizada
rs7901695 (TCF7L2)	C_3844583_10
rs7903146 (TCF7L2)	C_29347861_10
rs12255372 (TCF7L2)	C_291484_20
Pro12Ala (PPARG2)	C_1129864_10
C677T (MTHFR)	C_1202883_20
rs2796495 (PRKAA2, AMPK)	C_16120201_10
rs4213 (PRKAB1, AMPK)	C_3259867_10
rs1036852 (PRKAB2, AMPK)	C_8719007_1_
rs2293445 (PRKAG1, AMPK)	C_15970947_20
rs8961 (PRKAG2, AMPK)	C_2667965_1_
rs1467320 (PRKAG3, AMPK)	C_2070256_20

Para realizar la amplificación del fragmento de ADN de interés para cada polimorfismo mediante la reacción en cadena de la polimerasa se prepara una mezcla con *TaqMan Universal PCR Master Mix* que contiene *AmpliAq Gold* DNA Polimerasa, dNTPs con dUTP, Referencia pasiva 1, Tampón para la reacción, agua destilada y ADN. Los volúmenes específicos de cada reactivo se resumen en la Tabla 3.16.

Tabla 3.16. Composición de la mezcla de reacción para la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa.

	Concentración Stock	Vol./muestra reacción
TaqMan PCR Master Mix	2x	2,5 µL
SNP Genotyping Assay	40x	0,125 µL
ADN	25 ng/µL	0,5 µL
Agua destilada		1,875 µL
Volumen Total		5 µL

Las reacciones se llevan a cabo en una placa de 384 pocillos (Microamp® Optical 384-well Reaction Plate, Applied Biosystems). Una vez cargada toda la placa se cubre con un adhesivo y se coloca en el bloque térmico del sistema de detección Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR.

Las condiciones para la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa para todos los polimorfismos son las siguientes:

10 minutos a 95 °C	x 1 ciclo
15 segundos a 92 °C	x 40 ciclos
1 minuto a 60 °C	

Tras la amplificación se procede a la discriminación alélica, mediante la cual el software del sistema de detección 7900HT Fast Real-Time PCR (SDS 2.3) clasifica las muestras según la fluorescencia que detecta de la siguiente manera: a) Homocigoto alelo X: si solo existe fluorescencia VIC; b) Homocigoto alelo Y: si solo existe fluorescencia FAM; c) Heterocigoto (alelo X e Y): si existen ambas fluorescencias VIC y FAM, (Figura 3.7).

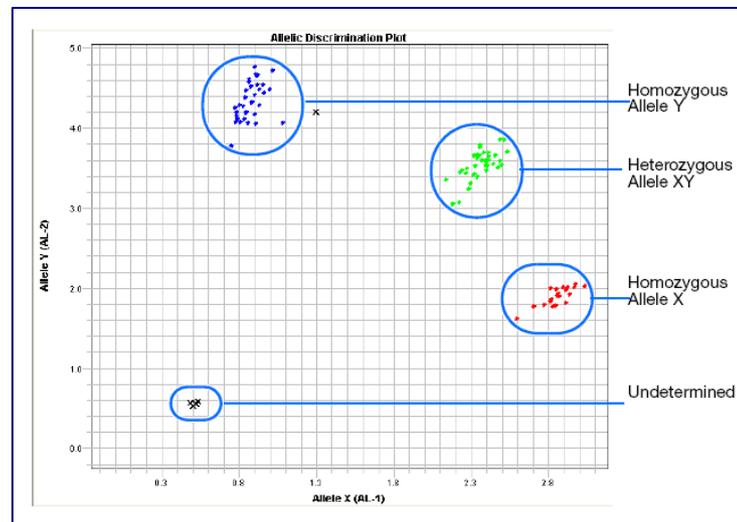


Figura 3.7. Gráfico que facilita el software del sistema de detección Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR tras realizar el análisis de discriminación alélica que permite conocer el genotipo de cada individuo. Según la fluorescencia que detecta agrupa las muestras en homocigoto para alelo Y, heterocigoto (alelo X e Y) y homocigoto alelo X. Los controles y las muestras donde no hay ADN los clasifica como indeterminados.

En todos los casos se realizaron siempre controles de calidad incluyendo un 10% de muestras de repetición para averiguar las concordancias, así como patrones y blancos en cada placa.

De todos los polimorfismos se obtuvieron datos de la variante genética en los alelos de ambos progenitores, y los individuos se clasificaron como homocigotos para el alelo normal, heterocigotos y homocigotos para el alelo mutado. Posteriormente, una vez comprobado si el efecto es dominante, recesivo o codominantes se agruparon los individuos de acuerdo con ello. Así, una vez demostrados efectos dominantes, o al menos codominantes, para una variante genética, se pudieron agrupar los individuos como portadores de la variante mutada (en homocigosis y en heterocigosis) y compararlos con los homocigotos normales.

3.5 Métodos estadísticos

A partir de los datos recopilados mediante cuestionarios, las variables obtenidas mediante las analíticas y los resultados de genotipado, se creó una base

de datos con el paquete estadístico SPSS, versión 15.0 para Windows (SPSS, Chicago, IL). Antes de proceder al análisis estadístico, se efectuó una depuración de los datos, con el fin de corregir errores de transcripción. Todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico SPSS mencionado.

Se realizó un estudio descriptivo de cada una de las poblaciones incluidas en el estudio (estudio piloto PREDIMED nodo de Valencia, estudio VALFRECO, estudio PREDIMED en el nodo de Valencia, estudio piloto PREDIMED general, estudio EPIC). En el caso de los estudios pilotos de PREDIMED en el nodo de Valencia y de PREDIMED general, se analizaron las diferencias de variables continuas y categóricas entre los grupos de intervención dietéticas (DM+AOVE, DM+FS, y grupo control). Con respecto a los estudios VALFRECO y PREDIMED en el nodo de Valencia, así como, estudio piloto de PREDIMED general se analizaron entre hombres y mujeres, y en el estudio EPIC entre casos y controles. Para las variables continuas o cuantitativas se calcularon la media y la desviación típica y se comprobó la normalidad de estas variables mediante gráficos de distribución de frecuencias. Cuando la variable original no mostró una distribución normal, se aplicó una transformación logarítmica, que fue el caso de los niveles plasmáticos de TG, PCR, IL-6, VCAM e ICAM. Las variables categóricas se expresaron en porcentaje. Se empleó un test T-Student para comparar las medias de dos grupos independientes, previa determinación de la homogeneidad de las varianzas mediante el test de Levene, y el test ANOVA para la comparación de medias de más de 2 grupos. Para la comparación de porcentajes se utilizó un test Chi-Cuadrado (χ^2). Se consideraron que existían diferencias estadísticamente significativas cuando el p-valor era menor de 0,05.

En los estudios pilotos tanto en el nodo de Valencia como en el PREDIMED general, se examinó la evolución de variables continuas entre la visita inicial y la visita a los 3 meses para cada uno de los grupos de intervención. Se calculó la media y la desviación típica para cada variable y se aplicó una transformación logarítmica sobre aquellas variables que no cumplían la normalidad (niveles plasmáticos de TG, PCR, IL-6, VCAM e ICAM). Se calculó la diferencia en la media de cada una de las variables analizadas entre las dos visitas (visita 3 meses-visita inicial) para cada uno de los grupos de intervención, mediante un test T-Student para muestras relacionadas. También se obtuvo el intervalo de confianza al 95% y el p-valor, que indicó que la diferencia entre las dos visitas era estadísticamente significativa cuando era menor de 0,05.

Para obtener los resultados del estudio VALFRECO, los valores de energía total y nutrientes (proteínas (g), carbohidratos (g), grasas (g), AGS (g), AGM (g), AGP (g), colesterol (mg), fibra (g), ácidos grasos omega-3 de origen marino (g) y de origen no marino (g) y ácido α -linoléico (g)), fueron transformados a log10

para ajustarse a una distribución normal. Para valorar la reproducibilidad y la validez del CFCA se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson y los coeficientes de correlación intraclase (CCI) de los valores de ingesta de cada nutriente y se ajustaron por energía total mediante el método residual (Willet WC et al, 1998). También, en el estudio de la validez del CFCA, se clasificaron a los individuos en quintiles según su ingesta y mediante tablas de contingencia se evaluó el grado (%) en que el CFCA2 clasifica en el mismo o adyacente quintil que la media de los 4 registros dietéticos.

En cuanto al análisis genético, se estimaron las frecuencias genotípicas y alélicas. Los polimorfismos analizados se localizan en *locus* correspondientes a cromosomas autosómicos. De este modo, cada individuo es portador de 2 alelos, uno en cada copia del cromosoma, que se heredan del padre y de la madre de manera independiente. Así pues, para un hipotético locus con los alelos A y B, las 3 posibilidades de parejas de alelos son AA, AB y BB que corresponden a los genotipos. Los individuos con dos alelos idénticos, AA o BB, se denominan homocigotos y los que tienen alelos diferentes (AB) heterocigotos (Iniesta R et al, 2005). En este trabajo las frecuencias genotípicas se expresaron en porcentaje $((AA/n)*100, (AB/n)*100, (BB/n)*100$; siendo n el tamaño de muestra), y las frecuencias alélicas se calcularon partir del recuento de cada genotipo en la población, a través de las siguientes fórmulas:

$$p = \frac{2 AA + AB}{2n} \qquad q = \frac{2 BB + AB}{2n}$$

siendo p y q las frecuencias alélicas para los alelos A y B respectivamente y n el número total de individuos.

Para obtener las frecuencias genotípicas en hombres y mujeres se realizaron tablas de contingencia y se comprobaron las diferencias según el sexo mediante un test de Chi-cuadrado (χ^2).

Antes de realizar los análisis de asociación, se comprobó si las frecuencias genotípicas estaban equilibrio de Hardy-Weinberg, sobretodo para constatar que no hubiera errores en la interpretación de los resultados de genotipado. De este modo, se comparan las frecuencias observadas y esperadas de los diferentes genotipos mediante un test de Chi-cuadrado (χ^2). Concretamente, se utilizó el programa *LINKUTYL* (Rockefeller University, 2004), disponible en la página web <http://linkage.rockefeller.edu/ott/linkutil.htm>.

Se calculó también el desequilibrio de ligamiento entre loci polimórficos. Para ello, se utilizó el programa Haploview versión 4.2. Este programa permite el cálculo D' , r^2 y LOD, así como la obtención de gráficos en los que se representa la $D' \times 100$ entre dos loci con diversas tonalidades de rojo en función del grado de desequilibrio de ligamiento (a mayor intensidad mayor grado) (Barrett JC et al, 2006).

Para realizar el análisis de asociación de cada polimorfismo con variables cuantitativas se calculó la media y la desviación típica de estas variables en cada genotipo y se aplicó una transformación logarítmica sobre aquellas variables que no cumplían la normalidad (niveles plasmáticos de TG, PCR, IL-6, VCAM e ICAM). En aquellos polimorfismos en los que la prevalencia del genotipo minoritario era menor del 10% se agruparon los portadores del alelo minoritario y se compararon con los homocigotos del alelo mayoritario, para aumentar el poder estadístico. Para establecer si las diferencias en las medias de variables cuantitativas eran estadísticamente significativas se empleó, un test T-Student para comparar las medias de dos grupos independientes (2 genotipos), y el test ANOVA para la comparación de medias de más de 2 grupos (3 genotipos). Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando el p-valor era menor de 0,05. Al realizar el test ANOVA se seleccionó un contraste polinómico que permitió obtener una estimación de la tendencia lineal de la asociación.

Se emplearon modelos multivariantes (ANCOVA) para ajustar el efecto de las estimaciones por variables de confusión. Una asociación en la que la variable dependiente era la glucosa se ajustó por edad, sexo, IMC, adherencia a la DM, actividad física y tratamiento con insulina o antidiabéticos orales. Si la variable dependiente eran niveles de lípidos se ajustó por edad, sexo, IMC, DMT2, HTA, tabaquismo, adherencia a la DM, actividad física y tratamiento hipolipemiente. Si la variable dependiente era peso, perímetro de cintura o IMC se ajustó por edad, sexo, DMT2, tabaquismo, adherencia a la DM y actividad física, y si la variable dependiente era PAS o PAD por edad, sexo, IMC, DMT2, tabaquismo, adherencia a la DM, actividad física y tratamiento antihipertensivo.

Se estudió también la heterogeneidad debido al sexo, diferencias entre diabéticos y no diabéticos, obesos y no obesos, hipercolesterolémicos y no hipercolesterolémicos, hipertensos y no hipertensos, en las asociaciones analizadas, y se emplearon modelos multivariantes (ANCOVA) para estimar interacciones gen*FR (siendo FR: factores de riesgo cardiovascular como sexo, DMT2, obesidad, hipercolesterolemia o HTA).

Por otro lado, se estudiaron interacciones gen*gen y gen*ambiente que influyeran sobre los fenotipos intermedios estudiados. Para estudiar los efectos de

los factores ambientales, se crearon variables dicotómicas con respecto a los factores ambientales: fumador/no fumador, sedentario/no sedentario y baja adherencia a la DM/alta adherencia a la DM y a partir también de los diferentes componentes de la DM incluidos en el cuestionario de 14 puntos. Primero, se determinaron las diferencias en las medias de variables cuantitativas de interés según estas variables dicotómicas mediante una prueba de T-Student para grupos independientes. A continuación, se estudió el efecto conjunto del polimorfismo y del factor ambiental sobre las variables de interés. La interacción entre dos variables se estimó mediante el cálculo de la significación estadística del término de interacción empleando modelos multivariantes (ANCOVA) para calcular interacciones gen*gen y gen*ambiente.

También se realizaron análisis de asociación de los polimorfismos seleccionados con enfermedad como DMT2, obesidad, hipercolesterolemia e HTA (estudio PREDIMED) e IAM (estudio EPIC). Para ello, se calculó la OR (*odds ratio*), que indica la probabilidad de que los sujetos con el problema de salud estudiado estén expuestos al factor analizado (polimorfismo), comparada con la probabilidad de que lo estén las personas sin el problema de salud. Clásicamente, el cálculo de las OR se ha reservado para los estudios de casos y controles (estudio EPIC), siendo la razón de prevalencia la medida de asociación típica de los estudios transversales (estudio PREDIMED). Sin embargo, en la actualidad está ampliamente aceptado el cálculo de las OR en los estudios de prevalencia, indicando que son OR de prevalencia.

Se utilizó el análisis de regresión logística simple y múltiple para estimar la OR y su intervalo de confianza (IC) al 95% de la asociación entre el polimorfismo y enfermedad agrupando portadores del alelo mutado frente a la categoría de referencia (homocigotos salvajes). El valor de P se calculó siempre con 2 colas y se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$. Para ajustar por variables de confusión se utilizó el análisis de regresión multivariante. Las OR en el estudio PREDIMED se ajustaron siempre por edad y sexo puesto que se trata de un estudio transversal. Las diferencias en la prevalencia de las frecuencias genotípicas en diabéticos y no diabéticos, obesos y no obesos (estudio PREDIMED) y casos de IAM y controles (estudio EPIC) se determinaron mediante tablas de contingencia y test de Chi-Cuadrado (χ^2).

4.1 Introducción

Los resultados presentados en esta tesis son fruto de un trabajo multidisciplinar que implica una labor en equipo para la obtención de las conclusiones generales. A lo largo de varios años de investigación, recopilando la información necesaria para llevar a cabo los trabajos conducentes a esta tesis, la doctoranda ha tenido la oportunidad de participar en todas y cada una de las tareas que forman parte del protocolo de la investigación genómica cardiovascular. Así, la doctoranda se ha familiarizado con las técnicas de laboratorio incluyendo, desde la extracción de ADN hasta el análisis de polimorfismos por distintas técnicas, en la elaboración de bases de datos, tratamiento y análisis estadístico de datos, y participación en la presentación de los resultados y redacción de los manuscritos o comunicaciones a congresos.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en el estudio piloto realizado en el nodo de Valencia y se compara con el estudio piloto del proyecto PREDIMED general. También, los resultados de la validación del CFCA utilizado en el estudio PREDIMED. Posteriormente, las características generales de la población del estudio PREDIMED en el nodo de Valencia y los resultados de los genes estudiados, la prevalencia, su asociación con fenotipos intermedios, y el análisis de interacciones gen*ambiente y gen*gen. Finalmente, las características generales de la cohorte EPIC-España y el análisis de la asociación del polimorfismo TaqIB de CETP con fenotipos finales de ECV e interacciones gen*ambiente.

4.2 Estudio PREDIMED

4.2.1 Resultados obtenidos en el estudio piloto

En el estudio piloto del proyecto PREDIMED se incluyeron 769 participantes reclutados en los nodos asignados a ello. De ellos, 150 pertenecen al nodo de Valencia. En este trabajo se presentan los resultados obtenidos en el nodo de Valencia y se comparan con los obtenidos a nivel general.

Concretamente, se obtuvieron resultados de marcadores del grado de cumplimiento de la dieta y se valoró la eficacia de la intervención dietética en los participantes incluidos en el estudio piloto. Los marcadores del grado de cumplimiento de la dieta que se utilizaron fueron la puntuación obtenida en el cuestionario de adherencia a la DM de 14 puntos y la concentración de los polifenoles tirosol e hidroxitirosol en orina. Para valorar la eficacia de la intervención dietética se determinaron niveles de glucosa, lípidos (CT, c-LDL, c-HDL, TG) y marcadores de inflamación (PCR, ICAM, VCAM e IL6) a nivel basal y a los 3 meses de intervención y se compararon los resultados entre los tres grupos de intervención. También se examinaron los cambios en el peso de los individuos incluidos en cada grupo de intervención.

4.2.1.1 Resultados del estudio piloto en el nodo de Valencia

La población incluida en el estudio piloto en el nodo de Valencia está compuesta por 150 participantes, 55 hombres y 95 mujeres. De ellos 38 pertenecen al grupo DM+AOVE, 67 al grupo DM+FS y 45 al grupo control.

Las principales características antropométricas y clínicas de los tres grupos se muestran en la tabla 4.1.

Puesto que se trata de una población de alto riesgo cardiovascular se encontraron elevadas prevalencias de HTA, DMT2, sobrepeso y dislipemia en los 3 grupos. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la media de edad e IMC entre los 3 grupos y tampoco en cuanto a los porcentajes de hipertensos, diabéticos, dislipémicos, con sobrepeso, fumadores y con antecedentes de CI.

Tabla 4.1. Características antropométricas y clínicas en el grupo de DM+AOVE, DM+FS y control de la población PREDIMED del estudio piloto en el nodo de Valencia.

	DM+AOVE (n= 38)	DM+FS (n=67)	CONTROL (n=45)
Edad (media±DS) (años)	66 ± 6	67 ± 6	68 ± 5
IMC (media±DS) (kg/m²)	32,4 ± 5,6	31,0 ± 5,1	32,1 ± 4,8
Hipertensión (%)	77,3	70,7	75,5
DMT2 (%)	40,9	45	42
Sobrepeso (IMC ≥ 25 kg/m²) (%)	93,2	89,2	96
Dislipemia (%)	50	64,6	72
Fumadores (%)	7	16	12
Antecedentes de CI (%)	18,6	13,6	28

DM+AOVE: grupo de Dieta Mediterránea con suplemento de aceite de oliva virgen extra; DM+FS: grupo de Dieta Mediterránea con suplemento de frutos secos; CONTROL: grupo control; IMC: índice de masa corporal; DMT2: diabetes mellitus tipo 2; CI: cardiopatía isquémica. * Indica P valor < 0,05. Se empleó el test de Chi- Cuadrado para comparar porcentajes y una prueba T-student para comparar medias entre grupos.

A continuación, se exponen los resultados de los cambios observados entre la visita inicial y tras 3 meses, en los 3 grupos de intervención, en la puntuación en el cuestionario de adherencia a la DM de 14 puntos, en el peso, en los niveles de glucosa y lípidos (CT, c-LDL, c-HDL y TG) (Tabla 4.2).

No se observaron diferencias entre grupos para ninguno de los parámetros medidos en la visita inicial. Se observa un incremento estadísticamente significativo en la puntuación del cuestionario de adherencia a la DM en los grupos DM+AOVE y DM+FS (P<0,001 en ambos casos) y no en el grupo control (P=0,615). En cuanto a los cambios en el peso, los resultados muestran que en el grupo DM+AOVE el peso se mantiene tras 3 meses de intervención (P=0,996), pero que, sin embargo, en los grupos DM+FS y control disminuye (P=0,025 y P=0,026 respectivamente).

Además, en el DM+AOVE la glucosa disminuyó, el CT, el c-LDL y c-HDL aumentaron muy levemente y los TG disminuyeron. En ninguno de los casos se encontraron diferencias estadísticamente significativas. En el grupo DM+FS la glucosa disminuyó, el CT y el c-LDL también disminuyeron, el c-HDL aumentó muy levemente, los TG disminuyeron. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el caso de la glucosa (P=0,027), del CT (P=0,007), c-LDL (P=0,034) y TG (P=0,010). En el grupo control la glucosa aumentó, el CT, c-LDL y c-HDL disminuyeron y los TG aumentaron. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el caso del c-HDL (P=0,005).

Tabla 4.2. Cambios en la puntuación en el cuestionario de adherencia a la DM de 14 puntos, en el peso, concentración de lípidos y glucosa tras 3 meses de intervención dietética en el estudio piloto del proyecto PREDIMED del nodo de Valencia.¹

	DM+AOVE (n=38)	DM+FS (n=67)	CONTROL (n=45)
Adherencia DM 14 ptos	2,9 (2,2 a 3,6)*	3,8 (3,3 a 4,3)*	0,2 (-0,6 a 1,0)
Peso (Kg)	0,02 (-0,74 a 0,77)	-0,96 (-1,79 a -0,12)*	-0,84 (-0,16 a -0,11)*
Glucosa (mg/dL)	-2,6 (-7,7 a 2,4)	-6,3 (-11,9 a -0,76) *	2,3 (-3,6 a 8,3)
CT (mg/dL)	0,8 (-8,1 a 9,8)	-8,1 (-14,0 a -2,3)*	-4,1 (-13,3 a 5,1)
c-LDL (mg/dL)	0,4 (-8,4 a 9,1)	-5,6 (-10,7 a -0,4)*	-4,4 (-12,7 a 4,0)
c-HDL (mg/dL)	0,7 (-0,8 a 2,2)	0,2 (-1,3 a 0,9)	-1,8 (-3,0 a -0,6)*
TG (mg/dL)	-4,1 (-21,6 a 13,5)	-12,1 (-21,2 a -3,0)*	10,2 (-4,7 a 25,2)

DM+AOVE: grupo de Dieta Mediterránea con suplemento de aceite de oliva virgen extra; DM+FS: grupo de Dieta Mediterránea con suplemento de frutos secos; CONTROL: grupo control; DM:dieta mediterránea; CT: colesterol total; c-LDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos. ¹ Los valores son diferencia de medias absolutas (IC 95%). * Indica que la diferencia de media entre la visita inicial y a los 3 meses es estadísticamente significativa, P<0,05.

Por otro lado, se obtuvieron niveles de los polifenoles tirosol e hidroxitirosol en orina como marcadores de la ingesta de AOVE. Se midieron en una muestra aleatoria compuesta por 60 participantes de los cuales 22 pertenecen al grupo de DM+AOVE, 25 al grupo DM+FS y 13 al grupo control (Figura 4.1).

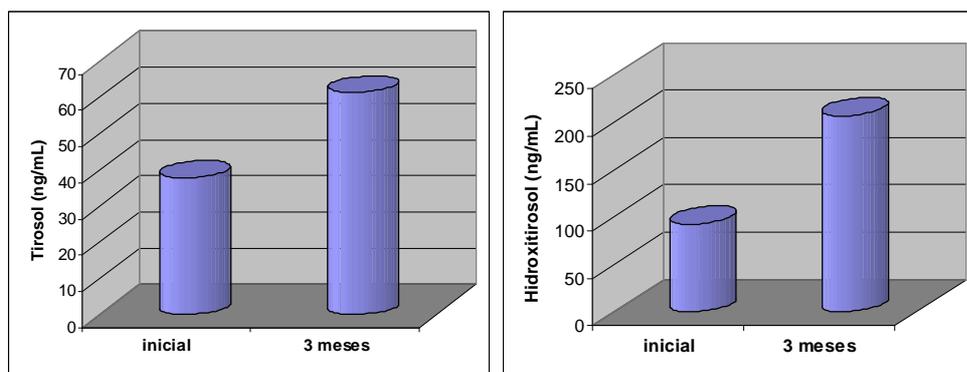


Figura 4.1. Variación en la concentración de tirosol e hidroxitirosol en orina tras 3 meses de intervención en el grupo de DM+AOEV del estudio piloto PREDIMED en el nodo de Valencia.

En el grupo de DM+AOVE, la concentración media de polifenoles aumentó tras 3 meses de intervención. En el caso del tirosol la concentración media inicial fue de 37,8±36,3 µg/L y a los 3 meses, 61,3±63,7 µg/L (P=0,127), y en el del hidroxitirosol, la

inicial fue de $92,7 \pm 86,4$ $\mu\text{g/L}$ y tras 3 meses $207,0 \pm 184,3$ $\mu\text{g/L}$ ($P=0,009$). La concentración de polifenoles también se determinó en los grupos de DM+FS y control. En el grupo DM+FS aumentó y en el grupo control disminuyó en ambos casos sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas.

Además, se determinó la concentración media en plasma de marcadores de inflamación (PCR, IL-6, ICAM, VCAM) a nivel basal y a los 3 meses de intervención. En la figura 4.2 se observan los cambios producidos.

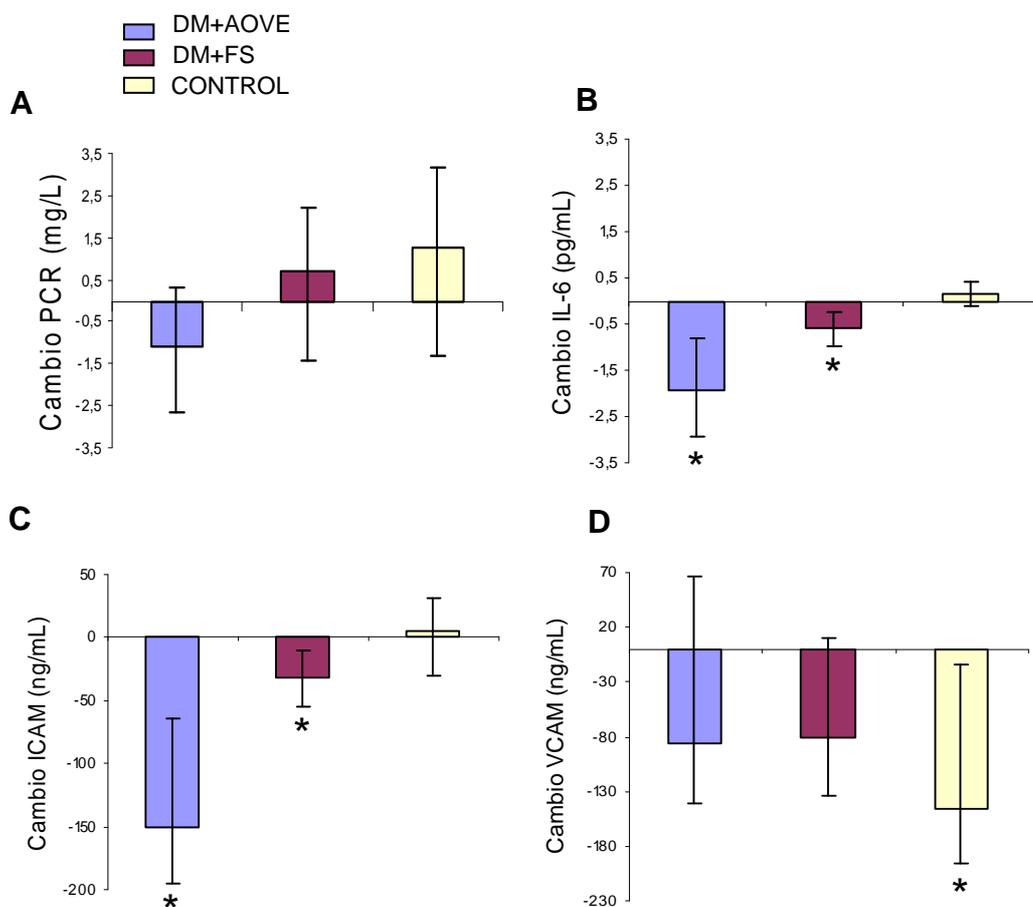


Figura 4.2 Cambios en los niveles de marcadores de inflamación tras 3 meses de intervención en los 3 grupos del estudio piloto en el nodo de Valencia. A: Cambios en los niveles de proteína C reactiva (PCR), B: Cambios en los niveles de interleuquina 6 (IL-6), C: Cambios en los niveles molécula de adhesión intercelular (ICAM), D: Cambios en los niveles de: molécula de adhesión celular vascular (VCAM). Las barras de error representan el intervalo de confianza al 95%. * Indica que la diferencia entre las medias de la visita inicial y a los 3 meses es estadísticamente significativa, $P < 0,05$.

La concentración plasmática de PCR disminuyó solo en los participantes del grupo DM+AOVE y aumenta en los grupos DM+FS y control, pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P=0,157$, $P=0,452$, $P=0,313$ respectivamente). También se observó un descenso estadísticamente significativo de los niveles de IL-6 e ICAM en los grupos DM+AOVE ($P=0,002$ y $P=0,002$ respectivamente) y DM+FS ($P=0,001$ y $P=0,007$ respectivamente) y en el grupo control aumentó levemente no alcanzando la significación estadística ($P=0,277$ y $P=0,971$ respectivamente). La concentración de VCAM disminuyó en los 3 grupos de intervención pero solo se encontró una diferencia estadísticamente significativa en el grupo control ($P=0,032$).

4.2.1.2 Resultados del estudio piloto del proyecto PREDIMED

En este apartado se presentarán los resultados del estudio piloto a nivel general del proyecto PREDIMED. Estos resultados han sido publicados (Estruch R et al, 2006).

La población está compuesta por 772 participantes de los cuales 3 fueron excluidos por no poder realizar la intervención dietética. De los 769 participantes incluidos finalmente, 257 pertenecen al grupo DM+AOVE, 257 al grupo DM+FS y 255 al grupo control. Las principales características antropométricas y clínicas de los tres grupos se muestran en la tabla 4.3.

Tabla 4.3. Características antropométricas y clínicas en el grupo de DM+AOVE, DM+FS y control de la población del estudio piloto del proyecto PREDIMED.

	DM+AOVE (n= 257)	DM+FS (n=257)	CONTROL (n=255)
Edad (media±DS) (años)	69 ± 7	69 ± 6	70 ± 6
IMC (media±DS) (kg/m²)	29,7 ± 4,1	29,4 ± 4,1	30,2 ± 4,3
Hipertensión (%)	77	75	83
DMT2 (%)	56	50	58
Sobrepeso (IMC ≥ 25 kg/m²) (%)	90	90	90
Dislipemia (%)	64	66	70
Fumadores (%)	14	19	15
Antecedentes de CI (%)	24	21	23

DM+AOVE: grupo de Dieta Mediterránea con suplemento de aceite de oliva virgen extra; DM+FS: grupo de Dieta Mediterránea con suplemento de frutos secos; CONTROL: grupo control; IMC: índice de masa corporal; DMT2: diabetes mellitus tipo 2; CI: cardiopatía isquémica * Indica P valor < 0,05. Se empleó el test de Chi- Cuadrado para comparar porcentajes y una prueba T-student para comparar medias entre grupos.

Los porcentajes de hipertensos, diabéticos, dislipémicos, con sobrepeso, fumadores y con antecedentes de CI son similares a los que se obtuvieron en el nodo de Valencia. Las prevalencias de HTA, DMT2, sobrepeso y dislipemia en los 3 grupos son elevadas puesto que se trata de una población de alto riesgo y además, no se observó heterogeneidad entre los 3 grupos. Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la media de edad e IMC.

A continuación, se exponen los resultados de los cambios observados entre la visita inicial y tras 3 meses, en los 3 grupos de intervención, en la puntuación en el cuestionario de adherencia a la DM de 14 puntos, en el peso, en los niveles de glucosa y lípidos (CT, c-LDL, c-HDL y TG) (Tabla 4.4). No se observaron diferencias entre grupos para ninguno de los parámetros medidos en la visita inicial.

Tabla 4.4. Cambios en la puntuación en el cuestionario de adherencia a la DM de 14 puntos, en el peso, concentración de lípidos y glucosa tras 3 meses de intervención dietética en el estudio piloto del proyecto PREDIMED.¹

	DM+AOVE (n=257)	DM+FS (n=257)	CONTROL (n=255)
Adherencia DM 14 ptos	2,2 (1,9 a 2,4)*	2,8 (2,6 a 3,1)*	-0,1 (-0,3 a 0,2)
Peso (Kg)	-0,19 (-0,46 a 0,07)	-0,26 (-0,59 a 0,08)	-0,24 (-0,48 a 0,01)
Glucosa (mg/dL)	-3,8 (-7,4 a -0,2)*	-2,5 (-5,5 a 0,5)	3,5 (-1,0 a 8,0)
CT (mg/dL)	-3,9 (-8,1 a 0,4)	-5,0 (-8,6 a -1,4)*	0,74 (-3,8 a 5,3)
c-LDL (mg/dL)	-5,8 (-9,8 a -1,8)*	-3,8 (-7,3 a -0,4)*	-0,56 (-4,6 a 3,5)
c-HDL (mg/dL)	2,4 (3,1 a 1,6)*	0,94 (0,1 a 1,8)*	-0,37 (-1,2 a 0,4)
TG (mg/dL)	-3,0 (-11,8 a 5,9)	-7,6 (-14,0 a -1,1)*	2,4 (-4,4 a 9,2)

DM+AOVE: grupo de Dieta Mediterránea con suplemento de aceite de oliva virgen extra; DM+FS: grupo de Dieta Mediterránea con suplemento de frutos secos; CONTROL: grupo control; DM: dieta mediterránea; CT: colesterol total; c-LDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos. ¹ Los valores son diferencia de medias absolutas (IC 95%). * Indica que la diferencia de media entre la visita inicial y a los 3 meses es estadísticamente significativa, P<0,05.

Los resultados en los cambios en la adherencia a la DM son similares a los encontrados en el nodo de Valencia. Se observa un incremento estadísticamente significativo en los grupos de intervención con DM y un leve descenso en el grupo control pero sin alcanzar la significación estadística.

En cuanto a la variación en el peso, en los 3 grupos se reduce levemente pero la diferencia no es estadísticamente significativa.

Los niveles de glucosa, de forma similar a lo observado en el nodo de Valencia, disminuyeron en los grupos de intervención con DM y aumentó en el grupo control, pero en este caso, la diferencia fue estadísticamente significativa en el grupo de DM+AOVE y no en el de DM+FS, y tampoco en el grupo control.

En cuanto a los niveles de lípidos, los resultados obtenidos para el CT y los TG son similares a los encontrados en el nodo de Valencia, observando un descenso estadísticamente significativo en el grupo DM+FS. Además, en el estudio piloto general, el c-LDL disminuyó y el c-HDL aumentó tanto en el grupo DM+AOVE como DM+FS alcanzando la significación estadística. En el grupo control se observó un descenso pero estadísticamente no significativo en ambos casos.

Por otra parte, en el estudio piloto general se midió el hidroxitirosol y el tirosol en orina en 273 participantes (35%). Los resultados mostraron que, comparado con el grupo control, el grupo DM+AOVE presentó un incremento de los niveles de tirosol de 19 ng/mL (CI 95% 5 a 35 ng/mL) y de hidroxitirosol de 84 ng/mL (CI 95% 34 a 135 ng/mL).

En cuanto a los cambios en la concentración de marcadores de inflamación, los resultados en ambas poblaciones son similares (Estruch R et al, 2006). En este caso, el descenso de PCR en el grupo DM+AOVE, el aumento de ICAM en el grupo control y el descenso de VCAM en los grupos de intervención con DM, tras 3 meses de intervención, son estadísticamente significativos. Los resultados difieren entre las 2 poblaciones en cuanto a la variación de VCAM en el grupo control. En el estudio piloto del proyecto PREDIMED general, se produce un aumento estadísticamente significativo de VCAM y no un descenso, como se observó en el grupo control de la población del nodo de Valencia.

4.2.2 Validación del cuestionario de frecuencia de consumo alimentario utilizado en el estudio PREDIMED. Estudio VALFRECO.

En este apartado se presentarán los resultados del estudio VALFRECO obtenidos de forma preliminar en el nodo de Valencia y de manera conjunta en los tres nodos que llevaron a cabo dicho estudio. Los resultados globales han sido recientemente publicados (Fernández-Ballart JD et al, 2010).

4.2.2.1 Resultados preliminares en el nodo de Valencia

En el nodo de Valencia se reclutaron inicialmente 63 participantes, de los cuales solo 51 completaron el estudio. Se registraron 5 abandonos tras la cumplimentación del primer

CFCA, y 2 abandonos tras el primer registro dietético. De estos 51 participantes que finalizaron el estudio, 21 son hombres (41,2%) y 30 mujeres (58,8%).

La media de edad de los 51 participantes incluidos es de 62 ± 8 , siendo en hombres 61 ± 7 y en mujeres 63 ± 9 . El IMC medio encontrado fue para la población total $27,0\pm 3,9$, para hombres $27,8\pm 3,5$ y para mujeres $26,5\pm 4,1$. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas debidas al sexo en estas dos variables ($P= 0,575$ para edad y $P= 0,227$ para IMC).

En la tabla 4.5 se presentan los valores medios de macronutrientes (energía total, hidratos de carbono, proteínas, grasas, AGM, AGP y AGS) registrados en los CFCA inicial y final y en los 4 registros dietéticos.

Tabla 4.5. Valores diarios medios de energía total, hidratos de carbono, proteínas, grasas, AGM, AGS, AGP, comparando CFCA 1, CFCA 2 y la media de los 4 registros dietéticos obtenidos en el estudio VALFRECO del nodo de Valencia.

	CFCA 1 Media (DS)	CFCA 2 Media (DS)	4 REGISTROS Media (DS)
Energía total (Kcal)	2605,6 (1063,9)	2718,4 (1111,5)	1986,9 (565,2) ^{1,2}
Carbohidratos (g)	269,5 (149,3)	282,1 (158,8)	185,0 (53,0) ^{1,2}
Proteínas (g)	108,1 (35,9)	110,2 (33,5)	84,6 (24,0) ^{1,2}
Grasas (g)	111,5 (50,5)	115,7 (48,8)	93,0 (28,8) ^{1,2}
AGS (g)	31,2 (14,9)	32,8 (16,0)	21,7 (8,4) ^{1,2}
AGM (g)	53,4 (25,2)	55,0 (25,4)	50,8 (17,8)
AGP (g)	17,8 (9,1)	18,1 (8,7)	13,1 (4,9) ^{1,2}

CFCA: cuestionario de frecuencia de consumo alimentario; AGS: ácidos grasos saturados; AGM: ácidos grasos monoinsaturados; AGP: ácidos grasos poliinsaturados; ¹ Indica P-valor < 0,05 al comparar la media de ingesta diaria de energía total, hidratos de carbono, proteínas, grasas, AGM, AGS, AGP entre CFCA1 y la media de los 4 registros dietéticos; ² Indica P-valor < 0,05 al comparar la media de ingesta diaria de energía total, hidratos de carbono, proteínas, grasas, AGM, AGS, AGP entre CFCA2 y la media de los 4 registros dietéticos

Tras comparar las medias mediante una prueba T-Student para muestras relacionadas, se encontró que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias obtenidas en el CFCA 1 y en el CFCA2 en ningún caso. Sin embargo, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas al comparar las medias del CFCA 1 y del CFCA 2 con la media de los 4 registros dietéticos en todos los casos excepto en los AGM. Se observa que los valores medios obtenidos con los 4 registros dietéticos, excepto el de los AGM, son inferiores que los obtenidos con los CFCA.

4.2.2.2 Resultados globales del estudio VALFRECO

De los 158 participantes incluidos, el 46,2 % son hombres y el 53,8 % mujeres. La media de edad del total de participantes es de 66 ± 7 y de IMC $27,3\pm 4,1$. El 19,2% son fumadores, el 53,8% hipertensos, el 37,7% presentan dislipemia y el 12,0% DMT2. La mayoría de la población está casada (81%). El 51,9 % tienen estudios primarios, el 24,1 % secundarios y el 24 % universitarios y el 62,6% realiza actividad física por lo menos una vez a la semana.

En la tabla 4.6 se presentan los valores medios de energía total, hidratos de carbono, proteínas, grasas, AGM, AGP, AGS, colesterol, fibra, ácidos grasos omega-3 de origen marino y de origen no marino y ácido α -linolénico registrados en los CFCA inicial y final y en los 4 registros dietéticos.

Tabla 4.6. Valores diarios medios de energía total, hidratos de carbono, proteínas, grasas, AGM, AGS, AGP, colesterol, fibra, ácidos grasos omega-3 de origen marino y de origen no marino y ácido α -linolénico comparando CFCA 1, CFCA 2 y la media de los 4 registros dietéticos, en la población del estudio VALFRECO global.

	CFCA 1 Media (DS)	CFCA 2 Media (DS)	4 REGISTROS Media (DS)
Energía total (Kcal)	2393,7 (803,1)	2368,7 (810,9)	2134,8 (565,6)
Carbohidratos (g)	259,8 (107,0)	252,9 (109,0)	239,7 (77,6)
Proteínas (g)	103,1 (27,8)	99,7 (26,2)	93,4 (23,5)
Grasas (g)	96,1 (38,1)	97,6 (36,3)	89,3 (25,7)
AGS (g)	27,1 (11,6)	27,0 (11,7)	20,3 (7,1)
AGM (g)	44,8 (18,8)	46,9 (19,0)	44,7 (13,5)
AGP (g)	15,5 (8,5)	15,0 (6,9)	12,7 (4,7)
Colesterol (mg)	419,3 (150,9)	409,0 (137,4)	210,3 (87,6)
Fibra (g)	28,2 (10,7)	26,6 (10,2)	22,0 (8,4)
n-3 origen marino (g)	1,0 (0,8)	0,8 (0,5)	0,8 (0,5)
n-3 origen no marino (g)	1,5 (1,0)	1,4 (0,8)	1,1 (0,4)
Ácido linolénico (g)	1,5 (1,0)	1,4 (0,8)	1,1 (0,4)

CFCA: cuestionario de frecuencia de consumo alimentario; AGS: ácidos grasos saturados; AGM: ácidos grasos monoinsaturados; AGP: ácidos grasos poliinsaturados.

Se observa también que los valores medios obtenidos con los 4 registros dietéticos, son inferiores que los obtenidos con los CFCA, excepto en el caso de los AGM, indicando que el CFCA puede sobreestimar la ingesta dietética con respecto a los registros dietéticos.

En la tabla 4.7 se muestra la reproducibilidad de las medidas de energía total, hidratos de carbono, proteínas, grasas, AGM, AGP, AGS, colesterol, fibra, ácidos grasos omega-3 de origen marino y de origen no marino y ácido α -linolénico del CFCA (CFCA1 vs CFCA2) mediante el cálculo de los coeficientes de correlación de Pearson y los CCI.

Tabla 4.7. Reproducibilidad del CFCA: correlación entre la ingesta de nutrientes en CFCA1 y CFCA2, en la población del estudio VALFRECO global.

	Coeficiente correlación Pearson		Coeficiente correlación intraclase	
	Sin ajustar	Ajustado*	Sin ajustar	Ajustado*
Energía total	0,66	-	0,79	-
Carbohidratos	0,71	0,67	0,83	0,8
Proteínas	0,55	0,50	0,71	0,67
Grasas	0,61	0,58	0,75	0,73
AGS	0,67	0,67	0,81	0,80
AGM	0,59	0,57	0,74	0,73
AGP	0,63	0,58	0,77	0,73
Colesterol	0,59	0,56	0,74	0,72
Fibra	0,76	0,78	0,86	0,88
n-3 origen marino	0,52	0,52	0,68	0,68
n-3 origen no marino	0,66	0,58	0,79	0,73
Ácido linolénico	0,66	0,60	0,79	0,75

AGS: ácidos grasos saturados; AGM: ácidos grasos monoinsaturados; AGP; ácidos grasos poliinsaturados; * Indica ajustado por energía total

Los coeficientes de correlación de Pearson fueron desde 0,52 hasta 0,76 (media 0,64) en el caso de los datos brutos y desde 0,50 hasta 0,78 (media 0,63) tras ajustar por energía total. Los CCI fueron desde 0,68 hasta 0,86 (media 0,77) para los datos brutos y desde 0,67 hasta 0,88 (media 0,77) tras ajustar por energía total.

Para analizar la validez del CFCA se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson y los CCI entre el CFCA2 y la media de los 4 registros dietéticos para los valores medios de energía total, hidratos de carbono, proteínas, grasas, AGM, AGP, AGS, colesterol, fibra, ácidos grasos omega-3 de origen marino y de origen no marino y ácido α -linolénico. Los resultados se muestran en la tabla 4.8.

Tabla 4.8. Validez del CFCA: correlación entre la ingesta de nutrientes en el CFCA2 y los 4 registros dietéticos, en la población del estudio VALFRECO global.

	Coeficiente correlación Pearson		Coeficiente correlación intraclase	
	Sin ajustar	Ajustado*	Sin ajustar	Ajustado*
Energía total	0,36	-	0,53	-
Carbohidratos	0,38	0,56	0,55	0,71
Proteínas	0,28	0,40	0,44	0,55
Grasas	0,47	0,46	0,63	0,62
AGS	0,52	0,61	0,68	0,75
AGM	0,51	0,44	0,67	0,61
AGP	0,43	0,42	0,60	0,60
Colesterol	0,37	0,23	0,54	0,37
Fibra	0,49	0,60	0,66	0,75
n-3 origen marino	0,33	0,32	0,49	0,49
n-3 origen no marino	0,36	0,37	0,50	0,52
Ácido linoléico	0,37	0,39	0,52	0,55

AGS: ácidos grasos saturados; AGM: ácidos grasos monoinsaturados; AGP; ácidos grasos poliinsaturados; * Indica ajustado por energía total

Los coeficientes de correlación de Pearson obtenidos para valorar la validez del CFCA fueron desde 0,29 hasta 0,49 (media 0,39) en el caso de los datos brutos y desde 0,23 hasta 0,61 (media 0,42) tras ajustar por energía total. Los CCI fueron desde 0,44 hasta 0,68 (media 0,56) para los datos brutos y desde 0,37 hasta 0,75 (media 0,56) tras ajustar por energía total. Por otro lado, para valorar la validez del CFCA para clasificar a los individuos estudiados según su ingesta, se clasificaron los individuos en quintiles según su ingesta alimentaria y se comparó el grado en que el CFCA clasifica de forma errónea con respecto a como lo hace el registro dietético. Concretamente, se calculó el porcentaje con el que el CFCA2 clasifica en el mismo o en el quintil adyacente al que lo hace la media de los 4 registros dietéticos para los nutrientes estudiados (energía total, hidratos de carbono, proteínas, grasas, AGM, AGP, AGS, colesterol, fibra, ácidos grasos omega-3 de origen marino y de origen no marino y ácido α -linoléico). Los resultados mostraron que entre el 55 y el 75% de los individuos (media 67,7%) fueron clasificados en el mismo quintil o uno adyacente por ambos métodos (Fernández-Ballart JD et al, 2010).

4.2.3 Estudio de asociación entre polimorfismos en genes candidatos y fenotipos intermedios de ECV.

En este apartado se exponen los resultados de asociación entre polimorfismos de genes relacionados con metabolismo lipídico (APOE, CETP, LPL, LIPC, ABCA1, PON1, APOA1), obesidad (FTO), DMT2 (PPARG2, PPARGC1, TCF7L2), marcadores de inflamación (COX-2, IL-6) marcadores de estrés oxidativo (CYBA) y otros como MTHFR, y AMPK y fenotipos intermedios de ECV.

4.2.3.1 Características de los participantes en el nodo de Valencia

En esta población se incluyen los participantes reclutados en el nodo de Valencia desde Junio de 2003 hasta Diciembre de 2008. Se compone de 1049 individuos (37,2% hombres, 62,8% mujeres). Las características antropométricas y bioquímicas del total de los individuos estudiados y comparando por sexo se muestran en la Tabla 4.9.

Tabla 4.9. Características antropométricas y bioquímicas de la población PREDIMED en el nodo de Valencia y comparación por sexo.

	Población total (n=1049) Media ± DS	Hombres (n=390) Media ± DS	Mujeres (n=659) Media ± DS
Edad (años)	67 ± 6	66,4 ± 7	67 ± 6
Peso (kg)	77,2 ± 12,9	81,2 ± 11,8	74,6 ± 12,6*
IMC(kg/m²)	30,8 ± 5,1	29,5 ± 3,9	31,3 ± 5,3*
Cintura (cm)	103,8 ± 12,3	104,6 ± 11,6	101,5 ± 12,0*
PAS (mmHg)	147,8 ± 49,0	146,7 ± 21,6	147,8 ± 54,3
PAD (mmHg)	81,7 ± 10,9	82,0 ± 11,0	81,0 ± 10,7
CT (mg/dl)	207,8 ± 40,9	198,0 ± 37,5	211,1 ± 40,9*
c-LDL (mg/dl)	127,8 ± 37,4	122,6 ± 36,7	130,2 ± 37,4*
c-HDL (mg/dl)	53,2 ± 13,6	48,2 ± 11,8	55,6 ± 14,1*
TG (mg/dl)	130,5 ± 79,5	135,4 ± 74,0	126,5 ± 80,9
Glucosa (mg/dl)	122,2 ± 40,6	126,1 ± 41,2	116,7 ± 38,5*

IMC: Índice de masa corporal; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; CT: colesterol total; c-LDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos. *Indica P valor < 0,05, encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres. Se empleó una prueba T-Student para comparar medias.

La media de edad en hombres y en mujeres es $66,4 \pm 7$ y 67 ± 6 años respectivamente. Los hombres presentan un IMC menor que las mujeres y una medida de cintura y peso mayor, encontrando diferencias estadísticamente significativas. En cuanto a los niveles de lípidos, las mujeres presentan mayor concentración de CT, c-LDL y c-HDL y menor concentración de glucosa que los hombres de forma estadísticamente significativa.

Por otro lado, en la tabla 4.10 se muestran las características clínicas de la población. Puesto que se trata de una población con elevado riesgo cardiovascular la prevalencia de HTA, DMT2, obesidad e hipercolesterolemia es alta (81,4%, 47,4 %, 51,2 %, 74,2 respectivamente). Existe un mayor porcentaje de mujeres que presentan HTA y obesidad y antecedentes de CI que de hombres, sin embargo, la proporción de hombres diabéticos es mayor respecto a las mujeres de forma estadísticamente significativa. El 13,0 % de los individuos incluidos en el estudio son fumadores y el 22,2% exfumadores. Los hombres presentan un porcentaje más elevado de fumadores y de exfumadores que las mujeres, hallándose diferencias estadísticamente significativas. También se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al porcentaje de sedentarios en hombres y mujeres, siendo mayor en mujeres.

Tabla 4.10. Características clínicas de la población PREDIMED del nodo de Valencia.

	Población total (n=1049)	Hombres (n=390)	Mujeres (n=659)
Hipertensos (%)	81,4	74,9	85,2*
Diabéticos (%)	47,4	52,3	41,0*
Obesos (IMC ≥ 30 kg/m²) (%)	51,2	42,6	56*
Hipercolesterolémicos (%)	74,2	70,5	76,3
Antecedentes de CI (%)	21,5	14,9	25,3*
Fumadores (%)	13,0	25,7	4,2*
Exfumadores (%)	22,2	46,6	8,2*
Baja adherencia DM (%)	50,0	49,3	50,5
Sedentarios (%)	27,1	21,4	30,5*
Medicaciones			
Hipolipemiante	49,7	49,3	49,9
HTA	65,1	58,6	68,8*
Insulínica o ADO	45,5	42,2	57,8*

CI: cardiopatía isquémica; HTA: Hipertensión arterial; ADO: Antidiabéticos orales. * Indica P valor < 0,05. Se empleó el test de Chi- Cuadrado para comparar porcentajes entre hombres y mujeres.

4.2.3.2 Estudio de asociación entre polimorfismos en genes candidatos relacionados con el metabolismo lipídico y fenotipos intermedios de ECV.

4.2.3.2.1 Polimorfismo E2/ E3 /E4 del gen de APOE

Para obtener los resultados, se agruparon los 6 posibles genotipos del polimorfismo E2/E3/E4 de la siguiente manera: individuos E2E2 más E2E3 forman el grupo de portadores del alelo E2, los individuos E3E3, portadores del alelo E3 y los E3E4 más E4E4, portadores del alelo E4. Los individuos E2E3 fueron excluidos.

Las frecuencias observadas en la población total y por sexo, de cada uno de los tres genotipos, se encuentran en la tabla 4.11.

Tabla 4.11. Frecuencias genotípicas del polimorfismo E2/E3/E4 del gen APOE en la población PREDIMED del nodo de Valencia y comparando por sexo.

Genotipos	Población total (n=1019)	Hombres (n=376)	Mujeres (n=643)
E2 (%)	10,6	11,4	10,1
E3 (%)	73,0	69,4	75,1
E4 (%)	16,4	19,1	14,8

Las frecuencias genotípicas se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg ($P=0,417$). No existen diferencias entre sexo en cuanto a la distribución del genotipo ($P=0,121$). Las frecuencias alélicas obtenidas fueron: 0,059 para E2, 0,851 para E3 y 0,090 para E4.

En la tabla 4.12 se muestran los resultados del análisis de asociación entre el polimorfismo E2/E3/E4 del gen de APOE y variables antropométricas, presión arterial, niveles plasmáticos de glucosa y de lípidos.

Los individuos con el alelo E4 mostraron mayores concentraciones de CT y c-LDL que los individuos con los alelos E3 y E2, siendo éstos últimos los que menor nivel presentaron. Se observa una tendencia lineal en ambos casos (P tendencia lineal $<0,001$ en ambos casos). Sin embargo, los individuos con el alelo E2 mostraron mayores niveles de glucosa y de TG que los E3 y E4, observándose también una tendencia lineal (P tendencia lineal=0,006 para glucosa; P tendencia lineal=0,012 para TG). La asociación entre el polimorfismo APOE y niveles de lípidos y glucosa se mantiene tras ajustar por variables de confusión ($P=0,001$ para CT, $P<0,001$ para c-LDL, $P=0,042$ para TG y $P=0,033$ para glucosa). Tras ajustar por concentración de TG, la asociación entre las variantes alélicas de APOE y concentración de glucosa fue menos potente ($P=0,068$) mostrando que dicha

asociación no es independiente del efecto del polimorfismo de APOE sobre la concentración de TG.

Tabla 4.12 Variables antropométricas (edad, peso, IMC, cintura), presión arterial (PAS, PAD), niveles plasmáticos de glucosa y de lípidos (CT, c-LDL, c-HDL, TG) según el genotipo del polimorfismo E2/E3/E4 del gen de APOE en la población PREDIMED del nodo de Valencia.

	E2 (n=108) Media ± DS	E3 (n=744) Media ± DS	E4 (n=167) Media ± DS	P¹
Edad (años)	68 ± 7	67 ± 6	67 ± 6	0,090
Peso (kg)	75,1 ± 12,7	76,6 ± 12,0	76,0 ± 12,0	0,449
IMC(kg/m²)	29,9 ± 4,4	30,4 ± 4,4	30,1 ± 4,4	0,367
Cintura (cm)	102,3 ± 11,3	102,8 ± 12,0	102,8 ± 12,5	0,946
PAS (mmHg)	148,9 ± 22,4	146,1 ± 20,0	145,9 ± 19,1	0,404
PAD (mmHg)	82,4 ± 10,9	81,4 ± 10,6	80,5 ± 10,2	0,334
Glucosa (mg/dl)	126,7 ± 38,4	119,3 ± 39,4	113,5 ± 33,7	0,022**
CT (mg/dl)	194,7 ± 35,2	206,0 ± 38,2	213,9 ± 41,1	<0,001**
c-LDL (mg/dl)	116,5 ± 31,9	127,8 ± 34,6	137,7 ± 37,3	<0,001**
c-HDL (mg/dl)	53,3 ± 14,1	52,7 ± 13,1	52,9 ± 12,3	0,883
TG (mg/dl)	133,5 ± 65,0	128,1 ± 66,4	115,7 ± 57,5	0,022**

IMC: Índice de masa corporal; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; CT: colesterol total; c-LDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos. ¹: p valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante una prueba ANOVA. *: p valor > 0,05 de comparación de medias tras ajustar por sexo, edad, IMC, (DMT2), HTA, tabaco, adherencia a la dieta mediterránea, actividad física y medicación. **: p valor < 0,05 de comparación de medias tras ajustar por sexo, edad, IMC, (DMT2), HTA, tabaco, adherencia a la dieta mediterránea, actividad física y medicación.

No se observó asociación entre el polimorfismo de APOE y la concentración de c-HDL, ni con el resto de variables estudiadas. Los resultados tampoco mostraron heterogeneidad debido al sexo excepto en el caso de los TG, ya que la asociación del alelo E2 con mayor concentración de TG permaneció estadísticamente significativa tras ajustar por variables de confusión solo en hombres y no en mujeres (Tabla 4.13).

Tabla 4.13. Concentración plasmática de TG según el genotipo del polimorfismo E2/E3/E4 de APOE en hombres y mujeres en la población PREDIMED del nodo de Valencia.

	E2	E3	E4	P¹
	Media ± DS	Media ± DS	Media ± DS	
TG (mg/dL)				
Hombres	148,8 ± 68,8	135,9 ± 73,9	115,0 ± 57,1	0,041*
Mujeres	132,6 ± 60,8	123,9 ± 61,8	116,2 ± 58,1	0,443

TG: triglicéridos ¹: p valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante una prueba ANOVA. *: p valor < 0,05 de comparación de medias tras ajustar por edad, IMC, DMT2, HTA, tabaco, adherencia a la dieta mediterránea, actividad física y medicación.

Por otro lado, dada la diferencia observada de los niveles de glucosa, se estudió el riesgo de DMT2 según el genotipo. No se observaron diferencias en las frecuencias genotípicas entre diabéticos y no diabéticos (Diabéticos: 12,2% E2, 71,2% E3, 16,6% E4; No diabéticos: 9,2% E2, 74,9% E3, 15,9% E4; P=0,257). El alelo E2 mostró mayor riesgo de DMT2 que el alelo E3 y E4 pero no se alcanzó la significación estadística ajustando por edad y sexo (alelo E2 vs alelo E3 OR=1,28 IC95%(0,93-2,10) P=0,239; alelo E2 vs alelo E4 OR=1,24 IC95% (0,75-2,05) P=0,369). La OR tampoco fue significativa al comparar el alelo E3 frente al alelo E4 (OR=1,10 IC95% (0,78-1,54) P=0,584).

También, se estudió el riesgo de HTA asociado al polimorfismo E2/E3/E4. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias genotípicas en hipertensos y no hipertensos mostrando menor prevalencia del alelo E2 y mayor prevalencia del alelo E3 y E4 en hipertensos (Hipertensos: 9,2% E2, 74,1% E3, 16,7% E4; No hipertensos: 15,3% E2, 69,8% E3, 14,8% E4; P=0,045). También, se observó un efecto protector del alelo E2 sobre la HTA frente a los alelos E4 y E3. Sin embargo, no se encontró diferencia en cuanto el efecto sobre el riesgo de HTA al comparar los alelos E4 y E3. Los resultados se muestran en la tabla 4.14. Tras ajustar por concentración de c-LDL, el efecto protector del alelo E2 continuó siendo significativo (Alelo E2 vs Alelo E4 OR=0,53 IC95%(0,28-0,99) P=0,047 y Alelo E2 vs Alelo E3 OR=0,53 IC95%(0,33-0,86) P=0,011). No se observó heterogeneidad por el sexo en estas observaciones.

Tabla 4.14. Estudio del riesgo de HTA asociado al polimorfismo E2/E3/E4 del gen de APOE.

	OR*	IC95%**	P***
Alelo E2 vs Alelo E4	0,48	0,26-0,88	0,017
Alelo E2 vs Alelo E3	0,55	0,34-0,88	0,013
Alelo E3 vs Alelo E4	0,91	0,58-1,43	0,685

*OR: Odds Ratio ajustada por edad y sexo; **IC95%: intervalo de confianza al 95%;***P: p-valor < de 0,05 obtenido al calcular la OR mediante regresión logística.

Por otro lado, no se encontraron diferencias entre obesos y no obesos, diabéticos y no diabéticos, hipertensos y no hipertensos o hipercolesterolémicos y no hipercolesterolémicos.

4.2.3.2.2 Polimorfismos en el gen de CETP

Las frecuencias genotípicas de los polimorfismos TaqIB y rs183130 del gen de la CETP observadas en la población total y por sexo, se encuentran en la tabla 4.15.

Tabla 4.15 Frecuencias genotípicas del polimorfismos TaqIB y rs183130 del gen CETP en la población PREDIMED del nodo de Valencia y comparando por sexo.

Polimorfismo	Genotipos	Población total	Hombres	Mujeres
TaqIB		n=1021	n=380	n=641
	B1B1 (%)	37,9	38,7	37,4
	B1B2 (%)	48,0	46,1	49,1
	B2B2 (%)	14,1	15,3	13,4
rs183130		n=1034	n=386	n=648
	CC (%)	52,8	54,4	51,9
	CT (%)	39,8	36,5	41,8
	TT (%)	7,4	9,1	6,3

Las frecuencias genotípicas del polimorfismo TaqIB se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg ($P=0,577$). No existen diferencias entre sexo en cuanto a la distribución del genotipo ($P=0,563$). Las frecuencia alélica de B1 fue 0,619 y de B2 0,381.

En el caso del polimorfismo rs183130, las frecuencias genotípicas se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg ($P=0,163$). No existen diferencias entre sexo en cuanto a la distribución del genotipo ($P=0,107$). Las frecuencia alélica de C fue 0,727 y de T 0,273.

Por otro lado, se mostró que los dos polimorfismos se encuentran en desequilibrio de ligamiento (Figura 4.3).

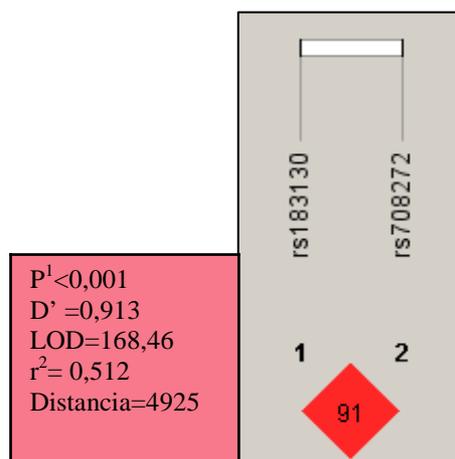


Figura 4.3. Variables y gráfico de desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos TaqIB (rs708272) y rs183130 del gen de la CETP. P^1 : p-valor para comparar las frecuencias genotípicas de ambos polimorfismos mediante un test Chi-cuadrado; D' : coeficiente de desequilibrio relativo al máximo; LOD: logaritmo (base 10) de probabilidad de ligamiento entre dos loci; r^2 : coeficiente de correlación entre los dos loci; Distancia: distancia medida en pares de base entre los loci.

En la tabla 4.16 se muestran los resultados del análisis de asociación entre el polimorfismo TaqIB del gen de CETP y variables antropométricas, presión arterial, niveles plasmáticos de glucosa y de lípidos. Se observa una tendencia según el genotipo en la concentración de CT, c-LDL, c-HDL y TG, de manera que los individuos B2B2 presentan mayores niveles de CT, c-LDL y c-HDL y menores de TG que los individuos B1B2 y B1B1 (p tendencia lineal=0,001 para CT, p tendencia lineal=0,010 para c-LDL, p tendencia lineal<0,001 para c-HDL y p tendencia lineal=0,050 para TG). También, los datos muestran diferencias estadísticamente significativas en la PAS y PAD pero no se observa una tendencia marcada por el genotipo (p tendencia lineal=0,387, p tendencia lineal = 0,328 respectivamente). La asociación observada entre el polimorfismo TaqIB de CETP y los niveles de lípidos permaneció significativa tras ajustar por variables de confusión. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a las variables antropométricas y la concentración de glucosa.

Tabla 4.16. Variables antropométricas (edad, peso, IMC, cintura), presión arterial (PAS, PAD), niveles plasmáticos de glucosa y de lípidos (CT, c-LDL, c-HDL, TG) según el genotipo del polimorfismo TaqIB del gen de CETP en la población PREDIMED del nodo de Valencia.

	B1B1 (n=387) Media ± DS	B1B2 (n=490) Media ± DS	B2B2 (n=144) Media ± DS	P¹
Edad (años)	67 ± 6	67 ± 6	66 ± 6	0,226
Peso (kg)	76,6 ± 11,8	76,4 ± 12,1	76,0 ± 12,8	0,876
IMC(kg/m²)	30,5 ± 4,3	30,4 ± 4,5	29,9 ± 4,4	0,427
Cintura (cm)	103,8 ± 11,9	102,5 ± 12,0	101,6 ± 11,5	0,104
PAS (mmHg)	148,7 ± 21,2	144,9 ± 18,8	147,0 ± 20,9	0,031
PAD (mmHg)	82,0 ± 10,8	80,7 ± 10,4	83,1 ± 9,8	0,032
Glucosa (mg/dl)	117,7 ± 35,0	120,4 ± 39,8	121,0 ± 43,6	0,531
CT (mg/dl)	203,9 ± 40,3	204,9 ± 36,8	217,2 ± 39,7	0,001**
c-LDL (mg/dl)	127,6 ± 36,0	126,4 ± 33,5	136,7 ± 38,5	0,009**
c-HDL (mg/dl)	50,1 ± 12,7	53,7 ± 13,0	56,4 ± 13,3	<0,001**
TG (mg/dl)	132,7 ± 65,9	124,1 ± 65,7	121,2 ± 60,4	0,031**

IMC: Índice de masa corporal; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; CT: colesterol total; c-LDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos. ¹: p valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante una prueba ANOVA. *: p valor > 0,05 de comparación de medias tras ajustar por sexo, edad, IMC, DMT2, HTA, tabaco, adherencia a la dieta mediterránea, actividad física y tratamiento hipolipemiente. **: p valor < 0,05 de comparación de medias tras ajustar por sexo, edad, IMC, DMT2, HTA, dislipemia, tabaco, adherencia a la dieta mediterránea, actividad física y tratamiento hipolipemiente.

Por otro lado, al comparar por sexo, se encontró una asociación entre la cintura y el polimorfismo TaqIB de la CETP en mujeres (P=0,021). Las que presentaban genotipo B2B2 mostraban menores valores de cintura que las B2B1 y B1B1 observándose una tendencia lineal (B1B1:103,3±12,0; B1B2: 101,2±12,0; B2B2: 99,4±10,8 m; p tendencia lineal=0,010). Las mujeres B2B2 también presentaron menores valores de IMC que las B1B2 y B1B1. Aunque las diferencias no alcanzaron la significación estadística (P=0,102) si se observó una tendencia lineal (B1B1:31,2±4,5; B1B2:30,9±4,6; B2B2:30,0±4,6 Kg/m²; p tendencia lineal=0,033). En hombres, no se observaron diferencias en IMC y cintura según el genotipo (B1B1:29,3±3,7; B1B2:29,4±4,0; B2B2:29,9±4,1 Kg/m²; P=0,650, p tendencia lineal=0,354; B1B1:104,7±11,5; B1B2: 104,8±11,5; B2B2: 105,1±11,8 m; P=0,978, p tendencia lineal=0,834). Dados los resultados obtenidos, se estudió la posible interacción entre el sexo y el polimorfismo TaqIB para determinar la cintura y el IMC pero dicha interacción no resultó estadísticamente significativa en ningún caso (Pinteracción=0,167 para la cintura, Pinteracción=0,119 para IMC). También se estudió si la asociación entre el

polimorfismo TaqIB y cintura e IMC en mujeres dependía de la concentración de c-HDL. Tras ajustar, se observó que esta asociación con cintura fue menos potente ($P=0,087$) y con IMC desapareció ($P=0,291$). Tanto en mujeres como en hombres no se obtuvo una OR estadísticamente significativa para el riesgo de obesidad ($OR=0,83$ IC95%(0,60-1,15) $P=0,266$; $OR=1,06$ IC95%(0,69-1,62) $P=0,799$, respectivamente). No se encontraron diferencias entre obesos y no obesos, diabéticos y no diabéticos, hipertensos y no hipertensos o hipercolesterolémicos y no hipercolesterolémicos.

Por otra parte, en la tabla 4.17 también se muestran los resultados del análisis de asociación entre el polimorfismo rs183130 del gen de CETP y variables antropométricas, presión arterial, niveles plasmáticos de glucosa y de lípidos.

Tabla 4.17 Variables antropométricas (edad, peso, IMC, cintura), presión arterial (PAS, PAD), niveles plasmáticos de glucosa y de lípidos (CT, c-LDL, c-HDL, TG) según el genotipo del polimorfismo rs183130 del gen de CETP en la población PREDIMED del nodo de Valencia.

	CC (n=546) Media \pm DS	CT (n=412) Media \pm DS	TT (n=76) Media \pm DS	P ¹
Edad (años)	67 \pm 6	67 \pm 6	66 \pm 7	0,308
Peso (kg)	76,2 \pm 12,5	76,7 \pm 11,6	76,1 \pm 11,8	0,792
IMC(kg/m ²)	30,3 \pm 4,4	30,4 \pm 4,4	29,9 \pm 4,2	0,625
Cintura (cm)	102,8 \pm 12,4	103,1 \pm 11,5	101,4 \pm 11,1	0,552
PAS (mmHg)	147,5 \pm 20,5	145,6 \pm 19,9	144,2 \pm 18,2	0,219
PAD (mmHg)	81,5 \pm 10,9	81,1 \pm 10,3	83,3 \pm 9,3	0,261
Glucosa (mg/dl)	117,1 \pm 36,4	121,7 \pm 41,1	121,6 \pm 40,3	0,162
CT (mg/dl)	205,0 \pm 39,8	205,4 \pm 37,3	214,6 \pm 37,8	0,127
c-LDL (mg/dl)	128,5 \pm 35,4	126,5 \pm 34,5	132,5 \pm 38,3	0,362
c-HDL (mg/dl)	51,2 \pm 13,2	53,5 \pm 12,1	58,6 \pm 13,8	<0,001**
TG (mg/dl)	128,5 \pm 64,4	126,7 \pm 65,9	117,6 \pm 64,6	0,400

IMC: Índice de masa corporal; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; CT: colesterol total; c-LDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos. ¹: p valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante una prueba ANOVA. *: p valor > 0,05 de comparación de medias tras ajustar por sexo, edad, IMC, DMT2, HTA, tabaco, adherencia a la dieta mediterránea, actividad física y tratamiento hipolipemiante. **: p valor < 0,05 de comparación de medias tras ajustar por sexo, edad, IMC, DMT2, HTA, tabaco, adherencia a la dieta mediterránea, actividad física y tratamiento hipolipemiante.

Se observa una asociación entre los polimorfismo rs183130 y los niveles de c-HDL siendo éstos mayores a medida que aumenta el número de alelos T ($P < 0,001$, p tendencia lineal $< 0,001$). Dicha asociación se mantuvo estadísticamente significativa tras ajustar ($P < 0,001$). No se encontró asociación con ninguna otra variable. No se observó heterogeneidad entre hombres y mujeres en los resultados ni tampoco diferencias entre obesos y no obesos, diabéticos y no diabéticos, hipertensos y no hipertensos o hipercolesterolémicos y no hipercolesterolémicos.

4.2.3.2.3 Polimorfismo Ser447X del gen de LPL

Las frecuencias genotípicas observadas en la población total y por sexo se encuentran en la tabla 4.18.

Tabla 4.18. Frecuencias genotípicas del polimorfismo Ser447X del gen LPL en la población PREDIMED del nodo de Valencia y comparando por sexo.

Genotipos	Población total (n=1028)	Hombres (n=386)	Mujeres (n=642)
Ser447Ser (%)	73,1	69,7	75,1
Ser447X (%)	25,7	28,5	24,0
X447X (%)	1,3	1,8	0,9

Las frecuencias genotípicas se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg ($P=0,06$). No existen diferencias entre sexo en cuanto a la distribución del genotipo ($P=0,114$). Las frecuencia alélica de Ser447 fue 0,859 y de 447X 0,141.

En la tabla 4.19 se muestran los resultados del análisis de asociación entre el polimorfismo Ser447X del gen de LPL y variables antropométricas, presión arterial, niveles plasmáticos de glucosa y de lípidos. Debido a la escasa prevalencia del genotipo X447X se agruparon heterocigotos e individuos con genotipo X447X para obtener mayor potencia estadística en los análisis realizados.

Los portadores del alelo 447X presentan menores concentraciones de TG y mayores de c-HDL pero en ningún caso se alcanza la significación estadística. Sin embargo, se observan diferencias estadísticamente significativas en el peso según el genotipo tanto en el modelo crudo como ajustado. Los individuos portadores del alelo 447X presentan mayor peso que los homocigotos Ser447Ser. También presentan mayor IMC ($P_{ajustada}=0,029$).

Con ello se estudió el riesgo de obesidad asociado al alelo 447X. Se observó que las frecuencias diferían entre obesos y no obesos (Obesos: 69,4% Ser447Ser vs 30,6% portadores del alelo 447X; no obesos: 76,2% Ser447Ser vs 23,8% portadores del alelo

447X; P=0,016). Además, los portadores del alelo 477X mostraron mayor riesgo de obesidad que los individuos Ser447Ser (OR=1,47 IC95%(1,10-1,95) P=0,008 tras ajustar por edad y sexo).

Tabla 4.19. Variables antropométricas (edad, peso, IMC, cintura), presión arterial (PAS, PAD), niveles plasmáticos de glucosa y de lípidos (CT, c-LDL, c-HDL, TG) según el genotipo del polimorfismo Ser447X del gen de LPL en la población PREDIMED del nodo de Valencia.

	Ser447Ser (n=751) Media ± DS	Ser447X + X447X (n=277) Media ± DS	P ¹
Edad (años)	67 ± 6	68 ± 6	0,071
Peso (kg)	75,8 ± 11,6	77,8 ± 13,1	0,023**
IMC(kg/m ²)	30,2 ± 4,3	30,7 ± 4,5	0,068**
Cintura (cm)	102,5 ± 11,9	103,2 ± 12,2	0,434
PAS (mmHg)	146,2 ± 20,0	147,3 ± 20,3	0,435
PAD (mmHg)	81,1 ± 10,3	82,2 ± 11,2	0,151
Glucosa (mg/dl)	119,2 ± 38,3	119,3 ± 39,8	0,973
CT (mg/dl)	207,3 ± 38,3	204,0 ± 39,9	0,222
c-LDL (mg/dl)	129,1 ± 35,1	127,4 ± 35,5	0,510
c-HDL (mg/dl)	52,6 ± 12,7	53,0 ± 13,8	0,682
TG (mg/dl)	128,4 ± 67,5	121,5 ± 58,5	0,277

IMC: Índice de masa corporal; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; CT: colesterol total; c-LDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos.¹: p valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante una prueba T-Student. *: p valor > 0,05 de comparación de medias tras ajustar por sexo, edad, DMT2, tabaco y adherencia a la dieta mediterránea, actividad física. **: p valor < 0,05 de comparación de medias tras ajustar por sexo, edad, DMT2, tabaco, adherencia a la dieta mediterránea y actividad física.

Al analizar los resultados por sexo, se observó que la asociación entre el polimorfismo con el peso y con IMC, así como el aumento de riesgo de obesidad asociado al alelo 477X, solo se mantuvo estadísticamente significativa en el caso de los hombres (Ser447Ser:80,2±11,8; portador alelo 447X: 83,0±11,7 Kg; p=0,036 para el peso; Ser447Ser:29,0±3,9; portador alelo 447X: 30,2±3,7 Kg/m²; p=0,006 para IMC; OR=2,05 IC95%(1,31-3.20) p=0,002). Las diferencias en el perímetro de la cintura quedaron en el límite de la significación estadística (Ser447Ser:103,9±11,6; portador alelo 447X: 106,2±11,4 m; p=0,078). En las mujeres no se observó asociación con el peso (P=0,558), el IMC (P=0,431) y la cintura (P=0,524). Además, las portadoras del alelo 477X mostraron

mayor riesgo de obesidad pero no se alcanzó la significación estadística (OR = 1,17 IC95% (0,82-1,69) P=0,386).

Tras observar las diferencias entre hombres y mujeres se estudió la posible interacción entre el polimorfismo Ser447X y el sexo para determinar el peso, el IMC y la cintura, pero dicha interacción no fue estadísticamente significativa (Pinteracción=0,332 para peso, Pinteracción =0,258 para IMC, Pinteracción =0,082 para cintura)

En cuanto a los resultados de TG y c-HDL, en ambos sexos los portadores del alelo 447X presentan menores concentraciones de TG y mayores de c-HDL pero en ningún caso se alcanza la significación estadística. En las mujeres, las diferencias en la concentración del TG según el genotipo se sitúan al límite de la significación estadística (Ser447Ser: 125,4±63,5; portador alelo 447X: 113,8±53,7 mg/dL; p=0,065). Los resultados no variaron tras ajustar por variables de confusión.

Por otro lado, no se encontraron diferencias entre obesos y no obesos, diabéticos y no diabéticos, hipertensos y no hipertensos o hipercolesterolémicos y no hipercolesterolémicos.

4.2.3.2.4 Polimorfismo R219K del gen de ABCA1

Las frecuencias genotípicas observadas en la población total y por sexo se encuentran en la tabla 4.20.

Tabla 4.20. Frecuencias genotípicas del polimorfismo R219K del gen ABCA1 en la población PREDIMED del nodo de Valencia y comparando por sexo.

Genotipos	Población total (n=1034)	Hombres (n=385)	Mujeres (n=649)
RR (%)	54,4	56,6	53,2
RK (%)	37,5	34,0	39,6
KK (%)	8,0	9,4	7,2

Las frecuencias genotípicas se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg (P=0,163). No existen diferencias entre sexo en cuanto a la distribución del genotipo (P=0,144). Las frecuencias alélicas de R fue 0,732 y de K 0,268.

En la tabla 4.21 se muestran los resultados del análisis de asociación entre el polimorfismo R219K del gen de ABCA1 y variables antropométricas, presión arterial, niveles plasmáticos de glucosa y de lípidos.

Tabla 4.21. Variables antropométricas (edad, peso, IMC, cintura), presión arterial (PAS, PAD), niveles plasmáticos de glucosa y de lípidos (CT, c-LDL, c-HDL, TG) según el genotipo del polimorfismo R219K del gen de ABCA1 en la población PREDIMED del nodo de Valencia.

	RR (n=563) Media ± DS	RK (n=388) Media ± DS	KK (n=83) Media ± DS	P¹
Edad (años)	67 ± 6	67 ± 6	66 ± 6	0,150
Peso (kg)	76,9 ± 11,7	75,6 ± 12,4	75,3 ± 12,0	0,232
IMC(kg/m²)	30,5 ± 4,4	30,2 ± 4,4	29,3 ± 4,1	0,040**
Cintura (cm)	103,3 ± 11,6	102,4 ± 12,3	100,3 ± 12,0	0,106*
PAS (mmHg)	147,0 ± 20,1	145,7 ± 20,0	147,4 ± 20,0	0,560
PAD (mmHg)	82,8 ± 10,5	80,8 ± 10,8	81,2 ± 10,0	0,339
Glucosa (mg/dl)	121,7 ± 38,6	117,1 ± 40,1	112,4 ± 30,9	0,055*
CT (mg/dl)	206,6 ± 38,0	204,3 ± 40,5	212,1 ± 36,1	0,251
c-LDL (mg/dl)	129,6 ± 35,2	126,0 ± 35,7	129,9 ± 34,4	0,282
c-HDL (mg/dl)	51,8 ± 12,4	53,8 ± 13,4	53,7 ± 15,3	0,050*
TG (mg/dl)	124,9 ± 63,5	127,0 ± 66,3	142,0 ± 69,7	0,081*

IMC: Índice de masa corporal; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; CT: colesterol total; c-LDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos. ¹: p valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante una prueba ANOVA. *: p valor > 0,05 de comparación de medias tras ajustar por sexo, edad, (IMC), (DMT2), HTA, tabaco, adherencia a la dieta mediterránea, actividad física y medicación. **: p valor < 0,05 de comparación de medias tras ajustar por sexo, edad, (IMC), (DMT2), HTA, tabaco, adherencia a la dieta mediterránea, actividad física y medicación.

Los resultados muestran diferencias estadísticamente significativas según el genotipo en la concentración de c-HDL pero no en la de TG. Los homocigotos RR presentan menores niveles de c-HDL con respecto a los heterocigotos y homocigotos KK, sin embargo, no se alcanza una tendencia lineal (p de tendencia lineal=0,218). Al comparar homocigotos RR frente a portadores de K, si se observan diferencias estadísticamente significativas en la concentración de c-HDL (RR: 51,8±12,4 mg/dL vs RK+KK: 53,8±13,7 mg/dL; P=0,014), incluso tras ajustar por variables de confusión (P=0,031).

Además, los homocigotos RR presentan mayor IMC que los heterocigotos y homocigotos KK. Se muestra un efecto lineal según el genotipo (p de tendencia lineal=0,014). También se observa una tendencia lineal en la cintura en el mismo sentido (p de tendencia lineal=0,042). Las diferencias según el genotipo, en el caso de la glucosa se encuentran en el límite de la significación estadística (P=0,055) y si se observa una tendencia lineal (p de tendencia lineal=0,048). Los individuos RR presentan mayor valor de

glucosa que los heterocigotos y que los homocigotos KK. Tras ajustar los resultados por las variables de confusión, solo se mantuvieron las diferencias estadísticamente significativas en el caso del IMC (Pajustada=0,043).

Tras la obtención de estos resultados se estudió el riesgo de DMT2 y obesidad asociado al polimorfismo R219K. La prevalencia de dicho polimorfismo en diabéticos y no diabéticos fue diferente (diabéticos: 58,8% RR, 34,2% RK, 7,0% KK vs no diabéticos 51,0% RR, 40,5% RK, 8,6% KK; $p=0,043$), mientras que la diferencia en la prevalencia entre obesos y no obesos quedó en el límite de la significación estadística (obesos: 57,2% RR, 36,7% RK, 6,1% KK vs no obesos 51,9% RR, 38,5% RK, 9,6% KK; $p=0,066$). Para obtener la OR se agruparon los portadores el alelo K y se compararon los individuos con genotipo RR. El riesgo de DMT2 asociado al alelo K fue de $OR=0,73$ $IC95\%(0,57-0,93)$ $P=0,012$. Tras ajustar por edad y sexo, la OR del alelo K permanece estadísticamente significativa ($OR=0,76$ $IC95\%(0,59-0,97)$ $P=0,030$). Tras ajustar por concentración de c-HDL, la OR se mantuvo significativa ($OR=0,77$ $IC95\%(0,60-0,99)$ $P=0,045$). Además, la media de concentración plasmática de glucosa fue menor en los portadores del alelo K que en los individuos con genotipo RR ($116,3 \pm 38,7$ mg/dL vs $121,7 \pm 38,6$ mg/dL, $p=0,027$) (Figura 4.4).

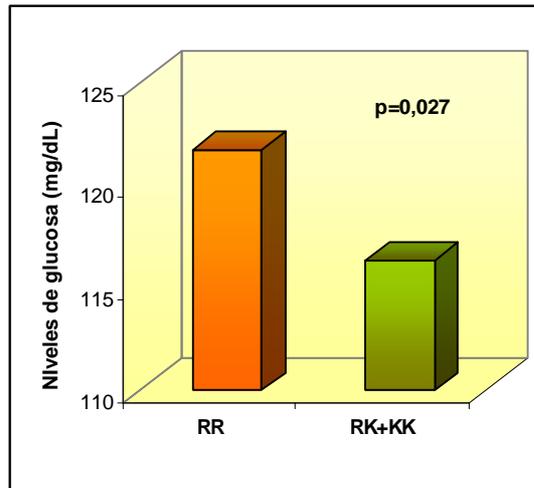


Figura 4.4. Niveles de glucosa en individuos con genotipo RR y portadores del alelo K según el polimorfismo R219K de ABCA1 en la población del estudio PREDIMED en el nodo de Valencia.

Los portadores del alelo K también mostraron menor riesgo de desarrollar obesidad pero de nuevo la asociación ajustada por edad y sexo quedó en el límite de la significación estadística ($OR=0,79$ $IC95\%(0,62-1,02)$ $P=0,067$).

Al analizar los datos por sexo, se observó que las diferencias según el genotipo en la concentración de glucosa, c-HDL, cintura e IMC solo se mantuvieron en mujeres (Tabla 4.22). Además, se detectó una interacción gen*sexo que determinaba el perímetro de la cintura (Pinteracción=0,001) que, tras ajustar por concentración de c-HDL, continuó siendo significativa.

Tabla 4.22. Valores de concentración de glucosa, c-HDL, IMC y perímetro de cintura según el genotipo del polimorfismo R219K del gen de ABCA1 en hombres y mujeres en la población PREDIMED del nodo de Valencia.

	RR	RK	KK	P ¹
	Media ± DS	Media ± DS	Media ± DS	
Glucosa (mg/dL)	² Pinteracción gen*sexo=0,499			
Mujeres	118,6 ± 37,4	112,2 ± 37,7	108,0 ± 27,3	0,046
Hombres	126,9 ± 40,0	126,8 ± 42,9	118,3 ± 34,8	0,519
c-HDL (mg/dL)	² Pinteracción gen*sexo=0,135			
Mujeres	54,0 ± 12,5	56,8 ± 13,7	58,1 ± 16,9	0,016
Hombres	48,1 ± 11,4	47,9 ± 10,5	47,8 ± 10,4	0,978
IMC (Kg/m²)	² Pinteracción gen*sexo=0,079			
Mujeres	31,3 ± 4,6	30,4 ± 4,5	29,7 ± 4,5	0,016
Hombres	29,3 ± 3,7	29,8 ± 4,2	28,6 ± 3,4	0,259
Cintura (cm)	² Pinteracción gen*sexo= 0,001			
Mujeres	103,1 ± 12,2	100,6 ± 11,6	96,8 ± 11,5	0,001
Hombres	103,6 ± 10,7	106,1 ± 13,0	105,5 ± 10,8	0,162

IMC: Índice de masa corporal; c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad ¹: p valor de comparación de medias obtenido mediante una prueba ANOVA. : ² P interacción obtenida mediante análisis multivariante.

También, solo en mujeres, se mostró menor riesgo de DMT2 asociado al alelo K (OR=0,64 IC95%(0,46-0,88) P=0,005 en mujeres; OR=0,93 IC95%(0,62-1,7) P=0,744 en hombres) y menor riesgo de obesidad estadísticamente significativo (OR= 0,67 IC95%0,48-0,90 p=0,009 en mujeres; OR=1,09 IC95% (0,72-1,65) P=0,693 en hombres). En mujeres, tras ajustar por concentración de c-HDL, la OR para DMT2 y obesidad continuó siendo estadísticamente significativa (OR=0,69 IC95% (0,50-0,96) P=0,028; OR= 0,72 IC95%(0,52-0,99) P=0,044, respectivamente). No se encontró una interacción gen*sexo para DMT2 y obesidad (Pinteracción=0,101; Pinteracción=0,275, respectivamente).

Por otro lado, no se encontraron diferencias entre obesos y no obesos, diabéticos y no diabéticos, hipertensos y no hipertensos o hipercolesterolémicos y no hipercolesterolémicos.

4.2.3.2.5 Polimorfismo -514C/T del gen de la LH

Las frecuencias genotípicas observadas en la población total y por sexo se encuentran en la tabla 4.23.

Tabla 4.23. Frecuencias genotípicas del polimorfismo -514C/T del gen LIPC en la población PREDIMED del nodo de Valencia y comparando por sexo.

Genotipos	Población total (n=1025)	Hombres (n=382)	Mujeres (n=643)
CC (%)	62,7	62,8	62,7
CT (%)	33,1	32,2	33,6
TT (%)	4,2	5,0	3,7

Las frecuencias genotípicas se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg ($P=0,841$). No existen diferencias entre sexo en cuanto a la distribución del genotipo ($P=0,600$). Las frecuencias alélicas de C fue 0,793 y de T 0,207.

En la tabla 4.24 se muestran los resultados del análisis de asociación entre el polimorfismo -514C/T del gen de LH y variables antropométricas, presión arterial, niveles plasmáticos de glucosa y de lípidos. Debido a la escasa prevalencia del genotipo TT, se agruparon heterocigotos e individuos con genotipo TT para obtener mayor potencia estadística en los análisis realizados.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas según el genotipo en ninguna de las variables estudiadas tanto al realizar los análisis en crudo como ajustados. Tampoco al estudiar las diferencias entre obesos y no obesos, diabéticos y no diabéticos, hipertensos y no hipertensos o hipercolesterolémicos y no hipercolesterolémicos.

Sin embargo, al obtener los resultados según el sexo, se observó que en hombres los portadores del alelo T mostraban mayor concentración de TG tras ajustar por variables de confusión (CC $129,3 \pm 62,6$ mg/dL CT+TT $143,3 \pm 82,2$ mg/dL; P sin ajustar=0,067, P ajustada=0,029). También se observó que los portadores del alelo T presentaban mayor PAS (CC $145,9 \pm 18,9$ mmHg, CT+TT $150,2 \pm 20,4$ mmHg; P sin ajustar=0,041, P ajustada=0,045). Las diferencias con respecto a PAD quedaron en el límite de la significación estadística (CC $81,5 \pm 10,9$ mg/dL CT+TT $83,3 \pm 11,2$ mg/dL P sin ajustar=0,116, P ajustada=0,063).

Tabla 4.24. Variables antropométricas (edad, peso, IMC, cintura), presión arterial (PAS, PAD), niveles plasmáticos de glucosa y de lípidos (CT, c-LDL, c-HDL, TG) según el genotipo del polimorfismo -514C/T del gen de LH en la población estudiada.

	CC (n=643) Media ± DS	CT+TT (n=382) Media ± DS	P ¹
Edad (años)	67 ± 6	67 ± 6	0,264
Peso (kg)	76,5 ± 12,0	76,2 ± 12,2	0,717
IMC(kg/m ²)	30,4 ± 4,5	30,3 ± 4,2	0,858
Cintura (cm)	102,9 ± 12,0	102,8 ± 11,9	0,946
PAS (mmHg)	145,8 ± 20,0	148,0 ± 19,7	0,088*
PAD (mmHg)	81,3 ± 10,6	81,7 ± 10,5	0,522
Glucosa (mg/dl)	118,5 ± 36,9	120,8 ± 41,8	0,369
CT (mg/dl)	205,0 ± 38,8	208,3 ± 38,9	0,198*
c-LDL (mg/dl)	127,6 ± 35,8	129,2 ± 34,4	0,488
c-HDL (mg/dl)	52,4 ± 13,3	53,4 ± 12,6	0,258*
TG (mg/dl)	124,9 ± 62,1	131,2 ± 70,1	0,246*

IMC: Índice de masa corporal; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; CT: colesterol total; c-LDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos. ¹: p valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante un prueba T-Student. *: p valor > 0,05 de comparación de medias tras ajustar por sexo, edad, IMC, DMT2, HTA, tabaco, adherencia a la dieta mediterránea, actividad física y medicación. **: p valor < 0,05 de comparación de medias tras ajustar por sexo, edad, IMC, DMT2, HTA, tabaco, adherencia a la dieta mediterránea, actividad física y medicación.

4.2.3.2.6 Polimorfismo -75G/A del gen de la APOA1

Las frecuencias genotípicas observadas en la población total y por sexo se encuentran en la tabla 4.25.

Las frecuencias genotípicas se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg (P=0,960). No existen diferencias entre sexo en cuanto a la distribución del genotipo (p=0,319). Las frecuencia alélica de G fue 0,828 y de A 0,172.

Tabla 4.25. Frecuencias genotípicas del polimorfismo -75G/A del gen APOA1 en la población PREDIMED del nodo de Valencia y comparando por sexo.

Genotipos	Población total (n=1011)	Hombres (n=377)	Mujeres (n=634)
GG (%)	68,6	71,4	67,0
GA (%)	28,4	26,3	29,7
AA (%)	3,0	2,4	3,3

En la tabla 4.26 se muestran los resultados del análisis de asociación entre el polimorfismo -75G/A del gen APOA1 y variables antropométricas, presión arterial, niveles plasmáticos de glucosa y de lípidos. Debido a la escasa prevalencia del genotipo AA, se agruparon los portadores del alelo A para obtener mayor potencia estadística.

Tabla 4.26. Variables antropométricas (edad, peso, IMC, cintura), presión arterial (PAS, PAD), niveles plasmáticos de glucosa y de lípidos (CT, c-LDL, c-HDL, TG) según el genotipo del polimorfismo -75G/A de APOA1 en la población PREDIMED del nodo de Valencia.

	GG (n=694) Media ± DS	GA+AA (n=317) Media ± DS	P ¹
Edad (años)	67 ± 6	67 ± 6	0,511
Peso (kg)	76,5 ± 12,1	75,9 ± 11,7	0,399
IMC(kg/m ²)	30,3 ± 4,3	30,3 ± 4,6	0,995
Cintura (cm)	103,0 ± 12,1	102,0 ± 11,3	0,197
PAS (mmHg)	146,7 ± 19,5	146,1 ± 21,2	0,689
PAD (mmHg)	81,5 ± 10,4	81,4 ± 10,9	0,860
Glucosa (mg/dl)	118,4 ± 38,4	121,8 ± 39,8	0,204
CT (mg/dl)	208,1 ± 38,9	203,7 ± 38,2	0,098*
c-LDL (mg/dl)	130,5 ± 35,1	124,9 ± 34,5	0,020**
c-HDL (mg/dl)	52,5 ± 12,9	53,2 ± 13,1	0,428
TG (mg/dl)	127,2 ± 65,1	127,3 ± 66,5	0,985

IMC: Índice de masa corporal; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; CT: colesterol total; c-LDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos. ¹: p valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante un prueba T-Student. *: p valor > 0,05 de comparación de medias tras ajustar por sexo, edad, IMC, DMT2, HTA, tabaco, adherencia a la dieta mediterránea, actividad física y tratamiento hipolipemiente. **: p valor < 0,05 de comparación de medias tras ajustar por sexo, edad, IMC, DMT2, HTA, tabaco, adherencia a la dieta mediterránea, actividad física y tratamiento hipolipemiente.

Los resultados muestran diferencias estadísticamente significativas con respecto a la concentración de c-LDL según el genotipo tanto al analizar los resultados en crudo como ajustados. Los portadores del alelo A presentan menores concentraciones de c-LDL. Las medias de las demás variables analizadas, entre ellas el c-HDL, son semejantes entre grupos. No se observó heterogeneidad en los resultados entre hombres y mujeres, ni entre obesos y no obesos, diabéticos y no diabéticos, hipertensos y no hipertensos o hipercolesterolémicos y no hipercolesterolémicos.

4.2.3.2.7 Polimorfismo Q192R del gen de PON1

Las frecuencias genotípicas observadas en la población total y por sexo se encuentran en la tabla 4.27.

Tabla 4.27. Frecuencias genotípicas del polimorfismo Q192R del gen PON1 en la población PREDIMED del nodo de Valencia y comparando por sexo.

Genotipos	Población total (n=1002)	Hombres (n=365)	Mujeres (n=637)
QQ (%)	41,6	37,0	44,3
QR (%)	44,0	48,5	41,4
RR (%)	14,4	14,5	14,3

Las frecuencias genotípicas se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg ($P=0,177$). No existen diferencias entre sexo en cuanto a la distribución del genotipo ($p=0,061$). Las frecuencias alélicas obtenidas fueron: 0,635 para Q192 y 0,365 para 192R.

En la tabla 4.28 se muestran los resultados del análisis de asociación entre el polimorfismo Q192R del gen de PON1 y variables antropométricas, presión arterial, niveles plasmáticos de glucosa y de lípidos.

Los individuos con genotipo QQ mostraron mayores niveles de c-HDL que los individuos QR y RR, que presentaron los niveles más bajos, observándose una tendencia lineal (p de tendencia lineal=0,008). Tras ajustar por variables de confusión se mantuvo la significación estadística ($P=0,046$). También se observaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de CT según el genotipo pero no se observó tendencia lineal ($P=0,119$) y tras ajustar no se alcanzó la significación estadística ($P=0,088$).

Tabla 4.28. Variables antropométricas (edad, peso, IMC, cintura), presión arterial (PAS, PAD), niveles plasmáticos de glucosa y de lípidos (CT, c-LDL, c-HDL, TG) según el genotipo del polimorfismo Q192R del gen de PON1 en la población PREDIMED del nodo de Valencia.

	QQ (n=417) Media ± DS	QR (n=441) Media ± DS	RR (n=144) Media ± DS	P ¹
Edad (años)	67 ± 6	67 ± 6	66 ± 6	0,360
Peso (kg)	75,7 ± 12,0	77,0 ± 11,9	76,2 ± 12,2	0,289
IMC(kg/m²)	30,3 ± 4,5	30,5 ± 4,4	30,5 ± 4,2	0,790
Cintura (cm)	103,1 ± 12,2	103,1 ± 11,3	101,7 ± 13,0	0,456
PAS (mmHg)	146,8 ± 21,4	146,3 ± 19,6	144,3 ± 17,7	0,475
PAD (mmHg)	81,3 ± 10,8	81,3 ± 10,2	81,4 ± 10,9	0,992
Glucosa (mg/dl)	119,0 ± 39,2	120,7 ± 38,1	118,0 ± 41,7	0,725
CT (mg/dl)	210,6 ± 37,7	204,4 ± 38,0	204,6 ± 40,5	0,048*
c-LDL (mg/dl)	131,4 ± 34,4	126,3 ± 35,3	129,3 ± 37,2	0,122
c-HDL (mg/dl)	53,5 ± 13,1	52,5 ± 13,0	50,1 ± 10,6	0,029**
TG (mg/dl)	127,2 ± 64,1	128,1 ± 67,5	121,9 ± 56,1	0,865

IMC: Índice de masa corporal; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; CT: colesterol total; c-LDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos ¹: p valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante una prueba ANOVA*: p valor > 0,05 de comparación de medias tras ajustar por sexo, edad, IMC, DMT2, HTA, tabaco, adherencia a la dieta mediterránea, actividad física y tratamiento hipolipemiente. **: p valor < 0,05 de comparación de medias tras ajustar por sexo, edad, IMC, DMT2, HTA, tabaco, adherencia a la dieta mediterránea, actividad física y tratamiento hipolipemiente.

Por otro lado, se observaron diferencias entre diabéticos y no diabéticos (Figura 4.5) y obesos y no obesos (Figura 4.6). La concentración de c-HDL fue menor en diabéticos que en no diabéticos ($50,0 \pm 11,8$ mg/dL vs $54,6 \pm 13,1$ mg/dL; $P < 0,001$) y en obesos que en no obesos ($51,5 \pm 11,7$ mg/dL vs $53,8 \pm 13,8$ mg/dL; $P = 0,006$). Se observó que los niveles de c-HDL se asociaban con el polimorfismo Q192R, únicamente en individuos no diabéticos y no obesos. En estos grupos se observó un efecto del polimorfismo, de modo que los individuos con genotipo RR mostraban menor concentración de c-HDL que los QR y los QQ (no diabéticos: QQ $56,0 \pm 14,0$ mg/dL, QR $54,2 \pm 12,9$ mg/dL, RR $51,7 \pm 10,2$ mg/dL $P = 0,044$; no obesos QQ $55,4 \pm 14,0$ mg/dL, QR $53,1 \pm 14,1$ mg/dL, RR $50,5 \pm 11,2$ mg/dL $P = 0,040$). Sin embargo, en diabéticos y obesos no se encontró dicha asociación (diabéticos: QQ $50,5 \pm 11,2$ mg/dL, QR $50,2 \pm 12,6$ mg/dL, RR $48,1 \pm 10,9$ mg/dL $P = 0,398$; obesos QQ $51,8 \pm 12,0$ mg/dL, QR $51,9 \pm 11,9$ mg/dL, RR $49,6 \pm 10,3$ mg/dL $P = 0,325$). La interacción no fue significativa en ningún caso (P interacción Q192-PON1* DMT2 = 0,618, P interacción Q192-PON1* obesidad = 0,337).

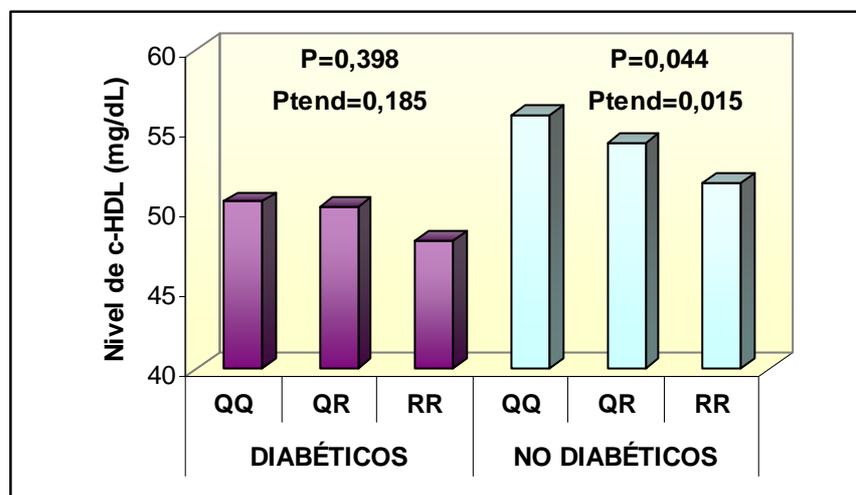


Figura 4.5. Niveles de c-HDL en diabéticos y no diabéticos según el genotipo del polimorfismo Q192R. (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba ANOVA; Ptend: p-valor obtenido de una prueba de tendencia lineal entre genotipos).

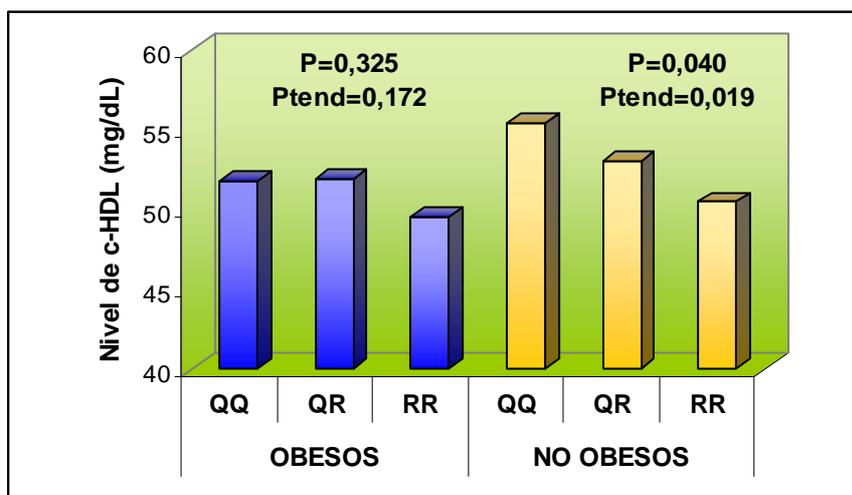


Figura 4.6. Niveles de c-HDL en obesos y no obesos según el genotipo del polimorfismo Q192R. (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba ANOVA; Ptend: p-valor obtenido de una prueba de tendencia lineal entre genotipos).

Por otro lado, se observa que la concentración de c-HDL es mayor en individuos QQ y QR diabéticos que no diabéticos y, sin embargo, en individuos RR no existen diferencias entre ambos grupos. Entre obesos y no obesos solo existen diferencias en los individuos

QQ y no en individuos con genotipo QR y RR. El alelo Q parece ser más susceptible, en su efecto sobre la concentración de c-HDL, al estado metabólico generado por la DMT2 o la obesidad (Tabla 4.29).

Tabla 4.29. Diferencia en la concentración de c-HDL según el genotipo del polimorfismo Q192R del gen de PON1 al comparar diabéticos y no diabéticos y obesos y no obesos en la población del nodo de Valencia del estudio PREDIMED.

	DMT2 Media ± DS	No DMT2 Media ± DS	P ¹	Obesos Media ± DS	No obesos Media ± DS	P ²
c-HDL mg/dl						
QQ	50,5 ± 11,2	56,0 ± 14,0	<0,001	51,8 ± 12,0	55,4 ± 14,0	0,005
QR	50,2 ± 12,6	54,2 ± 12,9	0,002	51,9 ± 11,9	53,1 ± 14,1	0,340
RR	48,1 ± 10,9	51,7 ± 10,2	0,075	49,6 ± 10,3	50,5 ± 11,2	0,608

c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; DMT2: Diabetes mellitus tipo 2; ¹: p valor de comparación de medias entre diabéticos y no diabéticos mediante un prueba T-Student. ²: p valor de comparación de medias entre obesos y no obesos mediante una prueba T-Student.

No se encontraron diferencias entre hipertensos y no hipertensos o hipercolesterolémicos y no hipercolesterolémicos.

4.2.3.3 Estudio de asociación entre polimorfismos en genes candidatos relacionados con la obesidad y fenotipos intermedios de ECV.

En este apartado se analizarán los polimorfismos rs9939609, rs1861868 y rs3751812 localizados en el gen de FTO.

Las frecuencias genotípicas de los tres polimorfismos observadas en la población total y por sexo se encuentran en la tabla 4.30. Las frecuencias genotípicas de los polimorfismos rs9939609, rs1861868 y rs3751812 se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg (P=0,622, P=0,588 y P=0,979 respectivamente). No existen diferencias entre sexo en cuanto a la distribución del genotipo en ningún caso (P=0,310, P=0,110 y P=0,675 respectivamente). Las frecuencias alélicas fueron: T 0,565 y A 0,435 para el polimorfismo rs9939609, G 0,556 y A 0,444 para rs1861868 y G 0,564 y T 0,436 para rs3751812.

Tabla 4.30. Frecuencias genotípicas de los polimorfismos rs9939609, rs1861868 y rs3751812 del gen FTO en la población PREDIMED del nodo de Valencia y comparando por sexo.

Polimorfismo	Genotipos	Población total	Hombres	Mujeres
rs9939609		n=1031	n=384	n=647
	TT (%)	32,3	34,1	31,2
	TA (%)	48,4	45,3	50,2
	AA (%)	19,3	20,6	18,5
rs1861868		n=841	n=321	n=520
	GG (%)	30,4	30,2	30,6
	GA (%)	50,3	53,9	48,1
	AA (%)	19,3	15,9	21,3
rs3751812		n=833	n=317	n=516
	GG (%)	31,8	31,2	32,2
	GT (%)	49,2	48,3	49,8
	TT (%)	19,0	20,5	18,0

Por otro lado, se mostró que los polimorfismos rs9939609 y rs3751812 se encuentran en fuerte desequilibrio de ligamiento y sin embargo, estos dos polimorfismos con respecto a rs1861868 muestran un desequilibrio de ligamiento débil (Figura 4.7).

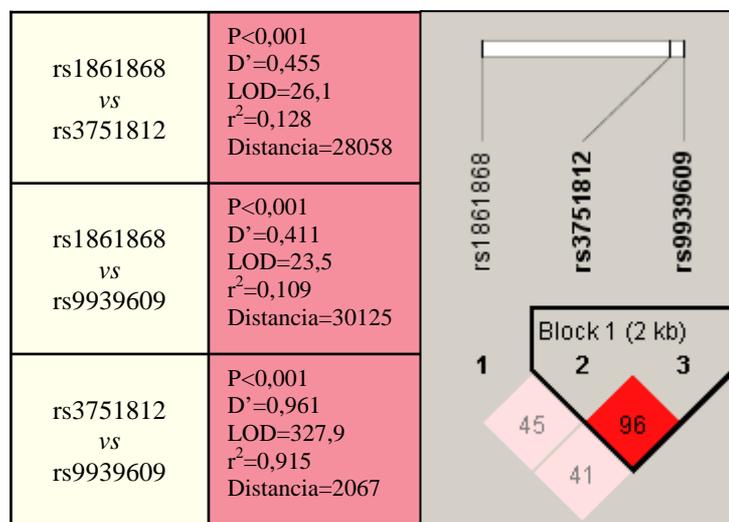


Figura 4.7. Variables y gráfico de desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos rs1861868, rs3751812 y rs9939609 del gen de la FTO. P1: p-valor para comparar las frecuencias genotípicas de ambos polimorfismos mediante un test Chi-cuadrado; D': coeficiente de desequilibrio relativo al máximo; LOD: logaritmo (base 10) de probabilidad de ligamiento entre los loci; r²: coeficiente de correlación entre los dos loci; Distancia: distancia medida en pares de bases entre los loci.

En las tablas 4.31, 4.32 y 4.33 se muestran los resultados del análisis de asociación entre los polimorfismos rs9939609, rs1861868 y rs3751812 del gen FTO y variables antropométricas, niveles plasmáticos de glucosa y TG respectivamente.

Tabla 4.31. Variables antropométricas (edad, peso, IMC, cintura), niveles plasmáticos de glucosa y TG según el genotipo del polimorfismo rs9939609 del gen de FTO en la población PREDIMED del nodo de Valencia.

	TT (n=333) Media ± DS	TA (n=499) Media ± DS	AA (n=199) Media ± DS	P ¹
Edad (años)	67 ± 6	67 ± 6	67 ± 6	0,508
Peso (kg)	76,4 ± 11,7	76,1 ± 12,0	76,7 ± 12,0	0,811
IMC(kg/m²)	30,2 ± 4,0	30,3 ± 4,6	30,4 ± 4,6	0,913
Cintura (cm)	102,7 ± 12,2	102,6 ± 11,7	103,4 ± 12,0	0,724
Glucosa (mg/dl)	119,7 ± 38,8	118,9 ± 38,5	120,4 ± 38,7	0,893
TG (mg/dl)	126,1 ± 59,6	127,8 ± 66,1	128,0 ± 71,7	0,924

IMC: Índice de masa corporal; TG: triglicéridos. ¹: p valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante una prueba ANOVA.

Tabla 4.32. Variables antropométricas (edad, peso, IMC, cintura), niveles plasmáticos de glucosa y TG según el genotipo del polimorfismo rs1861868 del gen de FTO en la población PREDIMED del nodo de Valencia.

	GG (n=256) Media ± DS	GA (n=423) Media ± DS	AA (n=162) Media ± DS	P ¹
Edad (años)	68 ± 6	67 ± 6	67 ± 6	0,776
Peso (kg)	76,6 ± 11,5	76,7 ± 12,3	76,2 ± 11,3	0,896
IMC(kg/m²)	30,6 ± 4,3	30,3 ± 4,4	30,3 ± 4,3	0,640
Cintura (cm)	105,0 ± 11,2	103,0 ± 11,5	103,3 ± 12,8	0,103*
Glucosa (mg/dl)	122,4 ± 41,0	121,3 ± 38,6	121,0 ± 40,3	0,918
TG (mg/dl)	129,2 ± 64,6	126,8 ± 63,0	128,0 ± 69,9	0,851

IMC: Índice de masa corporal; TG: triglicéridos. ¹: p valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante una prueba ANOVA. *: p valor > 0,05 de comparación de medias tras ajustar por sexo, edad, DMT2, tabaco, adherencia a la dieta mediterránea y actividad física. **: p valor < 0,05 de comparación de medias tras ajustar por sexo, edad, DMT2, tabaco, adherencia a la dieta mediterránea y actividad física.

Tabla 4.33 Variables antropométricas (edad, peso, IMC, cintura), niveles plasmáticos de glucosa y TG según el genotipo del polimorfismo rs3751812 del gen de FTO en la población PREDIMED del nodo de Valencia.

	GG (n=265) Media ± DS	GT (n=410) Media ± DS	TT (n=158) Media ± DS	P¹
Edad (años)	67 ± 6	67 ± 6	68 ± 6	0,616
Peso (kg)	76,9 ± 12,0	76,9 ± 12,1	77,0 ± 12,0	0,995
IMC(kg/m²)	30,4 ± 4,0	30,5 ± 4,6	30,8 ± 4,3	0,717
Cintura (cm)	104,0 ± 12,4	103,6 ± 11,6	105,1 ± 10,9	0,423
Glucosa (mg/dl)	121,6 ± 38,4	120,7 ± 38,7	120,6 ± 39,8	0,950
TG (mg/dl)	126,2 ± 59,8	127,4 ± 62,9	133,0 ± 75,3	0,877

IMC: Índice de masa corporal; TG: triglicéridos. ¹: p valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante una prueba ANOVA.

Ninguno de los tres polimorfismos se asoció con variables antropométricas relacionadas con obesidad como peso, cintura o IMC. Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas según el genotipo con respecto a los niveles plasmáticos de glucosa y TG. Al comparar por sexo no se observó heterogeneidad por sexo. Tampoco se encontraron diferencias entre obesos y no obesos, diabéticos y no diabéticos, hipertensos y no hipertensos o hipercolesterolémicos y no hipercolesterolémicos.

Por otro lado, se estudió el riesgo de obesidad asociado a los polimorfismos seleccionados del gen de la FTO. Para ello, se agruparon los portadores del alelo A en el caso de los polimorfismos rs9939609 y rs1861868 y del alelo T del polimorfismo rs3751812 y se compararon frente a los homocigotos salvajes. Tras realizar los análisis, no se encontraron diferencias entre las frecuencias genotípicas en obesos y no obesos en ningún caso. Tampoco los polimorfismos estudiados mostraron un riesgo de obesidad estadísticamente significativo. En la tabla 4.34 se presentan los resultados.

De igual modo, también se estudió el riesgo de DMT2 pero tampoco se obtuvieron diferencias entre las frecuencias genotípicas en diabéticos y no diabéticos (P=0,448 para rs9939609, P=0,602 para rs1861868 y P=0,957 para rs3751812) y no se observó mayor riesgo de DMT2 en los portadores del alelo minoritario frente a los individuos homocigotos salvajes en ningún caso (OR=1,15 IC95%(0,88-1,51) p=0,309 para rs9939609, OR=0,91 IC95%(0,67-1,22) p=0,518 para rs1861868 y OR=1,03 IC95%(0,76-1,39) p=0,860 para rs3751812).

Tabla 4.34. Análisis del riesgo de obesidad según el genotipo de los diferentes polimorfismos del gen de FTO en la población PREDIMED del nodo de Valencia.

Polimorfismo		Genotipo			
rs9939609	No obesos	TT (%)	TA (%)	AA (%)	P ¹ =0,492
	Obesos	31,9	50,0	18,1	
	OR= 0,97 (0,74-1,27) p=0,821	32,3	46,9	20,8	
rs1861868	No obesos	GG (%)	GA (%)	AA (%)	P ¹ =0,503
	Obesos	28,8	52,8	18,4	
	OR= 0,91 (0,67-1,23) p=0,534	31,0	48,7	20,3	
rs3751812	No obesos	GG (%)	GT (%)	TT (%)	P ¹ =0,528
	Obesos	32,2	50,5	17,3	
	OR= 1,05 (0,78-1,41) p=0,771	31,4	46,9	20,8	

P1: p valor de comparación de frecuencias genotípicas entre obesos/ no obesos obtenido mediante un test Chi-Cuadrado. OR: valor de odds ratio referido a los portadores del alelo minoritario con respecto al genotipo homocigoto más prevalente, ajustado por edad y sexo obtenida mediante regresión logística. Entre paréntesis se incluye el intervalo de confianza al 95% y p-valor obtenido al calcular la OR mediante regresión logística.

4.2.3.4 Estudio de asociación entre polimorfismos en genes candidatos relacionados con el DMT2 y fenotipos intermedios de ECV.

En este apartado se estudian los polimorfismos Pro12Ala del gen de PPARG2, Gly482Ser del gen de PPARGC1 y las variantes localizadas en el gen de TCF7L2.

4.2.3.4.1 Polimorfismo Pro12Ala del gen de PPARG2

Las frecuencias genotípicas observadas en la población total y por sexo se encuentran en la tabla 4.35. Las frecuencias genotípicas se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg (P=0,173). No existen diferencias entre sexo en cuanto a la distribución del genotipo (P=0,521). Las frecuencia alélica de Pro12 fue 0,910 y de 12Ala 0,090.

Tabla 4.35. Frecuencias genotípicas del polimorfismo Pro12Ala del gen PPARG2 en la población PREDIMED del nodo de Valencia y comparando por sexo.

Genotipos	Población total (n=1040)	Hombres (n=387)	Mujeres (n=653)
Pro12Pro (%)	83,2	82,4	83,6
Pro12Ala (%)	15,7	16,8	15,0
Ala12Ala (%)	1,2	0,8	1,4

En la tabla 4.36 se muestran los resultados del análisis de asociación entre el polimorfismo Pro12Ala del gen PPARG2 y variables antropométricas, niveles plasmáticos de glucosa y de lípidos. Debido a la escasa prevalencia del genotipo AlaAla se agruparon heterocigotos e individuos con genotipo AlaAla para obtener mayor potencia estadística en los análisis realizados.

Tabla 4.36 Variables antropométricas (edad, peso, IMC, cintura), niveles plasmáticos de glucosa y de lípidos (CT, c-LDL, c-HDL, TG) según el genotipo del polimorfismo Pro12Ala del gen PPARG2 en la población PREDIMED del nodo de Valencia.

	Pro12Pro (n=865) Media ± DS	Pro12Ala+Ala12Ala (n=175) Media ± DS	P¹
Edad (años)	67 ± 6	67 ± 6	0,782
Peso (kg)	76,5 ± 12,0	75,7 ± 12,4	0,435
IMC(kg/m²)	30,4 ± 4,4	30,0 ± 4,3	0,297
Cintura (cm)	102,8 ± 12,0	102,4 ± 11,9	0,686
Glucosa (mg/dl)	120,1 ± 39,2	114,9 ± 35,3	0,112*
CT (mg/dl)	205,4 ± 39,0	208,4 ± 37,6	0,359
c-LDL (mg/dl)	127,5 ± 35,2	130,9 ± 35,5	0,259
c-HDL (mg/dl)	52,9 ± 13,1	51,7 ± 12,2	0,281
TG (mg/dl)	127,8 ± 66,8	123,1 ± 55,0	0,684

IMC: Índice de masa corporal; CT: colesterol total; c-LDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos. ¹: p valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante un prueba T-Student. *: p valor > 0,05 de comparación de medias tras ajustar por sexo, edad, IMC, adherencia a la dieta mediterránea, actividad física y tratamiento con insulina o antidiabéticos orales. **: p valor < 0,05 de comparación de medias tras ajustar por sexo, edad, IMC, adherencia a la dieta mediterránea y actividad física, tratamiento con insulina o antidiabéticos orales.

Los portadores del alelo 12Ala mostraron menor concentración de glucosa pero no se alcanzó la significación estadística tanto al analizar los resultados en crudo (P=0,112), como al ajustar por variables de confusión (P=0,189). Los portadores del alelo 12Ala tampoco presentaron menor riesgo de DMT2 (OR=0,92 IC95% (0,66-1,29) P=0,636 ajustado por edad y sexo).

Por otra parte, los portadores del alelo 12Ala mostraron menores niveles de PAD que los individuos con genotipo Pro12Pro (Pro12Pro:81,7±10,6; portador alelo 12Ala: 79,5±9,9 mmHg; P=0,013). Con respecto a la PAS se observa el mismo efecto pero las diferencias no son estadísticamente significativas (P=0,233). Sin embargo, no se observó menor riesgo

de HTA asociado al alelo 12Ala (OR=0,82 IC95% (0,55-1,23) P= 0,339 ajustado por edad y sexo).

Al comparar por sexo, los resultados son homogéneos en cuanto a las variables antropométricas, de glucosa y lípidos. Sin embargo, en hombres, el alelo 12Ala se asoció con menores niveles de PAS (Pro12Pro:148,7±19,7; portador alelo 12Ala: 141,2±18,8 mmHg; P=0,005) y PAD (Pro12Pro:82,6±10,9; portador alelo 12Ala: 79,1±11,1 mmHg; P=0,019) (Figura 4.8). Tras ajustar por edad, DMT2, IMC y tratamiento para la HTA se mantuvo la significación estadística (P=0,031 para PAS; P=0,026 para PAD). Dicha asociación no se encontró en mujeres (P=0,534 y P=0,196 respectivamente). Sin embargo, tras analizar la interacción entre el polimorfismo Pro12Ala y el sexo para determinar PAS y PAD, solo se alcanzó la significación estadística en el caso de PAS (P=0,011 para PAS; P=0,251 para PAD).

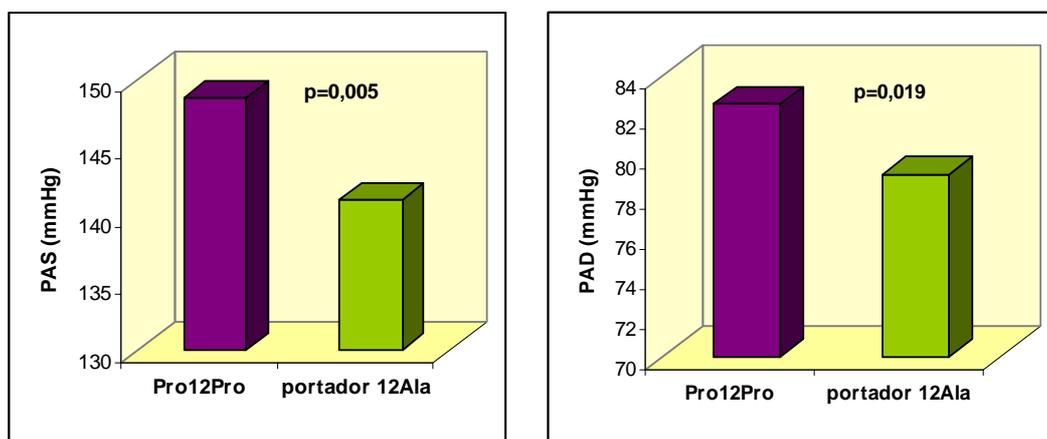


Figura 4.8. Niveles de presión arterial sistólica (PAS) y de presión arterial diastólica (PAD) según el polimorfismo Pro12Ala del gen de PPARG2 en hombres de la población PREDIMED en el nodo de Valencia.

En ambos sexos, los portadores del alelo 12Ala no mostraron menor riesgo de HTA (OR=0,80 IC95% (0,44-1,44) P= 0,458 en hombres; OR=0,84 IC95%(0,49-1,47) P= 0,535 en mujeres).

Por otro lado, no se encontraron diferencias entre obesos y no obesos, diabéticos y no diabéticos, hipertensos y no hipertensos o hipercolesterolémicos y no hipercolesterolémicos en cuanto a la asociación del polimorfismo Pro12Ala con variables antropométricas, presión arterial, glucosa y lípidos.

4.2.3.4.2 Polimorfismo Gly482Ser del gen de PPARGC1

Las frecuencias genotípicas observadas en la población total y por sexo se encuentran en la tabla 4.37.

Tabla 4.37. Frecuencias genotípicas del polimorfismo Gly482Ser del gen PPARGC1 en la población PREDIMED del nodo de Valencia y comparando por sexo.

Genotipos	Población total (n=1040)	Hombres (n=388)	Mujeres (n=652)
Gly482Gly (%)	38,4	38,9	38,0
Gly482Ser (%)	46,3	43,0	48,2
Ser482Ser (%)	15,4	18,0	13,8

Las frecuencias genotípicas se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg ($P=0,450$). No existen diferencias entre sexo en cuanto a la distribución del genotipo ($P=0,118$). Las frecuencias alélicas de Gly482 fue 0,615 y de 482Ser 0,385.

En la tabla 4.38 se muestran los resultados del análisis de asociación entre el polimorfismo Gly482Ser del gen PPARGC1 y variables antropométricas, presión arterial, niveles plasmáticos de glucosa y de lípidos.

No se encontró asociación entre el polimorfismo Gly482Ser del gen PPARGC1 y los niveles de glucosa. Tampoco se mostró mayor riesgo de DMT2 en los portadores del alelo 482Ser con respecto a los individuos con genotipo Gly482Gly ($OR=1,15$ $IC_{95\%}$ (0,89-1,49) $P=0,288$ tras ajustar por edad y sexo). Tampoco se encontraron diferencias según el genotipo en las variables antropométricas medidas.

Por otro lado, los resultados muestran una tendencia según el genotipo en la concentración de CT. Los homocigotos Ser482Ser presentan mayor concentración de CT que los Gly482Ser, y éstos mayores niveles de CT que los homocigotos Gly482Gly (P tendencia lineal=0,003, P ajustada=0,006). El mismo efecto se observa en la concentración de c-LDL. Aunque las diferencias entre genotipos se encuentran en el límite de la significación estadística, existe una tendencia lineal ($p=0,056$, p tendencia lineal=0,017). Tras ajustar por variables de confusión las diferencias de c-LDL según el genotipo continúan siendo estadísticamente significativas ($P=0,016$).

Tabla 4.38. Variables antropométricas (edad, peso, IMC, cintura), niveles plasmáticos de glucosa y de lípidos (CT, c-LDL, c-HDL, TG) según el genotipo del polimorfismo Gly482Ser del gen PPARGC1 en la población PREDIMED del nodo de Valencia.

	Gly482Gly (n=399) Media ± DS	Gly482Ser (n=481) Media ± DS	Ser482Ser (n=160) Media ± DS	P¹
Edad (años)	67 ± 6	67 ± 6	67 ± 6	0,981
Peso (kg)	76,3 ± 11,8	76,3 ± 12,4	76,4 ± 11,7	0,983
IMC(kg/m²)	30,2 ± 4,2	30,5 ± 4,5	30,1 ± 4,5	0,512
Cintura (cm)	103,1 ± 12,2	102,7 ± 12,1	101,7 ± 11,0	0,456
Glucosa (mg/dl)	117,3 ± 35,5	120,2 ± 40,8	120,6 ± 39,6	0,490
CT (mg/dl)	203,4 ± 38,9	205,4 ± 38,9	214,1 ± 36,9	0,012**
c-LDL (mg/dl)	126,1 ± 35,1	127,8 ± 34,9	134,1 ± 36,1	0,056**
c-HDL (mg/dl)	52,6 ± 12,1	52,5 ± 13,4	53,1 ± 14,2	0,875
TG (mg/dl)	124,2 ± 63,0	127,9 ± 67,8	131,3 ± 62,8	0,326

IMC: Índice de masa corporal; c-LDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos¹: p valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante una prueba ANOVA. *: p valor > 0,05 de comparación de medias tras ajustar por sexo, edad, IMC, DMT2, HTA, tabaco, adherencia a la dieta mediterránea, actividad física y tratamiento hipolipemiente. **: p valor < 0,05 de comparación de medias tras ajustar por sexo, edad, IMC, DMT2, HTA, tabaco, adherencia a la dieta mediterránea, actividad física y tratamiento hipolipemiente.

No se encontraron diferencias según el genotipo al analizar los resultados en hombres y mujeres. Tampoco entre obesos y no obesos, diabéticos y no diabéticos, hipertensos y no hipertensos o hipercolesterolémicos y no hipercolesterolémicos

4.2.3.4.3 Polimorfismos en el gen de TCF7L2

En este apartado se analizarán los polimorfismos rs7901695, rs7903146 y rs12255372 localizados en el gen de TCF7L2.

Las frecuencias genotípicas de los tres polimorfismos observadas en la población total y por sexo se encuentran en la tabla 4.39. Las frecuencias genotípicas de los polimorfismos rs7901695, rs7903146 y rs12255372 se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg (P=0,591, P=0,509 y P=0,577 respectivamente). No existen diferencias entre sexo en cuanto a la distribución del genotipo en ningún caso (P=0,406, P=0,514 y P=0,707 respectivamente). Las frecuencias alélicas fueron: T 0,586 y C 0,414 para el polimorfismo rs7901695, C 0,619 y T 0,381 para rs7903146 y G 0,614 y T 0,386 para rs12255372.

Tabla 4.39. Frecuencias genotípicas de los polimorfismos rs7901695, rs7903146 y rs12255372 del gen TCF7L2 en la población PREDIMED del nodo de Valencia y comparando por sexo.

Polimorfismo	Genotipos	Población total	Hombres	Mujeres
rs7901695		n=1021	n=378	n=643
	TT (%)	34,8	32,3	36,2
	TC (%)	47,7	48,9	47,0
	CC (%)	17,5	18,8	16,8
rs7903146		n=1026	n=380	n=646
	CC (%)	38,8	36,8	39,9
	CT (%)	46,2	46,8	45,8
	TT (%)	15,0	16,3	14,2
rs12255372		n=1047	n=391	n=656
	GG (%)	37,2	35,8	38,1
	GT (%)	48,2	48,8	47,9
	TT (%)	14,5	15,3	14,0

Por otro lado, los 3 polimorfismos se encuentran de desequilibrio de ligamiento (Figura 4.9), aunque entre los polimorfismos rs7901695 y rs7903146 éste es mayor que entre rs7901695 y rs12255372 o entre rs7903146 y rs12255372.

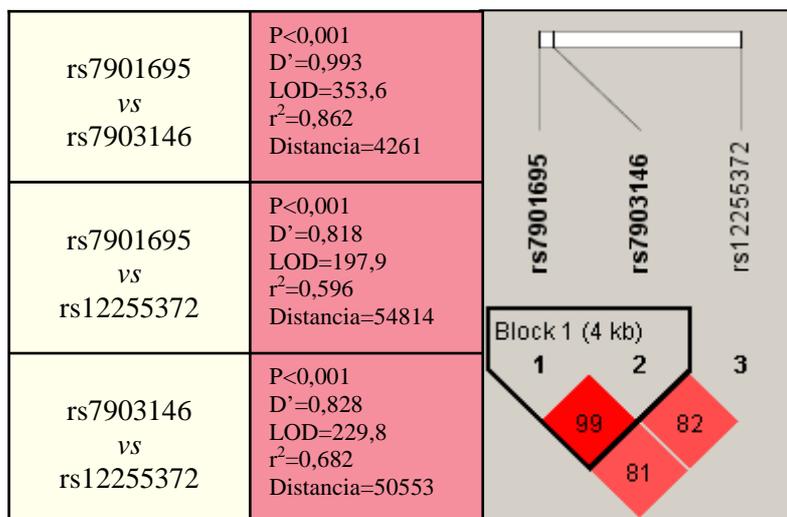


Figura 4.9. Variables y gráfico de desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos rs7901695, rs7903146 y rs12255372 del gen de TCF7L2. P1: p-valor para comparar las frecuencias genotípicas de ambos polimorfismos mediante un test Chi-cuadrado; D': coeficiente de desequilibrio relativo al máximo; LOD: logaritmo (base 10) de probabilidad de ligamiento entre los loci; r²: coeficiente de correlación entre los dos loci; Distancia: distancia medida en pares de bases entre los loci.

En las tablas 4.40, 4.41 y 4.42 se muestran los resultados del análisis de asociación entre los polimorfismos del gen TCF7L2 y variables antropométricas, glucosa y TG.

Tabla 4.40. Variables antropométricas (edad, peso, IMC, cintura), niveles plasmáticos de glucosa y TG según el genotipo del polimorfismo rs7901695 del gen de TCF7L2 en la población PREDIMED del nodo de Valencia.

	TT (n=355) Media ± DS	TC (n=487) Media ± DS	CC (n=179) Media ± DS	P ¹
Edad (años)	67 ± 6	67 ± 6	67 ± 7	0,753
Peso (kg)	76,6 ± 12,1	76,2 ± 12,3	76,6 ± 11,5	0,842
IMC(kg/m²)	30,8 ± 4,6	30,1 ± 4,3	30,1 ± 4,2	0,088*
Cintura (cm)	103,3 ± 11,7	102,5 ± 12,1	103,0 ± 11,6	0,659
Glucosa (mg/dl)	116,3 ± 37,0	121,0 ± 38,6	121,1 ± 42,4	0,182*
TG (mg/dl)	130,2,1 ± 66,0	128,8 ± 69,0	120,7 ± 52,3	0,247

IMC: Índice de masa corporal; TG: triglicéridos. ¹: p valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante una prueba ANOVA. *: p valor > 0,05 de comparación de medias tras ajustar por sexo, edad, (IMC), (DMT2), HTA, tabaco, adherencia a la dieta mediterránea, actividad física y tratamiento con insulina o antidiabéticos orales.**: p valor < 0,05 de comparación de medias tras ajustar por sexo, edad, (IMC), (DMT2), HTA, tabaco, adherencia a la dieta mediterránea, actividad física y tratamiento con insulina o antidiabéticos orales.

Tabla 4.41. Variables antropométricas (edad, peso, IMC, cintura), niveles plasmáticos de glucosa y TG según el genotipo del polimorfismo rs7903146 del gen de TCF7L2 en la población PREDIMED del nodo de Valencia.

	CC (n=387) Media ± DS	CT (n=462) Media ± DS	TT (n=149) Media ± DS	P ¹
Edad (años)	67 ± 6	67 ± 6	67 ± 6	0,266
Peso (kg)	76,6 ± 12,1	76,0 ± 12,2	76,8 ± 11,9	0,660
IMC(kg/m²)	30,7 ± 4,6	30,1 ± 4,2	30,1 ± 4,4	0,066**
Cintura (cm)	102,7 ± 12,0	102,7 ± 12,0	103,1 ± 11,4	0,923
Glucosa (mg/dl)	115,3 ± 36,7	121,0 ± 38,5	124,2 ± 43,6	0,027**
TG (mg/dl)	128,0 ± 66,1	129,2 ± 68,7	122,6 ± 54,3	0,574

IMC: Índice de masa corporal; TG: triglicéridos. ¹: p valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante una prueba ANOVA. *: p valor > 0,05 de comparación de medias tras ajustar por sexo, edad, (IMC), (DMT2), HTA, tabaco, adherencia a la dieta mediterránea, actividad física y tratamiento con insulina o antidiabéticos orales.**: p valor < 0,05 de comparación de medias tras ajustar por sexo, edad, (IMC), (DMT2), HTA, tabaco, adherencia a la dieta mediterránea, actividad física y tratamiento con insulina o antidiabéticos orales.

Tabla 4.42. Variables antropométricas (edad, peso, IMC, cintura), niveles plasmáticos de glucosa y TG según el genotipo del polimorfismo rs12255372 del gen de TCF7L2 en la población PREDIMED del nodo de Valencia.

	GG (n=265) Media ± DS	GT (n=410) Media ± DS	TT (n=158) Media ± DS	P¹
Edad (años)	67 ± 6	67 ± 6	67 ± 6	0,497
Peso (kg)	76,6 ± 12,0	76,1 ± 12,1	76,6 ± 11,7	0,791
IMC(kg/m²)	30,7 ± 4,6	30,1 ± 4,2	30,0 ± 4,4	0,089*
Cintura (cm)	102,4 ± 12,1	103,0 ± 12,0	102,6 ± 11,7	0,771
Glucosa (mg/dl)	114,5 ± 35,3	121,6 ± 39,0	122,6 ± 43,7	0,014**
TG (mg/dl)	128,0 ± 66,1	128,1 ± 66,1	122,0 ± 58,9	0,584

IMC: Índice de masa corporal; TG: triglicéridos. ¹: p valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante una prueba ANOVA. *: p valor > 0,05 de comparación de medias tras ajustar por sexo, edad, (IMC), (DMT2), HTA, tabaco, adherencia a la dieta mediterránea, actividad física y tratamiento con insulina o antidiabéticos orales. **: p valor < 0,05 de comparación de medias tras ajustar por sexo, edad, (IMC), (DMT2), HTA, tabaco, adherencia a la dieta mediterránea, actividad física y tratamiento con insulina o antidiabéticos orales.

Se observa una asociación entre los polimorfismos rs7903146 y rs12255372 y los niveles de glucosa siendo éstos mayores a medida que aumenta el número de alelos T en los dos casos (P de tendencia lineal=0,018 y P=0,038 respectivamente). Se mantuvo la significación estadística tras ajustar por variables de confusión (P=0,020 y P=0,008 respectivamente). Con respecto al polimorfismo rs7901695 no se encontró asociación con la concentración de glucosa. Además, se observa una tendencia en el valor de IMC según el genotipo, en los 3 polimorfismos, de manera que los homocigotos mutados presentan menor IMC que los heterocigotos y los homocigotos salvajes, pero sin embargo, solo se alcanzó la significación estadística en el caso del polimorfismo rs7903146 tras ajustar por las variables de confusión (P=0,047).

En cuanto al resto de variables, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas según el genotipo en ningún caso y los resultados no mostraron heterogeneidad debido al sexo o entre obesos y no obesos, diabéticos y no diabéticos, hipertensos y no hipertensos o hipercolesterolémicos y no hipercolesterolémicos

Tras los resultados obtenidos se estudió el riesgo de DMT2 asociado al genotipo en los 3 polimorfismos. Las frecuencias genotípicas de cada polimorfismo en diabéticos y no diabéticos se muestran en la tabla 4.43. El genotipo TT de los polimorfismos rs7903146 y rs12255372 es más prevalente en individuos diabéticos que en no diabéticos. El genotipo CC de rs7901695 también es más prevalente en diabéticos pero las diferencias no son estadísticamente significativas.

Tabla 4.43. Frecuencias genotípicas de los polimorfismos rs7901695, rs7903146 y rs12255372 del gen TCF7L2 en diabéticos y no diabéticos, en la población PREDIMED del nodo de Valencia.

Polimorfismo		Genotipo			P ¹
		TT (%)	TC (%)	CC (%)	
rs7901695	No diabéticos	36,9	46,0	17,1	P ¹ =0,199
	Diabéticos	31,5	50,1	18,4	
rs7903146	No diabéticos	41,9	44,9	13,2	P ¹ =0,034
	Diabéticos	34,5	48,3	17,2	
rs12255372	No diabéticos	41,1	45,4	13,5	P ¹ =0,011
	Diabéticos	32,0	51,9	16,0	

P1: p valor de comparación de frecuencias genotípicas entre obesos/ no obesos obtenido mediante un test Chi-Cuadrado

Por otro lado, la figura 4.10 muestra el riesgo de DMT2 asociado a los portadores del alelo minoritario de los polimorfismos frente a los homocigotos salvajes.

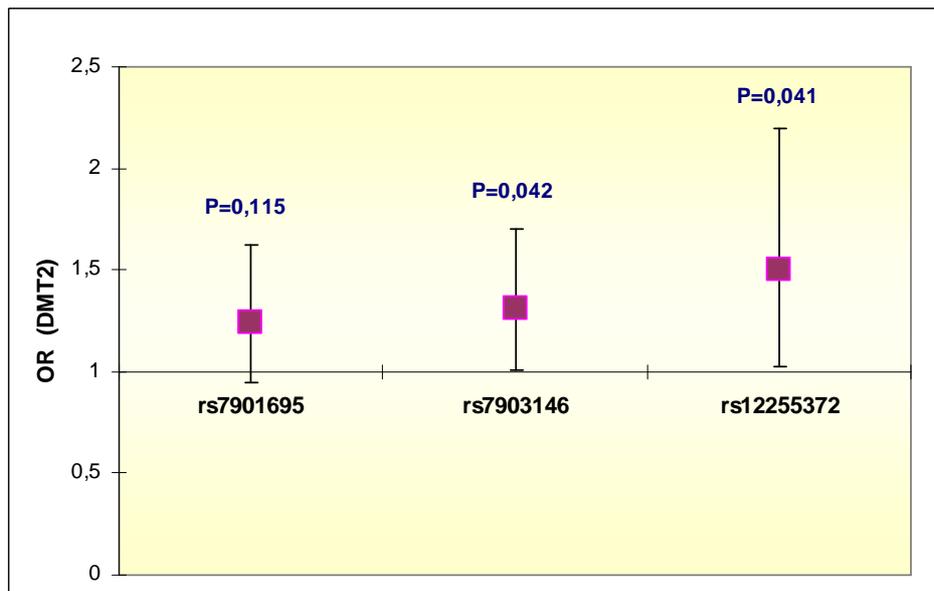


Figura 4.10. Riesgo de DMT2 (OR) asociado a los portadores del alelo minoritario de los polimorfismos rs7901695, rs7903146, rs12255372 del gen de TCF7L2 frente a los homocigotos salvajes, en la población PREDIMED del nodo de Valencia. Se representa la OR para DMT2 tras ajustar por edad y sexo mediante regresión logística. Las barras de error representan el intervalo de confianza al 95% y se incluye el p-valor obtenido al calcular la OR mediante regresión logística.

Tras ajustar por edad y sexo, los portadores del alelo T en el caso de los polimorfismos rs7903146 y rs12255372, mostraron mayor riesgo de DMT2 que los homocigotos salvajes (OR=1,31 IC95%(1,01-1,70) P=0,042 para rs7903146, OR=1,50 IC95%(1,02-2,20) P=0,041 para rs12255372). Los portadores del alelo C del polimorfismo rs7901695 también mostraron mayor riesgo de DMT2 con respecto a los homocigotos salvajes, pero no se alcanzó la significación estadística (OR=1,24 IC95%(0,95-1,62) P=0,115).

También se estudió el riesgo de obesidad asociado a los portadores del alelo minoritario con respecto a los homocigotos salvajes. En ningún caso se observaron diferencias en las frecuencias genóticas entre obesos y no obesos (P=0,279 para rs7901695, P=0,283 para rs7903146, P=0,479 para rs12255372). Igualmente, en los 3 casos los portadores del alelo minoritario mostraron menor riesgo de obesidad pero no se alcanzó la significación estadística tras ajustar por edad y sexo (rs7901695 (TC+CC vs TT): OR=0,83 IC95%(0,64-1,08) P=0,162; rs7903146 (CT+TT vs CC): OR=0,82 IC95%(0,63-1,06) P=0,121; rs12255372 (GT+TT vs GG): OR=0,88 IC95%(0,68-1,13) P=0,306).

4.2.3.5 Estudio de asociación entre polimorfismos en genes candidatos relacionados con marcadores de inflamación y fenotipos intermedios de ECV.

Este estudio ha sido publicado (Corella D et al, 2009). La población utilizada fue la del estudio piloto general del proyecto PREDIMED puesto que los marcadores de inflamación solo de obtuvieron para estos participantes. La población del estudio piloto se compone de 769 participantes. De ellos, 721 completaron la intervención dietética durante 3 meses de seguimiento y se determinó el genotipo de los polimorfismos -765G/C en el gen de COX-2 y -174 G/C en el gen de IL-6. De los 721 participantes incluidos, 314 son hombres y 407 mujeres. Las características principales en la visita inicial de esta población por sexo se muestran en la tabla 4.44.

Se observan diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres en la edad, IMC, concentración de c-HDL, y PCR mostrando niveles superiores en mujeres. Además, las mujeres presentan mayor prevalencia de HTA, dislipemia e historia familiar de CI y los hombres mayor prevalencia de DMT2 y hábito tabáquico. Estas diferencias concuerdan con las obtenidas en el consumo de fármacos ya que los varones utilizan, en mayor porcentaje que las mujeres, insulina y antidiabéticos orales y las mujeres, fármacos para el colesterol y la HTA.

Tabla 4.44. Características antropométricas, bioquímicas y clínicas de la población del estudio piloto general del estudio PREDIMED.

	Hombres (n=314)	Mujeres (n=407)
Edad (años)	68 ± 6	70 ± 6*
IMC(kg/m²)	29,0 ± 3,5	30,3 ± 4,5*
c-LDL (mmol/L)	3,62 ± 0,92	3,80 ± 0,87
c-HDL (mmol/L)	1,09 ± 0,23	1,25 ± 0,24*
TG (mmol/L)	1,58 ± 0,79	1,60 ± 0,70
Glucosa (mmol/L)	6,92 ± 2,23	6,56 ± 2,12
PCR (mg/L)	2,94 ± 3,03	3,67 ± 3,68*
IL-6 (ng/L)	5,56 ± 4,85	5,37 ± 4,40
ICAM (µg/L)	250 ± 101	264 ± 122
VCAM (µg/L)	1055 ± 390	1094 ± 416
Hipertensión, n (%)	228 (72,7)	337 (82,8)*
DMT2, n (%)	189 (60,2)	205 (50,4)*
Sobrepeso (IMC>25kg/m²), n (%)	270 (86,0)	364 (89,5)
Dislipemia (%)	176 (56,0)	271 (66,7)*
Fumadores (%)	97 (31,0)	26 (6,4)*
Exfumadores (%)	138 (44,0)	29 (7,1)*
Antecedentes CI (%)	63 (20,1)	110 (27,1)*
Fármacos n (%)		
Colesterol	133 (42,4)	210 (51,6)*
Hipertensión	201 (64,1)	285 (70,0)*
Insulina o ADO	157 (50,0)	71 (42,3)*
Aspirina	52 (16,6)	72 (17,8)

IMC: Índice de masa corporal; c-LDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos; PCR: proteína C reactiva; IL-6: interleuquina 6; ICAM: molécula de adhesión intercelular; VCAM; molécula de adhesión celular vascular; DMT2: diabetes mellitus tipo 2; CI: cardiopatía isquémica; ADO: antidiabéticos orales. * Indica P valor<0,05 calculado mediante una prueba T-student para comparar medias o un test de Chi-Cuadrado para comparar porcentajes entre hombres y mujeres.

Los resultados obtenidos para cada uno de los polimorfismos se presentan en los siguientes apartados.

4.2.3.5.1 Polimorfismo -765G/C del gen COX-2

Las frecuencias genotípicas observadas en la población total y por sexo se encuentran en la tabla 4.45.

Tabla 4.45. Frecuencias genotípicas del polimorfismo -765G/C del gen COX-2 en la población del estudio piloto general del estudio PREDIMED y comparando por sexo.

Genotipos	Población total (n=721)	Hombres (n=314)	Mujeres (n=407)
GG (%)	63,0	65,0	61,2
GC (%)	33,3	31,8	34,6
CC (%)	3,7	3,2	4,2

Las frecuencias genotípicas se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg ($P > 0,05$). No existen diferencias entre sexo en cuanto a la distribución del genotipo ($P > 0,05$). Las frecuencias alélicas obtenidas fueron: para el alelo G 0,798 y para el alelo C 0,205.

En la tabla 4.46 se muestran los resultados del análisis de asociación entre el polimorfismo -765G/C del gen de COX-2 y variables antropométricas, niveles plasmáticos de glucosa, de lípidos y marcadores de inflamación. Debido a la escasa prevalencia del genotipo CC, se agruparon heterocigotos e individuos con genotipo CC para obtener mayor potencia estadística en los análisis realizados.

Los resultados muestran que en la visita inicial los portadores del alelo C no difieren en cuanto a edad, IMC, y niveles plasmáticos de glucosa y de lípidos de los homocigotos GG. Sin embargo, el polimorfismo -765 G/C se asocia con la concentración sérica de IL-6 ($P = 0,002$) e ICAM ($P = 0,018$) presentando menores niveles los portadores del alelo C. Tras ajustar por las variables de confusión estas asociaciones permanecieron estadísticamente significativas. La concentración sérica de VCAM y PCR no se asoció con este polimorfismo.

Tabla 4.46. Variables antropométricas (edad, IMC), niveles plasmáticos de glucosa y de lípidos (CT, c-LDL, c-HDL, TG) y marcadores de inflamación (PCR, IL-6, ICAM, VCAM) según el genotipo del polimorfismo -765G/C del gen de COX-2 en la población PREDIMED del estudio piloto general.

	GG (n=453) Media ± DS	GC+CC (n=268) Media ± DS	P¹
Edad (años)	69 ± 7	69 ± 6	0,171
IMC(kg/m²)	29,8 ± 4,4	29,7 ± 3,9	0,650
Glucosa (mmol/L)	6,86 ± 2,35	6,47 ± 1,81	0,242
CT (mmol/L)	5,49 ± 1,02	5,40 ± 0,91	0,091*
c-LDL (mmol/L)	3,64 ± 0,90	3,51 ± 0,81	0,358
c-HDL (mmol/L)	1,15 ± 0,25	1,13 ± 0,25	0,053*
TG (mmol/L)	1,55 ± 0,74	1,68 ± 0,74	0,071*
PCR (mg/L)	3,29 ± 3,54	3,47 ± 3,22	0,329
IL6 (ng/L)	5,85 ± 4,82	4,76 ± 4,14	0,002**
ICAM (µg/L)	265,8 ± 114,8	243,0 ± 107,1	0,018**
VCAM (µg/L)	1073,2 ± 395,2	1085,4 ± 422,2	0,731

IMC: Índice de masa corporal; CT: colesterol total; c-LDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos; PCR: proteína C reactiva; IL-6: interleuquina 6; ICAM: molécula de adhesión intercelular; VCAM: molécula de adhesión celular vascular. ¹: p valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante un prueba T-Student. *: p valor > 0,05 de comparación de medias tras ajustar por sexo, edad, IMC, DMT2, HTA, tabaco, adherencia a la dieta mediterránea y medicación. **: p valor < 0,05 de comparación de medias tras ajustar por sexo, edad, IMC, DMT2, HTA, tabaco, adherencia a la dieta mediterránea y medicación (tratamiento antihipertensivo, hipolipemiente y antidiabéticos).

Además, al analizar los datos por sexo, se obtuvieron resultados homogéneos. En ambos sexos el polimorfismo -765G/C se asoció con menor concentración de ICAM e IL-6 (Pinteracción COX-2*sexo=0,900; P=0,021 para la diferencia de medias en hombres y P=0,037 en mujeres). No se encontraron diferencias tampoco en el resto de variables.

4.2.3.5.2. Polimorfismo -174G/C del gen de IL-6

Las frecuencias genotípicas observadas en la población total y por sexo se encuentran en la tabla 4.47.

Tabla 4.47. Frecuencias genotípicas del polimorfismo -174G/C del gen IL-6 en la población PREDIMED del estudio piloto general y comparando por sexo.

Genotipos	Población total (n=721)	Hombres (n=314)	Mujeres (n=407)
GG (%)	42,0	41,2	42,5
GC (%)	44,9	46,0	44,2
CC (%)	13,1	12,8	13,3

Las frecuencias genotípicas se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg ($P > 0,05$). No existen diferencias entre sexo en cuanto a la distribución del genotipo ($P > 0,05$). Las frecuencias alélicas obtenidas fueron: para el alelo G 0,645 y para el C 0,355.

En la tabla 4.48 se muestran los resultados del análisis de asociación entre el polimorfismo -174G/C del gen de IL-6 y variables antropométricas, niveles plasmáticos de glucosa, de lípidos y marcadores de inflamación.

Se observó que el polimorfismo -174 G/C se asociaba con la concentración sérica de ICAM, de modo que los individuos CC presentan mayores niveles de ICAM. Esta asociación permanece tras ajustar por variables de confusión. Sin embargo, no se observó asociación con los demás marcadores de inflamación (PCR, IL-6 y VCAM). Tampoco se encontró asociación con variables antropométricas (edad e IMC) y niveles plasmáticos de lípidos (CT, c-LDL, c-HDL y CT) y de glucosa.

Tabla 4.48. Variables antropométricas (edad, IMC), niveles plasmáticos de glucosa, lípidos (CT, c-LDL, c-HDL, TG) y marcadores de inflamación (PCR, IL-6, ICAM, VCAM) según el genotipo del polimorfismo -174G/C del gen de IL-6 en la población PREDIMED del estudio piloto general.

	GG (n=303) Media ± DS	GC (n=324) Media ± DS	CC (n=94) Media ± DS	P¹
Edad (años)	69 ± 6	69 ± 7	69 ± 6	0,708
IMC(kg/m²)	29,9 ± 4,35	29,8 ± 4,23	29,3 ± 3,47	0,471
Glucosa (mmol/L)	6,83 ± 2,12	6,64 ± 2,24	6,61 ± 2,10	0,637
CT (mmol/L)	5,39 ± 0,97	5,49 ± 0,99	5,57 ± 1,00	0,300
c-LDL (mmol/L)	3,52 ± 0,90	3,61 ± 0,83	3,72 ± 0,88	0,202
c-HDL (mmol/L)	1,14 ± 0,26	1,15 ± 0,25	1,15 ± 0,23	0,893
TG (mmol/L)	1,66 ± 0,80	1,55 ± 0,69	1,56 ± 0,75	0,226
PCR (mg/L)	3,04 ± 3,06	3,78 ± 3,77	3,03 ± 3,33	0,065*
IL6 (pg/ml)	5,15 ± 4,24	5,63 ± 4,79	6,09 ± 5,19	0,192
ICAM (ng/ml)	254,3 ± 110,5	252,9 ± 115,3	284,7 ± 108,0	0,049**
VCAM (ng/ml)	1062,5 ± 392,4	1100,9 ± 406,5	1049,9 ± 434,2	0,337

IMC: Índice de masa corporal; CT: colesterol total; c-LDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos; PCR: proteína C reactiva; IL-6: interleuquina 6; ICAM: molécula de adhesión intercelular; VCAM: molécula de adhesión celular vascular. ¹: p valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante un prueba T-Student. *: p valor > 0,05 de comparación de medias tras ajustar por sexo, edad, IMC, DMT2, HTA, tabaco, adherencia a la dieta mediterránea y medicación. **: p valor < 0,05 de comparación de medias tras ajustar por sexo, edad, IMC, DMT2, HTA, tabaco, adherencia a la dieta mediterránea y medicación (tratamiento antihipertensivo, hipolipemiente y antidiabéticos).

Por otra parte, tras analizar posibles interacciones gen*sexo se encontró una interacción (P=0,002 con un modelo no ajustado, P=0,009 con un modelo multivariante ajustado) que determina la concentración sérica de IL-6 (Figura 4.11). El polimorfismo -174G/C se asociaba con mayores niveles en suero de IL-6 (P=0,013) siguiendo una tendencia creciente en hombres y, sin embargo, en mujeres no se encontró asociación (P=0,873).

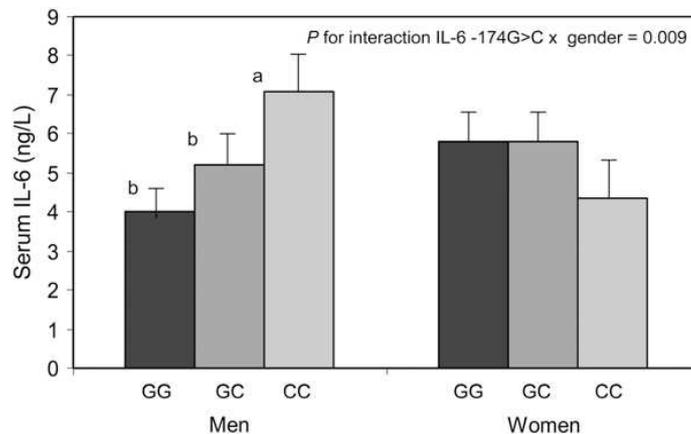


Figura 4.11. Concentración sérica de IL-6 en hombres y mujeres según el polimorfismo -174G/C del gen de IL-6, en la población PREDIMED del estudio piloto general. (Dentro de un género, cuando las medias no tienen la misma letra significa que son diferentes $P < 0,05$).

4.2.3.6 Estudio de asociación entre polimorfismos en genes candidatos relacionados con estrés oxidativo y fenotipos intermedios de ECV.

En este apartado se estudiará el polimorfismo C242T del gen CYBA.

Las frecuencias genotípicas observadas en la población total y por sexo se encuentran en la tabla 4.49.

Tabla 4.49 Frecuencias genotípicas del polimorfismo C242T del gen CYBA en la población PREDIMED del nodo de Valencia y comparando por sexo.

Genotipos	Población total (n=1031)	Hombres (n=384)	Mujeres (n=647)
CC (%)	41,6	40,1	42,5
CT (%)	45,8	44,0	46,8
TT (%)	12,6	15,9	10,7

Las frecuencias genotípicas se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg ($P=0,992$). No existen diferencias entre sexo en cuanto a la distribución del genotipo ($p=0,060$). Las frecuencias alélicas de C fue 0,645 y de T 0,355.

Por otro lado, se analizó la posible asociación entre el polimorfismo C242T y los niveles plasmáticos de marcadores de estrés oxidativo tales como 8-oxo-dG, MDA, GSSG,

GHS, razón GSSG/GSH y catalasa. Dichos marcadores se midieron en una muestra de 196 participantes. Los resultados se muestran en la tabla 4.50.

Tabla 4.50. Niveles plasmáticos de marcadores de estrés oxidativo según el genotipo del polimorfismo C242T del gen CYBA en la población PREDIMED del nodo de Valencia.

	CC (n=92) Media ± DS	CT (n=74) Media ± DS	TT (n=30) Media ± DS	P ¹
8-oxo-dG (8-oxo-dG/106dG)	5,0 ± 1,1	5,3 ± 1,1	5,0 ± 1,3	0,340
MDA (nmol/mg Prot)	0,48 ± 0,18	0,53 ± 0,17	0,47 ± 0,14	0,091*
GSSG (nmol/mg Prot)	0,58 ± 0,16	0,56 ± 0,17	0,63 ± 0,28	0,241
GSH (nmol/mg Prot)	19,3 ± 4,33	20,9 ± 4,23	19,7 ± 5,92	0,045**
GSSG/GSH	3,1 ± 1,0	2,9 ± 1,1	3,4 ± 1,3	0,203
Catalasa (U/g Prot)	97,3 ± 45,4	103,9 ± 47,0	104,5 ± 47,0	0,599

8-oxo-dG: 8-oxo-2'-deoxiguanosina; MDA: malondialdehído; GSSG: glutation oxidado; GSH: glutation reducido. ¹: p valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante una prueba ANOVA. *: p valor > 0,05 de comparación de medias tras ajustar por sexo, edad, IMC, DMT2, HTA, tabaco, adherencia a la dieta mediterránea, actividad física. **: p valor < 0,05 de comparación de medias tras ajustar por sexo, edad, IMC, DMT2, HTA, tabaco, adherencia a la dieta mediterránea, actividad física.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas según el genotipo del polimorfismo C242T en la concentración de GSH tanto al realizar los análisis en crudo como al ajustar por variables de confusión (Pajustada=0,037). Sin embargo, no se observó una tendencia lineal (p tendencial lineal=0,555). Tras agrupar los portadores del alelo T y compararlos con los homocigotos CC, se observó que los portadores del alelo T mostraban mayores concentraciones de GSH que los homocigotos CC (CC: 19,1 ± 4,3 nmol/mg Prot vs CT+TT: 20,6 ± 4,8 nmol/mg Prot, P=0,030). Tras ajustar por variables de confusión se mantuvo la significación estadística (Pajustada=0,015).

Por otro lado, en la tabla 4.51 se muestran los resultados del análisis de asociación entre el polimorfismo C242T del gen CYBA y variables antropométricas, presión arterial, niveles plasmáticos de glucosa y de lípidos.

No se encontró asociación entre el polimorfismo C242T y con ninguna de las variables analizadas. Tampoco se observaron diferencias entre sexos o entre obesos y no obesos, diabéticos y no diabéticos, hipertensos y no hipertensos o hipercolesterolémicos y no hipercolesterolémicos

Tabla 4.51 Variables antropométricas (edad, peso, IMC, cintura), presión arterial (PAS, PAD), niveles plasmáticos de glucosa y de lípidos (CT, c-LDL, c-HDL, TG) según el genotipo del polimorfismo C242T del gen CYBA en la población PREDIMED del nodo de Valencia.

	CC (n=429) Media ± DS	CT (n=472) Media ± DS	TT (n=130) Media ± DS	P¹
Edad (años)	67 ± 6	67 ± 6	67 ± 6	0,318
Peso (kg)	75,7 ± 11,8	76,4 ± 12,1	78,0 ± 12,2	0,160
IMC(kg/m²)	30,2 ± 4,3	30,4 ± 4,6	30,5 ± 4,2	0,784
Cintura (cm)	102,4 ± 11,7	102,5 ± 12,3	104,2 ± 11,9	0,352
PAS (mmHg)	145,7 ± 19,3	146,7 ± 20,7	147,3 ± 20,5	0,648
PAD (mmHg)	81,3 ± 10,3	81,5 ± 10,7	81,0 ± 10,6	0,870
Glucosa (mg/dl)	118,1 ± 38,7	120,6 ± 40,2	118,1 ± 33,0	0,586
CT (mg/dl)	205,6 ± 37,6	206,8 ± 39,9	205,9 ± 37,8	0,902
c-LDL (mg/dl)	127,6 ± 34,3	128,7 ± 36,4	128,8 ± 33,6	0,891
c-HDL (mg/dl)	52,6 ± 12,5	52,8 ± 13,5	53,0 ± 13,0	0,960
TG (mg/dl)	129,0 ± 67,2	123,7 ± 61,5	130,6 ± 71,8	0,380

IMC: Índice de masa corporal; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; CT: colesterol total; c-LDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos. ¹: p valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante una prueba ANOVA.

Por otro lado, debido a la relación estrecha que existe entre estrés oxidativo y HTA se estudió el riesgo de HTA según el genotipo del polimorfismo C242T pero no se encontraron diferencias en las frecuencias genotípicas en hipertensos y no hipertensos (P=0,229), ni una reducción del riesgo asociado al alelo T (OR:=0,958 IC95%(0,739-1,241) p=0,744).

4.2.3.7 Estudio de asociación entre polimorfismos en otros genes candidatos y fenotipos intermedios de ECV.

En este apartado se estudiará el polimorfismo C677T localizado en el gen de la MTHFR y los polimorfismos de las distintas subunidades de AMPK, rs2796495 de la subunidad $\alpha 2$ (PRKAA2), rs4213 de la subunidad $\beta 1$ (PRKAB1), rs1036852 de la subunidad $\beta 2$ (PRKAB2), rs2293445 de la subunidad $\gamma 1$ (PRKAG1), rs8961 de la subunidad $\gamma 2$ (PRKAG2) y rs1467320 de la subunidad $\gamma 3$ (PRKAG3).

4.2.3.7.1 Polimorfismo C677T del gen de MTHFR

Las frecuencias genotípicas observadas en la población total y por sexo se encuentran en la tabla 4.52.

Tabla 4.52. Frecuencias genotípicas del polimorfismo C677T del gen MTHFR en la población PREDIMED del nodo de Valencia y comparando por sexo.

Genotipos	Población total (n=1034)	Hombres (n=385)	Mujeres (n=649)
CC (%)	33,8	35,8	32,5
CT (%)	48,8	46,5	50,2
TT (%)	17,4	17,7	17,3

Las frecuencias genotípicas se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg ($P=0,908$). No existen diferencias entre sexo en cuanto a la distribución del genotipo ($p=0,470$). Las frecuencias alélicas de C fue 0,582 y de T 0,418.

En la tabla 4.53 se muestran los resultados del análisis de asociación entre el polimorfismo C677T del gen MTHFR y variables antropométricas, presión arterial, niveles plasmáticos de glucosa y de lípidos.

Los resultados muestran diferencias estadísticamente significativas en los niveles de glucosa y CT, pero no se observa una tendencia en dichos niveles ligada al alelo T (P de tendencia lineal=0,400 para la glucosa; P de tendencia lineal=0,097 para el CT). Con respecto a las demás variables analizadas, no se obtuvo asociación con ninguna de ellas y el polimorfismo C677T.

Tabla 4.53. Variables antropométricas (edad, peso, IMC, cintura), presión arterial (PAS, PAD), niveles plasmáticos de glucosa y de lípidos (CT, c-LDL, c-HDL, TG) según el genotipo del polimorfismo C677T del gen MTHFR en la población PREDIMED del nodo de Valencia.

	CC (n=349) Media ± DS	CT (n=505) Media ± DS	TT (n=180) Media ± DS	P ¹
Edad (años)	67 ± 6	67 ± 7	66 ± 6	0,217
Peso (kg)	76,0 ± 11,8	76,4 ± 12,3	77,0 ± 11,8	0,683
IMC(kg/m ²)	30,0 ± 4,2	30,5 ± 4,5	30,6 ± 4,5	0,205
Cintura (cm)	101,9 ± 11,7	103,3 ± 12,5	103,2 ± 11,1	0,218
PAS (mmHg)	147,3 ± 20,0	145,6 ± 19,8	147,1 ± 20,2	0,422
PAD (mmHg)	81,2 ± 10,7	81,1 ± 10,4	82,6 ± 10,6	0,266
Glucosa (mg/dl)	115,2 ± 37,0	122,6 ± 41,3	118,2 ± 33,0	0,023**
CT (mg/dl)	201,2 ± 37,0	209,0 ± 40,1	207,2 ± 37,9	0,016*
c-LDL (mg/dl)	125,4 ± 33,7	129,8 ± 36,3	128,8 ± 35,8	0,205
c-HDL (mg/dl)	52,6 ± 12,8	52,8 ± 13,7	52,7 ± 11,6	0,972
TG (mg/dl)	124,8 ± 62,7	129,0 ± 67,1	125,8 ± 65,4	0,633

IMC: Índice de masa corporal; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; CT: colesterol total; c-LDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos. ¹: p valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante un prueba T-Student. *: p valor > 0,05 de comparación de medias tras ajustar por sexo, edad, IMC, (DMT2), HTA, tabaco, adherencia a la dieta mediterránea, actividad física y medicación. **: p valor < 0,05 de comparación de medias tras ajustar por sexo, edad, IMC, (DMT2), HTA, tabaco, adherencia a la dieta mediterránea, actividad física y medicación.

Se estudió el riesgo de obesidad y DMT2 en portadores del alelo T con respecto a homocigotos CC (Tabla 4.54). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la prevalencia de los genotipos entre obesos y no obesos, de modo que en obesos se encontraron mayor porcentaje de individuos con genotipo TT. Además, se mostró en individuos portadores del alelo T mayor riesgo de obesidad tras ajustar por edad y sexo. Las diferencias de IMC y perímetro de cintura entre portadores del alelo T y homocigotos CC quedaron en el límite de la significación estadística tras ajustar por variables de confusión (Cintura: CC 101,9 ± 11,7 cm vs portadores del alelo T 103,3 ± 12,1 cm, P=0,067; IMC: CC 30,0 ± 4,2 Kg/m² vs portadores del alelo T 30,5 ± 4,5 Kg/m², P=0,083)

En cuanto al estudio del riesgo de DMT2, las diferencias en la prevalencia de cada genotipo en diabéticos y no diabéticos quedaron en el límite de la significación estadística (Tabla). Sin embargo, se mostró que los portadores del alelo T presentaban mayor riesgo de DMT2 que los individuos CC tras ajustar por edad y sexo. Los portadores del alelo T

también mostraron mayor concentración de glucosa que los individuos con genotipo CC (Portadores del alelo T: $121, 5 \pm 39,3$ mg/dL; Genotipo CC: $115, 2 \pm 37,0$ mg/dL; P cruda=0,016, P ajustada= 0,011).

Tabla 4.54. Análisis del riesgo de obesidad y DMT2 según el genotipo del polimorfismo C677T del gen de MTHFR, en la población PREDIMED del nodo de Valencia.

Polimorfismo		OBESO	NO OBESO	DMT2	NO DMT2
		%	%	%	%
C677T	CC	30,3	37,5	30,5	36,9
	CT	50,1	47,7	50,9	46,8
MTHFR	TT	19,6	14,8	18,6	16,3
		P¹=0,021		P¹=0,096	
		OR: 1,37 (1,05-1,78) P=0,021		OR: 1,39 (1,06-1,82) P=0,016	

DMT2: Diabetes mellitus tipo 2. P1: p valor de comparación de frecuencias genotípicas entre obesos/ no obesos o diabéticos/ nodiabéticos obtenido mediante un test Chi-Cuadrado. OR: valor de odds ratio referido a los portadores del alelo T con respecto al genotipo homocigoto CC, ajustado por edad y sexo obtenida mediante regresión logística. Entre paréntesis se incluye el intervalo de confianza al 95% y p-valor obtenido al calcular la OR mediante regresión logística.

Al comparar por sexo no se obtuvo heterogeneidad en los resultados. Tampoco al comparar por obesos y no obesos, diabéticos y no diabéticos, hipertensos y no hipertensos o hipercolesterolémicos y no hipercolesterolémicos.

4.2.3.7.2 Polimorfismos en los genes de las subunidades de AMPK

En este apartado se estudiarán los polimorfismos de genes de subunidades de AMPK: rs2796495 de la subunidad $\alpha 2$ (PRKAA2), rs4213 de la subunidad $\beta 1$ (PRKAB1), rs1036852 de la subunidad $\beta 2$ (PRKAB2), rs2293445 de la subunidad $\gamma 1$ (PRKAG1), rs8961 de la subunidad $\gamma 2$ (PRKAG2) y rs1467320 de la subunidad $\gamma 3$ (PRKAG3).

Las frecuencias genotípicas de los polimorfismos observadas en la población total y por sexo se encuentran en la tabla 4.55.

Las frecuencias genotípicas de los polimorfismos rs2796495, rs4213, rs1036852, rs2293445, rs8961 y rs1467320 se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg (P=0,075, P=0,433, P=0,993, P=0,096, P=0,121 y P=0,430 respectivamente). No existen diferencias entre sexo en cuanto a la distribución del genotipo en ningún caso (P=0,472, P=0,326 P=0,125, P=0,311, P=0,382 y P=0,983 respectivamente). Las frecuencias alélicas fueron: 0,570 y 0,430 (C/T) para el polimorfismo rs2796495, 0,626 y 0,374 (T/G) para rs4213, 0,466 y 0,534 (A/G) para rs1036852, 0,619 y 0,381 (G/A) para rs2293445, 0,668 y 0,332 (C/T) para rs8961, y 0,841 y 0,159 (G/A) para rs1467320.

Tabla 4.55. Frecuencias genotípicas de los polimorfismos rs2796495, rs4213, rs1036852, rs2293445, rs8961 y rs1467320 del gen AMPK en la población PREDIMED del nodo de Valencia y comparando por sexo.

Polimorfismo	Genotipos	Población total	Hombres	Mujeres
rs2796495 PRKAA2	CC (%)	n=951 31,1	n=359 30,6	n=592 31,4
	CT (%)	51,8	50,4	52,7
	TT (%)	17,0	18,9	15,9
rs4213 PRKAB1	TT (%)	n=1044 39,8	n=389 42,7	n=655 38,0
	TG (%)	45,7	43,7	46,9
	GG (%)	14,6	13,6	15,1
rs1036852 PRKAB2	AA (%)	n=1043 15,3	n=390 18,5	n=653 23,7
	GA (%)	46,6	52,6	48,1
	GG (%)	28,5	29,0	28,2
rs2293445 PRKAG1	GG (%)	n=931 37,1	n=353 34,0	n=578 38,9
	GA (%)	49,7	51,8	48,4
	AA (%)	13,2	14,2	12,6
rs8961 PRKAG2	CC (%)	n=1045 45,7	n=390 46,4	n=655 45,3
	CT (%)	42,2	43,3	41,5
	TT (%)	12,1	10,3	13,1
rs1467320 PRKAG3	GG (%)	n=979 71,1	n=372 71,2	n=607 71,0
	GA (%)	26,0	25,8	26,2
	AA (%)	2,9	3,0	2,8

Además, ningún polimorfismo se encuentra en desequilibrio de ligamiento (Figura 4.12).

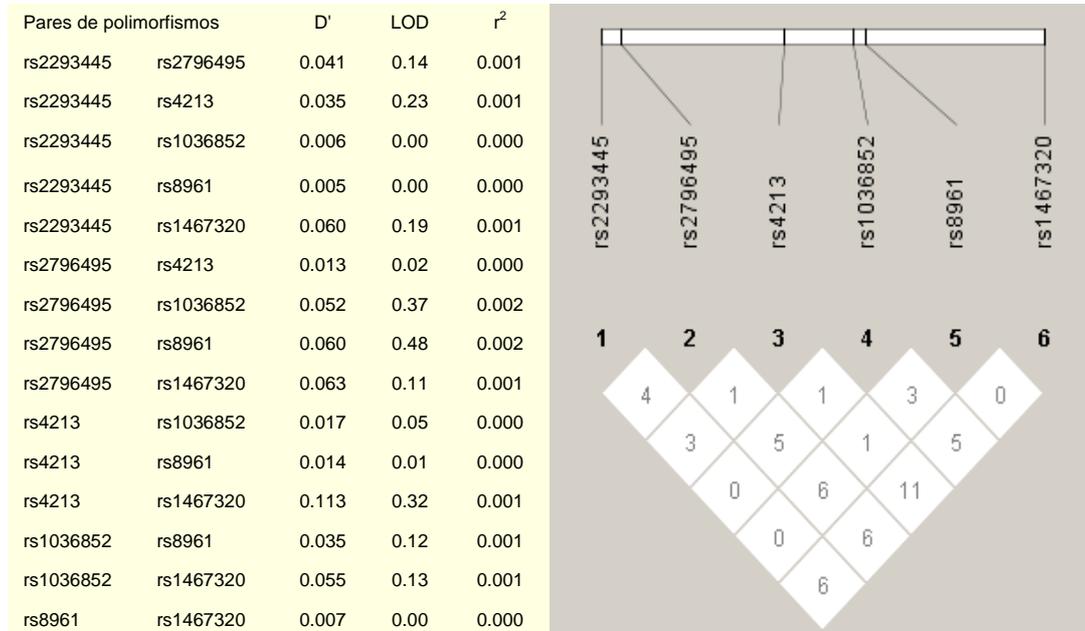


Figura 4.12. Variables y gráfico de desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos rs2796495, rs4213, rs1036852, rs2293445, rs8961 y rs1467320 de los genes de las subunidades de AMPK.; D': coeficiente de desequilibrio relativo al máximo; LOD: logaritmo (base 10) de probabilidad de ligamiento entre los loci; r²: coeficiente de correlación entre los dos loci.

A continuación, se muestran los resultados del análisis de asociación entre los polimorfismos rs2796495, rs4213, rs1036852, rs2293445, rs8961 y rs1467320 de los genes de las subunidades de la AMPK y variables antropométricas, niveles plasmáticos de glucosa y TG.

En la tabla 4.56 se presentan los resultados para el polimorfismo rs2796495 de la subunidad PRKAA2. No se encontró asociación con ninguna de las variables analizadas. Tampoco se detectaron diferencias por sexo.

Tabla 4.56. Variables antropométricas (edad, peso, IMC, cintura), niveles plasmáticos de glucosa y TG según el genotipo del polimorfismo rs2796495 del gen de PRKAA2 en la población PREDIMED del nodo de Valencia.

	CC (n=296) Media ± DS	CT (n=493) Media ± DS	TT (n=162) Media ± DS	P ¹
Edad (años)	67 ± 6	67 ± 6	67 ± 7	0,772
Peso (kg)	77,4 ± 11,3	75,9 ± 12,6	76,2 ± 11,6	0,212*
IMC(kg/m ²)	30,7 ± 3,8	30,2 ± 4,6	30,1 ± 4,4	0,244*
Cintura (cm)	103,4 ± 11,1	102,0 ± 11,4	103,1 ± 12,8	0,243*
Glucosa (mg/dl)	118,0 ± 37,5	118,9 ± 39,0	119,0 ± 38,4	0,942
TG (mg/dl)	126,8 ± 61,1	130,7 ± 68,5	120,6 ± 65,6	0,198*

IMC: Índice de masa corporal; TG: triglicéridos. ¹: p valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante una prueba ANOVA. *: p valor > 0,05 de comparación de medias tras ajustar por sexo, edad, (IMC), DMT2, (HTA), tabaco, adherencia a la dieta mediterránea, actividad física y (tratamiento hipolipemiente). **: p valor < 0,05 de comparación de medias tras ajustar por sexo, edad, (IMC), DMT2, (HTA), tabaco, adherencia a la dieta mediterránea, actividad física y (tratamiento hipolipemiente).

Por otro lado, el polimorfismo rs4213 de la subunidad PRKAB1 tampoco mostró asociación con las variables analizadas (Tabla 4.57).

Tabla 4.57. Variables antropométricas (edad, peso, IMC, cintura), niveles plasmáticos de glucosa y TG según el genotipo del polimorfismo rs4213 del gen de PRKAB1 en la población PREDIMED del nodo de Valencia.

	TT (n=415) Media ± DS	TG (n=477) Media ± DS	GG (n=152) Media ± DS	P ¹
Edad (años)	67 ± 6	67 ± 6	67 ± 6	0,149
Peso (kg)	76,5 ± 11,3	76,1 ± 12,1	76,6 ± 12,7	0,878
IMC(kg/m ²)	30,4 ± 4,4	30,3 ± 4,5	30,2 ± 3,9	0,844
Cintura (cm)	103,2 ± 12,6	102,5 ± 11,3	102,4 ± 12,0	0,640
Glucosa (mg/dl)	121,7 ± 39,8	116,6 ± 36,7	120,0 ± 40,6	0,138*
TG (mg/dl)	128,6 ± 64,6	125,7 ± 67,4	127,6 ± 58,8	0,812

IMC: Índice de masa corporal; TG: triglicéridos. ¹: p valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante una prueba ANOVA. *: p valor > 0,05 de comparación de medias tras ajustar por sexo, edad, IMC, (DMT2), HTA, tabaco, adherencia a la dieta mediterránea, actividad física y tratamiento con insulina o antidiabéticos orales. **: p valor < 0,05 de comparación de medias tras ajustar por sexo, edad, IMC, (DMT2), HTA, tabaco, adherencia a la dieta mediterránea, actividad física y insulina o antidiabéticos orales.

Sin embargo, se encontró una interacción entre el polimorfismo rs4213 y el sexo sobre el peso y el IMC. De este modo, se observó que en hombres, el genotipo GG se asoció con mayor peso e IMC que TG y TT, y en mujeres el genotipo GG se asoció con menor IMC que TG y TT. La interacción en ambos casos fue significativa (Figuras 4.13 y 4.14).

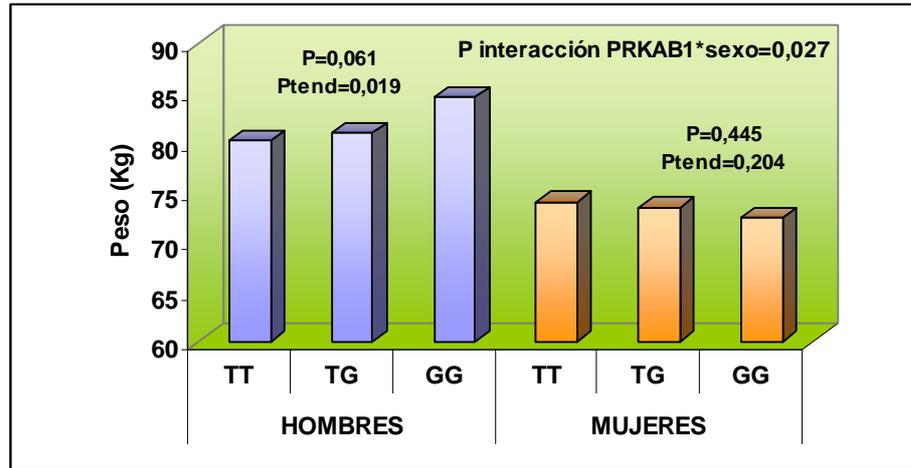


Figura 4.13. Media de peso en hombres y mujeres según el genotipo del polimorfismo rs4213 del gen PRKAB1. (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba ANOVA; Ptend: p-valor obtenido de una prueba de tendencia lineal entre genotipos).

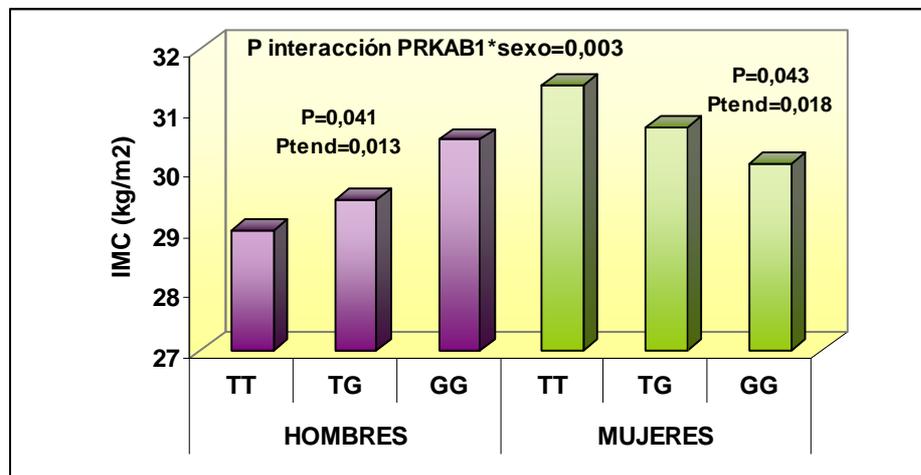


Figura 4.14. Media de IMC en hombres y mujeres según el genotipo del polimorfismo rs4213 del gen PRKAB1. (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba ANOVA; Ptend: p-valor obtenido de una prueba de tendencia lineal entre genotipos).

En la siguiente tabla (Tabla 4.58) se presentan los resultados para el polimorfismo rs1036852 de la subunidad PRKAB2.

Tabla 4.58 Variables antropométricas (edad, peso, IMC, cintura), niveles plasmáticos de glucosa y TG según el genotipo del polimorfismo rs1036852 del gen de PRKAB2 en la población PREDIMED del nodo de Valencia.

	AA (n=227) Media ± DS	GA (n=519) Media ± DS	GG (n=297) Media ± DS	P ¹
Edad (años)	68 ± 6	67 ± 6	67 ± 6	0,236
Peso (kg)	76,8 ± 11,3	76,8 ± 12,3	75,1 ± 12,0	0,132*
IMC(kg/m ²)	30,8 ± 4,1	30,4 ± 4,5	29,7 ± 4,3	0,016**
Cintura (cm)	103,4 ± 11,8	103,2 ± 12,4	101,4 ± 11,3	0,095*
Glucosa (mg/dl)	117,9 ± 34,9	118,6 ± 38,0	120,5 ± 42,2	0,733
TG (mg/dl)	128,7 ± 69,4	125,8 ± 61,2	128,2 ± 68,7	0,817

IMC: Índice de masa corporal; TG: triglicéridos. ¹: p valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante una prueba ANOVA. *: p valor > 0,05 de comparación de medias tras ajustar por sexo, edad, DMT2, tabaco, adherencia a la dieta mediterránea, actividad física. **: p valor < 0,05 de comparación de medias tras ajustar por sexo, edad, DMT2, tabaco, adherencia a la dieta mediterránea, actividad física.

Los resultados muestran una asociación entre el polimorfismo rs1036852 de la subunidad PRKAB2 y el IMC (P=0,016) de manera que los individuos GG presentan menor IMC que los heterocigotos y, éstos a su vez, que los homocigotos AA (p tendencia lineal=0,006). Se observa el mismo efecto en los valores de la cintura según el genotipo de este polimorfismo pero no se alcanza la significación estadística (P=0,095; p tendencia lineal=0,071). No se detectaron diferencias entre hombres y mujeres.

Por otro lado, se encontraron diferencias estadísticamente significativas según el genotipo del polimorfismo rs2293445 de la subunidad PRKAG1 en la concentración de glucosa y TG (Tabla 4.59). En el caso de la glucosa, no se observó una tendencia marcada por el alelo A (p tendencia lineal=0,894), pero sí en las concentraciones de TG (p tendencia lineal=0,004). Tampoco se encontró asociación con variables antropométricas. Los resultados fueron homogéneos en hombres y mujeres.

Tabla 4.59. Variables antropométricas (edad, peso, IMC, cintura), niveles plasmáticos de glucosa y TG según el genotipo del polimorfismo rs2293445 del gen de PRKAG1 en la población PREDIMED del nodo de Valencia.

	GG (n=345) Media ± DS	GA (n=463) Media ± DS	AA (n=123) Media ± DS	P¹
Edad (años)	67 ± 6	67 ± 6	67 ± 6	0,903
Peso (kg)	76,2 ± 11,8	76,1 ± 12,4	77,1 ± 10,7	0,716
IMC(kg/m²)	30,3 ± 4,4	30,3 ± 4,4	30,4 ± 4,2	0,961
Cintura (cm)	102,8 ± 11,2	102,4 ± 12,9	103,0 ± 11,9	0,848
Glucosa (mg/dl)	115,2 ± 38,6	122,5 ± 39,0	114,7 ± 36,7	0,015**
TG (mg/dl)	126,9 ± 62,3	128,8 ± 65,6	112,2 ± 61,5	0,006**

IMC: Índice de masa corporal; TG: triglicéridos. ¹: p valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante una prueba ANOVA. *: p valor > 0,05 de comparación de medias tras ajustar por sexo, edad, IMC, DMT2, HTA, tabaco, adherencia a la dieta mediterránea, actividad física y medicación. **: p valor < 0,05 de comparación de medias tras ajustar por sexo, edad, IMC, DMT2, HTA, tabaco, adherencia a la dieta mediterránea, actividad física y medicación.

Con respecto al polimorfismo rs8961 del gen de la subunidad PRKAG2, no se mostró asociación con ninguna de las variables analizadas (Tabla 4.60). Tampoco se encontraron diferencias por sexo.

Tabla 4.60. Variables antropométricas (edad, peso, IMC, cintura), niveles plasmáticos de glucosa y TG según el genotipo del polimorfismo rs8961 del gen de PRKAG2 en la población PREDIMED del nodo de Valencia.

	CC (n=478) Media ± DS	CT (n=441) Media ± DS	TT (n=126) Media ± DS	P¹
Edad (años)	67 ± 6	67 ± 6	66 ± 7	0,138
Peso (kg)	77,0 ± 12,5	75,7 ± 11,7	76,0 ± 11,1	0,292
IMC(kg/m²)	30,5 ± 4,4	30,1 ± 4,2	30,4 ± 4,9	0,405
Cintura (cm)	103,4 ± 11,5	102,1 ± 12,8	102,4 ± 10,5	0,307
Glucosa (mg/dl)	118,4 ± 36,9	121,3 ± 40,1	113,6 ± 38,5	0,132*
TG (mg/dl)	127,3 ± 62,4	126,5 ± 66,2	130,0 ± 71,7	0,872

IMC: Índice de masa corporal; TG: triglicéridos. ¹: p valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante una prueba ANOVA. *: p valor > 0,05 de comparación de medias tras ajustar por sexo, edad, IMC, adherencia a la dieta mediterránea, actividad física y tratamiento con insulina o antidiabéticos orales. **: p valor < 0,05 de comparación de medias tras ajustar por sexo, edad, IMC, adherencia a la dieta mediterránea, actividad física y tratamiento con insulina o antidiabéticos orales.

En el caso del polimorfismo rs1467320 del gen de la subunidad PRKAG3, debido a la escasa prevalencia del genotipo AA se agruparon heterocigotos e individuos con genotipo AA para obtener mayor potencia estadística en los análisis realizados. Los resultados se muestran en la siguiente tabla (Tabla 4.61).

Tabla 4.61. Variables antropométricas (edad, peso, IMC, cintura), niveles plasmáticos de glucosa y TG según el genotipo del polimorfismo rs1467320 del gen de PRKAG3 en la población PREDIMED del nodo de Valencia.

	GG (n=696) Media ± DS	GA+AA (n=283) Media ± DS	P¹
Edad (años)	67 ± 6	67 ± 6	0,929
Peso (kg)	75,9 ± 11,6	77,6 ± 12,9	0,040**
IMC(kg/m²)	30,2 ± 4,3	30,7 ± 4,5	0,110*
Cintura (cm)	102,3 ± 11,7	103,5 ± 12,2	0,178*
Glucosa (mg/dl)	119,1 ± 38,3	119,5 ± 40,1	0,882
TG (mg/dl)	127,5 ± 63,7	128,0 ± 68,1	0,915

IMC: Índice de masa corporal; TG: triglicéridos. ¹: p valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante una prueba T-Student. *: p valor > 0,05 de comparación de medias tras ajustar por sexo, edad, DMT2, tabaco, adherencia a la dieta mediterránea, actividad física. **: p valor < 0,05 de comparación de medias tras ajustar por sexo, edad, IMC, DMT2, tabaco, adherencia a la dieta mediterránea, actividad física.

También se encontró asociación entre el polimorfismo rs1467320 de la subunidad PRKAG3 y el peso, de modo, que los portadores del alelo A presentan mayor peso que los homocigotos GG (P=0,040). Los portadores del alelo A también mostraron mayor IMC y cintura pero no se alcanzó la significación estadística en ningún caso (P=0,110 y P=0,185 respectivamente). En los hombres, el alelo A no solo se asoció con mayores valores de peso sino también con IMC (Portadores del alelo A: 83,8 ± 13,2 Kg, genotipo GG 80,1 ± 11,1 Kg. Psin ajustar=0,008, Pajustada=0,004 para el peso; Portadores del alelo A: 30,2 ± 4,5 Kg, genotipo GG 29,1 ± 3,6 Kg. Psin ajustar=0,020, Pajustada=0,015 para el IMC). Dichas asociaciones no se encontraron en mujeres (P=0,730 para peso, P=0,430 para IMC). La interacción PRKAG3*sexo no fue significativa en ningún caso (P=0,090 para el peso; P=0,153 para el IMC).

Por otro lado, puesto que la proteína AMPK es un enzima clave en el metabolismo energético, AG y glucosa se estudió el riesgo de obesidad y DMT2 según el genotipo de los diferentes polimorfismos de la subunidades de AMPK. Los resultados se muestran en la tabla 4.62.

Tabla 4.62. Análisis del riesgo de obesidad y DMT2 según el genotipo de los diferentes polimorfismos de la subunidades de AMPK, en la población PREDIMED del nodo de Valencia.

Polimorfismo		OBESO	NO OBESO	DMT2	NO DMT2
		%	%	%	%
rs2796495 PRKAA2	CC	35,3	26,5	30,2	31,7
	CT	48,9	55,6	52,7	51,3
	TT	15,7	17,9	17,1	16,9
		P¹=0,014		P¹=0,551	
		OR: 0,66 (0,49-0,87) P=0,003		OR: 1,09 (0,82-1,45) P=0,551	
rs4213 PRKAB1	TT	42,2	37,2	42,5	37,7
	TG	44,1	47,2	43,6	46,9
	GG	13,7	15,6	13,8	15,3
		P¹=0,253		P¹=0,289	
		OR: 0,78 (0,61-1,01) P=0,062		OR: 0,86 (0,67-1,11) P=0,252	
rs1036852 PRKAB2	AA	24,7	19,1	22,4	21,3
	AG	49,1	50,1	48,3	50,9
	GG	26,2	30,8	29,3	27,8
		P¹=0,066		P¹=0,551	
		OR: 0,75 (0,56-1,01) P=0,062		OR: 1,09 (0,82-1,45) P=0,614	
rs2293445 PRKAG1	GG	36,9	37,4	34,2	39,3
	GA	50,4	48,8	52,3	47,5
	AA	12,6	13,8	13,4	13,2
		P¹=0,820		P¹=0,269	
		OR: 1,05 (0,80-1,38) P=0,731		OR: 1,21 (0,92-1,60) P=0,170	
rs8961 PRKAG2	CC	46,6	44,4	44,0	47,5
	CT	41,3	43,8	44,7	40,2
	TT	12,1	11,8	11,3	12,3
		P¹=0,715		P¹=0,357	
		OR: 0,91 (0,71-1,17) P=0,479		OR: 1,14 (0,89-1,47) P=0,292	
rs1467320 PRKAG3	GG	70,0	72,9	70,1	72,4
	GA	27,9	23,5	26,0	25,7
	AA	2,1	3,6	3,9	1,9
		P¹=0,132		P¹=0,161	
		OR: 1,14 (0,86-1,51) P=0,375		OR: 1,13 (0,85-1,50) P=0,409	

DMT2: Diabetes mellitus tipo 2. P1: p valor de comparación de frecuencias genotípicas entre obesos/ no obesos o diabéticos/ nodiabéticos obtenido mediante un test Chi-Cuadrado. OR: valor de odds ratio referido a los portadores del alelo minoritario (excepto para el rs1036852) con respecto al genotipo homocigoto más prevalente, ajustado por edad y sexo obtenida mediante regresión logística. Entre paréntesis se incluye el intervalo de confianza al 95% y p-valor obtenido al calcular la OR mediante regresión logística.

El polimorfismo que presentó una menor prevalencia en obesos fue el rs2796495 (C>T) en el gen PRKAA2. Tras ajustar por sexo y edad, se observó que los portadores del alelo T mostraban menor riesgo de obesidad que los homocigotos CC. Las asociaciones

ajustadas de las variantes alélicas para los polimorfismos rs4213 (T>G) de PRKAB1 (portadores alelo G) y rs1036852 (A>G) de PRKAB2 (alelo G), quedaron en el límite de la significación estadística ($P=0,062$ en ambos casos). Los polimorfismos rs2293445 de PRKAG1, rs8961 de PRKAG2 y rs1467320 de PRKAG3 no mostraron asociación.

Por otra parte, ninguno de los polimorfismos de los genes de las subunidades de AMPK mostró asociación con DMT2.

Tras observar las diferencias en las medias de IMC y peso entre hombres y mujeres en los polimorfismos PRKAB1 y PRKAG3, se estudió también el riesgo de obesidad asociado al alelo minoritario (alelo G en el polimorfismo de PRKAB1 y alelo A en el polimorfismo PRKAG3) en ambos sexos. En mujeres, los portadoras del alelo del alelo G mostraron menor riesgo de desarrollar obesidad ($OR=0,55$ IC95%(0,40-0,77) $p<0,001$), sin embargo, en hombres, los portadores del alelo G presentaron mayor riesgo de obesidad pero no se alcanzó la significación estadística ($OR=1,39$ IC95%(0,91-2,10) $p=0,124$). Con respecto al polimorfismo de PRKAG3 los portadores del alelo A en ambos sexos mostraron mayor riesgo de obesidad pero en ningún caso se alcanzó el nivel de significación estadística ($OR=1,20$ IC95%(0,75-1,91) $P=0,443$ para hombres; $OR=1,11$ IC95%(0,77-1,58) $P=0,583$ para mujeres).

Por otro lado, en ningún caso se encontraron diferencias entre obesos y no obesos, diabéticos y no diabéticos, hipertensos y no hipertensos o hipercolesterolémicos y no hipercolesterolémicos, en cuanto al efecto de cada uno de los polimorfismos sobre variables antropométricas, niveles de TG o glucosa o riesgo de DMT2 u obesidad.

4.2.4 Estudio de posibles interacciones gen*ambiente sobre fenotipos intermedios

En este apartado se examinarán las interacciones gen*tabaco, gen*adherencia a la DM o a alguno de sus componentes incluidos en el cuestionario de 14 puntos y gen*actividad física, detectadas para los polimorfismos estudiados, en la población PREDIMED del nodo de Valencia.

4.2.4.1 Estudio de interacción gen-tabaco

En la siguiente tabla (Tabla 4.63) se presentan las diferencias entre fumadores y no fumadores con respecto a variables antropométricas, niveles de lípidos y presión arterial. La prevalencia de fumadores es considerablemente menor que la de no fumadores (13% vs 87% respectivamente). Se observaron diferencias estadísticamente significativas en la edad, peso, IMC, PAD, c-HDL y TG, de modo que los fumadores presentan menor edad, IMC y c-HDL y mayor peso, PAD y concentración plasmática de TG.

Tabla 4.63. Diferencias en parámetros antropométricos, niveles plasmáticos de lípidos y tensión arterial entre fumadores y no fumadores en la población PREDIMED del nodo de Valencia

	Fumadores (n=136) Media ± DS	No fumadores (n=913) Media ± DS	P¹
Edad (años)	64 ± 6	68 ± 6	<0,001
Peso (kg)	79,7 ± 13,1	75,8 ± 11,8	0,001
IMC(kg/m²)	29,4 ± 4,2	30,4 ± 4,4	0,010
Cintura (cm)	102,9 ± 12,2	102,7 ± 11,9	0,855
PAS (mmHg)	147,6 ± 20,2	146,2 ± 20,2	0,453
PAD (mmHg)	83,5 ± 10,2	81,1 ± 10,6	0,017
Glucosa (mg/dl)	120,0 ± 38,3	118,9 ± 38,6	0,775
CT (mg/dl)	209,0 ± 44,8	205,5 ± 37,8	0,336
c-LDL (mg/dl)	129,5 ± 38,3	127,8 ± 34,6	0,623
c-HDL (mg/dl)	48,6 ± 13,9	53,3 ± 12,8	<0,001
TG (mg/dl)	140,8 ± 73,0	124,8 ± 63,4	0,010

IMC: Índice de masa corporal; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; CT: colesterol total; c-LDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos. ¹: p valor de comparación de medias mediante un prueba T-Student.

Tras realizar los estudios de interacción gen*tabaco, se observó modulación por la presencia de hábito tabáquico en la relación entre polimorfismo y fenotipo intermedio de ECV en las variantes rs183130 del gen de la CETP, Q192R en el gen de PON1 y C242T de la subunidad *p22phox* de la NADPH oxidasa. Los análisis se presentan a continuación.

4.2.4.1.1 Interacción entre el polimorfismo rs183130 del gen de la CETP con el consumo de tabaco sobre la concentración de c-HDL.

En el apartado 4.2.3.2.2 se describió la asociación del polimorfismo rs183130 del gen de CETP con los niveles plasmáticos de c-HDL. Concretamente, se observó que los individuos con genotipo TT presentaban mayores niveles de c-HDL que los CT y CC. Por otro lado, el consumo de tabaco se asoció con un descenso estadísticamente significativo en la concentración de c-HDL (Tabla 4.63). Dado el impacto del consumo de tabaco y del genotipo de rs183130, se analizó la posible interacción de ambos factores sobre la concentración plasmática de c-HDL.

En la tabla 4.64 se muestran los resultados. Se observa que los niveles de c-HDL son mayores en los individuos TT que en los CT y CC tanto en el grupo de fumadores como en el de no fumadores, sin embargo, tanto un individuos CC como CT, la concentración de c-HDL es significativamente menor en fumadores con respecto a no fumadores. Dicho efecto es mayor en individuos CC (7 mg/dL) que en CT (4,8 mg/dL). De este modo, parece que el alelo C interacciona con el consumo de tabaco para reducir los niveles de c-HDL, mientras que los individuos con genotipo TT son resistentes a la disminución de c-HDL inducida por el tabaco (Pinteracción rs183130-CETP*tabaco = 0,011).

Tabla. 4.64. Interacción entre el polimorfismo rs183130 del gen de CETP y consumo de tabaco sobre los niveles plasmáticos de c-HDL en la población PREDIMED del nodo de Valencia.

	CC Media ± DS	CT Media ± DS	TT Media ± DS	P ¹
c-HDL (mg/dl)				
Fumadores	45,0 ± 9,7	49,2 ± 14,2	65,2 ± 19,1	<0,001
No fumadores	52,1 ± 11,0	54,0 ± 11,5	57,9 ± 13,0	0,001
P²	<0,001	0,009	0,141	
P interacción rs183130-CETP*tabaco = 0,011				

c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; ¹: p valor de comparación de medias entre genotipos mediante un prueba ANOVA. ²: p valor de comparación de medias entre fumadores y no fumadores mediante un prueba T-Student.

4.2.4.1.2 Interacción entre el polimorfismo Q192R del gen de la PON1 con el consumo de tabaco sobre la concentración de c-HDL.

Se comparó el efecto del polimorfismo Q192R sobre los niveles de c-HDL en fumadores y no fumadores (Figura 4.15). La concentración de c-HDL fue menor en fumadores que en no fumadores como se ha mostrado en la tabla (4.63). Se observó que los niveles de c-HDL se asociaban que el polimorfismo Q192R únicamente en individuos no fumadores. En este grupo, los individuos con genotipo RR mostraban menor concentración de c-HDL que los QR y los QQ (no fumadores QQ 54,3 ± 13,2 mg/dL, QR 53,1 ± 12,7 mg/dL, RR 50,3 ± 10,0 mg/dL P=0,013). Sin embargo, en fumadores no se encontró dicha asociación (fumadores QQ 48,6 ± 11,5 mg/dL, QR 46,7 ± 13,5 mg/dL, RR 46,7 ± 13,5 mg/dL P=0,720). La interacción no fue estadísticamente significativa (P interacción Q192R-PON1*tabaco = 0,483).

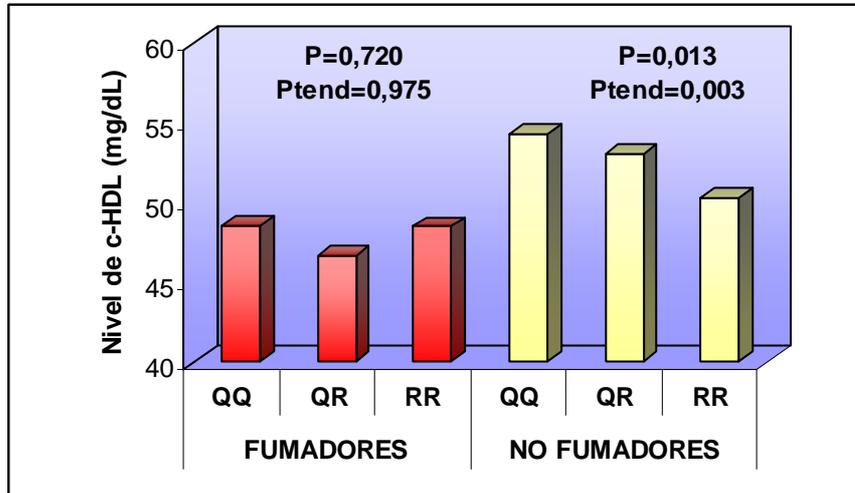


Figura 4.15. Niveles de c-HDL en fumadores y no fumadores según el genotipo del polimorfismo Q192R en la población PREDIMED del nodo de Valencia. (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba ANOVA; Ptend: p-valor obtenido de una prueba de tendencia lineal entre genotipos).

Por otro lado, se observa que la concentración de c-HDL es mayor en individuos QQ y QR fumadores que no fumadores y, sin embargo, en individuos RR no existen diferencias entre ambos grupos poniendo de manifiesto que el alelo Q es más susceptible, en su efecto sobre la concentración de c-HDL, al consumo de tabaco que el genotipo RR (Tabla 4.65).

Tabla 4.65. Diferencia en la concentración de c-HDL según el genotipo del polimorfismo Q192R del gen de PON1 al comparar fumadores y no fumadores en la población PREDIMED del nodo de Valencia.

	Fumadores Media \pm DS	No fumadores Media \pm DS	P ¹
c-HDL (mg/dl)			
QQ	48,6 \pm 11,5	54,3 \pm 13,2	0,002
QR	46,7 \pm 13,5	53,1 \pm 12,7	0,001
RR	46,7 \pm 13,5	50,3 \pm 10,0	0,526

c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; ¹: p valor de comparación de medias entre fumadores y no fumadores mediante un prueba T-Student.

4.2.4.1.3 Interacción entre el polimorfismo C242T del gen de la *p22phox* de la NADPH oxidasa con el consumo de tabaco sobre la concentración de GSH.

En la población del nodo de Valencia del estudio PREDIMED se observó un asociación entre el polimorfismo C242T con concentración de GSH, un potente antioxidante. Se estudió la posible interacción con el consumo de tabaco y los resultados se muestran en la tabla 4.66. En no fumadores, se observó que los portadores del alelo T mostraban mayor concentración de GSH que los homocigotos CC, sin embargo, en el grupo de fumadores no se encontró dicha asociación. La interacción no alcanzó la significación estadística. Cabe destacar el reducido tamaño de muestra, sobretodo en el grupo de fumadores.

Tabla 4.66. Interacción entre el polimorfismo C242T del gen de *p22phox* y consumo de tabaco sobre los niveles plasmáticos de GSH en la población PREDIMED del nodo de Valencia.

	n	Genotipos	GSH (nmol/mg) Media \pm DS	P ¹
Fumadores	10	CC	20,4 \pm 4,1	0,510
	14	CT+TT	20,1 \pm 5,2	
No fumadores	80	CC	18,8 \pm 4,3	0,012
	88	CT+TT	20,6 \pm 4,7	
P interacción <i>p22phox</i> *tabaco= 0,125				

GSH:glutation reducido; ¹: p valor de comparación de medias entre genotipos mediante un prueba T-Student.

4.2.4.2 Estudio de interacción gen*dieta

En este apartado se presentarán las interacciones gen*dieta encontradas en la población PREDIMED del nodo de Valencia y en la población del estudio piloto del proyecto PREDIMED general. Se analizaran las interacciones entre los genes seleccionados y el grado de adherencia al patrón dietético de DM en su conjunto y, además, la influencia de los distintos componentes de la dieta, incluidos en el cuestionario de 14 puntos de adherencia a la DM.

4.2.4.2.1 Estudio de interacción gen*dieta en la población PREDIMED del nodo de Valencia

En la siguiente tabla (Tabla 4.67) se presentan las diferencias individuos que consumen una dieta con elevado grado de adherencia a la DM o bajo grado de adherencia a la DM con respecto a variables antropométricas, niveles de lípidos y presión arterial. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en el IMC, cintura, c-HDL, de modo

que los individuos con baja adherencia a la DM presentan menor c-HDL y mayor IMC y cintura con respecto a los individuos con alta adherencia a la DM.

Tabla 4.67. Diferencias en parámetros antropométricos, niveles plasmáticos de lípidos y tensión arterial entre individuos que consumen una dieta con elevado o bajo grado de adherencia a la DM en la población PREDIMED del nodo de Valencia.

	Baja adherencia DM (n=526) Media ± DS	Alta adherencia DM (n=523) Media ± DS	P ¹
Edad (años)	67 ± 7	67 ± 6	0,624
Peso (kg)	76,9 ± 11,9	75,5 ± 12,2	0,055
IMC(kg/m ²)	30,8 ± 4,3	29,8 ± 4,4	<0,001
Cintura (cm)	103,9 ± 11,9	101,4 ± 11,9	0,001
PAS (mmHg)	146,9 ± 19,6	145,7 ± 20,5	0,336
PAD (mmHg)	80,8 ± 10,6	81,9 ± 10,5	0,088
Glucosa (mg/dl)	120,9 ± 40,2	117,3 ± 37,0	0,138
CT (mg/dl)	206,2 ± 39,2	205,6 ± 38,1	0,808
c-LDL (mg/dl)	128,7 ± 35,4	127,4 ± 34,7	0,564
c-HDL (mg/dl)	51,5 ± 12,9	53,7 ± 13,2	0,008
TG (mg/dl)	128,8 ± 73,0	124,2 ± 65,2	0,265

DM: Dieta Mediterránea; IMC: Índice de masa corporal; PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica CT: colesterol total; c-LDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos. ¹: p valor de comparación de medias mediante un prueba T-Student.

A continuación, se presentan las interacciones entre los genes estudiados y el grado de adherencia a la DM y/o del consumo de alimentos característicos de la DM, encontradas en la población del nodo de Valencia del estudio PREDIMED.

4.2.4.2.1.1 Interacción entre el polimorfismo Q192R del gen de la PON1 con la adherencia a la DM sobre la concentración de c-HDL.

Se ha observado que la concentración de c-HDL es menor en individuos con baja adherencia a la DM que en aquellos que consumen una dieta con alta adherencia a la DM (Tabla 4.67), así que se estudió el efecto de la adherencia a la DM sobre la asociación entre el polimorfismo Q192R y los niveles de c-HDL.

Se observó que los niveles de c-HDL se asociaban que el polimorfismo Q192R únicamente en individuos con alta adherencia a la DM (Figura 4.16). En este grupo, los

individuos con genotipo RR mostraban menor concentración de c-HDL que los QR y los QQ (QQ $55,1 \pm 13,3$ mg/dL, QR $53,0 \pm 13,2$ mg/dL, RR $50,4 \pm 10,1$ mg/dL $P=0,037$). Sin embargo, en individuos con baja adherencia a la DM no se encontró dicha asociación (QQ $51,6 \pm 12,4$ mg/dL, QR $51,9 \pm 12,6$ mg/dL, RR $49,5 \pm 10,8$ mg/dL $P=0,310$). La interacción no fue estadísticamente significativa (P interacción Q192R-PON1*adherencia a la DM = 0,350).

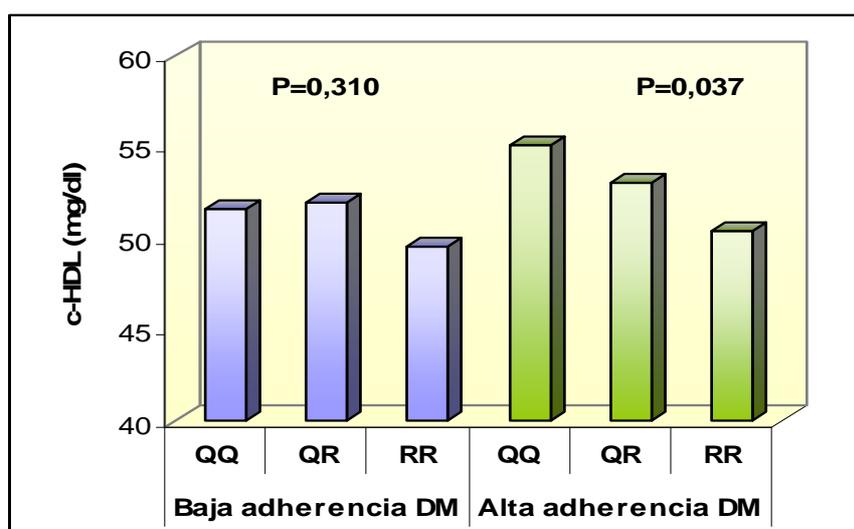


Figura 4.16. Niveles de c-HDL en individuos con alta y baja adherencia a la DM según el genotipo del polimorfismo Q192R. (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba ANOVA).

Por otro lado, se observa que la concentración de c-HDL es mayor en individuos QQ en individuos con alta adherencia a la DM que con baja adherencia y, sin embargo, en individuos QR y RR no existen diferencias entre ambos grupos, poniendo de manifiesto que los individuos QQ son más susceptibles, en su efecto sobre la concentración de c-HDL, a la adherencia a la DM, que los individuos QR y RR (Tabla 4.68).

Tabla 4.68. Diferencia en la concentración de c-HDL según el genotipo del polimorfismo Q192R del gen de PON1 al comparar individuos con alta y baja adherencia a la DM, en la población PREDIMED del nodo de Valencia.

	Baja adherencia DM Media \pm DS	Alta adherencia DM Media \pm DS	P ¹
c-HDL (mg/dl)			
QQ	51,6 \pm 12,4	55,1 \pm 13,3	0,007
QR	51,9 \pm 12,6	53,0 \pm 13,2	0,393
RR	49,5 \pm 10,8	50,4 \pm 10,1	0,572

c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; ¹: p valor de comparación de medias entre fumadores y no fumadores mediante un prueba T-Student.

4.2.4.2.1.2 Interacción entre el polimorfismo -75G/A del gen de la APOA1 con la adherencia a la DM y consumo de carnes rojas y productos cárnicos sobre la concentración de c-LDL.

En la población del estudio PREDIMED del nodo de Valencia se observó un efecto protector del alelo A del polimorfismo -75G/A sobre la concentración de c-LDL. Sin embargo, se detectó también una interacción estadísticamente significativa (Pinteracción ApoA1*adherencia a la DM=0,030) entre el polimorfismo -75G/A del gen de ApoA1 y el grado de adherencia a la DM sobre la concentración de c-LDL, de modo que, los portadores del alelo A solo presentaban menores niveles de c-LDL estadísticamente significativos, si consumen una dieta con elevado grado de adherencia a la DM (GG: 131,3 \pm 33,5 mg/dL vs GA+AA: 120,3 \pm 34,8 mg /dL; p=0,001). Sin embargo, en individuos con baja adherencia a la DM los portadores del alelo A muestran niveles de cLDL similares a los individuos con genotipo GG (GG: 130,1 \pm 36,0 mg/dL vs GA+AA:129,7 \pm 33,8 mg /dL; p=0,914) (Figura 4.17).

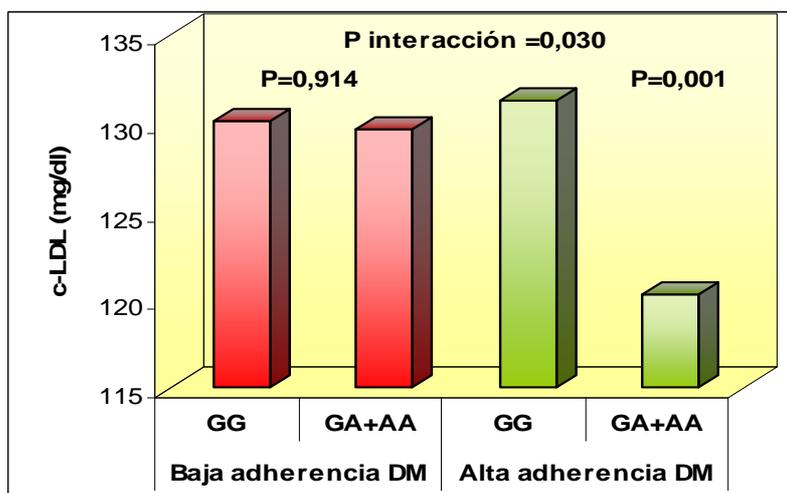


Figura 4.17. Niveles de c-LDL en individuos con alta y baja adherencia a la DM según el genotipo del polimorfismo -75G/A del gen APOA1 en la población PREDIMED del nodo de Valencia. (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba T-Student).

Por otro lado, se observó que el consumo de carnes rojas y otros productos cárnicos (hamburguesas, salchichas o embutidos), era el componente más importante en esta interacción. De hecho, se observó que solo en aquellos participantes que consumían menos de 1 vez al día estos productos, el alelo A se asociaba con menores concentraciones de c-LDL con respecto al genotipo GG, y sin embargo, en los individuos con mayor consumo (más de 1 vez al día), no se observaba este descenso en los niveles de c-LDL en los portadores del alelo A (Tabla 4.69). La interacción fue estadísticamente significativa (Pinteracción ApoA1*consumo carnes rojas/derivados = 0,020).

Tabla 4.69. Interacción entre el polimorfismo -75G/A del gen de ApoA1 y consumo de carnes rojas, hamburguesas, salchichas o embutidos sobre los niveles plasmáticos de c-LDL en la población PREDIMED del nodo de Valencia.

	GG Media ± DS	GA+AA Media ± DS	P ¹
c-LDL (mg/dl)			
Menos de 1 vez/día	130,9 ± 35,1	122,4 ± 34,7	0,002
1 o más veces/día	129,5 ± 33,6	136,3 ± 31,7	0,235
P ²	0,706	0,011	

¹: p valor de comparación de medias entre genotipos mediante un prueba T-Student. ²: p valor de comparación de medias entre individuos que consumen menos o 1 o más veces al día carnes rojas, hamburguesas, salchichas o embutidos mediante un prueba T-Student.

4.2.4.2.1.3 Interacción entre el polimorfismo R219K del gen de la ABCA1 y la adherencia a la DM y sus componentes sobre la concentración de glucosa y el IMC.

En la población del estudio PREDIMED del nodo de Valencia se observó un efecto protector del alelo K frente a concentración de glucosa y riesgo de DMT2. Sin embargo, parece que esta asociación está modulada por el grado de adherencia a la DM (Tabla 4.70). Así pues, se observó que los portadores del alelo K mostraban menor concentración de glucosa y menor riesgo de DMT2 si consumían una dieta con alta adherencia a la DM. Los portadores del alelo K no mostraron diferencias con respecto a la concentración de glucosa y al riesgo de DMT2 en comparación con los individuos con genotipo RR cuando consumían una dieta con baja adherencia a la DM. La interacción fue significativa tanto para la concentración de glucosa como para la DMT2 (Pinteracción R219K-ABCA1*adherencia a la DM=0,023; Pinteracción R219K-ABCA1*adherencia a la DM = 0,002, respectivamente).

Tabla 4.70. Interacción entre el polimorfismo R219K del gen de ABCA1 y adherencia a la DM sobre los niveles plasmáticos de glucosa y DMT2 en la población PREDIMED del nodo de Valencia.

	RR Media ± DS	RK+KK Media ± DS	P¹	OR³
Glucosa (mg/dl)				
Alta adherencia DM	122,6 ± 38,4	111,5 ± 34,9	0,001	0,47 (0,32-0,69) p<0,001
Baja adherencia DM	120,5 ± 39,0	122,0 ± 42,2	0,685	1,12 (0,78-1,60) p=0,551
P²	0,501	0,004		

DM: Dieta Mediterránea ¹: p valor de comparación de medias entre genotipos mediante un prueba T-Student. ²: p valor de comparación de medias entre individuos con alta y baja adherencia a la DM mediante un prueba T-Student. ³OR para Diabetes mellitus tipo 2: valor de odds ratio referido a los portadores del alelo K con respecto al genotipo homocigoto RR, ajustado por edad y sexo obtenida mediante regresión logística. Entre paréntesis se incluye el intervalo de confianza al 95%. También el p-valor obtenido al calcular la OR mediante regresión logística.

Además, se observó que el consumo de pescado y marisco era el componente de la dieta que más influía en la interacción del polimorfismo R219K con la adherencia a la DM para determinar los niveles de glucosa plasmáticos y DMT2 (Tabla 4.71). Se observó que los portadores del alelo K del polimorfismo R219K, mostraban menor concentración de glucosa y menor riesgo de DMT2, solo si consumían 3 o más veces a la semana pescado o marisco. En individuos con un consumo menor de 3 veces a la semana, el polimorfismo no presenta efecto sobre los niveles de glucosa y DMT2. La interacción fue significativa para la concentración de glucosa (Pinteracción R219K-ABCA1*consumo de pescado-marisco=0,024).

Tabla 4.71. Interacción entre el polimorfismo R219K del gen de ABCA1 y consumo de pescado o marisco sobre los niveles plasmáticos de glucosa y DMT2 en la población PREDIMED del nodo de Valencia.

	RR Media ± DS	RK+KK Media ± DS	P ¹	OR ³
Glucosa (mg/dl)				
3 o más veces/semana	121,6 ± 39,2	111,1 ± 35,6	0,002	0,65 (0,45-0,94) p=0,022
Menos 3 veces/semana	121,4 ± 38,2	122,1 ± 41,3	0,834	0,84 (0,58-1,20) p=0,334
P²	0,953	0,003		

DM: Dieta Mediterránea ¹: p valor de comparación de medias entre genotipos mediante una prueba T-Student. ²: p valor de comparación de medias entre individuos que consumen 3 veces o más o menos de 3 veces pescado/marisco por semana mediante un prueba T-Student. ³OR para Diabetes mellitus tipo 2: valor de odds ratio referido a los portadores del alelo K con respecto al genotipo homocigoto RR, ajustado por edad y sexo obtenida mediante regresión logística. Entre paréntesis se incluye el intervalo de confianza al 95%. También el p-valor obtenido al calcular la OR mediante regresión logística.

Por otro lado, se detectó una interacción entre el polimorfismo R219K y el consumo de repostería comercial que determina el efecto protector del alelo K sobre el IMC y la obesidad, observado en la población PREDIMED del nodo de Valencia (Tabla 4.72). De este modo, se observó que los portadores del alelo K presentaban menor IMC y riesgo de obesidad si el consumo de repostería comercial era menor de 2 veces por semana. La interacción fue significativa tanto para el IMC como para la obesidad (Pinteracción R219K-ABCA1*repostería comercial=0,010; Pinteracción R219K-ABCA1*repostería comercial = 0,004, respectivamente).

Tabla 4.72. Interacción entre el polimorfismo R219K del gen de ABCA1 y consumo de repostería comercial sobre IMC y obesidad en la población PREDIMED del nodo de Valencia.

	RR Media ± DS	RK+KK Media ± DS	P ¹	OR ³
IMC (kg/m²)				
Menos 2 veces/semana	30,6 ± 4,2	29,6 ± 4,1	0,002	0,60 (0,43-0,82) p=0,002
Más 2 veces/semana	30,4 ± 4,8	30,9 ± 4,6	0,346	1,25 (0,81-1,93) p=0,305
P²	0,524	0,003		

DM: Dieta Mediterránea ¹: p valor de comparación de medias entre genotipos mediante una prueba T-Student. ²: p valor de comparación de medias entre individuos que consumen menos de 2 o más de 2 veces repostería comercial por semana mediante un prueba T-Student. ³OR para obesidad: valor de odds ratio referido a los portadores del alelo K con respecto al genotipo homocigoto RR, ajustado por edad y sexo obtenida mediante regresión logística. Entre paréntesis se incluye el intervalo de confianza al 95%. También el p-valor obtenido al calcular la OR mediante regresión logística.

4.2.4.2.1.4 Interacción entre el polimorfismo -514C/T del gen de la LH y el consumo de verduras/hortalizas, fruta y frutos secos sobre la concentración de TG y c-HDL.

Por un lado, en la población del nodo de Valencia del estudio PREDIMED, se detectó una interacción entre el polimorfismo -514C/T de LIPC y el consumo de verdura, hortalizas y fruta sobre los niveles plasmáticos de TG (Pinteracción LIPC*consumo verduras/hortalizas=0,007, Pinteracción LIPC*consumo fruta=0,013). De este modo, los portadores del alelo T presentaban mayores niveles de TG de manera estadísticamente significativa, cuando su consumo de verduras/hortalizas y fruta era menor de 2 veces al día y menor de 3 veces al día, respectivamente. En aquellos participantes cuyo consumo de verduras/hortalizas y fruta era más elevado no se observó este incremento en la concentración de TG asociado al alelo T (Figura 4.18).

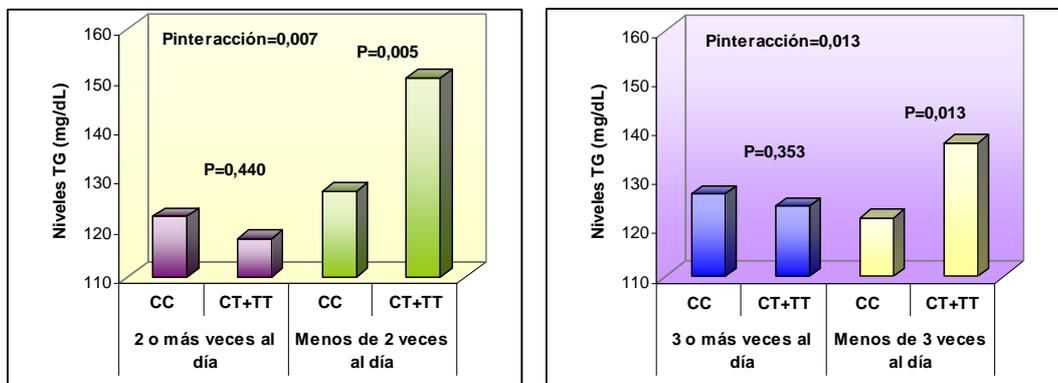


Figura 4.18. Niveles de TG en individuos que consumen 2 o más veces o menos de 2 veces verduras/hortalizas al día (izquierda) y 3 o más veces o menos de 3 veces fruta al día (derecha) según el genotipo del polimorfismo -514C/T del gen LIPC, en la población PREDIMED del nodo de Valencia. (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba T-Student).

Por otro lado, también se detectó una interacción entre el polimorfismo -514 C/T del gen de LH y el consumo de FS para determinar los niveles plasmáticos de c-HDL (Pinteracción LIPC*consumo FS=0,045). En la tabla 4.73 se observa que, los individuos con genotipo CC presentan mayores niveles de c-HDL cuando consumen más de 3 veces a la semana FS con respecto a los individuos, con el mismo genotipo, pero que consumen FS con menor frecuencia. Sin embargo, en los portadores del alelo T no se observan diferencias en la concentración de c-HDL, en función del consumo de FS.

Tabla 4.73. Interacción entre el polimorfismo -514 C/T del gen LIPC y consumo frutos secos sobre los niveles plasmáticos de c-HDL en la población PREDIMED del nodo de Valencia.

	CC Media ± DS	CT+TT Media ± DS	P ¹
c-HDL (mg/dl)			
Más de 3 veces/semana	55,0 ± 14,6	53,0 ± 12,0	0,268
Menos de 3 veces/semana	51,4 ± 12,4	53,3 ± 12,9	0,049
P²	0,002	0,842	

¹: p valor de comparación de medias entre genotipos mediante un prueba T-Student. ²: p valor de comparación de medias entre individuos que consumen menos o más de 3 veces a la semana frutos secos mediante un prueba T-Student.

4.2.4.2.1.5 Interacción entre los polimorfismos rs7901695, rs7903146, rs12255372 del gen de TCF7L2 y el consumo de frutos secos sobre el IMC y riesgo de obesidad.

En la población del nodo de Valencia de PREDIMED se encontró una interacción entre los polimorfismos rs7901695, rs7603146 y rs12255372 del gen de TCF7L2 y el consumo de FS sobre el IMC y el riesgo de obesidad. En las figuras 4.19, 4.20 y 4.21 se presentan los resultados. Para los 3 polimorfismos, se observa un efecto protector de los alelos minoritarios (C para rs7901695 y T para rs7903146 y rs12255372) sobre el IMC y el riesgo de obesidad en aquellos individuos que consumen 3 o más veces a la semana FS. Sin embargo, este efecto no se manifiesta en los individuos cuyo consumo de FS es menor. La interacción para IMC y riesgo de obesidad fue estadísticamente significativa en el caso de los polimorfismos rs7901695 (Pinteracción=0,029 para IMC, Pinteracción=0,003 para riesgo de obesidad) y rs12255372 (Pinteracción=0,022 para IMC, Pinteracción=0,021 para riesgo de obesidad) y pero en el caso del polimorfismo rs7903146 solo fue significativa la de obesidad (Pinteracción=0,117 para IMC, Pinteracción=0,039 para riesgo de obesidad).

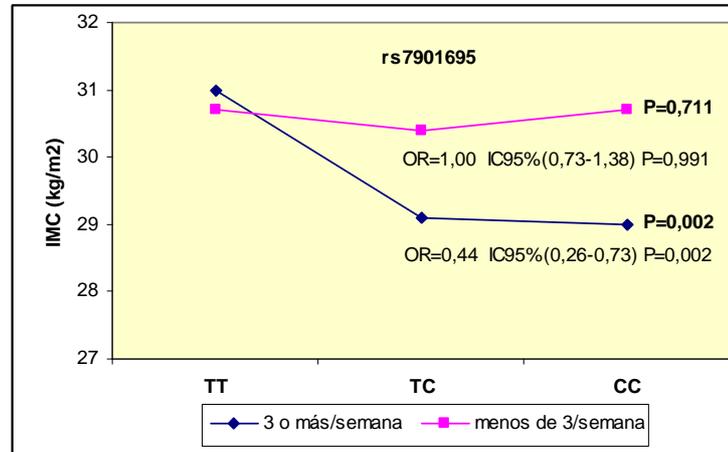


Figura 4.19. IMC (Kg/m²) en individuos que consumen 3 o más o menos de 3 veces a la semana FS según el polimorfismo rs7901695 del gen de TCF7L2 en la población del nodo de Valencia del estudio PREDIMED. (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba ANOVA; OR para obesidad: valor de odds ratio referido a los portadores del alelo C con respecto al genotipo homocigoto TT, ajustado por edad y sexo obtenida mediante regresión logística. Entre paréntesis se incluye el intervalo de confianza al 95%. También el p-valor obtenido al calcular la OR mediante regresión logística.

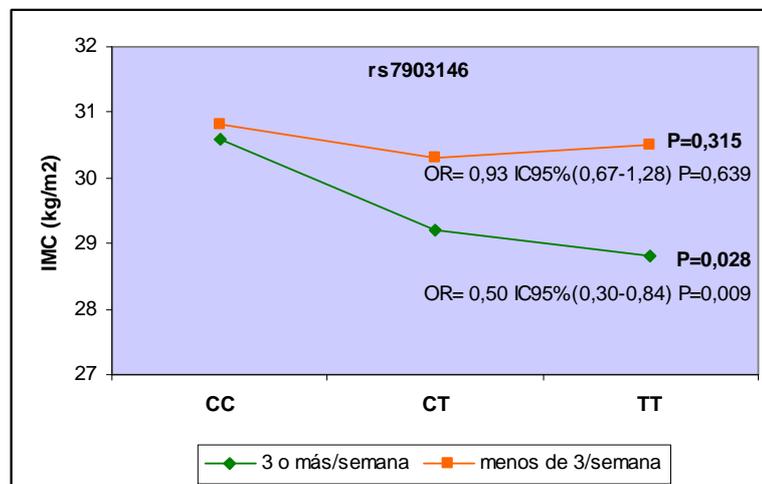


Figura 4.20. IMC (Kg/m²) en individuos que consumen 3 o más o menos de 3 veces a la semana FS según el polimorfismo rs7903146 del gen de TCF7L2 en la población del nodo de Valencia del estudio PREDIMED. (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba ANOVA; OR para obesidad: valor de odds ratio referido a los portadores del alelo C con respecto al genotipo homocigoto TT, ajustado por edad y sexo obtenida mediante regresión logística. Entre paréntesis se incluye el intervalo de confianza al 95%. También el p-valor obtenido al calcular la OR mediante regresión logística.

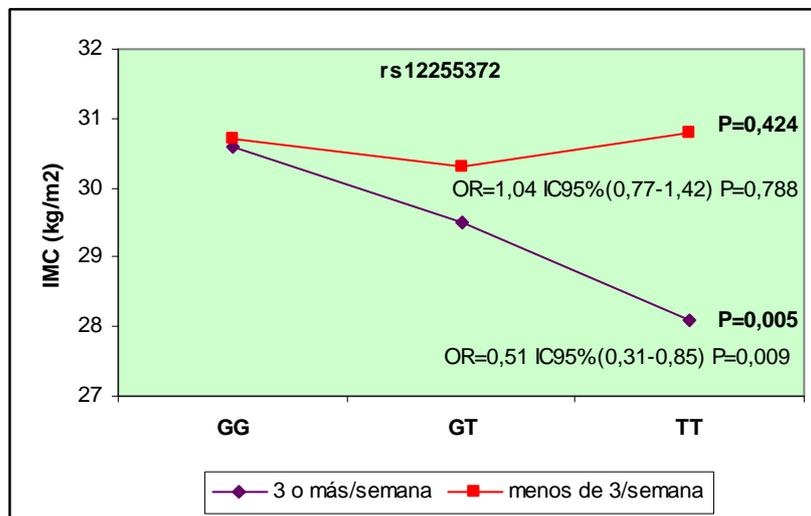


Figura 4.21. IMC (Kg/m²) en individuos que consumen 3 o más o menos de 3 veces a la semana FS según el polimorfismo rs12255372 del gen de TCF7L2 en la población del nodo de Valencia del estudio PREDIMED. (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba ANOVA; OR para obesidad: valor de odds ratio referido a los portadores del alelo C con respecto al genotipo homocigoto TT, ajustado por edad y sexo obtenida mediante regresión logística. Entre paréntesis se incluye el intervalo de confianza al 95%. También el p-valor obtenido al calcular la OR mediante regresión logística.

4.2.4.2.1.6 Interacción entre el polimorfismo C677T del gen de la MTHFR y consumo de repostería comercial y consumo preferente de carnes blancas frente a carnes rojas sobre el IMC y el riesgo de obesidad.

Por un lado, se observó que la asociación del polimorfismo C677T del gen de MTHFR con IMC y riesgo de obesidad estaba influenciada por el consumo de repostería comercial en la población PREDIMED del nodo de Valencia. De este modo, se detectó que en los individuos que consumen menos de 2 veces a la semana repostería comercial, el polimorfismo C677T se asociaba con mayor IMC y riesgo de obesidad y, sin embargo, en aquellos que consumen con una frecuencia de 2 veces o más a la semana no se observó este efecto (Tabla 4.74). La interacción quedó en el límite de la significación estadística para el IMC (Pinteracción MTHFR*consumo repostería comercial=0,054). Se observa que los genotipos CT y TT no muestran variabilidad en el IMC en función del consumo de repostería, sin embargo, el genotipo CC si que presenta dicha variabilidad.

Tabla 4.74. Interacción entre el polimorfismo C677T del gen de MTHFR y consumo de repostería comercial sobre el IMC y riesgo de obesidad en la población PREDIMED del nodo de Valencia.

	CC Media ± DS	CT Media ± DS	TT Media ± DS	P ¹	OR ³
IMC (Kg/m²)					
Menos de 2 veces/semana	29,5 ± 3,8	30,4 ± 4,4	30,8 ± 4,2	0,011	1,52 (1,08-2,15) p=0,017
2 o más veces/semana	30,8 ± 4,7	30,5 ± 4,8	30,4 ± 4,9	0,747	1,27 (0,82-2,00) p=0,289
P²	0,004	0,868	0,538		

IMC: Índice de Masa Corporal; ¹: p valor de comparación de medias entre genotipos mediante una prueba T-Student. ²: p valor de comparación de medias entre individuos que consumen menos de 2 o 2 o más veces por semana repostería comercial mediante un prueba T-Student. ³OR para obesidad: valor de odds ratio referido a los portadores del alelo T con respecto al genotipo homocigoto CC, ajustado por edad y sexo obtenida mediante regresión logística. Entre paréntesis se incluye el intervalo de confianza al 95%. También el p-valor obtenido al calcular la OR mediante regresión logística.

Por otro lado, se observó un efecto similar al estudiar la interacción del polimorfismo C677T del gen de MTHFR con el consumo preferente de carnes blancas (pollo, pavo o conejo) frente a carnes rojas (ternera, cerdo), hamburguesas o salchichas, sobre el IMC y riesgo de obesidad (Tabla 4.75). De este modo, los individuos con genotipo CC muestran menor IMC cuando consumen de forma preferente carnes blancas que carnes rojas y, valores de IMC más elevados, cuando consumen más carnes rojas que carnes blancas. Sin embargo, en los portadores del alelo T, ya sea heterocigotos como homocigotos (CT o TT), el consumo preferente de carnes blancas o rojas no afecta al IMC, y además, muestran valores de IMC similares a los individuos con genotipo CC que consumen más carnes rojas que carnes blancas. Por ello, en aquellos individuos que consumen de forma preferente carnes blancas frente a carnes rojas, se observa un efecto del alelo T que provoca mayor IMC y riesgo de obesidad. Este efecto no se observa en individuos que consumen más carnes rojas que blancas. La interacción es estadísticamente significativa para el IMC (Pinteracción MTHFR*consumo preferente carnes blancas vs carnes rojas=0,034).

Tabla 4.75. Interacción entre el polimorfismo C677T del gen de MTHFR y consumo preferente de pollo, pavo o conejo frente a carnes rojas o derivados cárnicos sobre el IMC y riesgo de obesidad en la población PREDIMED del nodo de Valencia.

	CC Media ± DS	CT Media ± DS	TT Media ± DS	P ¹	OR ³
IMC (Kg/m²)					
Si	29,6 ± 3,9	30,5 ± 4,5	30,7 ± 4,6	0,019	1,48 (1,08-2,04) p=0,016
No	31,0 ± 4,7	30,2 ± 4,6	30,4 ± 4,0	0,415	1,25 (0,75-2,07) p=0,396
P²	0,007	0,445	0,687		

IMC: Índice de Masa Corporal; ¹: p valor de comparación de medias entre genotipos mediante una prueba T-Student. ²: p valor de comparación de medias entre individuos que consumen o no consumen de forma preferente pollo, pavo o conejo frente a carnes rojas o derivados cárnicos mediante un prueba T-Student. ³OR para obesidad: valor de odds ratio referido a los portadores del alelo T con respecto al genotipo homocigoto CC, ajustado por edad y sexo obtenida mediante regresión logística. Entre paréntesis se incluye el intervalo de confianza al 95%. También el p-valor obtenido al calcular la OR mediante regresión logística.

4.2.4.2.1.7 Interacción entre el polimorfismo rs1467320 del gen de la subunidad PRKAG3 de AMPK y la adherencia a la DM y el consumo de carnes rojas o productos cárnicos derivados sobre la concentración de glucosa y el riesgo de DMT2.

En la población de elevado riesgo cardiovascular del estudio PREDIMED no se encontró asociación entre el polimorfismo rs1467320 del gen de la subunidad PRKAG3 de la AMPK y concentración de glucosa o riesgo de DMT2. Sin embargo, se encontró una interacción con la adherencia a la DM que modulaba dichas asociaciones (Tabla 4.76). En individuos con alta adherencia a la DM, los portadores del alelo A mostraron menor concentración de glucosa y menor riesgo de DMT2, quedando en el límite de la significación estadística. Sin embargo, en individuos con baja adherencia a la DM, los portadores del alelo A mostraron mayor concentración de glucosa, sin alcanzar la significación estadística, y mayor riesgo de DMT2. Tanto para la concentración de glucosa como para la DMT2, las interacciones fueron estadísticamente significativas (P interacción rs1467320-PRKAG3*adherencia a la DM = 0,034 para glucosa, P interacción rs1467320-PRKAG3*adherencia a la DM = 0,005 para DMT2).

Tabla 4.76. Interacción entre el polimorfismo rs1467320 del gen de PRKAG3 y adherencia a la DM sobre los niveles plasmáticos de glucosa y DMT2 en la población PREDIMED del nodo de Valencia.

	GG Media ± DS	GA+AA Media ± DS	P ¹	OR ³
Glucosa (mg/dl)				
Alta adherencia DM	119,0 ± 39,3	113,3 ± 31,1	0,110	0,66 (0,43-1,02) p=0,064
Baja adherencia DM	119,0 ± 37,2	125,3 ± 37,2	0,116	1,64 (1,10-2,40) p=0,016
P²	0,997	0,015		

DM: Dieta Mediterránea ¹: p valor de comparación de medias entre genotipos mediante una prueba T-Student. ²: p valor de comparación de medias entre individuos con alta y baja adherencia a la DM mediante una prueba T-Student. ³OR para Diabetes mellitus tipo 2: valor de odds ratio referido a los portadores del alelo A con respecto al genotipo homocigoto GG, ajustado por edad y sexo obtenida mediante regresión logística. Entre paréntesis se incluye el intervalo de confianza al 95%. También el p-valor obtenido al calcular la OR mediante regresión logística.

Se observó que en la interacción observada estaba implicado el consumo de carnes rojas y productos cárnicos como hamburguesas, salchichas o embutidos (Tabla 4.77). De este modo, los portadores del alelo A, cuyo consumo de carnes rojas o derivados era elevado (1 o más veces al día), mostraban mayor concentración de glucosa y riesgo de DMT2. Sin embargo, en los individuos que consumían menos carnes rojas o derivados no se observó este efecto del alelo A. La interacción fue estadísticamente significativa para la concentración de glucosa y el riesgo de DMT2 (Pinteracción rs1467320-PRKAG3*consumo de carnes rojas y derivados=0,034, Pinteracción rs1467320-PRKAG3*consumo de carnes rojas y derivados=0,004, respectivamente).

Tabla 4.77. Interacción entre el polimorfismo rs1467320 del gen de PRKAG3 y consumo de carnes rojas, hamburguesas, salchichas o embutidos sobre los niveles plasmáticos de glucosa y DMT2 en la población PREDIMED del nodo de Valencia.

	GG Media ± DS	GA+AA Media ± DS	P ¹	OR ³
Glucosa (mg/dl)				
Menos 1 vez/día	118,5 ± 38,8	115,9 ± 39,1	0,410	0,88 (0,63-1,21) p=0,422
1 o más veces/día	120,8 ± 34,8	133,2 ± 43,1	0,048	2,5 (1,29-4,78) p=0,007
P²	0,577	0,004		

¹: p valor de comparación de medias entre genotipos mediante un prueba T-Student. ²: p valor de comparación de medias entre individuos consumen menos o 1 o más veces al día carnes rojas, hamburguesas, salchichas o embutidos mediante un prueba T-Student. ³OR para Diabetes mellitus tipo 2: valor de odds ratio referido a los portadores del alelo A con respecto al genotipo homocigoto GG, ajustado por edad y sexo obtenida mediante regresión logística. Entre paréntesis se incluye el intervalo de confianza al 95%. También el p-valor obtenido al calcular la OR mediante regresión logística.

4.2.4.2.1.8 Interacción entre el polimorfismo rs2796495 del gen de la subunidad PRKAA2 de AMPK y la adherencia a la DM y consumo de pescado sobre el IMC, perímetro de la cintura y riesgo de obesidad.

Se observó que la asociación del polimorfismo rs2796495 del gen de la subunidad PRKAA2 de AMPK con IMC, perímetro de la cintura y riesgo de obesidad estaba modulada por la adherencia a la DM (Tablas 4.78 y 4.79).

Concretamente, solo se observó un efecto protector del alelo T frente al IMC, la cintura, en aquellos individuos que consumen una dieta con alta adherencia a la DM. Sin embargo, no se detectó efecto del alelo T en individuos con baja adherencia a la DM. La interacción fue estadísticamente significativa para IMC y perímetro de la cintura.

Tabla 4.78. Interacción entre el polimorfismo rs2796495 del gen de PRKAA2 y adherencia a la DM sobre IMC y perímetro de la cintura en la población del nodo de Valencia del estudio PREDIMED.

	CC	CT	TT	P ¹
	Media ± DS	Media ± DS	Media ± DS	
IMC (Kg/m²)				
Alta adherencia DM	30,5 ± 3,9	29,8 ± 4,5	29,0 ± 4,3	0,044
Baja adherencia DM	30,9 ± 3,8	30,6 ± 4,8	31,5 ± 4,1	0,376
P ²	0,352	0,046	<0,001	
P interacción rs2796495-PRKAA2*adherencia DM = 0,049				
Cintura (cm)				
Alta adherencia DM	103,8 ± 11,4	100,7 ± 11,5	100,5 ± 11,1	0,050
Baja adherencia DM	103,1 ± 10,8	103,3 ± 11,2	105,9 ± 13,9	0,191
P ²	0,578	0,012	0,009	
P interacción rs2796495-PRKAA2*adherencia DM = 0,025				

DM: Dieta Mediterránea ¹: p valor de comparación de medias entre genotipos mediante una prueba ANOVA. ²: p valor de comparación de medias entre individuos con alta y baja adherencia a la DM mediante una prueba T-Student

Con respecto al riesgo de obesidad se observaron efectos similares. Los individuos portadores del alelo T que consumen una dieta con alto grado adherencia a la DM mostraron menor riesgo de obesidad. Sin embargo, en individuos con baja adherencia a la DM no se observó este efecto protector (Tabla 4.79).

Tabla 4.79. Riesgo de obesidad asociado al polimorfismo rs2796495 del gen de PRKAA2 en individuos con alta y baja adherencia a la DM en la población PREDIMED del nodo de Valencia.

	OR ¹
Alta adherencia DM	0,58 (0,38-0,88) p=0,010
Baja adherencia DM	0,79 (0,53-1,19) p=0,263
P interacción = 0,018	

DM: Dieta Mediterránea ¹OR para obesidad: valor de odds ratio referido a los portadores del alelo T frente a homocigotos CC, ajustado por edad y sexo obtenido mediante regresión logística. Entre paréntesis se incluye el intervalo de confianza al 95%. También el p-valor obtenido al calcular la OR mediante regresión logística.

Por otro lado, se detectó que la interacción observada estaba determinada por el consumo de pescado (Tablas 4.80 y 4.81). Así, se observó un efecto protector del alelo T frente al IMC, la cintura y al riesgo de obesidad solo en aquellos individuos que consumen 3 o más veces a la semana pescado. Sin embargo, en individuos con un consumo menor, no se detectó efecto del alelo T sobre el IMC y riesgo de obesidad, e incluso, en el caso del perímetro de la cintura, los individuos TT mostraron mayores valores que los individuos CT y CC. La interacción fue estadísticamente significativa para IMC y cintura, y quedó en el límite de la significación estadística en el caso del riesgo de obesidad.

Tabla 4.80. Interacción entre el polimorfismo rs2796495 del gen de PRKAA2 y el consumo de pescado sobre IMC y perímetro de la cintura en la población PREDIMED del nodo de Valencia

	CC Media ± DS	CT Media ± DS	TT Media ± DS	P ¹
IMC (Kg/m²)				
3 o más veces/semana	30,9 ± 4,0	29,6 ± 4,6	29,3 ± 4,2	0,008
Menos 3 veces/semana	30,5 ± 3,8	30,9 ± 4,6	31,1 ± 4,4	0,547
P²	0,353	0,003	0,010	
P interacción rs2796495-PRKAA2*adherencia DM = 0,012				
Cintura (cm)				
3 o más veces/semana	104,3 ± 11,8	100,7 ± 11,7	100,3 ± 11,4	0,008
Menos 3 veces/semana	102,5 ± 10,4	103,4 ± 10,9	107,0 ± 13,5	0,026
P²	0,177	0,014	0,001	
P interacción rs2796495-PRKAA2*adherencia DM = 0,001				

¹: p valor de comparación de medias entre genotipos mediante una prueba ANOVA. ²: p valor de comparación de medias entre individuos que consumen más o menos de 3 veces a la semana pescado mediante una prueba T-Student

Tabla 4.81. Riesgo de obesidad asociado al polimorfismo rs2796495 del gen de PRKAA2 según en consumo de pescado en la población PREDIMED del nodo de Valencia.

	OR ¹
3 o más veces/semana	0,52 (0,35-0,79) p=0,002
Menos 3 veces/semana	0,87 (0,58-1,32) p=0,519
	P interacción = 0,090

¹OR para obesidad: valor de odds ratio referido a los portadores del alelo T frente a homocigotos CC, ajustado por edad y sexo obtenido mediante regresión logística. Entre paréntesis se incluye el intervalo de confianza al 95%. También el p-valor obtenido al calcular la OR mediante regresión logística.

4.2.4.2.2 Estudio de interacción gen-dieta en la población del estudio piloto del proyecto PREDIMED general. Interacción entre los polimorfismos -765G/C en el gen de COX-2 y -174G/C en el gen de IL-6 y la dieta sobre marcadores de inflamación

En el apartado 4.2.3.5 se ha mostrado la relación entre los polimorfismos -765G/C en el gen de COX-2 y -174G/C en el gen de IL-6 y niveles de glucosa, lípidos y de marcadores de inflamación en la población del estudio piloto general del proyecto PREDIMED. De los 721 individuos incluidos en el estudio, 241 pertenecen al grupo de DM+AOVE, 241 al grupo de DM+FS y 240 al grupo control. Las características demográficas, clínicas, genéticas y de dieta no difieren entre grupos en la visita inicial.

Tras 3 meses de intervención dietética con DM+AOVE o DM+FS, la puntuación en el cuestionario de adherencia a la DM de 14 puntos aumentó en estos dos grupos (Tabla 4.82). Según las respuestas en los cuestionarios todos los participantes de los grupos de intervención dietética tomaron los suplementos de AOVE y FS. Además, medidas de marcadores de cumplimiento de la dieta en plasma y orina revelaron buena adherencia a dichos suplementos. Comparando con el grupo control, en el grupo de DM+AOEV se observó un aumento de tirosol (12µg/L;IC95%(7-16);P=0,001) e hidroxitirosol (0,08 µg/L;IC95%(0,05-0,011);P=0,01) en orina, y en el grupo de DM+FS, un aumento de ácido α-linolénico en plasma (60µg/L;IC95%(45-79);P=0,04). Además, en los grupos de intervención con AOEV y FS se observó un descenso en los marcadores de inflamación (IL-6, ICAM, VCAM) tras 3 meses de estudio. Estos marcadores no disminuyeron en el grupo control (Tabla 4.82).

Tabla. 4.82. Cambios en el consumo de alimentos (medidos mediante el CFCA), en la puntuación en el cuestionario de adherencia a la DM de 14 puntos, concentración de lípidos y marcadores de inflamación tras 3 meses de intervención dietética en la población PREDIMED del estudio piloto general.¹

	DM+AOVE (n=241)	DM+FS (n=241)	CONTROL (n=240)
AOV (g/d)	32,3 (27,2 a 37,4)*	1,2 (0,1 a 2,9)	-0,1 (-3,1 a 2,7)
AOR (g/d)	-25,7 (-30,6 a -21,9)*	-0,6 (-5,5 a 4,2)	-1,6 (-5,9 a 1,4)
Frutos secos (g/d)	1,7 (0,5 a 3,0)	40,8 (33,5 a 47,6)*	-0,70 (-3,6 a 1,8)
Verduras (g/d)	13,4 (6,2 a 39,3)	18,1 (-1,3 a 36,2)	8,1 (-13,2 a 29,6)
Legumbres (g/d)	8,6 (3,4 a 13,7)	10,1 (5,8 a 14,9)	3,5 (0,1 a 6,7)
Fruta (g/d)	5,6 (-33,4 a 44,1)	15,3 (-11,7 a 41,4)	24,9 (1,1 a 49,8)
Pescado/marisco (g/d)	1,8 (-6,3 a 9,5)	2,4 (-7,9 a 13,1)	11,5 (-4,4 a 28,5)
Carne/productos cárnicos (g/d)	-23,9 (-34,5 a 12,6)*	-29,7 (-45,6 a 13,2)*	-7,6 (-3,7 a 0,1)
Lácteos (g/d)	-17,1 (-38,3 a 4,1)	-45,0 (-69,8 a -19,3)	-22,1 (-50,2 a 4,3)
Adherencia DM 14 pts	2,2 (1,9 a 2,4)*	2,8 (2,6 a 3,0)*	-0,1 (-0,3 a 0,2)
c-LDL (mmol/L)	-0,12 (-0,23 a -0,06)	-0,10 (-0,20 a -0,04)	-0,16 (-0,24 a -0,09)
c-HDL (mmol/L)	0,06 (0,08 a 0,04)*	0,02 (0,01 a 0,05)*	-0,01 (0,04 a 0,02)
TG (mmol/L)	-0,04 (-0,13 a -0,01)	-0,09 (-0,16 a 0,03)*	0,04 (-0,05 a 0,12)
PCR (mg/L)	-0,70 (-1,05 a -0,22)*	0,21 (-0,15 a 0,53)	-0,10 (-0,38 a 0,32)
IL-6 (ng/L)	-0,67 (-1,41 a -0,13)*	-0,91 (-1,69 a -0,17)*	0,42 (0,02 a 1,19)
ICAM (µg/L)	-65,8 (-82,3 a -49,6)*	-49,4 (-75,1 a -30,2)*	22,1 (3,5 a 50,7)
VCAM (µg/L)	-117,6 (-178,2 a -56,8)*	-94,7(-165,3 a -31,8)*	46,2 (5,8 a 135,9)

DM+AOVE: grupo de Dieta Mediterránea con suplemento de aceite de oliva virgen extra; DM+FS: grupo de Dieta Mediterránea con suplemento de frutos secos; CONTROL: grupo control; AOV: aceite de oliva virgen; AOR: aceite de oliva refinado; CT: colesterol total; c-LDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos; PCR: proteína C reactiva; IL-6: interleuquina 6; ICAM: molécula de adhesión intercelular; VCAM; molécula de adhesión celular vascular. ¹ Los valores son diferencias de medias absolutas (IC 95%). * Indica valor diferentes del grupo control, P<0,05.

En este trabajo, se ha examinado la influencia de los polimorfismos -765G/C en el gen de COX-2 y -174G/C en el gen de IL-6 sobre los cambios en las concentraciones séricas de los marcadores de inflamación asociados a la intervención dietética. No se encontró interacción gen-dieta en ningún grupo. En cuanto a la influencia del polimorfismo -765G/C en el gen de COX-2 sobre los niveles séricos de IL-6, el efecto de la DM en la disminución de la concentración de IL-6 fue el mismo en homocigotos GG y portadores del alelo C

(Pinteracción gen-dieta=0,634). Se observaron resultados similares al examinar la posible interacción entre el polimorfismo -765G/C de COX-2 y la intervención dietética sobre la concentración sérica de ICAM (Pinteracción gen*dieta =0,696). No se encontró una interacción en ningún grupo, pero si se observó que la concentración sérica de ICAM disminuyó en los grupos de DM+AOVE y DM+FS independientemente del genotipo de la variante -765G/C. Tampoco se encontró interacción que determine los niveles séricos de PCR y VCAM (Pinteracción gen*dieta= 0,259 y 0,548 respectivamente). En cuanto al polimorfismo -174 G/C en el gen de IL-6, el efecto de la intervención dietética sobre la concentración sérica de ICAM no fue modificada por dicho polimorfismo (Pinteracción gen*dieta= 0,392). Tampoco se encontró una interacción gen*dieta cuando se examinó el efecto combinado de los dos polimorfismos sobre los niveles de ICAM (P=0,249). Estos resultados han sido publicados recientemente (Corella D et al, 2009).

4.2.4.3 Estudio de interacción gen-actividad física

En la tabla 4.83, se presentan las diferencias entre sedentarios y no sedentarios con respecto a variables antropométricas, niveles de lípidos y presión arterial.

Tabla 4.83. Diferencias en parámetros antropométricos, niveles plasmáticos de lípidos y tensión arterial entre sedentarios y no sedentarios en la población PREDIMED del nodo de Valencia.

	Sedentarios (n=295) Media ± DS	No sedentarios (n=754) Media ± DS	P¹
Edad (años)	67 ± 6	67 ± 6	0,723
Peso (kg)	77,5 ± 13,0	75,7 ± 11,5	0,035
IMC(kg/m²)	31,1 ± 4,7	29,9 ± 4,1	<0,001
Cintura (cm)	105,2 ± 12,3	101,6± 11,8	<0,001
PAS (mmHg)	148,7 ± 20,6	146,0 ± 19,9	0,061
PAD (mmHg)	82,1 ± 10,5	81,4 ± 10,5	0,411
Glucosa (mg/dl)	126,3 ± 43,1	115,7 ± 36,1	<0,001
CT (mg/dl)	209,0 ± 39,4	205,1 ± 38,9	0,165
c-LDL (mg/dl)	129,2 ± 36,0	127,8 ± 35,3	0,589
c-HDL (mg/dl)	51,2 ± 12,8	53,3 ± 13,0	<0,027
TG (mg/dl)	135,3 ± 70,6	123,4 ± 63,2	0,010

IMC: Índice de masa corporal; CT: colesterol total; c-LDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos. ¹: p valor de comparación de medias mediante un prueba T-Student.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en el perímetro de cintura, peso, IMC, glucosa, c-HDL y TG, de modo que los sedentarios presentan menores niveles de c-HDL y mayor perímetro de cintura, peso e IMC y concentración plasmática de glucosa y TG. Las diferencias en la PAS quedaron en el límite de la significación estadística.

Tras realizar los estudios de interacción gen*actividad física, se observó modulación por la actividad física en la relación entre polimorfismo y fenotipo intermedio de ECV en las variantes rs9939609 del gen de la FTO y Pro12Ala en el gen de PPARG2. Los análisis se presentan a continuación.

4.2.4.3.1 Interacción entre el polimorfismo rs9939609 del gen de FTO y la actividad física sobre perímetro de cintura e IMC.

Puesto que en nuestra población de elevado riesgo cardiovascular del estudio PREDIMED no se encontró asociación entre los polimorfismos del gen de la FTO con parámetros relacionados con obesidad y además, el hecho de mantener un estilo de vida sedentario se asoció con mayor perímetro de cintura, peso e IMC, se examinó si la actividad física influye sobre el efecto de las variantes de FTO estudiadas, sobre parámetros relacionados con obesidad.

Se encontró una interacción entre el polimorfismo rs9939609 con la actividad física que determinaba la asociación de dicho polimorfismo con perímetro de cintura y el IMC (P interacción rs9939609-FTO*actividad física = 0,006 para la cintura; P interacción rs9939609-FTO*actividad física = 0,027 para el IMC). Se observó, que el perímetro de la cintura y el IMC aumentaba en individuos con genotipo AA con respecto a aquellos con genotipo TA y TT, únicamente en individuos sedentarios. En individuos que realizaban actividad física el efecto del alelo A desapareció, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas según el genotipo (Figuras 4.22 y 4.23).

Con respecto al polimorfismo rs375812 en el gen de FTO, que se encontró en desequilibrio de ligamiento con rs9939609, la interacción gen*actividad física sobre IMC y perímetro de la cintura quedó en el límite de la significación estadística (P interacción rs375812-FTO*actividad física=0,109 para la cintura; P interacción rs375812-FTO*actividad física=0,071 para el IMC). En cuanto al polimorfismo rs1861868 del gen de FTO no se observó interacción gen*actividad física sobre IMC y perímetro de la cintura (P interacción rs1861868-FTO*actividad física=0,978 para la cintura; P interacción rs1861868-FTO*actividad física=0,770 para el IMC).

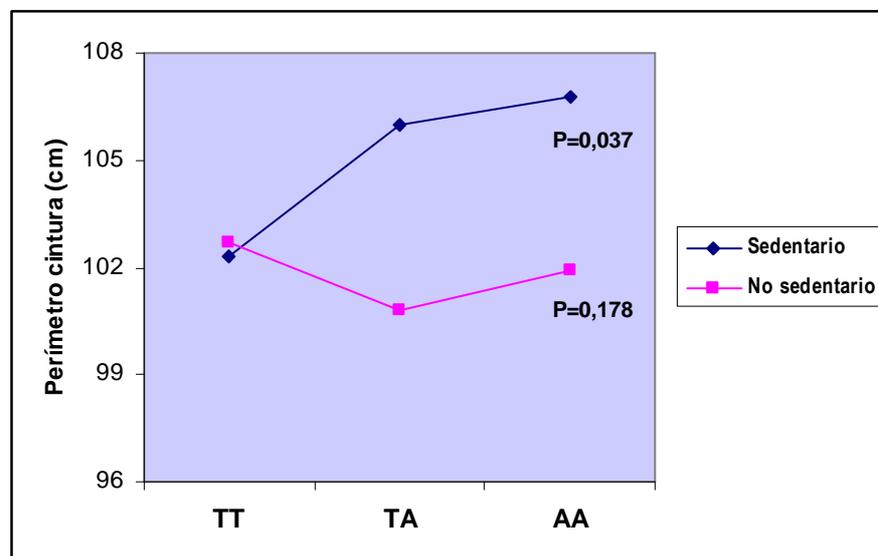


Figura 4.22. Perímetro de la cintura en individuos sedentarios y no sedentarios según el polimorfismo rs99396309 del gen de la FTO en la población PREDIMED del nodo de Valencia. (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba ANOVA).

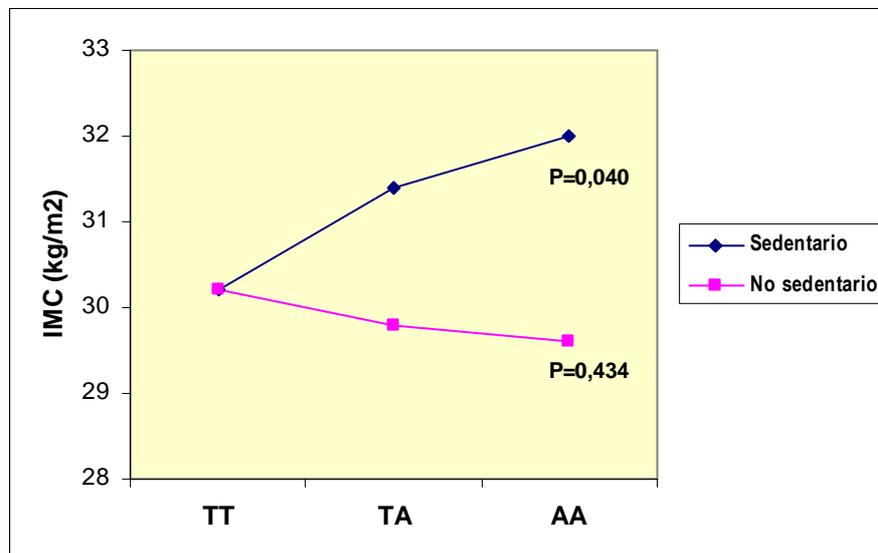


Figura 4.23. Índice de masa corporal (IMC) en individuos sedentarios y no sedentarios según el polimorfismo rs99396309 del gen de la FTO, en la población PREDIMED del nodo de Valencia. (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba ANOVA).

4.2.4.3.2 Interacción entre el polimorfismo Pro12Ala del gen de PPARG2 y la actividad física sobre la concentración de glucosa.

En la población de PREDIMED del nodo de Valencia no se encontró asociación entre el polimorfismo Pro12Ala y los niveles de glucosa o riesgo de DMT2. Sin embargo, se detectó que estas asociaciones eran influenciadas por la realización o no de actividad física (Tabla 4.84). Se observó que en individuos sedentarios, los individuos con genotipo Pro12Pro mostraban mayor concentración de glucosa que los portadores del alelo 12Ala, y sin embargo, en no sedentarios no se observan diferencias entre genotipos. Además, los individuos con genotipo Pro12Pro mostraron mayor glucosa en el grupo de sedentarios que en el de no sedentarios. Los individuos con genotipo Pro12Pro que realizaban actividad física, presentaron niveles de glucosa similares a los individuos portadores del alelo 12Ala pertenecientes tanto al grupo de sedentarios como al de no sedentarios. También, en individuos sedentarios, el genotipo Pro12Pro mostró mayor riesgo de DMT2, aunque no se alcanzó la significación estadística. La interacción para la concentración de glucosa fue significativa pero para la DMT2 no (P interacción Pro12Ala-PPARG2*actividad física = 0,043 para glucosa, P interacción Pro12Ala*PPARG2 *actividad física = 0,103 para DMT2). Así pues, el genotipo Pro12Pro parece ser más sensible que el alelo 12Ala, con respecto a los niveles de glucosa, a la realización o no de actividad física.

Tabla 4.84. Interacción entre el polimorfismo Pro12Ala del gen de PPARG2 y actividad física sobre los niveles plasmáticos de glucosa y DMT2 en la población del nodo de Valencia del estudio PREDIMED.

	Pro12Pro Media \pm DS	Port 12Ala Media \pm DS	P ¹	OR ³
Glucosa (mg/dl)				
Sedentarios	129,3 \pm 44,6	112,3 \pm 31,4	0,016	1,73 (0,89-3,33) p=0,105
No sedentarios	116,2 \pm 36,3	114,1 \pm 35,8	0,562	0,94 (0,63-1,40) p=0,745
P²	<0,001	0,766		

Port: portadores; ¹: p valor de comparación de medias entre genotipos mediante un prueba T-Student. ²: p valor de comparación de medias entre individuos sedentarios y no sedentarios mediante un prueba T-Student. ³OR para Diabetes mellitus tipo 2: valor de odds ratio referido Homocigotos Pro12Pro frente a los portadores del alelo 12Ala, ajustado por edad y sexo obtenida mediante regresión logística. Entre paréntesis se incluye el intervalo de confianza al 95%. También el p-valor obtenido al calcular la OR mediante regresión logística.

4.2.5 Estudio de combinaciones genotípicas de polimorfismos

En este apartado se examinará el efecto combinado de polimorfismos que han mostrado asociación con niveles de lípidos, y parámetros relacionados con obesidad y DMT2.

4.2.5.1 Estudio de combinaciones genotípicas de polimorfismos que se han asociado con niveles de lípidos.

Los polimorfismos TaqIB y rs183130 del gen de la CETP, R219K del gen de ABCA1 y Q192R del gen de PON1 mostraron asociación con niveles plasmáticos de c-HDL y los polimorfismos E2/E3/E4 del gen de ApoE y -75 G/A del gen de ApoA1 con niveles plasmáticos de c-LDL. Así pues, se examinará el efecto combinado de dichos polimorfismos.

4.2.5.1.1 Estudio de combinaciones genotípicas de polimorfismos que se han asociado con niveles de c-HDL.

Los polimorfismos TaqIB y rs183130 del gen de la CETP mostraron asociación con los niveles de c-HDL. En la tabla 4.85 se muestran los resultados del efecto sobre la concentración de c-HDL de los homocigotos mutados, B2B2 o TT, en comparación con los homocigotos salvajes, B1B1 o CC, para cada uno de los dos polimorfismos. Además se presenta también el efecto de la combinación de los genotipos más favorables frente a los menos favorables (B2B2/TT vs B1B1/CC) de ambos polimorfismos. Se observó, para el polimorfismo TaqIB, que los homocigotos mutados B2B2 presentan un 12,6% de incremento en la concentración de c-HDL frente a los homocigotos salvajes B1B1. En el caso del polimorfismo rs183130, la diferencia entre homocigotos TT y homocigotos CC en los niveles de c-HDL fue de 14,5%. Al realizar la combinación genotípica de ambos polimorfismos, se detectó un incremento de 17,7%, en los niveles de c-HDL, en genotipos más favorables (B2B2/TT) frente a los menos favorables (B1B1/CC). Las diferencias fueron estadísticamente significativas en las tres comparaciones.

Tabla 4.85. Efecto del genotipo homocigoto mutado frente al homocigoto salvaje y de la combinación de estos genotipos sobre los niveles plasmáticos de c-HDL, de los polimorfismos TaqIB y rs183130 de CETP en población PREDIMED en el nodo de Valencia.

Polimorfismo	Genotipo	n	c-HDL	Diferencia(%) ¹	P ²
TaqIB	B1B1	387	50,1 ± 12,7	12,6	<0,001
	B2B2	144	56,4 ± 13,3		
rs183130	CC	546	51,2 ± 13,2	14,5	<0,001
	TT	76	58,6 ± 13,8		
Combinación ³	B1B1/CC	358	50,3 ± 12,8	17,7	<0,001
	B2B2/TT	65	59,2 ± 14,2		

¹ Porcentaje de diferencia en la concentración de c-HDL entre los genotipos más y menos favorables. ² indica p-valor obtenido con una prueba T-Student para comparar medias; ³ Combinación de genotipos más favorables de TaqIB y rs183130 de CETP frente a los menos favorables.

En la tabla 4.86 se muestra el efecto sobre los niveles de c-HDL, de forma individual y combinada, de los portadores del alelo mutado frente a los homocigotos salvajes de los polimorfismos Taq IB y rs183130 del gen de CETP. Se observa que los portadores del alelo B2 del polimorfimo de TaqIB presentan un incremento de un 8,4% en los niveles de c-HDL frente a los homocigotos B1B1. Los portadores del alelo T del polimorfismo rs183130 presentan un incremento de un 6,1% en la concentración de c-HDL. Al realizar la combinación de genotipos, se observa que los portadores de los alelos mutados para ambos polimorfismos frente a los homocigotos salvajes (B1B1/CC) muestran un incremento de 8,4% en los niveles de c-HDL. Las diferencias fueron estadísticamente significativas en todos los casos.

Tabla 4.86. Efecto del genotipo homocigoto salvaje frente portadores del alelo mutado y de la combinación de estos genotipos sobre los niveles plasmáticos de c-HDL, de los polimorfismos TaqIB y rs183130 de CETP en población PREDIMED en el nodo de Valencia.

Polimorfismo	Genotipo	n	c-HDL	Diferencia(%) ¹	P ²
TaqIB	B1B1	387	50,1 ± 12,7	8,4	<0,001
	Portadores B2	634	54,3 ± 13,1		
rs183130	CC	546	51,2 ± 13,2	6,1	<0,001
	Portadores T	488	54,3 ± 12,5		
Combinación ³	B1B1/CC	446	50,3 ± 12,8	8,4	<0,001
	Port B2/Port T	358	54,5 ± 12,7		

¹ Porcentaje de diferencia en la concentración de c-HDL entre los genotipos más y menos favorables; ² indica p-valor obtenido con una prueba T-Student para comparar medias; ³ Combinación de genotipos más favorables de TaqIB y rs183130 de CETP frente a los menos favorables (Port= Portadores).

Por otro lado, el polimorfismo Q192R localizado en el gen de la PON1 también mostró asociación con los niveles de c-HDL. Así pues, también se estudio la diferencia en el efecto sobre la concentración de c-HDL en individuos portadores de los alelos más favorables frente los individuos con genotipo homocigótico para los alelos menos favorables de los polimorfismos Taq1B y rs183130 del gen de la CETP y el polimorfismo Q192R en el gen de PON1. En la tabla 4.87 se muestran los resultados.

Se observó que los portadores del alelo R del polimorfimo Q192R en el gen de PON1, presentaron un incremento de un 3,1% en los niveles de c-HDL frente a los homocigotos QQ. Al realizar la combinación de genotipos, se observó que los individuos portadores de los genotipos más favorables (Portadores del alelo B2/portadores de T/QQ) mostraron un incremento de un 10,4% en los niveles de c-HDL frente a los individuos que presentaron los genotipos menos favorables (B1B1/CC/Portadores del alelo Q). Las diferencias fueron estadísticamente significativas en ambos casos.

Tabla 4.87. Efecto del genotipo más favorable frente genotipo menos favorable y de la combinación de estos genotipos sobre el los niveles plasmáticos de c-HDL, de los polimorfismos Taq1B y rs183130 del gen de CETP, Q192 del gen de PON1 y R219K del gen de ABCA1 en población PREDIMED en el nodo de Valencia.

Polimorfismo	Genotipo	n	c-HDL	Diferencia(%) ¹	P ²
Taq1B	B1B1	387	50,1 ± 12,7	8,4	<0,001
	Portadores B2	634	54,3 ± 13,1		
rs183130	CC	546	51,2 ± 13,2	6,1	<0,001
	Portadores T	488	54,3 ± 12,5		
Q192R	QQ	417	53,5 ± 13,1	3,1	0,050
	Portadores R	585	51,9 ± 12,5		
ABCA1	RR	563	51,8 ± 12,4	3,9	0,014
	Portadores K	471	53,8 ± 13,7		
Combinación ³	B1B1/CC/Port R	141	49,8 ± 12,2	10,4	<0,001
	Port B2/PortT/QQ	281	55,0 ± 11,8		
Combinación ⁴	B1B1/CC/RR	198	49,3 ± 12,3	12,4	<0,001
	Port B2/PortT/PortK	231	55,4 ± 13,5		

¹ Porcentaje de diferencia en la concentración de c-HDL entre los genotipos más y menos favorables; ² indica p-valor obtenido con una prueba T-Student para comparar medias; ³ Combinación de genotipos más favorables de Taq1B y rs183130 de CETP y Q192R de PON1 frente a los menos favorables.

⁴ Combinación de genotipos más favorables de Taq1B y rs183130 de CETP y R219K de ABCA1 frente a los menos favorables (Port= Portadores).

El polimorfismo R219K del gen de ABCA1 también mostró asociación con los niveles de c-HDL. Concretamente, los portadores del alelo K presentaron un incremento de 3,9% en la concentración plasmática de c-HDL con respecto a los homocigotos RR. Así pues, también se examinó el efecto combinado de los genotipos favorables y no favorables de los polimorfismos TaqIB y rs183130 del gen de CETP y el polimorfismo R219K del gen de ABCA1. Los individuos portadores de los genotipos favorables para los 3 polimorfismos (Portadores de B2/Portadores de T/portadores de K) mostraron un incremento estadísticamente significativo de un 12,4% en los niveles de c-HDL en comparación a los individuos con genotipos no favorables (homocigotos salvajes en los 3 polimorfismos B1B1/CC/RR) (Tabla 4.87).

4.2.5.1.2 Estudio de combinaciones genotípicas de polimorfismos que se han asociado con niveles de c-LDL.

Los polimorfismos E2/E3/E4 del gen de ApoE y -75G/A del gen de ApoA1 mostraron asociación con concentración de c-LDL. Los portadores del alelo E4 del polimorfismo del gen de ApoE mostraron un 7,8% más de c-LDL que los portadores del alelo E3. En el caso del polimorfismo -75 G/A del gen ApoA1, los homocigotos GG presentaron un 4,5% más de c-LDL que los portadores del alelo A. Al examinar el efecto combinado de los genotipos favorables (portadores de alelo E3/ portadores de alelo A) frente a los de riesgo (portadores alelo E4/homocigotos GG), se observó un incremento de un 10% en los individuos portadores de los genotipos de riesgo. Las diferencias en todos los casos fueron estadísticamente significativas (Tabla 4.88).

Tabla 4.88. Efecto del genotipo más favorable frente genotipo menos favorable y de la combinación de estos genotipos sobre los niveles plasmáticos de c-LDL, de los polimorfismos E2/E3/E4 del gen de ApoE y -75 G/A del gen de ApoA1, en población PREDIMED en el nodo de Valencia.

Polimorfismo	Genotipo	n	c-LDL	Diferencia(%) ¹	P ²
E2/E3/E4	E3	744	127,8 ± 34,6	7,8	0,001
	E4	167	137,7 ± 37,3		
-75 G/A	GG	694	130,5 ± 35,1	4,5	0,020
	Portadores A	317	124,9 ± 34,5		
Combinación ³	E3/Port A	614	128,7 ± 34,1	10,0	<0,001
	E4/GG	119	141,5 ± 38,1		

¹ Porcentaje de diferencia en la concentración de c-LDL entre los genotipos más y menos favorables; ² indica p-valor obtenido con una prueba T-Student para comparar medias; ³ Combinación de genotipos más favorables de E2/E3/E4 de APOE y -75 G/A de APOA1 frente a los menos favorables (Port= Portadores).

4.2.5.2. Estudio de combinaciones genotípicas de polimorfismos que se han asociado con IMC.

Los polimorfismos rs7903146 del gen de TCF7L2, rs1036852 del gen de PRKAB2 y R219K del gen de ABCA1 mostraron un efecto protector sobre el IMC en la población de PREDIMED del nodo de Valencia. Los portadores del alelo T del polimorfismo rs7903146 presentaron un 2,7% menos de IMC que los homocigotos CC. Los portadores del alelo G del polimorfismo de rs1036852 mostraron un descenso de un 2,0% en el IMC con respecto a los homocigotos AA. Con respecto al polimorfismo R219K, los portadores del alelo K presentaron un 1,7% menos de IMC que los homocigotos RR. Los descensos en estos dos últimos polimorfismos quedaron en el límite de la significación estadística (Tabla). Al examinar la combinación de genotipos más favoreables (portadores de T/ portadores de G/ portadores de K) frente a los alelos menos favorables (Homocigotos CC/ homocigotos AA/ homocigotos RR), se observó que los individuos portadores de los genotipos favorables mostraban un descenso estadísticamente significativo de un 6,3% en el IMC (Tabla 4.89).

Tabla 4.89. Efecto del genotipo más favorable frente genotipo menos favorable y de la combinación de estos genotipos sobre el IMC, de los polimorfismos rs7903146 del gen de TCF7L2, rs1036852 del gen de PRKAB2 y R219K del gen de ABCA1, en población PREDIMED en el nodo de Valencia.

Polimorfismo	Genotipo	n	IMC	Diferencia(%) ¹	P ²
rs7903146	CC	387	30,8 ± 4,7	2,7	0,013
	Portadores T	611	30,0 ± 4,2		
rs1036852	AA	227	30,8 ± 4,1	2,0	0,061
	Portadores G	816	30,2 ± 4,4		
R219K	RR	563	30,5 ± 4,4	1,7	0,073
	Portadores K	471	30,0 ± 4,4		
Combinación ³	CC/AA/R R	43	32,0 ± 4,4	6,3	0,011
	Port T/Port G/Port K	202	30,1 ± 4,3		

¹ Porcentaje de diferencia de IMC entre los genotipos más y menos favorables; ² indica p-valor obtenido con una prueba T-Student para comparar medias; ³ Combinación de genotipos más favorables de rs7903146 de TCF7L2, rs1036852 de PRKAB2 y R219K de ABCA1 frente a los menos favorables (Port= Portadores).

4.2.5.3. Estudio de combinaciones genotípicas de polimorfismos que se han asociado con concentración plasmática de glucosa.

Los polimorfismos rs7903146 y rs12255372 del gen de TCF7L2 mostraron asociación con la concentración plasmática de glucosa en la población de PREDIMED del nodo de Valencia. En la tabla 4.90 se muestra para ambos polimorfismos, el efecto del genotipo homocigoto salvaje (CC o GG) frente al homocigoto mutado (TT en ambos casos), sobre la concentración de glucosa. Los homocigotos mutados TT mostraron un 7,7% más de glucosa que los homocigotos salvajes CC para el polimorfismo rs7903146. En el caso del polimorfismo rs12255372, el incremento fue de un 7,1%. Se estudió también la diferencia en el efecto sobre la concentración de glucosa entre individuos portadores de genotipos homocigotos salvajes para ambos polimorfismos (CC/GG) frente a los individuos portadores de los genotipos mutados (TT/TT) (Tabla 4.90). La diferencia entre ambos fue de 9,3%. En todos los casos, los incrementos en la concentración de glucosa fueron estadísticamente significativos.

Tabla 4.90. Efecto del genotipo homocigoto mutado frente al homocigoto salvaje y de la combinación de estos genotipos sobre los niveles plasmáticos de glucosa, de los polimorfismos rs7903146 y rs12255372 del gen de TCF7L2 en población PREDIMED en el nodo de Valencia.

Polimorfismo	Genotipo	n	Glucosa	Diferencia(%) ¹	P ²
rs7903146	CC	387	115,3 ± 36,7	7,7	0,027
	TT	149	124,2 ± 43,6		
rs12255372	GG	265	114,5 ± 35,3	7,1	0,016
	TT	158	121,6 ± 39,0		
Combinación ³	CC/GG	322	114,7 ± 35,5	9,3	0,014
	TT/TT	110	125,4 ± 47,8		

¹ Porcentaje de diferencia en la concentración de glucosa entre los genotipos más y menos favorables. ² Indica p-valor obtenido con una prueba T-Student para comparar medias; ³ Combinación de genotipos más favorables de rs7903146 y rs12255372 frente a los menos favorables.

Por otro lado, también se examinó el efecto sobre la concentración de glucosa en individuos portadores de los alelos de riesgo de ambos polimorfismos frente a homocigotos salvajes, además, de la combinación de genotipos (Tabla 4.91). En el caso del polimorfismo rs7903146, el incremento en la concentración de glucosa fue de 5,7%, en el del polimorfismo rs12255372 de 6,4%, y en la combinación de genotipos (Homocigotos salvajes CC/GG vs portadores del alelo T en ambos polimorfismos) fue de 7,9%.

Tabla 4.91. Efecto del genotipo homocigoto salvaje frente portadores del alelo mutado y de la combinación de estos genotipos sobre los niveles plasmáticos de glucosa, de los polimorfismos rs7903146 y rs12255372 del gen de TCF7L2 en población PREDIMED en el nodo de Valencia.

Polimorfismo	Genotipo	n	Glucosa	Diferencia(%) ¹	P ²
rs7903146	CC	387	115,3 ± 36,7	5,7	0,022
	Portadores T	611	121,9 ± 40,3		
rs12255372	GG	265	114,5 ± 35,3	6,4	0,003
	Portadores T	568	121,8 ± 40,1		
Combinación ³	CC/GG	252	115,1 ± 35,8	7,9	0,007
	Port T/Port T	524	122,6 ± 40,5		

¹ Porcentaje de diferencia en la concentración de glucosa entre los genotipos más y menos favorables; ² indica p-valor obtenido con una prueba T-Student para comparar medias; ³ Combinación de genotipos más favorables de rs7903146 y rs12255372 frente a los menos favorables (Port= Portadores).

El polimorfismo R219K del gen de ABCA1 también mostró asociación con niveles de glucosa. Los portadores del alelo K presentaron menores niveles de glucosa, concretamente un 4,6% menos (Tabla 4.92). Así pues, se estudió el efecto combinado de los polimorfismos rs7903146 y rs12255372 del gen de TCF7L2 y el polimorfismo R219K del gen de ABCA1 sobre los niveles de glucosa (Tabla 4.92). Se compararon los portadores de los genotipos favorables (CC/GG/Portadores del alelo K) frente a los genotipos de riesgo (Portadores del alelo T/ portadores del alelo T/ RR) de los polimorfismos rs7903146, rs12255372 y R219K respectivamente. Los individuos portadores de los genotipos de riesgo mostraron un incremento de un 13,6% en los niveles de glucosa.

El polimorfismo C677T del gen de MTHFR también mostró asociación con niveles de glucosa. Los portadores del alelo T presentaron mayor concentración de glucosa, concretamente un 5,5% más. Así también, se estudió el efecto al combinar genotipos de riesgo y favorables de los polimorfismos rs7903146 y rs12255372 del gen de TCF7L2 y el polimorfismo C677T del gen de MTHFR (Tabla 4.92). Los individuos portadores de los genotipos de riesgo (portadores del alelo T en los 3 polimorfismos) en comparación con los individuos portadores de los genotipos favorables (homocigotos salvajes en los 3 polimorfismos CC/GG/CC) mostraron un incremento de un 9,8% en la concentración de glucosa.

Tabla 4.92. Efecto del genotipo más favorable frente genotipo menos favorable y de la combinación de estos genotipos sobre el los niveles plasmáticos de glucosa, de los polimorfismos rs7903146 y rs12255372 del gen de TCF7L2, R219K del gen de ABCA1 y C677T del gen de MTHFR en población PREDIMED en el nodo de Valencia.

Polimorfismo	Genotipo	n	Glucosa	Diferencia(%) ¹	P ²
rs7903146	CC	387	115,3 ± 36,7	5,7	0,022
	Portadores T	611	121,9 ± 40,3		
rs12255372	GG	265	114,5 ± 35,3	6,4	0,003
	Portadores T	568	121,8 ± 40,1		
R219K	RR	563	121,7 ± 38,6	4,6	0,027
	Portadores K	471	116,3 ± 38,7		
C677T	CC	349	115,2 ± 37,3	5,5	0,016
	Portadores T	685	121,5 ± 37,3		
Combinación ³	CC/GG/Port K	141	110,5 ± 33,1	13,6	<0,001
	Port T/Port T/RR	281	125,5 ± 41,0		
Combinación ⁴	CC/GG/CC	112	114,4 ± 33,9	9,8	0,008
	PortT/PortT/PortT	353	125,7 ± 40,9		

¹ Porcentaje de diferencia en la concentración de glucosa entre los genotipos más y menos favorables; ² indica p-valor obtenido con una prueba T-Student para comparar medias; ³ Combinación de genotipos más favorables de rs7903146 y rs12255372 de TCF7L2 y R219K de ABCA1 frente a los menos favorables ⁴ Combinación de genotipos más favorables de rs7903146 y rs12255372 de TCF7L2 y C677T de MTHFR frente a los menos favorables (Port= Portadores).

4.2.6 Estudio de posibles interacciones gen*gen sobre fenotipos intermedios

En este apartado se presentarán los resultados de la interacción gen*gen entre el polimorfismo TaqIB del gen de CETP y E2/E3/E4 del gen de ApoE y la interacción entre las variantes TaqIB y rs183130 del gen de CETP y el polimorfismo -514 C/T de LIPC, sobre los niveles de c-HDL, en población de alto riesgo cardiovascular.

4.2.6.1 Estudio de interacciones gen*gen entre los polimorfismo TaqIB del gen de CETP y E2/E3/E4 del gen de ApoE sobre los niveles de c-HDL.

En la población PREDIMED del nodo de Valencia, los portadores del alelo B2 del polimorfismo TaqIB del gen de la CETP mostraron mayores concentraciones de c-HDL que

los individuos B1B1. Sin embargo, no se encontró asociación entre el polimorfismo E2/E3/E4 del gen de ApoE, con los niveles de c-HDL.

Tras el análisis de la interacción gen*gen entre el polimorfismo TaqIB localizado en el gen de CETP y el polimorfismo E2/E3/E4 de APOE sobre los niveles de c-HDL, no se encontró una interacción gen*gen estadísticamente significativa (Pinteracción=0,707) (Figura 4.24).

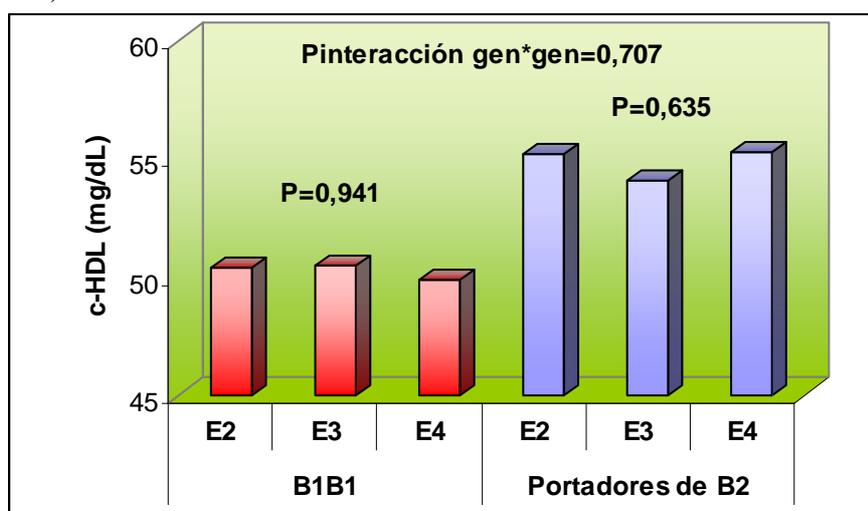


Figura 4.24. Medias de c-HDL (mg/dL) según los polimorfismos TaqIB en el gen de CETP y E2/E3/E4 en el gen de ApoE en la población PREDIMED del nodo de Valencia.

Tanto en individuos con genotipo B1B1 del polimorfismo de CETP como en portadores del alelo B2, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de c-HDL según el polimorfismo E2/E3/E4 de APOE. En los individuos B1B1 las medias de c-HDL según el polimorfismo de APOE fueron: E2 50,4±14,4 mg/dL, E3 50,5±12,9 mg/dL, E4 49,9±10,6 mg/dL, p=0,941. En los portadores del alelo B2 las medias fueron: E2 55,2±13,7 mg/dL, E3 54,1±13,2 mg/dL, E4 55,3±12,9 mg/dL, p=0,635.

4.2.6.2 Estudio de interacciones gen*gen entre los polimorfismos TaqIB y rs183130 del gen de CETP y -514 C/T del gen LIPC sobre los niveles de c-HDL.

En la población PREDIMED del nodo de Valencia, los portadores del alelo B2 del polimorfismo TaqIB y del alelo T del polimorfismo rs183130 del gen de CETP mostraron mayores niveles de c-HDL que los individuos B1B1 y CC respectivamente. Sin embargo, no se encontró asociación entre el polimorfismo -514C/T de LIPC con c-HDL. Tras realizar el estudio de interacciones gen*gen, no se encontró interacción entre los polimorfismos

TaqIB del gen de CETP y -514C/T de LIPC, sobre los niveles de c-HDL (Pinteracción $\text{gen}^*\text{gen}= 0,494$) (Figura 4.25). Tanto en individuos con genotipo B1B1 como en portadores del alelo B2 de TaqIB, el polimorfismo -514C/T de LIPC no mostró asociación con c-HDL. En los individuos B1B1 las medias de c-HDL según el polimorfismo de LIPC fueron: CC $50,1\pm 13,5$ mg/dL, CT+TT $50,3\pm 11,3$ mg/dL, $p=0,917$. En los portadores del alelo B2 las medias fueron: CC $53,9\pm 13,1$ mg/dL, CT+TT $55,2\pm 13,1$ mg/dL, $p=0,223$.

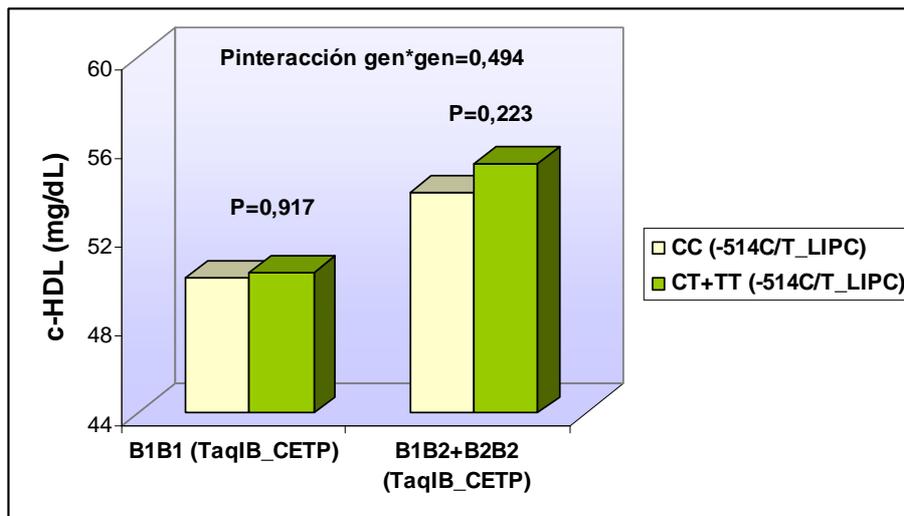


Figura 4.25. Medias de c-HDL (mg/dL) según los polimorfismos TaqIB en el gen de CETP y -514C/T en el gen LIPC en la población PREDIMED del nodo de Valencia.

Sin embargo, se encontró una interacción estadísticamente significativa entre los polimorfismos rs183130 del gen de CETP y -514C/T de LIPC, sobre los niveles de c-HDL (Pinteracción $\text{gen}^*\text{gen}= 0,010$) (Figura 4.26). Concretamente, el polimorfismo -514C/T solo se asoció con mayores niveles de c-HDL en individuos portadores del alelo T del polimorfismo rs183130 de CETP. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de c-HDL entre los portadores del alelo T y los homocigotos CC del polimorfismo -514 C/T, en individuos con genotipo CC del polimorfismo rs183130 del gen de CETP. Así pues, en los individuos CC (rs183130_CETP) las medias de c-HDL según el polimorfismo de LIPC fueron: CC $51,7\pm 14,2$ mg/dL, CT+TT $50,8\pm 11,6$ mg/dL, $p=0,439$. En los portadores del alelo T (rs183130_CETP) las medias fueron: CC $53,1\pm 12,2$ mg/dL, CT+TT $56,6\pm 13,1$ mg/dL, $p=0,004$. Los portadores del alelo T en ambos polimorfismos presentaron un incremento de 9,5% en la concentración de c-HDL con respecto a los individuos homocigotos CC para ambos polimorfismos (CC/CC).

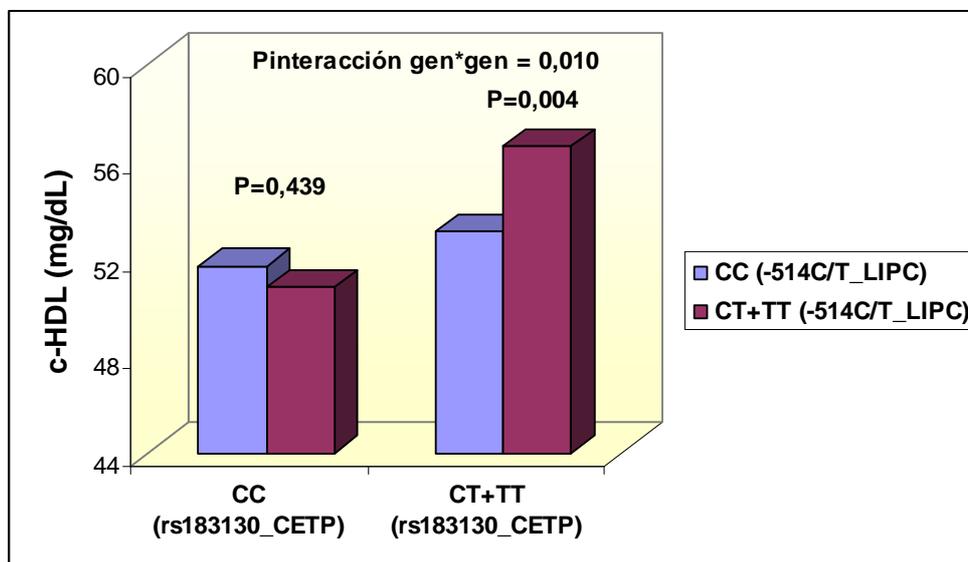


Figura 4.26. Medias de c-HDL (mg/dL) según los polimorfismos rs183130 en el gen de CETP y -514C/T en el gen LIPC en la población PREDIMED del nodo de Valencia.

4.3 Estudio EPIC

4.3.1 Características de la población

En la tabla 4.93 se muestran las características demográficas, antropométricas, clínicas, bioquímicas y en la tabla 4.94 las características dietéticas y de estilo de vida en los casos (n=557) y en los controles (n=1180).

Los casos presentan mayor nivel de IMC y peor perfil lipídico que los controles. Además, la prevalencia de obesos, individuos con bajo nivel de c-HDL, diabéticos, hipertensos e hipercolesterolémicos también es mayor en casos que en controles.

Tabla 4.93. Características demográficas, antropométricas, clínicas, bioquímicas, en los casos y en los controles del estudio EPIC.

	Casos (n=557)	Controles (n=1180)	P
	Media ± DS	Media ± DS	
Hombres/Mujeres	445/112	932/248	0,663
Edad (años)	53,9 ± 7,3	53,8 ± 7,2	0,702
IMC(kg/m²)	29,2 ± 3,5	28,7 ± 3,7	0,004
CT (mg/dL)*	235,8 ± 37,2	221,0 ± 35,1	<0,001
c-LDL (mg/dL)*	164,6 ± 29,9	152,7 ± 28,2	<0,001
c-HDL (mg/dL)*	49,7 ± 15,4	53,8 ± 14,8	<0,001
TG (mg/dL)**	156,6 ± 114,8	123,8 ± 86,5	<0,001
Obesidad; n (%)	203 (36,4)	360 (30,5)	0,014
c-HDL bajo*** ; n (%)	168 (33,2)	210 (19,5)	<0,001
Diabetes; n (%)	61 (11,0)	85 (7,2)	0,009
Hipertensión; n (%)	192 (34,5)	279 (23,7)	<0,001
Hiperlipidemia; n (%)	224 (43,3)	293 (24,9)	<0,001

IMC: Índice de masa corporal; CT: colesterol total; c-LDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; c-HDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos; *Medido en 1584 individuos a (506 casos y 1078 controles). ** Medido en 996 muestras obtenidas de individuos en ayunas. *** c-HDL bajo: < 40 mg/dL en hombres y < 50 mg/dL en mujeres. P: P valor para obtener diferencias entre casos y controles mediante una prueba T-Student para comparar medias de variables continuas y con un test de Chi- Cuadrado para comparar variables categóricas.

Los casos y controles también difieren en el consumo de AGS, AGM y la ingesta de alcohol, de modo que la prevalencia de no bebedores en los casos es mayor que la de los controles. La prevalencia de fumadores también es más elevada en los casos que en los controles.

Tabla 4.94. Características dietéticas y de estilo de vida en casos y controles del estudio EPIC.

	Casos (n=557) Media ± DS	Controles (n=1180) Media ± DS	P
Ingesta energética (Kcal/d)	2454,8 ± 772,6	2519,6 ± 756,6	0,098
Grasa total (% energía)	35,7 ± 5,9	36,2 ± 6,0	0,112
AGS (% energía)	10,5 ± 2,8	10,9 ± 2,9	0,015
AGM (% energía)	15,2 ± 3,7	15,7 ± 3,6	0,009
AGP (% energía)	6,3 ± 2,6	6,0 ± 2,5	0,062
Ingesta alcohol (g/d)	24,7 ± 31,7	27,2 ± 32,6	0,011
Alcohol bebedores (g/d)	32,9 ± 32,6	32,7 ± 33,1	0,912
Bebedores n (%)			
No bebedores	139 (25,0)	197 (16,7)	<0,001
Consumo moderado	220 (39,5)	509 (43,1)	
Consumo elevado	198 (35,5)	474 (40,2)	
Ingesta grasa > 30%, n (%)	461 (82,8)	1008 (85,4)	0,152
AGS > 10%; n (%)	307 (55,1)	678 (57,5)	0,358
Tabaco; n (%)			
Fumadores	270 (48,7)	399 (33,8)	<0,001
Exfumadores	109 (19,6)	268 (22,7)	
Nunca fumador	176 (31,7)	512 (43,5)	
Actividad física; n (%)			
Inactivo	168 (30,7)	315 (27,6)	0,183
Moderadamente inactivo	184 (33,6)	358 (31,3)	
Moderadamente activo	120 (21,9)	282 (24,7)	
Activo	75 (13,7)	188 (16,4)	

AGS: ácidos grasos saturados; AGM: ácidos grasos monoinsaturados; AGP: ácidos grasos poliinsaturados. P: P valor para obtener diferencias entre casos y controles mediante una prueba T-Student para comparar medias de variables continuas y con un test de Chi- Cuadrado para comparar variables categóricas.

4.3.2 Estudio de asociación entre polimorfismos en genes candidatos y fenotipos finales de ECV. Polimorfismo TaqIB de la CETP y riesgo de CI.

El polimorfismo TaqIB de la CETP se asoció fuertemente con mayor concentración de c-HDL tanto en casos como en controles (Tabla 4.95).

Tabla 4.95. Asociación entre el polimorfismo TAqIB de la CETP y lípidos plasmáticos en casos incidentes de cardiopatía isquémica (CI) y controles a nivel basal en el estudio EPIC.

	Casos (n=506)		Controles (n=1078)	
	n	Media ± DS	n	Media ± DS
CT (mg/dL)				
B1B1	205	236,8 ± 39,6	446	220,0 ± 36,9
B1B2	225	236,4 ± 36,3	491	221,3 ± 34,2
B2B2	76	231,7 ± 33,1	141	223,5 ± 32,6
		P ¹ : 0,565 P ² : 0,303		P ¹ : 0,587 P ² : 0,311
c-LDL (mg/dL)				
B1B1	205	165,4 ± 31,8	446	151,9 ± 29,6
B1B2	225	165,1 ± 29,2	491	152,9 ± 27,5
B2B2	76	161,3 ± 26,6	141	154,7 ± 26,2
		P ¹ : 0,565 P ² : 0,304		P ¹ : 0,587 P ² : 0,311
c-HDL* (mg/dL)				
B1B1	204	47,7 ± 13,6	446	51,7 ± 13,7
B1B2	224	49,3 ± 13,3	491	54,9 ± 15,5
B2B2	76	54,0 ± 17,6	141	56,6 ± 14,4
		P ¹ : 0,018 P ² : 0,005		P ¹ : <0,001 P ² : 0,001
TG (mg/dL)				
B1B1	128	164,9 ± 118,8	277	126,0 ± 101,7
B1B2	149	145,6 ± 114,4	316	124,2 ± 78,6
B2B2	46	169,0 ± 103,2	80	114,3 ± 52,3
		P ¹ : 0,033 P ² : 0,739		P ¹ : 0,927 P ² : 0,698

*Dos outliers fueron excluidos ya que presentaban concentraciones de c-HDL > 140 mg/dL. P1: p valor de comparación de medias en un modelo no ajustado mediante una prueba ANOVA; P2: p valor obtenido de una prueba de tendencia lineal entre genotipos.

Por otro lado, se estimó el riesgo de presentar concentración baja de c-HDL asociado al polimorfismo TaqIB ya que se considera un FR cardiovascular. Se observó que dicho polimorfismo era un fuerte predictor de presentar bajo nivel de c-HDL. Considerando los individuos B1B1 como referencia, el riesgo de presentar concentración baja de c-HDL disminuyó a medida que aumentaron los alelos B2 (OR=0,66 IC95% (0,51-0,85), para B1B2 y OR=0,46 IC95% (0,30-0,69) para B2B2).

Con respecto a la asociación del polimorfismo TaqIB con la incidencia de CI (Tabla 4.96), no se observó un efecto protector del alelo B2 sobre el riesgo de CI tanto estudiando los genotipos con alelo B2 (OR para B1B2: 0,99; P=0,929, OR para B2B2: 1,15; P=0,364, ajustado según Modelo 1) como considerando los portadores del alelo B2 en conjunto (OR=1,03; P=0,796). Estos resultados no cambiaron tras realizar adicionales ajustes con variables incluidas en el Modelo 2, 3 y 4.

Tabla 4.96. Asociación entre el polimorfismo TaqIB y cardiopatía isquémica incidente. Análisis de regresión logística.

CETP	n	Modelo 1*		n	Modelo 2**	
		OR CI95%	P		OR CI95%	P
B1B1	706	1,00(referencia)		706	1,00(referencia)	
B1B2	784	0,99(0,08-1,23)	0,929	784	1,00(0,08-1,26)	0,975
B2B2	247	1,15(0,85-1,57)	0,364	247	1,12(0,82-1,55)	0,471
		P ¹ : 0,595			P ¹ : 0,747	
CETP	n	Modelo 3***		n	Modelo4****	
		OR CI95%	P		OR CI95%	P
B1B1	706	1,00(referencia)		706	1,00(referencia)	
B1B2	784	1,00(0,08-1,26)	0,982	784	1,07(0,84-1,37)	0,589
B2B2	247	1,16(0,84-1,61)	0,374	247	1,29(0,91-1,84)	0,148
		P ¹ : 0,638			P ¹ : 0,352	
CETP	n	Modelo 1*		n	Modelo 2**	
		OR CI95%	P		OR CI95%	P
B1B1	706	1,00(referencia)		706	1,00(referencia)	
Alelo B2	1031	1,03(0,84-1,26)	0,796	1031	1,03(0,83-1,28)	0,772
CETP	n	Modelo 3***		n	Modelo4****	
		OR CI95%	P		OR CI95%	P
B1B1	706	1,00(referencia)		706	1,00(referencia)	
Alelo B2	1031	1,04(0,84-1,29)	0,773	1031	1,12(0,89-1,41)	0,344

* Modelo ajustado por sexo y edad; **Modelo ajustado por sexo, edad, IMC, DMT2, dislipemia, HTA, consumo de tabaco y de alcohol; *** Modelo ajustado por sexo, edad, IMC, DMT2, dislipemia, HTA, consumo de tabaco y de alcohol, actividad física, ingesta de grasa total y energía total; ****Modelo ajustado por las variables incluidas en el modelo 3 más la concentración de c-HDL.

4.3.3 Estudio de posibles interacciones gen-ambiente sobre fenotipos finales. Modulación del efecto del polimorfismo TaqIB de la CETP sobre el riesgo de CI por el consumo de alcohol.

En el apartado 4.3.2 se mostró que el polimorfismo TaqIB de la CETP se asocia con mayor concentración de c-HDL pero no con menor riesgo de CI. Tras obtener estos resultados se pensó estudiar la modulación de dicho efecto por el consumo de alcohol.

Al analizar el efecto sobre la concentración de c-HDL, no se observó una interacción estadísticamente significativa en controles (P interacción TaqIB-CETP*consumo de alcohol = 0,669). Tanto en bebedores como en no bebedores, la media de c-HDL fue mayor en individuos B2B2 (P<0,05). Tras ajustar por actividad física, ingesta energética y grasas totales los resultados no variaron (P interacción TaqIB-CETP*consumo de alcohol = 0,549). Tampoco se observó una interacción estadísticamente significativa cuando se utilizó la variable de consumo de alcohol con 3 categorías (no consumo, moderado y alto) en lugar de la dicotómica (P interacción TaqIB-CETP*consumo de alcohol = 0,830, modelo ajustado). En los casos tampoco se observó una interacción estadísticamente significativa entre el consumo de alcohol y el polimorfismo TaqIB de la CETP para determinar la concentración de c-HDL (P interacción TaqIB-CETP*consumo de alcohol = 0,666, modelo ajustado).

Para analizar el efecto sobre el riesgo de CI se realizó un análisis estratificado utilizando la variable dicotómica de consumo de alcohol (Tabla 4.97). Se observó que en no bebedores, los genotipos B1B2 y B2B2 se asociaban con menor riesgo de CI pero sin alcanzar la significación estadística. La OR para el genotipo B2B2 en un modelo multivariante ajustado, en no bebedores fue: 0,49 IC95%(0,22-1,09), P=0,081. Sin embargo, en bebedores, estos genotipos se asociaron con mayor riesgo, quedando dicha asociación en el límite de la significación estadística. La interacción entre el consumo de alcohol y el genotipo B2B2 para determinar el riesgo de CI fue estadísticamente significativa con el Modelo 1 (P=0,033) y el Modelo 2 (P=0,031). Tras ajustar estos dos modelos por la concentración de c-HDL (para mostrar si el polimorfismo TaqIB de la CETP influye sobre el riesgo de CI independientemente de la concentración de c-HDL), el incremento de riesgo de CI asociado a individuos con genotipos B2B2 bebedores permaneció estadísticamente significativo (OR: 1,55 IC 95%(1,05-2,29), P=0,026).

También, se analizó si el efecto protector del consumo de alcohol sobre el riesgo de CI observado en la población estudiada (OR: 0,56 IC95%(0,43-0,72), P<0,001), se presentaba en todos los genotipos del polimorfismo TaqIB de la CETP o no. Se encontró que en los individuos B1B1, el consumo de alcohol (consumo vs no consumo) se asociaba de forma estadísticamente significativa con menor riesgo de CI (OR: 0,42 IC95%(0,27-0,67), P<0,001). Sin embargo, en individuos B2B2, el consumo de alcohol no se asoció con bajo riesgo de CI (OR: 1,07 IC 95%(0,46-2,51), P=0,863).

Tabla 4.97. Asociación entre el polimorfismo TaqIB y cardiopatía isquémica incidente según el consumo de alcohol (bebedores y no bebedores). Análisis de regresión logística.

		Modelo 1*		Modelo 2**		Modelo 3***	
No bebedores							
CETP	n	OR IC95%	P	OR IC95%	P	OR IC95%	P
B1B1	62/74	1,00(referencia)		1,00(referencia)		1,00(referencia)	
B1B2	61/90	0,80(0,49-1,28)	0,343	0,74(0,44-1,24)	0,253	0,74(0,42-1,32)	0,311
B2B2	16/33	0,60(0,30-1,19)	0,141	0,49(0,22-1,09)	0,081	0,57(0,24-1,34)	0,197
Bebedores							
CETP	n	OR IC95%	P	OR IC95%	P	OR IC95%	P
B1B1	162/408	1,00(referencia)		1,00(referencia)		1,00(referencia)	
B1B2	186/447	1,17(0,90-1,55)	0,684	1,06(0,82-1,38)	0,650	1,17(0,90-1,55)	0,252
B2B2	70/128	1,38(0,98-1,95)	0,065	1,39(0,97-1,99)	0,076	1,55(1,05-2,29)	0,026

n: se refiere a casos/controles. * Modelo 1 ajustado por sexo y edad; **Modelo 2 ajustado por sexo, edad, IMC, DMT2, dislipemia, HTA, consumo de tabaco, actividad física, ingesta energética y de grasa total; ***Modelo ajustado por las variables incluidas en el modelo 2 más la concentración de c-HDL.

Además, se estudiaron variables relacionadas con el consumo de alcohol y se detectó que el porcentaje de consumidores de alcohol era menor ($P=0,003$) en diabéticos que en no diabéticos (71,2% vs 81,5% respectivamente). Así pues, se investigó si la DMT2 podría tener influencia sobre los resultados obtenidos. La asociación entre el polimorfismo TaqIB y el riesgo de CI se analizó en diabéticos y no diabéticos (Tabla 4.98). A pesar del bajo consumo de alcohol en diabéticos, se observó que los diabéticos portadores del alelo B2 presentaban mayor riesgo de CI y que este riesgo aumentaba con el número de alelos B2 (OR para B1B2: 2,96; $P=0,043$, y OR para B2B2: 8,18; $P=0,009$, en comparación con individuos B1B1). La interacción entre la DMT2 y el genotipo B2B2 de la CETP que modula el riesgo de CI fue estadísticamente significativa tanto para el Modelo 1 ($P=0,040$) como el Modelo 2 ($P=0,046$).

Sin embargo, no se observó una modificación del efecto al analizar la posible modulación de la concentración de c-HDL por la interacción entre el polimorfismo TaqIB y la DMT2, mostrando que el mecanismo a través del cual el alelo B2 incrementa el riesgo de CI en diabéticos es independiente de la cantidad de c-HDL.

Tabla 4.98. Asociación entre el polimorfismo TaqIB y cardiopatía isquémica incidente en diabéticos y no diabéticos. Análisis de regresión logística.

		Modelo 1*		Modelo 2**	
Diabéticos					
CETP	n	OR IC95%	P	OR IC95%	P
B1B1	19/34	1,00(referencia)		1,00(referencia)	
B1B2	31/43	2,96(1,03-8,45)	0,043	0,74(0,44-1,24)	0,253
B2B2	11/8	8,18(1,69-39,65)	0,009	0,49(0,22-1,09)	0,081
No diabéticos					
CETP	n	OR IC95%	P	OR IC95%	P
B1B1	205/446	1,00(referencia)		1,00(referencia)	
B1B2	216/496	0,95(0,75-1,22)	0,709	1,02(0,79-1,31)	0,897
B2B2	75/153	1,06(0,75-1,49)	0,743	1,16(0,81-1,68)	0,414

n: se refiere a casos/controles. * Modelo 1 ajustado por sexo, edad, IMC, DMT2, dislipemia, HTA, consumo de tabaco y de alcohol, actividad física, ingesta de grasa total y energía total; **Modelo ajustado por las variables incluidas en el modelo 2 más la concentración de c-HDL.

En este capítulo se realiza, en primer lugar, la discusión de los resultados obtenidos en el estudio piloto del proyecto PREDIMED, del estudio de validación del CFCA utilizado en dicho proyecto (estudio VALFRECO), las características generales, los factores ambientales o del estilo de vida de la población del estudio PREDIMED en el nodo de Valencia y la población del estudio EPIC y, finalmente, se trata cada uno de los genes analizados y las interacciones gen*ambiente y gen*gen obtenidas.

5.1 Discusión del estudio piloto del proyecto PREDIMED

Puesto que la evidencia científica que existe actualmente de los efectos de la DM ha sido obtenida, mayoritariamente, por estudios observacionales (Serra-Majem L et al, 2006), el estudio PREDIMED fue diseñado con el propósito de proporcionar evidencias de primer nivel sobre el efecto de la DM en la prevención primaria cardiovascular.

Un proyecto tan ambicioso como el estudio PREDIMED requiere un metodología bien definida y herramientas de obtención de datos, de procesamiento y de gestión, así como técnicas de laboratorio bien estudiadas y validadas, para optimizar su funcionamiento y obtener resultados fiables. Para ello, se realizó un estudio piloto con los primeros participantes de todos los nodos a los que se les realizó un seguimiento de tres meses, con el que, además de optimizar protocolos y procesos, validar instrumentos y herramientas, llevar a cabo puestas a punto de técnicas de laboratorio, seleccionar las técnicas de análisis estadístico apropiadas, así como elaborar sistemas de gestión que ayuden al buen funcionamiento del proyecto, se pretendía evaluar el cumplimiento y la eficacia de la intervención dietética y obtener resultados preliminares acerca de los efectos de la DM sobre fenotipos intermedios de riesgo cardiovascular.

En este trabajo se han presentado los resultados del estudio piloto realizado en el nodo de Valencia y los del estudio PREDIMED general incluyendo todos los

nodos participantes. Los resultados obtenidos en ambas poblaciones son similares. Dado que el tamaño de muestra en el PREDIMED general es mayor que el de la población del nodo de Valencia, se consigue mayor poder estadístico y mayor es la probabilidad de encontrar diferencias estadísticamente significativas entre la visita inicial y a los 3 meses de seguimiento, sobretudo en el caso del grupo DM+AOVE donde el tamaño de muestra en la población del nodo de Valencia es menor.

Tras 3 meses de intervención, se ha constatado la buena adherencia a las instrucciones dietéticas de cada uno de los grupos mediante la puntuación en el cuestionario de adherencia a la DM de 14 puntos y la determinación de marcadores biológicos de cumplimiento dietético como polifenoles (hidroxitirosol y tirosol) en orina. Cabe destacar que el incremento en la puntuación media en el grupo de DM+FS es mayor que la del grupo DM+AOVE manifestando que los participantes del grupo DM+FS consumen de manera cotidiana aceite de oliva y que han incorporado a la dieta los FS. Además, los resultados mostraron que los participantes del grupo de DM+AOVE han aumentado el consumo de AOVE sustituyendo el aceite de oliva no virgen u otros aceites por el AOVE. Así pues, la provisión gratuita de AOVE y FS, así como la motivación adquirida tras la intervención dietética de forma individual y a través de las reuniones grupales, fueron efectivas para mejorar los hábitos dietéticos hacia un patrón dietético más saludable. Además, el aumento en la puntuación en el cuestionario adherencia a la DM es clínicamente importante ya que se ha observado que, el incremento en 2 puntos en la adherencia a la DM, reduce en un 9% la mortalidad total y la mortalidad debida a ECV (Sofi F et al, 2008). Tanto el grupo DM+AOEV como DM+FS aumentaron en más de 2 puntos su puntuación.

Por otro lado, si la DM es útil para la prevención primaria de ECV, cabe esperar que personas que consuman esta dieta muestren una reducción en los FR para aterosclerosis. En nuestro estudio, los resultados mostraron que individuos con elevado riesgo cardiovascular, que han mejorado su adherencia a la DM después de una educación nutricional y además han incorporado a su dieta suplementos de AOVE y FS, desarrollan un perfil lipídico, de glucemia y marcadores de inflamación más favorable que aquellos que consumen una dieta baja en grasa.

La DM se caracteriza por ser rica en AGM debido a la gran cantidad de aceite de oliva usado en las culturas mediterráneas (Willet WC et al, 1995, Martínez-González MA et al, 2004(a)). Existe evidencia científica que constata el efecto beneficioso de las dietas ricas en AGM sobre FR cardiovascular, obesidad y DMT2 (Keys A et al, 1970, Martínez-González MA et al, 2004(a), Kris-Etherton PM, 1999, Sabaté J, 2003, Ros E, 2003). Sin embargo, cuando se proporcionan recomendaciones dietéticas a individuos con sobrepeso u obesos, se evitan las dietas con elevado porcentaje de grasa, aunque provenga de AGM, como

alternativa a la dieta tradicional baja en grasa, bajo la premisa de que el exceso de grasa promueve la obesidad. Sin embargo, algunos estudios han mostrado que la DM puede tener un efecto favorable sobre la ganancia de peso (García-Lorda P et al, 2003, Sabaté J, 2003, Jiang R et al, 2006, Mc Manus K et al, 2001, Schroder H et al, 2004, Trichopoulou A et al, 2005(a), Méndez MA et al, 2006) aunque este efecto no ha sido consistentemente demostrado (Malik VS et al, 2007, Serra-Majem et al, 2006). Nuestros resultados contribuyen a aumentar la evidencia de que una dieta tipo mediterráneo con suplementos, que añaden una cantidad considerable de grasas insaturadas que provienen del AOVE y FS, no induce ganancia de peso. García-Lorda P et al (2003) comprobaron, en un estudio de corta duración, que la incorporación de FS a la dieta, en cantidades de hasta 50 g diarios, no incrementa el peso. En otros estudios a medio plazo con suplementos diarios de FS, no se ha observado ningún incremento de peso apreciable (Rajaram S et al, 2006). Ello se ha atribuido, en gran parte, a la compensación del aporte de energía procedente de los FS por su efecto saciante y, en menor medida, a una malaabsorción de la grasa contenida en ellos, menos biodisponible que otras grasas, debido a que se halla contenida dentro de membranas celulares, sobre todo si los FS no se mastican bien (García-Lorda P et al, 2003, Rajaram S et al, 2006).

Por otra parte, los niveles de glucosa disminuyeron en los participantes incluidos en los grupos de intervención con DM y no en el grupo de dieta baja en grasa. La DMT2 se ha asociado con un exceso de ingesta energética, particularmente en forma de AGS y azúcares simples que incrementan la adiposidad (Franz MJ et al, 2002). De este modo, de forma tradicional, se han recomendado dietas bajas en grasa y con un aumento de la carga de hidratos de carbono para pacientes diabéticos. Sin embargo, tales dietas pueden empeorar el control metabólico, efecto que no se ha observado en dietas con elevado nivel de grasa procedente de AGM del aceite de oliva o nueces (Ros E, 2003). Algunos estudios han comprobado dichos efectos. Jiang R et al (2002) comprobaron que el consumo frecuente de FS se asocia inversamente al riesgo de DMT2. En un estudio transversal llevado a cabo en población adulta (1514 varones y 1529 mujeres), se observó una asociación inversa entre adherencia a la DM y parámetros relacionados con la homeostasis de la glucosa (glucemia, insulinemia, resistencia a la insulina); sin embargo, tras ajustar por edad, sexo y variables relacionadas con la adiposidad, riesgo cardiovascular y estilo de vida la asociación sólo se mantuvo en pacientes con normoglucesmia (Panagiotakos DB et al, 2007). En un estudio aleatorizado controlado de intervención (DIRECT), en el que 322 participantes obesos fueron asignados de manera aleatoria a 3 grupos, dieta baja en grasa, dieta baja en hidratos de carbono y DM, tras 2 años de intervención, se observó que los cambios en los niveles de glucosa e insulinemia eran más favorables en el grupo de DM que en el de dieta baja en grasa, en individuos que eran diabéticos. Sin embargo, en otro estudio aleatorizado controlado de intervención (Medi-RIVAGE)

llevado a cabo con DM y dieta baja en grasa se observó que, después de 3 meses de intervención, ambas dietas disminuyeron significativamente la glucemia, insulinemia y la resistencia a la insulina, manteniéndose la insulinemia significativa tras ajustar por IMC.

Por otro lado, tras 3 meses de intervención, se observó un perfil lipídico más favorable en los grupos de intervención dietética con DM y, sin embargo, dicho perfil no cambió en el caso del grupo con dieta baja en grasa. Varios estudios transversales han mostrado que la adherencia a la DM se asocia con mejor perfil lipídico, sobretodo respecto a la concentración de CT. Así, Tzima N et al (2007) publicaron que, individuos con sobrepeso u obesidad en el tercil más alto de la puntuación a la DM, presentaban menores concentraciones de CT, tras ajustar por edad, sexo e IMC, respecto al primer tercil. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la trigliceridemia y en la concentración de c-HDL. En otro estudio, también se encontró asociación inversa entre adherencia a la DM y colesterolemia. Asimismo, individuos con obesidad abdominal y menos activos físicamente presentaron una adherencia menor a la DM junto con concentraciones de cHDL más bajas. Un estudio de cohorte prospectivo evaluó la adherencia a la DM junto con el estilo de vida en 150 individuos de edad avanzada en Grecia. Tras un año de seguimiento, se observó una asociación inversa entre hipercolesterolemia y adherencia a la DM (OR=0,77, p=0,02). En el estudio aleatorizado controlado de intervención Medi-RIVAGE, tras 3 meses de intervención, tanto en el grupo de dieta baja en grasa como en el de DM, se redujo la concentración de c-LDL y TG tras ajustar por IMC (Vicent-Baudry S et al, 2005). Los resultados mostraron también una mejora del perfil lipídico en un estudio aleatorizado cruzado de 4 semanas de duración (Ambring A et al, 2004). Se observó una disminución significativa en los niveles de CT, c-LDL y TG en el grupo que recibió una dieta basada en la mediterránea, rica en AG n-3, esteroles y fibra y baja en grasa saturada, frente al grupo que consumió una dieta habitual sueca.

Por otro lado, la intervención dietética en el grupo de DM+FS en la población del nodo de Valencia disminuyó las concentraciones de CT, c-LDL y TG. En la población del estudio PREDIMED general, además de observar estos efectos, también aumentó la concentración de c-HDL. Varios estudios han mostrado que varios tipos de FS tienen un efecto hipocolesterolémico (Zambón D et al, 2000, Kris-Etherton PM et al, 2001, Ros E et al, 2004). Así, estudios clínicos de intervención dietética a corto y medio plazo, en voluntarios sanos, han mostrado que el consumo diario de una cantidad razonable de FS tiene un efecto reductor de la colesterolemia (Kris-Etherton PM et al, 2001). En un estudio controlado con nueces en pacientes hipercolesterolémicos de ambos sexos, se observó una reducción significativa del CT y cLDL con la dieta de nueces (alrededor de 50 g al día) en comparación con una dieta control, isoenergética y con la misma

proporción de grasa total y de AGS poniendo de manifiesto que el efecto hipocolesteromiantes de las nueces es aditivo al de la DM (Zambón D et al, 2000). También Ros E et al (2004) llevaron a cabo un estudio aleatorizado cruzado, en personas con hipercolesterolemia moderada, con el objetivo de establecer si una dieta que contenía nueces (el 18% de la energía) que reemplazaban el 32% de la energía proveniente de AGM, podía mejorar marcadores relacionados con la función endotelial respecto a otra dieta típica mediterránea con un aporte similar de energía, grasa, proteínas, hidratos de carbono, pero con un aporte de grasa monoinsaturada. Tras el seguimiento de cada dieta durante 4 semanas, observaron una disminución significativa del CT y de c-LDL con la dieta que aportaba nueces. Sin embargo, no encontraron diferencias en las concentraciones de TG y cHDL, aunque sí una tendencia a la disminución en el cociente entre el cLDL y el cHDL ($p = 0,061$). Además, aunque pequeños ensayos clínicos, en los que se consume FS, no se ha observado un descenso de los niveles de TG (Kris- Etherton PM et al, 2001, Ros E et al, 2004), un estudio transversal mostró que el consumo de ácido α -linolénico está inversamente relacionado con la concentración de TG (Djoussé L et al, 2003). Esto es consistente con la disminución de los niveles de TG observado en el grupo de DM+FS, tanto en la población del nodo de Valencia como en el estudio PREDIMED general.

Así pues, mientras que dietas ricas en varios FS han mostrado una reducción en la hipercolesterolemia de manera consistente, los beneficios sobre los niveles de lípidos cuando se sustituye el aceite de oliva refinado por AOVE en una dieta no se conocen. En el estudio piloto en el nodo de Valencia, no se observó variación en el perfil lipídico tras la intervención. Posiblemente sea debido al reducido tamaño de muestra. Destaca, en la población del estudio PREDIMED general, el incremento que experimentan en la concentración de c-HDL los individuos pertenecientes al grupo DM+AOVE en comparación al grupo DM+FS. Los elementos minoritarios que contiene el AOVE, como los compuestos fenólicos y otras sustancias antioxidantes (Visiolo F et al, 2001, Beauchamp GK, et al, 2005), podrían explicar estos efectos, aspecto que sería interesante examinar en futuros estudios.

Por otro lado, la aterosclerosis se considera una enfermedad inflamatoria (Ross R, 1999, Libby P, 2002(b)). Estudios epidemiológicos, clínicos y experimentales han mostrado que la DM (Panagiotakos DB et al, 2006, Fung TT et al, 2005, Chrysohoou C et al, 2004, Esposito K et al, 2004) o el consumo frecuente de varios componentes de este patrón dietético como el aceite de oliva (Beauchamp GK et al, 2005, Carluccio MA, et al, 2003) o los FS (Jiang R et al, 2006, Ros E et al, 2004) se asocian con estado menos inflamatorio y una mejora de la función endotelial. Así, Panagiotakos DB et al (2006) encontraron asociación negativa y significativa entre adherencia a la DM y concentración de PCR. También, la puntuación más alta en los índices AHEI (Alternate Healthy Eating Index) y aMED

(alternate Mediterranean Diet index) se asociaron con menor concentración de IL-6 y PCR en el *The Nurses Health Study* (Fung TT et al, 2005). Asimismo, la puntuación sobre la DM, en el tercil más alto, se asoció con una disminución de los valores de PCR e IL-6 (Chrysohoou C et al, 2004). Además, Esposito K et al (2004), en un estudio realizado en Italia con 180 individuos con síndrome metabólico, observaron un descenso significativo en la concentración de PCR e IL-6 en el grupo de intervención (instruidos a seguir DM) en comparación con el grupo control (dieta con un porcentaje de grasa menor a 30%), tras 2 años de seguimiento.

También, varios alimentos incluidos en el patrón dietético de la DM han mostrado propiedades antiinflamatorias (Bulló M et al, 2007). Entre ellos, el AOVE por el hecho de no estar refinado, conserva todos sus compuestos fenólicos, caracterizados por tener propiedades antiinflamatorias y antioxidantes (Fito M et al, 200, Beauchamp GK et al, 2005). Según diferentes evidencias científicas, estos compuestos, como el hidroxitirosol, son capaces de disminuir la producción de algunos mediadores de la inflamación y de inhibir la producción de ciertos marcadores de adhesión endotelial como, ICAM y VCAM, *in vitro* (Carluccio MA et al, 2003). Los FS, además de contener AG insaturados, tienen cantidades importantes de fibra, compuestos fenólicos, L-arginina (precursor de óxido nítrico), así como otras moléculas antiinflamatorias y antioxidantes (Salas-Salvadó J, 2006). Es interesante hacer mención especial a las nueces, por su elevado contenido en ácido α -linolénico, caracterizado por poseer propiedades antiinflamatorias (Zwarts L et al, 1999). Estudios de intervención muestran que la ingesta de FS comporta una disminución de algunos marcadores periféricos de la inflamación y función endotelial como PCR e IL-6 (Jiang R et al, 2006). También se ha visto *in vivo* su capacidad de modular los niveles de VCAM y la función endotelial (Ros E et al, 2004). En la población del nodo de Valencia del estudio piloto, se observaron descensos significativos de IL-6 e ICAM en los grupos de intervención con DM, sin embargo, en el grupo control se observó una disminución de la concentración de VCAM tras 3 meses de intervención. En la población del estudio PREDIMED general, se observaron descensos significativos de IL-6, ICAM y VCAM en los dos grupos de intervención con DM y de PCR en el grupo DM+AOVE. En el grupo control aumentó las concentraciones de marcadores de disfunción endotelial (ICAM y VCAM) (Figura). Dados los resultados en los grupos de intervención con DM más los suplementos de AOVE y FS, el estudio piloto del proyecto PREDIMED añade evidencia científica de los efectos antiinflamatorios de la DM y alimentos incluidos en ella.

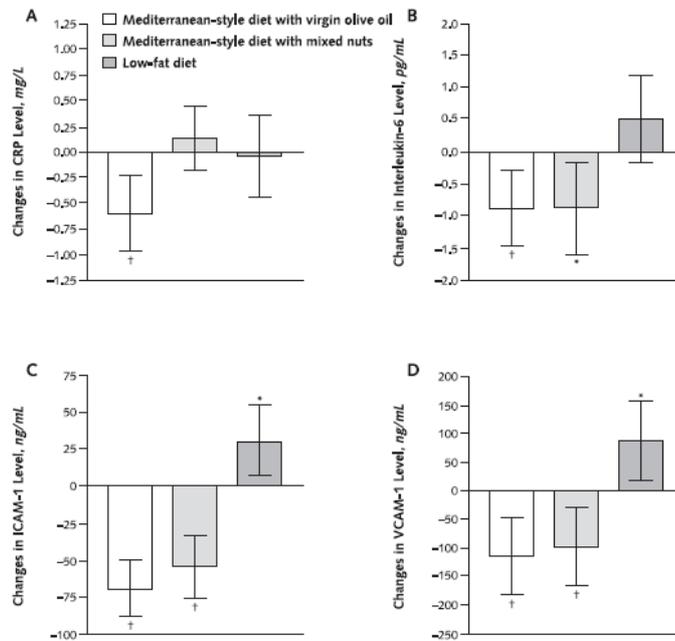


Figura 5.1. Cambios en los niveles de marcadores de inflamación tras 3 meses de intervención en los 3 grupos del estudio piloto del proyecto PREDIMED general. A: Cambios en los niveles de proteína C reactiva (PCR), B: Cambios en los niveles de interleuquina 6 (IL-6), C: Cambios en los niveles molécula de adhesión intercelular (ICAM), D: Cambios en los niveles de molécula de adhesión celular vascular (VCAM). Las barras de error presentan el intervalo de confianza al 95%. * Indica que la diferencia entre las medias de la visita inicial y a los 3 meses es estadísticamente significativa, $P < 0,05$ (Estruch R et al, 2006)

Una limitación de nuestro estudio es que la educación nutricional en el grupo de dieta baja en grasa es menos intensa que en los grupos de DM. De hecho, en el grupo de dieta baja en grasa, la ingesta de grasa es reducida ligeramente. Esto es debido en parte al diseño del estudio pero también, al hecho de que los participantes incluidos en este grupo pertenecen a una cultura mediterránea donde se consume aceite de oliva de manera preferente. Puesto que una dieta baja en grasa no es la dieta habitual, los participantes en este grupo también cambian sus hábitos alimentarios en una dirección más saludable. Por lo tanto, las diferencias en los resultados observados entre los grupos con DM y el grupo con dieta baja en grasa pueden ser atribuidas a los suplementos de AOVE y FS proporcionados. La duración del seguimiento, de solo 3 meses de intervención dietética, no puede ser considerada una importante limitación puesto que los efectos de intervenciones

dietéticas sobre FR no necesitan periodos largos (Appel LJ et al, 1997, Sacks FM et al, 2001, Franz MJ et al, 2002) y además, parecen persistir el tiempo que se mantenga la adherencia a la intervención (Esposito K et al, 2004, Tuomilehto J et al, 2001, Knowler WC et al, 2002).

En conclusión, tanto en el estudio piloto realizado en el nodo de Valencia como en el estudio PREDIMED general, los resultados sugieren que los efectos saludables de la DM observados en estudios epidemiológicos son ejercidos a través de mejora en el perfil lipídico, en la glucemia y en los niveles de marcadores de inflamación. Así la DM puede ser un patrón dietético útil para individuos con elevado riesgo de ECV. La duración del estudio no permite ofrecer resultados clínicos, pero un seguimiento más prolongado como el que pretende realizar el estudio PREDIMED podrá proporcionar finalmente mayor evidencia.

5.2 Discusión del estudio VALFRECO

Uno de los principales problemas en los estudios epidemiológicos es que la dieta es el factor ambiental más difícil de medir y requiere una metodología bien validada para poder explorar asociaciones entre dieta y enfermedad (Willet C, 1998). En el estudio PREDIMED, se utiliza un CFCA, uno de los métodos más utilizados en los estudios epidemiológicos (Willet WC, 1998, Jiménez LG et al, 2006) ya que permite obtener información del consumo habitual a largo plazo, incluyendo la influencia de la variabilidad estacional, en poblaciones grandes y, además, es relativamente barato, rápido y fácil de aplicar (Willet WC, 1998, Cade J et al, 2002). Sin embargo, para cuantificar la ingesta absoluta de los alimentos y nutrientes específicos es limitado (Sullivan BL et al, 2008, Ishihara J, et al, 2009). Además, un CFCA debe ser diseñado de manera apropiada para obtener una medida fiable de la dieta en la población específica que va a ser estudiada (Willet WC, 1998). De este modo, en el presente estudio, se ha realizado la validación del CFCA de 137 items, utilizado en un ensayo clínico a gran escala, multicéntrico y aleatorizado para la prevención primaria de ECV con DM tradicional (estudio PREDIMED), para conocer la validez y la reproducibilidad de sus mediciones en población mediterránea de elevado riesgo cardiovascular. En este trabajo, se presentaron los resultados preliminares obtenidos en el nodo de Valencia y los resultados generales del estudio PREDIMED englobados en el estudio VALFRECO (Fernández- Ballart JD et al, 2010).

A pesar de que existen buenos biomarcadores para medir algunos componentes de la dieta como la energía (técnica del agua doblemente marcada) (Black AE et al, 1996) o las proteínas (determinación del nitrógeno urinario) (Cena H et al, 2008), no se disponen de biomarcadores para determinar todos los

componentes alimentarios (Fidanza F et al, 2002). Por ello, se utilizan frecuentemente otros métodos de medida de la dieta como referencia para validar un CFCA (Cade J et al, 2002), incluso para nutrientes específicos (Sullivan BL et al, 2008), caracterizados por ser auto-administrados. Estos métodos conllevan errores en la estimación de la dieta pero se considera que el método de referencia proporciona mejor información que el CFCA aunque con una precisión limitada (Kipnis V et al, 2003). En este contexto, el registro dietético, es un método de referencia ampliamente utilizado para validar un CFCA (Cade J et al, 2002). En el estudio VALFRECO, el registro dietético se realizó 12 días (en cuatro períodos de 3 días). Aunque un período más largo de registro puede reflejar mejor la verdadera ingesta, se eligieron no más de 12 días para evitar la pérdida de participación y detrimento de la calidad de los datos obtenidos. Además, la administración de registros dietéticos en diferentes momentos del año y, en distintos días de la semana, permitió estimar las posibles influencias de las variabilidades estacionales y semanales.

En el estudio VALFRECO, se ha medido la reproducibilidad y validez del CFCA utilizado en el estudio PREDIMED. Tanto en el estudio preliminar en el nodo de Valencia como en el estudio VALFRECO general (Pamplona, Reus y Valencia), se encontró una sobreestimación de la ingesta de nutrientes en el CFCA de forma general, aunque este resultado puede ser un tanto artificial por una posible subestimación ocasionada en el registro dietético. Sin embargo, el CFCA normalmente refleja estimaciones más elevadas, para la mayoría de nutrientes, que el método de referencia (Subar AF et al, 2001), particularmente si el CFCA excede de 100 ítems (Klipstein-Grobusch K et al, 1998) como ocurre en el CFCA utilizado en el estudio PREDIMED. Una revisión reciente ha mostrado que un CFCA con más ítems es mejor para clasificar a los individuos según su ingesta (Molag ML et al, 2007). Esta sobreestimación puede ser debida a errores introducidos por diferencias en la concepción del tamaño de las porciones, en la interpretación de ítems específicos y la frecuencia y tamaño de ración diferente entre el CFCA y el registro dietético. Este es especialmente el caso que se produce cuando existen múltiples alimentos en un ítem del CFCA. Además, al estimar la media de la ingesta que se realiza en un año, puede realizarse una apreciación errónea, que puede ser diferente a los errores cometidos al realizar el registro dietético en el que se estiman las cantidades de ingesta de manera muy reciente. También, puede ser una fuente de error el hecho de que en el estudio VALFRECO se ha asumido, al calcular la ingesta de nutrientes a partir de la información proporcionada por el CFCA, que cada alimento en los diferentes ítems contribuye de manera igual a la ingesta de un nutriente determinado, y sería mejor estimar el peso de cada uno de ellos y usar esta información para calcular la ingesta del nutriente en cuestión.

Por otro lado, el intervalo de tiempo entre los dos CFCA es un factor importante que puede influir en la reproducibilidad. Si el intervalo es demasiado corto no permite incluir las variaciones estacionales y se facilita el hecho de que los participantes respondan en función de las respuestas recordadas en la primera administración del cuestionario, de modo que la reproducibilidad sería sobreestimada. Sin embargo, si el intervalo es demasiado largo puede conllevar a una mayor pérdida de participación y desinterés y aumenta la posibilidad de producirse un verdadero cambio en el patrón alimentario lo que podría conducir a una subestimación de la reproducibilidad (Tsubono Y et al, 1995). En la revisión realizada por Cade J et al, 2002 se mostró que el intervalo de tiempo entre los CFCA, en los estudios publicados, oscilaba entre 2 horas y 15 años. En el presente estudio, se eligió un intervalo de un año para evitar los errores antes decritos y además, se pidió a los participantes que no cambiarán sus hábitos dietéticos. Así pues, tanto en el nodo de Valencia como en el estudio VALFRECO general se observaron pequeñas diferencias en la media de ingestas de nutrientes entre el primer CFCA y el segundo. Muchos estudios han utilizado este mismo intervalo de tiempo (Willet WC et al, 1998, Martín-Moreno JM et al, 1993, Ogawa K et al, 2003, Johansson I et al, 2002) y han mostrado rangos de coeficientes de correlación similares (Johansson I et al, 2002).

Con respecto a la validación del CFCA, los coeficientes de correlación para energía y nutrientes son comparables a los obtenidos en estudios de validación similares (Ahn Y et al, 2007, Chen Y et al, 2004, Dumartheray EW et al, 2006, Ogawa K et al, 2003, Shu XO et al, 2004). Además, estudios de validación de un CFCA diseñado especialmente para estimar la ingesta de AGP, usando registros por pesada de alimentos como método de referencia, encontró resultados solo ligeramente mejores que los observados en el estudio VALFRECO (McNaughton SA et al, 2007).

Por otro lado, también hay que tener en cuenta que los participantes del estudio VALFRECO fueron voluntarios que accedieron a formar parte de este estudio y puede que tendieran a contestar de forma más precisa al CFCA y a los registros dietéticos o que tuvieran hábitos dietéticos diferentes a los individuos que no han participado.

Además, la corrección de errores aleatorios asociados a variación intra-individual casi siempre incrementa los valores de correlación. En este caso, los coeficientes de correlación brutos y corregidos fueron similares, quizás debido a la baja variación intra-individual con respecto a la variación inter-individual en los participantes y/o por el elevado número de días de registro dietético (12 días).

Por otro lado, dado que el CFCA se utiliza para categorizar a los individuos según su ingesta más que para obtener una cuantificación exacta de la ingesta de nutrientes, en el estudio VALFRECO general se examinó el grado en el que el CFCA clasifica de forma errónea a los individuos en quintiles según su ingesta alimentaria. Se observó que el CFCA presentaba una muy baja frecuencia de clasificación errónea y, relativamente, una alta concordancia, especialmente con respecto a los grupos de alimentos y nutrientes relacionados con riesgo cardiovascular.

En conclusión, este CFCA semicuantitativo de 137 ítems parece ser un instrumento útil para la estimación de los hábitos alimentarios y la ingesta de nutrientes en la investigación epidemiológica de la dieta como FR de ECV y otras enfermedades crónicas y el control dietético en España. Se han encontrado niveles aceptables de reproducibilidad y validez.

5.3 Discusión de las características generales de la población PREDIMED en el nodo de Valencia y población EPIC e influencia de los factores ambientales.

5.3.1 Estudio PREDIMED

La población del estudio PREDIMED se caracteriza por presentar un elevado riesgo cardiovascular puesto que se trata de individuos de edad avanzada, bien diabéticos o con tres o más de los siguientes criterios: dislipemia, HTA, sobrepeso, antecedentes familiares de cardiopatía precoz o tabaquismo. Así pues, en esta población, la prevalencia de diabéticos, obesos, hipercolesterolémicos e hipertensos es elevada con respecto a población general (Gabriel R et al, 2008, Bertomeu V et al, 2008, Lahoz C et al, 2007).

El riesgo de arteriosclerosis coronaria es mayor en hombres que en mujeres hasta los 60 años. Sin embargo, con el desarrollo de la menopausia el riesgo en mujeres aumenta rápidamente hasta igualarse al de los hombres (Jousilahti J, 1999). En nuestra población se observaron diferencias entre hombres y mujeres. Las mujeres presentaron mayor IMC y prevalencia de obesidad que los hombres. Sin embargo, los hombres presentaron mayor perímetro de cintura que las mujeres. Algunos estudios realizados en población española han observado que la obesidad se incrementa con la edad y que en individuos mayores de 65 años las diferencias entre sexos se acentúan más, mostrando las mujeres mayor IMC y prevalencia de obesidad (Gabriel R et al, 2008, Gutiérrez-Fisac JL et al, 2004). Sin embargo,

también se ha observado, en otros estudios, que la grasa abdominal y el perímetro de cintura suele ser mayor en hombres, como se ha mostrado en nuestro estudio (Carr MC et al, 2001).

Las mujeres también mostraron mayores niveles de CT, c-LDL y prevalencia de hipercolesterolemia, pero también mayor concentración de c-HDL, en comparación a los hombres. En población española, se ha observado que conforme la población envejece, la concentración de CT aumenta sobretodo en las mujeres. Además, la edad, parece invertir las diferencias entre sexos, tanto en los valores medios de CT como en la prevalencia de hipercolesterolemia (Suárez C et al, 1998, Gabriel R et al, 2008). En hombres, el CT aumenta hasta los 65 años y luego se estabiliza o incluso disminuye. El c-HDL no aumenta con la edad pero las cifras mayores se observan en las mujeres (Gabriel R et al, 2008).

Las mujeres también mostraron mayor prevalencia de HTA que los hombres, sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los valores de PAS y PAD entre sexos. Varios estudios en población española han observado que la prevalencia de HTA aumenta con la edad sobretodo en mujeres (Suárez C et al, 1998, Belza MJ et al, 1997). Asimismo, Gabriel R et al (2008) mostraron que en individuos entre 45-64 años, la prevalencia de hipertensos en hombres y mujeres es similar pero, en individuos mayores de 65 años, la prevalencia es mayor en mujeres.

Por otro lado, la prevalencia de DMT2 fue mayor en hombres que en mujeres. También fue mayor la concentración plasmática de glucosa en hombres. Otros estudios en población española, también han observado elevado porcentaje de glucemia alterada y de DMT2 en hombres con respecto a las mujeres (Goday A, 2002, Gabriel R et al, 2008).

Con respecto a los factores ambientales, la prevalencia de fumadores fue del 13%. El hábito tabáquico es claramente más frecuente en varones que en mujeres, excepto en edades comprendidas entre 16-24 años (Bellido Casado J et al, 2001, Fernández A et al, 2003, Gabriel R et al, 2008). Según la Encuesta Nacional de Salud 2006, la prevalencia de hombres y mujeres fumadores con edades entre 65-74 años (intervalo de edades donde se sitúa la media de edad de nuestra población) es de 20,6% y 4,5%, respectivamente (Ministerio de Sanidad y Consumo, 2006). Estos datos son similares a los encontrados en nuestra población (25,7% hombres y 4,2% mujeres). Además, el hábito tabáquico disminuye con la edad (Gabriel R et al, 2008, Ministerio de Sanidad y Consumo, 2006), de hecho en nuestra población los fumadores son más jóvenes que los no fumadores. Además, en los individuos fumadores se observó menor IMC, pero mayores niveles de PAD y TG y menores

de c-HDL, con respecto a los no fumadores. Estos efectos se han observado en otros estudios (Lahoz C et al, 2007, Lavi S et al, 2007, Rahman MM et al, 2007).

Con respecto a la adherencia a la DM la prevalencia de individuos que consumen una dieta con bajo grado de adherencia a la DM fue del 50% puesto que el punto de corte para clasificar a los individuos en los grupos de baja y alta adherencia a la DM fue la media del total de los puntos obtenidos en el cuestionario de 14 puntos. No se observaron diferencias entre hombres y mujeres con respecto a la adherencia a la DM. Los individuos con alta adherencia a la DM presentaron menor IMC y perímetro de cintura y mayores niveles de c-HDL. Varios estudios han mostrado también un efecto beneficioso de la DM sobre la obesidad (Schroder H et al, 2004, Trichopoulou A et al, 2005(a), Méndez MA et al, 2006, McManus K et al, 2001) y sobre la concentración de c-HDL (Estruch R et al, 2006, Andreoli A et al, 2008).

Por otro lado, la prevalencia de sedentarismo fue de 27,1%, considerando como sedentarismo el hecho de no cumplir con las recomendaciones de la *American College of Sport Medicine* y la AHA para individuos de avanzada edad (Nelson ME et al, 2007). Se observó que dicha prevalencia fue mayor en mujeres que en hombres (30,5% vs 21,4%), hecho también observado en otros estudios tanto en población española como en otras poblaciones (Eaton CB et al, 1994, Domínguez-Berjón MF et al, 1998, Perula de Torres LA et al, 1998, Elizondo-Armendáriz JJ et al, 2005, US Department of Health and Human Services, 2010). Aún así, la prevalencia observada en nuestra población es baja ya que, por ejemplo, en EEUU se ha estimado que únicamente el 15% de la población adulta sigue las recomendaciones de 30 minutos de ejercicio moderado 5 días a la semana (Ham SA et al, 2004). Se debe tener en cuenta que en individuos mayores de 65 años o para adultos entre 50 y 64 años con condiciones crónicas clínicamente relevantes, la intensidad de ejercicio recomendada para reducir el riesgo de enfermedades crónicas, aparición de eventos cardiovasculares o mortalidad es menor que la de los adultos menores de 65 años y con buen estado de salud (Nelson ME et al, 2007, Haskell WL et al, 2007). De hecho, en varios estudios se ha demostrado que, en personas mayores de 65 años, caminar se asocia con un menor riesgo de CI (Manson JE et al, 1999). De este modo, el número de personas que pueden tratarse como no sedentarias puede aumentar con respecto a población adulta menor de 65 años y con buen estado de salud. El efecto beneficioso de la actividad física también se ha constatado en nuestra población ya que los individuos no sedentarios presentaron menor IMC, perímetro de cintura, concentración plasmática de glucosa y de TG y mayores niveles de c-HDL, con respecto a los no sedentarios. Estos efectos se han observado en otros estudios con respecto a los niveles de TG y c-HDL (Leon SA et al, 2000, Leon SA et al, 2001), obesidad (Wing RR et al, 2001, Slentz CA et al,

2004), y la glucosa y otros parámetros relacionados con DMT2 (Thompson PD et al, 2001, Weinstein AR et al, 2004).

Cabe destacar que los fenotipos intermedios que más varían en función de los factores ambientales son el IMC y los niveles plasmáticos de c-HDL.

5.3.2 Estudio EPIC

En la población del estudio EPIC se incluyeron 557 casos de IAM incidente y 1180 controles. Se detectaron diferencias en los FR cardiovascular entre casos y controles. De este modo, los casos mostraron mayor IMC y prevalencia de obesidad, mayores niveles de CT, c-LDL, TG y prevalencia de hiperlipidemias, y menor concentración de c-HDL y prevalencia de c-HDL bajo, en comparación con los controles. Los casos también mostraron mayor prevalencia de HTA y DMT2. Estas diferencias entre casos y controles son razonables puesto que la obesidad (Yusuf S et al, 2004, Baker JL et al, 2007, Hajer GR et al, 2008), elevados niveles de CT, c-LDL, TG y bajos de c-HDL (Keys A et al, 1984, Anderson KM et al, 1987, Kannel WB et al, 1979, Law MR et al, 1994, Assmann et al, 1996, Sharret et al, 2001, NCEP, 2002), HTA (O'Donell CJ et al, 1997, Van den Hoogen PCW et al, 2000, Neal B et al, 2000, Lewington S et al, 2002) y DMT2 (Fox C et al, 2004, Eckel RH et al, 2006, Lebovitz HE et al, 2006, Thomas JE et al, 2007), son FR que se asocian con mayor riesgo de IAM.

Con respecto a los factores ambientales se observaron diferencias entre casos y controles en cuanto al tipo de grasa de la dieta, la ingesta de alcohol y el consumo de tabaco, pero no con respecto a la actividad física. En los casos, el porcentaje con respecto a la energía total de consumo de AGS fue menor pero también el de AGM. Varios estudios han mostrado el efecto protector del consumo de AGM sobre las complicaciones cardiovasculares como el IAM (Hu FB et al, 1997, Pietinen P et al, 1997, Fernández-Jarne E et al, 2002). También, se ha observado que un consumo moderado de alcohol disminuye el riesgo de IAM (Corrao G et al, 2002). Un consumo moderado de alcohol según la OMS corresponde a 2 vasos al día en las mujeres y 3 vasos al día en los hombres, y un vaso constituyen 10g de alcohol (OMS, 2003). Así pues, aunque existan diferencias entre los casos y los controles en la ingesta de alcohol al día (g/d), ambos grupos se sitúan en el rango de una ingesta de alcohol moderada.

5.4 Discusión de cada uno de los polimorfismos y las interacciones gen*ambiente.

A continuación, se expone la discusión de los resultados para cada uno de los polimorfismos estudiados así como las interacciones gen*ambiente que se han detectado, tanto en el estudio PREDIMED como en el estudio EPIC de manera conjunta.

5.4.1 Discusión los polimorfismos relacionados metabolismo lipídico y fenotipos intermedios y finales de ECV.

5.4.1.1 Polimorfismo E2/E3/E4 del gen de ApoE

El gen de la APOE ha sido uno de los más estudiados en las últimas décadas en relación con el metabolismo lipídico y el riesgo cardiovascular, bien de forma aislada o en asociación con otros genes o con factores ambientales. Se trata de un gen polimórfico que presenta 3 alelos comunes en la población general, E2, E3 y E4 (Weisgraber et al, 1981). La frecuencia de los mismos varía ampliamente según la zona geográfica. En poblaciones caucásicas las frecuencias de los alelos E2, E3 y E4 se han estimado aproximadamente en 0,08, 0,77 y 0,15 respectivamente (Davignon J et al, 1988). Sin embargo, en Europa se ha observado que la frecuencia del alelo E4 es mayor en el norte de Europa (alrededor del 20%) que en el sur situándose alrededor de un 10%. El alelo E3 presenta un gradiente inverso mostrando la frecuencia más elevada en los países del sur de Europa y, sin embargo, el alelo E2 permanece estable geográficamente (Lucotte G et al, 1997, James RW et al, 1993). Las frecuencias alélicas obtenidas en la población del estudio PREDIMED del nodo de Valencia son similares a las detectadas en estudios realizados en países del sur de Europa como Italia (Cattin L et al, 1997, Lucotte G et al, 1997), Francia (Luc G et al, 1994) o España (Gómez-Coronado D et al, 1999, Corella D et al, 2001(b), Sorlí JV et al, 2002). La frecuencia del alelo E4 en asiáticos e hispanos americanos es similar a la de los países del sur de Europa (Hanis CL et al, 1991, Evans AE et al, 1993, Eto M et al, 1989, Kamboh MI et al, 1993) mientras que las poblaciones africanas presentan frecuencias elevadas (superiores al 20%) (Kamboh MI et al, 1989, Howard BV et al, 1998).

Por otro lado, estudios en individuos centenarios han mostrado cierta ventaja de supervivencia asociada al alelo E2. De hecho, se han encontrado frecuencias alteradas de las variantes alélicas del gen de APOE en población de avanzada edad frente a individuos jóvenes de la misma población (Louhija J et al, 1994, Schächter F et al, 1994). Este efecto se ha observado sobretodo en mujeres. Varios estudios

han mostrado que la prevalencia de mujeres portadoras del alelo E4 mayores de 60 años es menor (Boemi M et al, 1993, Louhija J et al, 1994, Wilson PWF et al, 1994). Existe evidencia de que los efectos del alelo E4 son más pronunciados en mujeres después de la menopausia (Schaefer EJ et al, 1994). En la población de PREDIMED del nodo de Valencia de edad avanzada, aunque no se detectaron diferencias por sexo en las frecuencias genotípicas, si se observó menor frecuencia de mujeres con el alelo E4 (14,8% en mujeres vs 19,1% en hombres).

La gran mayoría de la investigaciones llevadas a cabo para analizar la relación entre niveles de lípidos plasmáticos y el gen de la APOE han mostrado que el alelo E4 se asocia con concentraciones de CT y c-LDL mayores, el alelo E3 con concentraciones intermedias y el alelo E2 con menores niveles (Wilson PWF et al, 1994, Davignon J et al, 1988, Hagberg JM et al, 2000, Dallongeville J et al, 1992, Gerdes LU et al, 2000). Las diferencias de c-LDL entre genotipos persisten incluso al tener en cuenta la posible influencia de la edad, variables antropométricas y de estilo de vida. En nuestra población de elevado riesgo cardiovascular también se han confirmado estos efectos puesto que, además de encontrar asociación entre el genotipo de APOE con CT y c-LDL, dicha asociación se mantuvo tras ajustar por edad, variables antropométricas y de estilo de vida. Se ha estimado que entre el 2% y el 11% de la variación de c-LDL es producida por el locus de APOE en individuos caucásicos sanos (Davignon J et al, 1988). En nuestra población del estudio PREDIMED se estimó que los portadores del alelo E4 mostraban un 7,8% más de c-LDL que los individuos E3/E3 y los portadores del alelo E2 un 9,7% menos que los E3/E3.

Así pues, el efecto del polimorfismo de APOE sobre c-LDL y CT es de los más sólidos y consistentes publicados en la literatura, descrito en un amplio número de grupos étnicos, de edad y estados metabólicos como DMT2 y otros (Davignon J et al, 1988, Dallongeville J et al, 1992, Bennet A et al, 2007). Por ello, el alelo E4 se ha propuesto como un genotipo ahorrador puesto que presenta mayor concentración de colesterol, y además, se sabe que en poblaciones primitivas el alelo E4 era más prevalente y, en la actualidad, como se ha apuntado anteriormente, la frecuencia de este alelo es todavía muy elevada en numerosos países africanos y poblaciones indígenas (Kamboh MI et al, 1989, Howard BV et al, 1998).

Por otro lado, se encontró una asociación del alelo E2 con mayor concentración de TG con respecto a los alelos E3 y E4, y sin embargo, estos alelos no influyeron en los niveles de c-HDL, en la población de PREDIMED del nodo de Valencia. Mientras que el efecto del polimorfismo de APOE sobre c-LDL está bien establecido, las asociaciones con c-HDL y TG son controvertidas y dependientes de la población estudiada (Frikke-Schmidt R et al, 2000). El alelo E2 ha mostrado tendencia hacia niveles elevados de TG en algunos estudios (Howard BV et al,

1998, Sorlí JV et al, 2002, Pablos-Méndez A et al, 1997) pero en otros no (Volcik KA et al, 2006, Humphries SE et al, 2001(b), Corella D et al, 2000(a)). Dallongeville J et al (1992) mostraron en un metanálisis que tanto el alelo E2 como el alelo E4 se asociaban con hipertrigliceridemia con respecto al alelo E3. Otro metanálisis realizado en 2007 (Bennet AM et al, 2007), incluyendo solo estudios con tamaño muestral elevado (al menos 500 casos y 1000 controles), confirmó este efecto. En nuestra población no se encontró diferencia entre los individuos E3E3 y los portadores del alelo E4 con respecto a los niveles de TG. Por otro lado, varios estudios han mostrado este efecto de los alelos E2 y E4 sobre la hipertrigliceridemia es más acusado en hombres (Wilson PWF et al, 1994, Eichner JE et al, 1990, Utermann G et al, 1979, Mahley RW et al, 1995) incluyendo entre ellos un estudio realizado en población española (Gómez-Coronado D et al, 1999). Este último aspecto, se ha observado también en este trabajo puesto que la asociación del alelo E2 con niveles elevados de TG solo permaneció significativa en hombres. Sin embargo, los portadores del alelo E4 no mostraron mayor concentración de TG con respecto a los portadores del alelo E3.

Por otro lado, la mayoría de los estudios no han obtenido una asociación entre las variantes alélicas de APOE y niveles plasmáticos de c-HDL (Pablos-Méndez A et al, 1997, Schaefer EJ et al, 1994, Muros M et al, 1996, Hsueh WC et al, 2000), coincidiendo con los resultados obtenidos en este trabajo. Sin embargo, otras investigaciones han detectado una tendencia de menores niveles de c-HDL en los portadores de E4 y mayores en los portadores de E2 (Tan CE et al, 2003, Kataoka S et al, 1996, Tiret L, 1994). En otros estudios, sólo se encuentra una asociación entre el alelo E4 con menores niveles de c-HDL (Dallongeville J et al, 1992, Gómez-Coronado D et al, 1999).

El efecto diferente de los alelos de los alelos E2 y E4 sobre los niveles de lípidos vendría dado por la distinta afinidad de las isoformas por los receptores LDL. Los portadores del alelo E2 tienen un nivel de colesterol plasmático más bajo porque la isoforma E2 tiene menor afinidad por el receptor de las LDL que las isoformas E3 y E4, disminuyendo la captación, por parte del hígado, de quilomicrones y VLDL, provocando una menor concentración intracelular de colesterol en el hepatocito, lo que lleva a una mayor expresión, por parte del hepatocito, de receptores de las LDL, aumentando su aclaramiento y disminuyendo el c-LDL plasmático. Por el contrario, la isoforma E4 posee más afinidad por el receptor LDL dando lugar a mayor captación hepática de estas lipoproteínas, por lo que aumenta el colesterol intracelular, disminuye la expresión de los receptores de las LDL y se reduce el aclaramiento plasmático de las mismas (Weisgraber KH et al, 1990, Lund-Kats S et al, 2001, Brewer Jr HB, et al, 1988, Zaiou M et al, 2000). Por otro lado, los elevados niveles de TG observados en individuos portadores del alelo E2 pueden ser explicados por la reducción del aclaramiento de quilomicrones

y remanentes de VLDL (Dallongeville J et al, 1992, Turner PR et al, 1985, Demant T et al, 1991). Gómez-Coronado et al (1999) observaron que los hombres portadores del alelo E2 mostraban más del doble de VLDL que las mujeres portadoras de E2, poniendo de manifiesto un diferente metabolismo de VLDL según el sexo. De este modo, el catabolismo de las partículas de VLDL estaría más comprometido en hombres que en mujeres y, por lo tanto, en hombres aumentaría la predisposición a la hipertrigliceridemia. Esto es consistente con el hecho de que la hiperlipoproteinemia tipo III asociada a individuos homocigotos para E2 y, caracterizada por la acumulación de partículas remanentes o β -VLDL, es más prevalente en hombres que en mujeres y tiende a aparecer más temprano en hombres (Mahley RW et al, 1995). Estos mecanismos pueden explicar la asociación entre el alelo E2 y mayores niveles de TG encontrado en los hombres de nuestra población de elevado riesgo cardiovascular.

Además de la influencia del sexo sobre la asociación del genotipo de APOE sobre los niveles de lípidos, se ha mostrado que dicha asociación puede ser modulada por edad, grupo étnico, dieta, tabaquismo, consumo de alcohol, actividad física y la presencia de DMT2 (Davignon J et al, 1988, Bernstein MS et al, 2002, Corella D et al, 2001(b), Masson LF et al, 2003, Shin M et al, 2005, Ordovas JM et al, 1995). En la población de PREDIMED del nodo de Valencia no se ha encontrado ninguna interacción gen*ambiente, tampoco se han observado diferencias entre diabéticos y no diabéticos. Posiblemente sea necesario mayor número de muestra debido a la baja frecuencia de los alelos E2 y E4, sobretodo porque varias de estas interacciones se han descrito en hombres o en mujeres.

Por otro lado, dado el impacto del gen de APOE sobre el metabolismo lipídico se ha propuesto como gen candidato para el desarrollo de otros FR cardiovascular como DMT2 o HTA. Con respecto a la relación del polimorfismo de APOE con DMT2 existe controversia. Diversos estudios a escala genómica (Scott LJ et al, 2007, Saxena R et al, 2007, Zeggini E et al, 2007) y un metanálisis (Zeggini E et al, 2008) no identificaron el locus de APOE como predictor de DMT2. Sin embargo, un reciente metanálisis (Anthopoulos PG et al, 2010) detectó que el alelo E2 se asociaba con un moderado riesgo de DMT2 (OR=1,18 IC95%(1,02-1,35)) y concluyó que, a pesar de ello, son necesarios más estudios a gran escala para detectar y descubrir los mecanismos biológicos de dicha asociación. En nuestro trabajo, los portadores del alelo E2 mostraron mayores niveles de glucosa que los portadores E3 y E4 pero, aunque el riesgo de DMT2 fue mayor en los portadores de E2 con respecto a E3 y E4 no se alcanzó la significación estadística. Se ha sugerido que este efecto puede ser debido a la asociación del alelo E2 con mayor concentración de TG ya que altos niveles de TG se relacionan con resistencia a la insulina y DMT2 (Anthopoulos PG et al, 2010). En nuestro estudio se observó que tras ajustar por niveles de TG la asociación entre los genotipos de APOE y glucosa

desaparecía indicando que dicha asociación no es independiente del efecto de los genotipos de APOE sobre los niveles de TG.

Con respecto a la asociación del polimorfismo con HTA también existe controversia en la literatura. Estudios de casos y controles han mostrado una asociación positiva entre el alelo E4 y HTA y niveles de presión arterial (Bhavani AB et al, 2005, Isbir T et al, 1997, Li X et al, 2003, Niu W et al, 2007) incluyendo un reciente metanálisis (Niu W et al, 2009). En estudios transversales se ha encontrado más inconsistencia. Algunas investigaciones no han encontrado asociación con HTA o niveles de PAD o PAS (Wilson PWF et al 1994, Jemaa R et al, 2006). Otros, sin embargo, encontraron asociación del alelo E2 con HTA en hombres y no en mujeres (Imazu M et al, 2001). También, Katsuya T et al, 2002 encontraron una asociación negativa entre la presencia del alelo E4 y la prevalencia de HTA en jóvenes (<60 años) pero no en individuos mayores de 60 años en una población japonesa. Cuatro estudios más en población de edad avanzada no encontraron efecto del polimorfismo de APOE sobre la HTA. Uno llevado a cabo en Finlandia (Rastas S et al, 2004) y otro en España (Formiga S et al, 2006) no obtuvieron asociación PAS y PAD y con HTA respectivamente. Otro estudio, en descendientes italianos residentes en Brasil, mostró menores niveles de PAD en portadores de E4 con respecto a individuos E3E3 pero los valores de PAS fueron similares en ambos grupos (Schwanke CH et al, 2002). Fusikawa AK et al (2008) tampoco encontraron asociación entre el polimorfismo de APOE y prevalencia de HTA o niveles de PAS y PAD en población de avanzada edad (60-95 años) (Fuzikawa AK et al, 2008). En nuestra población de elevado riesgo cardiovascular, sin embargo, se encontró un efecto protector del alelo E2 frente a HTA en comparación con los alelos E3 y E4, sin observar diferencias entre hombres y mujeres. Entre los alelos E3 y E4 no se encontró diferencia en cuanto al riesgo de HTA. Este efecto podría ser debido a la influencia del polimorfismo de APOE sobre los niveles de c-LDL y CT, sin embargo, a pesar de las discrepancias existentes entre estudios con respecto a la relación de los genotipos de APOE con HTA, todos ellos, menos el estudio de Formiga S et al (2006) en el que no se midieron niveles de lípidos, encontraron una asociación consistente con concentraciones de c-LDL y similar a la encontrada en este estudio. Además, en nuestro estudio el efecto protector frente a la HTA de alelo E2 con respecto al genotipo E3E3 y el alelo E4 se mantuvo tras ajustar por concentración de c-LDL, indicando que dicho efecto es independiente del observado en cuanto a los niveles de c-LDL. Así pues, otros factores o mecanismos pueden subyacer a la relación entre APOE y HTA.

Por otro lado, dada la asociación del polimorfismo de APOE con concentración de c-LDL y CT, muchos estudios se han centrado en analizar las variantes de APOE con el riesgo de ECV. La relación del alelo E4 con mayor

riesgo de CI es de las más firmes, sin embargo, con respecto a enfermedades cerebrovasculares existe más controversia (Eichner RE et al, 2002, Woo D et al, 2002), hecho compatible con las discrepancias encontradas en la literatura con respecto a su relación con HTA puesto que la HTA es un FR muy importante para dichas enfermedades (*Joint National Committee on Detection*, 1993). Los resultados en cuanto al alelo E2 son heterogéneos. Algunos estudios han mostrado menor riesgo de CI del alelo E2 en comparación con el genotipo E3E3 (Hallman DM et al, 1991, Tiret L et al, 1994). Otros no han encontrado asociación y algunos detectaron mayor riesgo de ECV en portadores del alelo E2 (Eichner JE et al, 1993). En 1996, un metanálisis con 14 estudios publicados mostró que comparado con individuos con genotipo E3E3, los portadores del alelo E4 presentaban mayor riesgo de CI (OR=1,26 IC95%(1,13-1,41)), mientras que el alelo E2 no se asoció con riesgo de CI (Wilson PWF et al, 1996). La ausencia de cardioprotección del alelo E2 se sugirió que estaba relacionada con la tendencia de dicho alelo hacia altos niveles de TG (Davignon J et al, 1988, Dallongeville J et al, 1992). Tras esta publicación se han realizado numerosos estudios (Eichner JE et al, 2002), pero diferencias en el diseño, tamaño de muestra y poder estadístico, población estudiada o fenotipo de ECV medido, no han permitido evaluar la potencia del efecto del polimorfismo de APOE sobre el riesgo de ECV de forma consistente.

Varios metanálisis han intentado examinar estas fuentes de heterogeneidad entre estudios previos y obtener la relación directa entre los genotipos de APOE y el riesgo de CI (Song Y et al, 2004, Bennet AM et al, 2007). Sin embargo, han obtenido resultados discordantes. Song Y et al (2004) identificaron 48 estudios relevantes y concluyeron que comparado con individuos E3E3, los portadores del alelo E4 tenían un 42% más de riesgo de CI (OR=1,42 IC95%(1,26-1,61)), mientras que, no se encontró asociación entre el alelo E2 y riesgo de CI (OR= 0,98 IC95%(0,66-1,46)). Sin embargo, Bennet AM et al (2007), seleccionaron 121 estudios, con al menos 500 casos y 1000 controles, y obtuvieron que comparado con individuos con genotipo E3E3, los portadores del alelo E2 tenían un 20% menos de riesgo de CI (OR=0,80 IC95%(0,70-0,90)) y los portadores de E4 un leve mayor riesgo (OR=1,06 IC95%(0,66-1,46)). Así pues, a pesar de la gran cantidad de estudios publicados el tipo y la magnitud de la asociación entre los diferentes genotipos de APOE y el riesgo de ECV no está totalmente definida. Un importante factor que puede influir en dicha asociación son las interacciones gen*ambiente. De hecho, ya se han descrito algunas interacciones con consumo de tabaco (Humphries DE et al, 2001, Talmud PJ et al, 2005), con consumo de alcohol (Corella D et al, 2001(b)) o con la grasa de la dieta (Masson LF et al, 2003).

En conclusión, en nuestro estudio se ha confirmado la asociación entre el polimorfismo E2/E3/E4 del gen de APOE con niveles plasmáticos de c-LDL y CT y ha mostrado que su influencia sobre niveles de TG depende del sexo. Además, se

ha proporcionado evidencia de la influencia de los genotipos de APOE sobre concentración plasmática de glucosa e HTA en una población mediterránea de elevado riesgo cardiovascular.

5.4.1.2 Polimorfismos TaqIB y rs183130 del gen de CETP

En este estudio, llevado a cabo en población mediterránea de elevado riesgo cardiovascular, se ha encontrado que variaciones en el gen de la CETP (TaqIB o rs183130) son potentes determinantes genéticos de la concentración plasmática de c-HDL a pesar de la influencia de múltiples FR y tratamientos farmacológicos, coincidiendo con publicaciones anteriores en poblaciones de varios continentes (Ordovás JM et al, 2000, Boekholdt SM et al, 2005, Corella D et al, 2000 (b), Tai S et al, 2003, Thompson JF et al 2007, Corella D et al, 2010).

La frecuencia del alelo B2 del polimorfismo TaqIB es similar a la de otros estudios en población española general y de elevado riesgo cardiovascular (Corella D et al, 2000(b), Corella D et al, 2010) y a la de otras poblaciones caucásicas europeas o norteamericanas (Ordovás JM et al, 2000, Boekholdt SM et al, 2005). En Asia, se ha observado una frecuencia menor a la europea pero difiere entre etnias (Tai ES et al, 2003(b)). La frecuencia del alelo T del polimorfismo rs183130 obtenida en nuestro estudio es similar, también, a la descrita en población española de elevado riesgo cardiovascular (Corella D et al, 2010).

Por otro lado, en el estudio Framingham se observó que los portadores del alelo B2 mostraban menor actividad de la CETP que los homocigotos B1B1, con la observación de que menor actividad de la CETP se asocia con un incremento de la concentración de c-HDL (Ordovás JM et al, 2000). Sin embargo, no se conoce el mecanismo con el que el polimorfismo TaqIB puede afectar a la actividad de CETP y, además, se piensa que esta variante intrónica podría ser un marcador de la mutación funcional hasta ahora desconocida (Thompson JF et al, 2005). Algunos, aunque escasos estudios se han dedicado a intentar descubrir el polimorfismo funcional que explique los efectos observados en la variante TaqIB (Tai ES et al, 2003(b), Lu H et al, 2003, Frisdal E et al, 2005, Horne E et al, 2006). El polimorfismo rs183130, localizado en el promotor del gen de CETP, fue propuesto como el determinante más importante para la concentración de c-HDL por Thompson JF et al (2007), sin embargo, en nuestra población no explica completamente los efectos del polimorfismo TaqIB a pesar de estar en desequilibrio de ligamiento con dicho polimorfismo.

Ambos presentaron efectos aditivos en individuos de forma discordante. Se observó un efecto mayor sobre la concentración de c-HDL del polimorfismo rs183130 que del TaqIB coincidiendo con otros estudios (Thompson JF et al, 2007,

Corella D et al, 2010, Spirin V et al, 2007). Los individuos B2B2 (polimorfismo TaqIB) mostraron un incremento de 12,6% de c-HDL con respecto a los individuos B1B1. Dicho incremento fue mayor en los individuos TT (polimorfismo rs183130) con respecto a los CC (14,5%). Además, el análisis de combinación de los alelos de ambos polimorfismos mostró un efecto clínicamente relevante puesto que los individuos homocigotos para los alelos minoritarios de cada uno de ellos (B2B2/TT) presentaron un 17,7% más de c-HDL que los individuos con 2 copias de los alelos B1 y C (B1B1/CC). Estos efectos se han estudiado en 4210 participantes de diversos nodos del estudio PREDIMED y se mostraron la misma tendencia pero menor magnitud (Corella D et al, 2010). En este estudio, el incremento de c-HDL de individuos B2B2 frente a B1B1 (TaqIB) fue de 9,2%, el de individuos TT frente a CC (rs183130) de 12,8% y el de la combinación B2B2/TT frente a B1B1/CC de 13,9%. En ambos estudios, el efecto del polimorfismo rs183130 fue mayor que el obtenido por Thompson JF et al (2007).

Por otro lado, en nuestra población del estudio PREDIMED se encontró una asociación entre el polimorfismo TaqIB y perímetro de cintura e IMC en mujeres, de modo que aquellas que presentaban el genotipo B2B2 mostraban menores valores de cintura e IMC que las B1B2 y B1B1. Sin embargo, dicha asociación no se encontró tras ajustar por los niveles de c-HDL poniendo de manifiesto que el efecto del polimorfismo TaqIB sobre IMC y cintura depende de su influencia en la concentración de c-HDL. No se encontró una interacción estadísticamente significativa con el sexo. Un estudio reciente en población asiática, ha mostrado que individuos con genotipo B2B2 presentan menor perímetro de cadera y pliegue subcutáneo del tríceps que individuos B1B2 y B1B1 y un efecto protector del alelo B2 con respecto a la obesidad, sin embargo, no se encontró relación con cintura (Ruan X et al, 2010). Estas asociaciones también se anularon al ajustar por c-HDL. En este estudio se encontró un efecto mayor en hombres que en mujeres de manera contraria a nuestros resultados, pero tampoco hallaron una interacción entre el polimorfismo TaqIB y el sexo. En este caso, las diferencias entre hombres y mujeres podría deberse a que en hombres el tamaño de muestra es menor.

El mecanismo biológico que subyace a la asociación entre el polimorfismo TaqIB y parámetros relacionados con obesidad se desconoce. En este estudio y en el de Ruan X et al (2010) se ha mostrado que dicha asociación está relacionada con el efecto de TaqIB sobre los niveles de c-HDL. Se ha observado que en el tejido adiposo, donde la CETP es altamente expresada (Jiang XC et al, 1991), la CETP tiene un papel clave en el consumo selectivo de ésteres de colesterol procedentes de c-HDL, proceso que podría contribuir a la acumulación de ésteres de colesterol en los adipocitos y, por lo tanto, al desarrollo de obesidad. Así, el descenso de c-HDL asociado al alelo B1 podría dar lugar a un retraso en el metabolismo de colesterol y la acumulación de colesterol a nivel celular podría conducir al

desarrollo de la obesidad (Benoist F et al, 1999). Sin embargo, otros estudios recientes en población asiática no encontraron asociaciones significativas entre TaqIB y riesgo de obesidad (Huang Zy et al, 2006, Srivastava N et al, 2008). En nuestra población tampoco se encontró dicho efecto a nivel global o por sexo. Así pues, la asociación entre el polimorfismo TaqIB con obesidad no está clara. Posiblemente, la variante genética de CETP funcional para obesidad está en desequilibrio de ligamiento con TaqIB. Así son necesarios posteriores estudios para descubrir dicha variante y para definir las posibles diferencias por sexo y según el tipo de depósito de grasa (subcutáneo o abdominal).

Por otro lado, en nuestra población de elevado riesgo cardiovascular se encontró una interacción entre el polimorfismo rs183130 de CETP y tabaco que modulaba la concentración de c-HDL. De este modo, se observó que el alelo C interacciona con el consumo de tabaco para reducir los niveles de c-HDL, mientras que los individuos con genotipo TT son resistentes a la disminución de c-HDL inducida por el tabaco (Interacción rs183130*tabaco=0,011). Es la primera vez que se encuentra esta interacción con el polimorfismo rs183130. Dado que el 25,7% de los hombres y el 4,2% de las mujeres en población española de elevado riesgo cardiovascular son fumadores y que la frecuencia del alelo C es de 72,7% esta interacción tiene especial importancia sobretodo en hombres.

Por otro lado, considerando que un 1% de incremento en el c-HDL se ha asociado con un 2-3% de reducción en la morbilidad y mortalidad cardiovascular (Gordon DJ et al, 1989(b), Natarajan P et al, 2010), los polimorfismos TaqIB y rs183130 pueden tener un papel relevante en la aterosclerosis. El polimorfismo TaqIB ha sido el más estudiado y, sin embargo, existe una amplia controversia acerca de la asociación entre este polimorfismo y el riesgo de CI. Así pues, aunque varios estudios de cohorte o de casos y controles (Dullaart RP et al, 1998, van Acker BA et al, 2008), así como, dos metanálisis (Thompson A et al, 2008, Kathiresan S et al, 2009) han mostrado menor riesgo de CI en portadores del alelo B2, otros estudios de casos y controles (Liu S et al, 2002, McCaskie PA et al, 2007, Dedoussis GV et al, 2007) y de cohortes (Whiting BM et al, 2005) han sugerido que el alelo B2 no tiene un efecto protector o, incluso mayor riesgo de CI en un estudio de cohorte (Borgrevve Se et al, 2006, Dullaart RP et al, 2008, Acker BA et al, 2008). Por lo tanto, el papel proaterogénico o antiaterogénico de CETP está siendo objeto de intenso debate durante muchos años (Hirano K et al, 2000).

En este trabajo se ha examinado la asociación entre el polimorfismo TaqIB de CETP y el riesgo de CI incidente en la población EPIC. A pesar de la fuerte asociación que se encontró entre el polimorfismo TaqIB y la concentración de c-HDL en esta población mediterránea, no se detectó una asociación significativa entre este polimorfismo y CI incidente tras 10 años de seguimiento de la cohorte en

concordancia con otros estudios (Liu S et al, 2002, McCaskie PA et al, 2007, Dedoussis GV et al, 2007, Whinting BM et al, 2005).

Con el objetivo de encontrar una posible explicación a las discrepancias entre estudios previos, Dullaart RP et al (2008), encontró diferencias que dependían del origen de la población (población de elevado riesgo vs población general). Estudios en población general, la OR para ECV fue 1,45 IC95%(1,07-1,95) en B2B2 comparado con B1B1, en contraste con el descenso de OR a 0,84 IC95%(0,74-0,96) en B2B2 vs B1B1 en individuos de población con elevado riesgo. En estos individuos la medicación hipolipemiante puede afectar a los parámetros biológicos de interés. Jensen MK et al, 2008, también estudió la interacción entre el consumo de alcohol y el polimorfismo TaqIB para determinar la concentración de c-HDL y el riesgo de CI. Aunque la concentración de c-HDL fue mayor en portadores del alelo B2 bebedores, no se encontró una interacción significativa que modulara el riesgo de CI. Fumeron F et al (1995), en un estudio de casos y controles, detectó una interacción significativa entre el consumo de alcohol y el polimorfismo TaqIB que determinaba los niveles de c-HDL y riesgo de CI. En contraste con los resultados de Fumeron F et al (1995) y Jensen MK et al (2008), en nuestro estudio no se encontró una interacción significativa entre el consumo de alcohol y el polimorfismo TaqIB sobre los niveles de c-HDL. Nuestros resultados son similares a los obtenidos en estudios previos como estudios transversales llevados a cabo en población general mediterránea (Corella D et al, 2000(b)), en una población de hombres sanos (Talmud PJ et al, 2002) o en hombres insulino-dependientes (Dullaart RP et al, 1998). Al estimar el riesgo de CI en bebedores y no bebedores, se encontró un mayor riesgo de CI asociado al alelo B2 en bebedores. Los resultados se mantuvieron significativos tras ajustar por c-HDL revelando un mecanismo independiente a la concentración de c-HDL. Por el momento, no se ha encontrado una hipótesis que explique dicho efecto. Sin embargo, dado el fracaso que ha mostrado el inhibidor de la CETP, torcetrapib, frente a la prevención de riesgo cardiovascular (Neeli H et al, 2008), existe actualmente la creencia entre diversos investigadores que elevadas concentraciones de c-HDL no siempre proporcionan protección frente a ECV. Además de la cantidad total de c-HDL, su tamaño y su capacidad antiinflamatoria pueden ser factores importantes. Algunas de estas situaciones podrían ocurrir entre individuos B2B2 con alto consumo de alcohol. Sin embargo, no existen estudios que hayan analizado estos aspectos.

Por otro lado, se pensó que este elevado riesgo asociado al genotipo B2B2 en bebedores podría ser debido a la posible interacción con DMT2. Sin embargo, al comparar entre diabéticos y no diabéticos, se encontró elevado riesgo de ECV en diabéticos portadores del alelo B2, a pesar de su consumo de alcohol. Se trata de la primera vez que se ha encontrado mayor riesgo de CI asociado al alelo B2 en

diabéticos. Sin embargo, el número de diabéticos en nuestra población EPIC es bajo, de modo que es necesario reproducir estos resultados en otras cohortes.

En conclusión, los polimorfismos TaqIB y rs183130 han mostrado una fuerte asociación con concentración de c-HDL en población mediterránea de elevado riesgo cardiovascular. A pesar de estar en desequilibrio de ligamiento, la variante rs183130 no parece explicar completamente los efectos observados en TaqIB. Además, el polimorfismo TaqIB parece tener influencia en parámetros relacionados con la obesidad en mujeres a través de su efecto sobre los niveles de c-HDL, pero no se encontró una asociación con riesgo de obesidad planteándose la necesidad de posteriores estudios. También se encontró por primera vez una interacción gen*ambiente, en la que el efecto del tabaco sobre los niveles de c-HDL era modulado por el polimorfismo rs183130. Además, en otra población mediterránea (EPIC), a pesar de confirmar la fuerte asociación entre el polimorfismo TaqIB y la concentración de c-HDL, el alelo B2 no se mostró asociado con menor riesgo CI incidente. Sin embargo, se observó que el consumo de alcohol podía modular esta interacción, en el sentido de que, en bebedores, el genotipo B2B2 fue asociado con mayor riesgo de CI, manteniendo la significación estadística tras ajustar por concentración de c-HDL. Otra interesante observación en la población EPIC fue el mayor riesgo de CI detectado en diabéticos portadores del alelo B2. Sin embargo, estudios adicionales se requieren para confirmar estos resultados.

5.4.1.3 Polimorfismo Ser477X del gen de LPL

La LPL es una enzima que juega un papel clave en el metabolismo lipídico, al hidrolizar partículas ricas en TG, quilomicrones y VLDL en tejido adiposo, músculo y macrófagos, generando AG libres y glicerol para utilizar en gasto y almacén de energía. Por ello, la relación de variaciones en el gen de LPL con niveles de lípidos y riesgo de ECV han sido objeto de numerosas investigaciones (Navarro-López F et al, 2002, Rip J et al, 2006, Sahoo GS et al, 2008).

El gen que codifica para LPL es altamente polimórfico. El polimorfismo Ser477X reviste un especial interés ya que es el más frecuente y el alelo 477X se ha asociado con un perfil lipídico más favorable, basado en el aumento de c-HDL y la reducción de TG, y una reducción del riesgo cardiovascular (Navarro-López F et al, 2002, Rip J et al, 2006, Sahoo Gs et al, 2008). Sin embargo, en nuestra población de elevado riesgo cardiovascular no se ha encontrado asociación con niveles de lípidos y además, de forma paradójica, el alelo 447X se ha asociado con mayor IMC y riesgo de obesidad.

La frecuencia obtenida del alelo 477X en nuestra población del estudio PREDIMED es similar a la obtenida en otras poblaciones europeas (Wittrup HH et

al, 2006, Garenc C et al, 2000, Wung SF et al, 2006, Ukkola O et al, 2001, Skoglund-Anderson C et al, 2003) y mediterránea españolas (Corella D et al, 2002). Existe evidencia de que la aparición de la variante Ser447X en el ser humano ocurrió antes de la división indo-germana lo que provoca que la variante se encuentre en caucásicos y en asiáticos (Rip J et al, 2006). De este modo, la frecuencia en caucásicos y asiáticos es similar (Shimo-Nakanishi Y et al, 2001) y menor en africanos (Chen W et al, 2001).

Por otro lado, algunos estudios han sugerido que en la asociación entre el polimorfismo Ser447X con TG y c-HDL subyacen interacciones gen*sexo puesto que dichas asociaciones solo se han observado en hombres (Chen L et al, 1996, Gagne SE et al, 1999), pero en nuestra población no se ha detectado heterogeneidad entre hombres y mujeres, coincidiendo con otros estudios en población mediterránea española (Corella D et al, 2002). También, se han detectado interacciones ambientales con el consumo de tabaco en el efecto del polimorfismo 477X sobre los niveles de c-HDL (Lee J et al, 2004), sin embargo, en este estudio no se han detectado.

El mecanismo biológico responsable de los efectos beneficiosos del polimorfismo Ser447X no se conoce de manera clara. La mayoría de las investigaciones se inclinan sobre la creencia de que este polimorfismo provoca un aumento de la actividad de LPL. De este modo, un aumento de la actividad lipolítica provoca un descenso de los niveles plasmáticos de TG y un aumento de la transferencia de proteínas, fosfolípidos y colesterol desde las VLDL a las partículas HDL₃, lo que aumenta las partículas HDL₂ con un consecuente incremento de c-HDL (Kuivenhoven JA et al, 1997). Sin embargo, otras posibilidades han sido propuestas como mayor afinidad por los receptores hepáticos, lo que facilita la eliminación de las partículas remanentes de VLDL (Wittrup HH et al, 1999), modificaciones en el anclaje al endotelio o cambio en la expresión de LPL y en la ingesta de lipoproteínas por macrófagos (Mean JR et al, 2000, Rip J et al, 2006). Podría ocurrir que en población de elevado riesgo algún factor relacionado con el estado metabólico influya en dichos mecanismos y enmascare el efecto del polimorfismo Ser447X. En diabéticos se ha observado que la actividad de la LPL está disminuída, y se ha sugerido que un daño endotelial, producido en la evolución de DMT2, podría reducir los sitios de unión en el endotelio para LPL (Hirano T et al, 1999).

Además, en nuestra población se ha encontrado una asociación entre el alelo 447X con mayor IMC y riesgo de obesidad. Esta asociación ha sido más marcada en hombres que en mujeres. No se ha encontrado una explicación para estas observaciones. El gen de la LPL ha sido propuesto como gen candidato para la obesidad (Kern PA et al, 1997) y varios polimorfismos de LPL han mostrado

asociación con obesidad (Wang H et al, 2009). Entre ellos el polimorfismo LPLHindIII que se encuentra en fuerte desequilibrio de ligamiento con Ser447X y también se asocia con menores niveles de TG y mayores de c-HDL (Corella D et al, 2002), y ha mostrado un efecto protector frente a la obesidad en población general mediterránea (Corella D et al, 2001(a), Jemaa R et al, 1995). En nuestra población no se ha encontrado asociación con TG y c-HDL y se ha observado un aumento de IMC y riesgo de obesidad asociado al alelo 447X. El polimorfismo Ser447X ha sido poco estudiado en este sentido, y no existen estudios en población de elevado riesgo cardiovascular. Garenc C et al (2000) no encontró asociación con diversas variables relacionadas con la obesidad como IMC, masa grasa o grasa abdominal en población general. Lis S et al (2006) tampoco encontraron una asociación significativa con IMC en individuos entre 4-17 años y adultos entre 18-44 años. Así pues, más estudios serán necesarios en población de elevado riesgo cardiovascular para confirmar si este efecto es debido a las características de la población y si influye el sexo, o es debido al azar.

En conclusión, el polimorfismo Ser447X no ha mostrado asociación con metabolismo lipídico en población mediterránea de elevado riesgo cardiovascular y, además, se ha observado un aumento del IMC y riesgo de obesidad asociado al alelo 447X, de forma más marcada en hombres. Son necesarios más estudios en población de elevado riesgo cardiovascular para confirmar si estas observaciones se relacionan con el estado metabólico.

5.4.1.4 Polimorfismo R219K del gen de ABCA1

La función antiaterogénica de c-HDL se ha atribuido en parte a su papel en el transporte reverso de colesterol donde la proteína ABCA1 participa de forma importante en su etapa inicial (Attie AD et al, 2001, Oram JF et al, 2001). De este modo, variaciones en el gen de ABCA1 han sido estudiadas y asociadas con niveles de c-HDL, TG y riesgo de ECV (Singaraja RR et al, 2003, Brunham LR et al, 2006). En este trabajo se ha estudiado la variante R219K. La frecuencia del alelo K obtenida en la población de PREDIMED del nodo de Valencia es similar a la de otras poblaciones caucásicas europeas (Clee SM et al, 2001, Porchay I et al, 2006) y americanas (25-28%) (Srinivasan S et al, 2003). Sin embargo, es menor que la observada en países asiáticos (40-47%) (Harada T et al, 2003) y opuesta a la de africanos (70-80%) (Srinivasan S et al, 2003).

El alelo K de la variante R219K provoca un aumento de la función de ABCA1 y, por tanto, una aceleración del transporte reverso de colesterol siendo compatible con los hallazgos de numerosos estudios epidemiológicos en los que dicho alelo se ha asociado con incremento de los niveles de c-HDL, descenso de TG y de riesgo de ECV (Clee SM et al, 2001, Singaraja RR et al, 2003, Brunham LR et al, 2006).

En el presente trabajo se ha confirmado la asociación con respecto a la concentración de c-HDL en mujeres, y no en hombres, en población de elevado riesgo cardiovascular. Este fenómeno ha sido observado en otros estudios. Kakko S et al (2003) estudiaron ambos sexos de forma separada y observaron que R219K se asociaba con elevada concentración de c-HDL solo en mujeres. Sugirieron que el motivo radicaba en las diferencias en factores ambientales entre ambos sexos, como el hábito tabáquico o el consumo de alcohol, que se encontraba con mayor frecuencia en hombres que en mujeres, y que pueden enmascarar el efecto del polimorfismo R219K sobre c-HDL en los hombres. En nuestra población del estudio PREDIMED el porcentaje de hombres fumadores es muy superior al de las mujeres (25,7% vs 4,2% respectivamente).

Con respecto al efecto del polimorfismo R129K sobre niveles de TG, en nuestra población de elevado riesgo cardiovascular no se encontró asociación. Zhao SP et al, (2004) en estudios de casos de enfermedad cerebrovascular y controles, con una edad media de 62 ± 12 años, observó que los individuos KK presentaban mayores concentraciones de c-HDL que los RK y RR, sin embargo, no encontró diferencias significativas en los niveles de TG. Además, observó que los efectos beneficiosos sobre c-HDL en portadores del alelo K eran más pronunciados en individuos con menos de 70 años.

Por otro lado, en el presente estudio se observó que el alelo K se asoció con menor IMC y concentración de glucosa y con un efecto protector frente a desarrollo de obesidad y DMT2. Estas asociaciones fueron más claras en mujeres que en hombres, sobretodo con respecto a la obesidad.

Escasos estudios han examinado la relación entre obesidad y el polimorfismo R219K. Kitjaroentham A et al (2007) no pudieron demostrar si R219K es una variante genética determinante para la obesidad poniendo de manifiesto la necesidad de futuros estudios. Villarreal-Molina MT et al (2007) mostraron por primera vez la asociación entre el gen de ABCA1 y obesidad y síndrome metabólico en población mejicana, pero lo hicieron con otro polimorfismo (R230C). Además, sus resultados sugirieron que el efecto de ABCA1 sobre la patofisiología de la obesidad era independiente de su papel en la regulación de los niveles de c-HDL. En nuestra población del estudio PREDIMED se observó que la asociación con parámetros relacionados con la obesidad, como perímetro de la cintura e IMC, y riesgo de obesidad, dependía del sexo puesto que el alelo K se asoció con menor cintura, IMC y riesgo de obesidad solo en mujeres y no en hombres. Incluso se detectó una interacción gen*sexo sobre el perímetro de la cintura (Pinteracción R219K*sexo=0,001). Dicha interacción con respecto a IMC quedó el límite de la significación estadística (Pinteracción R219K*sexo =0,079). Las diferencias entre hombres y mujeres pueden explicar la falta de asociación en

el estudio de Kitjaroentharn A et al (2007). Además, se observó que estas asociaciones detectadas en mujeres eran independientes del efecto de ABCA1 sobre los niveles de c-HDL, ya que tras ajustar por c-HDL las asociaciones con perímetro de la cintura, IMC y riesgo de obesidad permanecían significativas, dando consistencia a las observaciones realizadas por Villarreal-Molina MT et al (2007). No se han encontrado estudios que muestren el efecto de R219K sobre obesidad de modo que este estudio es el primero. Además, en la población PREDIMED del nodo de Valencia se observó que la asociación entre R219K e IMC y riesgo de obesidad dependía del consumo de repostería comercial (Pinteracción R219K*repostería comercial=0,010, Pinteracción R219K*repostería comercial=0,004, respectivamente). Los productos de repostería comercial se caracterizan por presentar niveles elevados de AGS provenientes de aceites de coco y palma o mantequillas, grasas trans e hidratos de carbono de alto índice glucémico que pueden incrementar el tamaño o número y estrés de adipocitos y el peso (Ludwig DS, 2002, Mozaffarian D et al, 2007). Así pues, el efecto protector del alelo K sobre IMC y riesgo de obesidad solo se encontró en aquellos individuos que consumen repostería comercial menos de 2 veces a la semana.

Por otro lado, el estudio de asociación del gen de ABCA1 con DMT2 ha cobrado gran interés en los últimos años, desde que Brunham LR et al (2007) investigó su función en las células β del páncreas. Demostraron, utilizando ratones con inactivación de ABCA1 en las células β , que ABCA1 probablemente tiene un efecto en la homeostasis del colesterol en los islotes pancreáticos y, como consecuencia, una influencia en la tolerancia a la glucosa y a la secreción de insulina. De este modo, el colesterol entra en la célula β pancreática a través del rLDL y ABCA1 regula la salida de colesterol de la célula. Así pues, la inactivación de ABCA1 supone un aumento de colesterol en las células β , lo que puede desencadenar en una disminución en la secreción de insulina. Asimismo, un descenso de colesterol en la célula β supondría un aumento de la secreción de insulina (Brunham LR et al, 2007). Esto es consistente con nuestros resultados puesto que el polimorfismo R219K provoca un aumento de la actividad de ABCA1 lo que supondría un descenso de colesterol en la célula y un aumento de la secreción de insulina, disminuyendo así el riesgo de DMT2. Tras la publicación de Brunham LR et al (2007), varios estudios han puesto de manifiesto la asociación de varios polimorfismos, diferentes de R219K, con mayor riesgo de DMT2, detectando que dicha asociación era independiente del efecto de los polimorfismos sobre los niveles de c-HDL (Daimon M et al, 2005, Brunham LR et al, 2008), sin embargo, no existen estudios que hayan mostrado el posible efecto protector del polimorfismo R219K sobre DMT2. Únicamente, Wang J et al (2008), mostraron que los individuos con genotipo RR presentaban mayor concentración de glucosa 2 horas después de un test de tolerancia a la glucosa (OGTT) y que el polimorfismo R219K provocaba diferente respuesta a rosigitazona en pacientes diabéticos,

poniendo de manifiesto la relación entre R219K y el metabolismo de la glucosa. El presente trabajo aporta evidencia del efecto protector del polimorfismo R219K sobre el riesgo de DMT2 y de que esta relación es independiente de su efecto sobre los niveles de c-HDL. Además, se han observado diferencias entre hombres y mujeres de forma similar a las observadas al estudiar la obesidad.

Dada la asociación del polimorfismo R219K con niveles de c-HDL, obesidad y DMT2 observadas en nuestra población de elevado riesgo cardiovascular se propone al gen ABCA1 como gen candidato para estudiar su relación con síndrome metabólico.

Por otro lado, en este trabajo también se ha puesto de manifiesto la influencia del grado de adherencia a la DM en la asociación entre el polimorfismo R219K y los niveles de glucosa y el riesgo de DMT2. Así pues, se observó que los portadores del alelo K solo presentan menores concentraciones de glucosa y menor riesgo de DMT2 si su dieta se caracteriza por tener un elevado grado de adherencia a la DM (Pinteracción R219K*adherencia DM= 0,023, para glucosa; Pinteracción R219K*adherencia DM = 0,002 para DMT2). No existen estudios que puedan dar consistencia a estos resultados con lo que es importante que futuras investigaciones se centren en ello. El componente de la dieta que con más frecuencia se ha observado que modula el efecto de un determinado polimorfismo sobre el riesgo de DMT2 o las diversas variables relacionadas con la DMT2 como la concentración de glucosa, sensibilidad a la insulina, tolerancia a la glucosa o resistencia a la insulina, es la grasa de la dieta y sus diferentes tipos como AGM o AGP, que son características de la DM (Morcillo S et al, 2007, Scacchi S et al, 2007, Pérez-Martínez P et al, 2007, Pérez-Martínez P et al, 2008, Weiss EP et al, 2007). De hecho, el consumo de pescado, rico en AGP, fue el componente de la DM que más influencia tuvo sobre la asociación entre R219K y niveles de glucosa y DMT2. El incremento de consumo de pescado y AGP, han mostrado efectos beneficiosos sobre los niveles de glucosa y otros parámetros relacionados con la DMT2 (Nettleton JA et al, 2005, Rudkowska I, 2010). De este modo, en nuestra población PREDIMED se observó que el efecto protector del polimorfismo R219K sobre concentración de glucosa y DMT2 solo se presentaba en aquellos participantes que consumían 3 o más veces pescado a la semana.

En conclusión, en población mediterránea de elevado riesgo cardiovascular se ha mostrado un efecto protector del polimorfismo R219K del gen de ABCA1 sobre niveles de c-HDL, obesidad, DMT2 y variables relacionadas con estas dos enfermedades en mujeres, mostrándose como gen candidato para síndrome metabólico. Además, dicho efecto sobre DMT2 y obesidad se ha mostrado modulado por el grado de adherencia a la DM y componentes de ésta como en consumo de pescado o de repostería comercial. Serán necesarios futuros estudios

epidemiológicos para confirmar dichas asociaciones y estudiar la influencia del sexo y la dieta en ellas y estudios experimentales *in vitro* e *in vivo* para entender mejor los mecanismos que subyacen a tales observaciones. Dada la influencia del gen ABCA1 sobre FR cardiovascular, dichos estudios serán cruciales para desarrollar terapias individualizadas.

5.4.1.5 Polimorfismo -514C/T del gen de LH

La frecuencia del alelo T del polimorfismo -514C/T de LH, obtenida en nuestra población del estudio PREDIMED es similar a la observada en otras poblaciones caucásicas (aproximadamente 0,20) (Jansen H et al, 1997, Guerra R et al, 1997). Africanos y japoneses presentan una frecuencia entorno a 0,050 (Zambon A et al, 1998, Juo SH et al, 2001, Inazu A et al, 2001) y asiáticos de la zona este una frecuencia intermedia (Zambon A et al, 1998, Ko YL et al, 2004).

La LH es una enzima que contribuye a metabolizar el c-HDL. Concretamente, promueve la ingesta de c-HDL (éster) y, a través de una estimulación de dicha ingesta, puede reducir los niveles de c-HDL (Jansen H et al, 2002). El polimorfismo estudiado en este trabajo (-514C/T) ha recibido una considerable atención ya que se localiza en el promotor del gen de LH y ha sido demostrada su influencia en los niveles de la actividad de LH. Se ha estimado que la actividad LH se reduce entre el 15-30% en los portadores del alelo T (Vega GL et al, 1998, Tahvanainen E et al, 1998, Shovet RV et al, 1999, Jansen H et al, 1997, Zambon A et al, 2001).

Así pues, varios estudios han mostrado un efecto positivo del alelo T sobre los niveles de c-HDL, sin embargo, este efecto difiere entre poblaciones e incluso en algunos estudios ha habido ausencia de asociación (Cohen JC et al, 1999, Jansen H et al, 2002, Isaacs A et al, 2004). En nuestra población tampoco se ha observado diferencias en los niveles de c-HDL según el polimorfismo -514C/T. Podría ocurrir que puesto que se trata de una población de elevado riesgo cardiovascular los efectos del polimorfismo -514C/T sobre niveles de c-HDL no se observen. De hecho, se han descrito interacciones con IMC, de modo, que el efecto protector del alelo T solo se observa en individuos no obesos, sin embargo, en individuos obesos el efecto del alelo T se atenúa (Zhang C et al, 2005). Otro estudio, llevado a cabo en 235 hombres, se mostró que en presencia de obesidad visceral el efecto protector del alelo T desaparece (St-Pierre J et al, 2003). Aunque el mecanismo biológico de este fenómeno no está claro, la interacción parece estar relacionada con la alta actividad de LH y baja concentración de c-HDL (sobretudo HDL₂) asociada a obesidad abdominal y a elevado IMC (Zhang C et al, 2005). También se ha observado una elevada actividad de LH con respecto a otros FR cardiovascular

como resistencia a la insulina y DMT2 (Baynes C et al, 1991), consumo de tabaco (Kong CL et al, 2001).

Por otro lado, las discrepancias encontradas en la asociación del polimorfismo -514C/T con la concentración de c-HDL también pueden ser explicadas por interacciones con factores ambientales como la dieta. De hecho, han sido demostradas interacciones entre el polimorfismo -514C/T con la grasa de la dieta (Ordovás JM et al, 2002(b), Tai ES et al, 2003(a)) en la que, los homocigotos TT, sólo presentarían un perfil lipoproteico más cardioprotector cuando la ingestión de grasa en la dieta fuera baja, sin embargo, superado el 30% del aporte calórico por este macronutriente, los homocigotos TT serían los que presentarían un perfil con mayor riesgo cardiovascular. Estas observaciones no se han examinado en nuestro estudio, pero, sin embargo, se detectó una interacción entre el polimorfismo -514C/T y el consumo de FS que determinaba la concentración de c-HDL. Varios estudios han mostrado que el consumo frecuente de FS incrementa los niveles de c-HDL (Lavedrine F et al, 1999, Masana L et al, 2000, Durak I et al, 1999, Edwards K et al, 1999). En nuestra población se observó que los individuos con genotipo CC presentan mayores niveles de c-HDL cuando consumen más de 3 veces a la semana FS con respecto a los individuos, con el mismo genotipo, pero que consumen FS con menor frecuencia. Sin embargo, en los portadores del alelo T no se observan diferencias en la concentración de c-HDL en función del consumo de FS. De este modo, los individuos con genotipo CC se mostraron más susceptibles al consumo de FS sobre los niveles plasmáticos de c-HDL. El genotipo CC se ha mostrado más respondedor que el TT a factores ambientales en otros estudios. Resultados del *Heritage Family Study* (Terán-García M et al, 2005) mostraron que los efectos beneficiosos de 20 semanas de entrenamiento físico sobre la sensibilidad a la insulina, fueron mayores en individuos homocigotos CC que en individuos TT para el polimorfismo -514 C/T. También, se ha observado que los individuos CC presentan una mejor respuesta con respecto al aumento de la concentración de c-HDL, a tratamiento hipolipemiente que los CT y TT (Zambon A et al, 2003).

Los FS son ricos en AGP y AGM y otros componentes beneficiosos para el metabolismo del colesterol y la salud cardiovascular, como vitamina E y polifenoles antioxidantes, fitoesteroles y otros compuestos fitoquímicos (Kris-Etherton PM et al, 1999, Sabaté J et al, 2006, Salas-Salvadó J et al, 2006), de modo que sería interesante estudiar si alguno de estos componentes es determinante en esta interacción.

Por otro lado, se ha observado que aunque el alelo T del polimorfismo -514C/T provoque un descenso de la actividad de LH, dicho alelo tiende a aumentar el riesgo de ECV. Así pues, varios estudios han puesto de manifiesto este

fenómeno. Dos estudios compararon la frecuencia del alelo T en sujetos normolipídicos con y sin CI. Ambos estudios, encontraron una mayor frecuencia del alelo T en participantes con CI que en controles (Shovet RV et al, 1999, Jansen H et al, 1997). Andersen RV et al (2001) obtuvieron un riesgo de 1,7 IC95%(1,2-2,4) de CI en homocigotos TT frente a homocigotos CC. Hakonson et al (2002) encontraron una asociación entre el alelo T y calcificación coronaria en individuos con Diabetes mellitus tipo 1. Además, Dugi KA et al (2001) mostraron que en hombres, el alelo T se asociaba con CI más severa. En todos ellos se observó que un descenso de la actividad de LH asociado al alelo T. En un intento de estudiar esta paradoja se ha propuesto múltiples mecanismos pro y antiaterogénicos en los que está implicada la LH (Jansen H et al, 2002, Zambon A et al, 2003).

En este sentido, en nuestra población de elevado riesgo cardiovascular se observó que, en hombres, los portadores del alelo T, presentaron mayores niveles de TG y PAS. Ji J et al (2002) mostraron también en hombres, una asociación del alelo T con mayores niveles de c-HDL y TG y además, observaron que la frecuencia del alelo T era mayor en casos de CI que en controles. Otro estudio, realizado en individuos sanos y miembros de familias con hiperlipemia combinada, también encontró asociación entre el alelo T y mayores niveles de TG y resistencia a la insulina (Pihlajamaki J et al, 2000). Tai ES et al (2003) también encontraron mayor concentración de TG en individuos TT con respecto a CT y CC en población asiática. Además, se ha observado que en familias con hiperlipemia combinada (Allayee H et al, 2000) y DMT2 (Baynes C et al, 1991) la LH puede contribuir al desarrollo de un perfil lipídico aterogénico. Por otro lado, Fan Y et al, 2001 mostraron en portadores del alelo T un descenso en el flujo sanguíneo coronario considerado una señal temprana de disfunción vascular, evento estrechamente relacionado con la HTA (Suzuki Y et al, 2003, Grielding KK et al, 1994, Harrison DG et al, 1997). Sin embargo, debido a la falta de estudios que examinen la relación de -514C/T con tensión arterial, sería interesante que tales observaciones fueran confirmadas.

Por otro lado, la asociación del polimorfismo -514C/T con TG se vió modulada por el consumo de verduras, hortalizas y fruta en nuestra población de elevado riesgo cardiovascular. Concretamente, se observó que los portadores del alelo T presentaban mayores niveles de TG, de manera estadísticamente significativa, cuando su consumo de verduras/hortalizas y fruta era menor de 2 veces al día y menor de 3 veces al día, respectivamente. En aquellos participantes cuyo consumo de verduras/hortalizas y fruta era más elevado no se observó este incremento en la concentración de TG asociado al alelo T. La interacción fue estadísticamente significativa en ambos casos (Pinteracción LIPC*consumo verduras/hortalizas=0,007, Pinteracción LIPC*consumo fruta=0,013). Existe evidencia de que personas que consumen más frutas y verduras tienen una menor

prevalencia de FR cardiovascular como HTA, obesidad y DMT2 y mejora del perfil lipídico (Bazzano LA et al, 2003, Djousse L et al, 2004, Liu RH 2003, Mirmiram P et al, 2009). Generalmente, el efecto beneficioso de las verduras y las frutas suele atribuirse a su contenido en fibra (Mirmiram P et al, 2009). De hecho, Santos JL (2006) realizó una interesante revisión de trabajos europeos, en los que se analizan interacciones entre polimorfismos genéticos y nutrientes, en la que destaca la interacción entre el polimorfismo -514C/T del gen LIPC y la ingesta de fibra que podría actuar sobre el metabolismo del colesterol y la obesidad (Stefan N et al, 2005).

Por otro lado, además de la fibra, las frutas y verduras contienen múltiples sustancias como esteroides, indoles, carotenoides, vitamina C, flavonoides, folatos, magnesio y potasio. Se han detectado efectos beneficiosos de algunos nutrientes de manera aislada, como el magnesio sobre la DMT2 (López-Ridaura R et al, 2004), pero otros investigadores, han propuesto que la acción protectora frente a la aparición FR cardiovascular y ECV es debido al efecto sinérgico de los nutrientes y fitoquímicos presentes en frutas y verduras (Liu RH 2003). De este modo, sería interesante estudiar si la interacción entre el consumo de frutas y verduras y el polimorfismo -514 C/T sobre los niveles de TG es debido a la acción de nutrientes de forma aislada o al efecto sinérgico de ellos.

En conclusión, en población de elevado riesgo cardiovascular no se ha observado una asociación entre el polimorfismo -514C/T en el promotor del gen de LH y concentraciones de c-HDL. Además, en hombres, los portadores del alelo T, presentaron mayores niveles de TG y PAS mostrando un efecto considerado aterogénico. Tanto la concentración de c-HDL como la de TG se ha observado modulada por el consumo de alimentos típicos de la DM como los FS, las frutas y las verduras.

5.4.1.6 Polimorfismo Q192R del gen de PON1

El polimorfismo Q192R del gen de PON1 ha sido ampliamente estudiado. En nuestra población de elevado riesgo cardiovascular, la frecuencia obtenida del alelo R es similar a la de otras poblaciones europeas (Sentí M et al, 2002, Scacchi R et al, 2003). En poblaciones africanas y asiáticas la frecuencia del alelo R es mayor (Scacchi R et al, 2003).

La enzima PON1 se encuentra unida a las partículas de HDL contribuyendo a las propiedades antiaterogénicas asociadas a ellas. Tanto estudios *in vitro* (Mackness MI et al, 1991, Aviram M et al, 1998) como *in vivo* (Shih DM et al,

1998, Oda MN et al, 2002) han mostrado que la actividad de PON1 previene la oxidación de las LDL e incluso de las propias HDL. Además, la PON1 se caracteriza por hidrolizar distintos ésteres de ácidos carboxílicos y algunos organofosfatos. Los alelos Q y R del polimorfismo Q192R se asocian con una menor/mayor actividad de la enzima dependiendo del sustrato (Humbert R et al, 1993). El alelo Q es menos eficiente en la hidrólisis de paraoxón pero es más eficiente frente a diazinón, sarín y somán (Davies HG et al, 1996). También el alelo Q se ha asociado con mayor capacidad de protección frente a la oxidación de las partículas de LDL y HDL que el alelo R (Aviram M et al, 2000).

Dada la asociación de la PON1 con oxidación de lipoproteínas se ha mostrado gran interés en estudiar la influencia de variantes en el gen de PON1, como Q192R, sobre el riesgo cardiovascular. Varios estudios han mostrado que el alelo Q ejerce un efecto protector frente a riesgo de ECV y el alelo R se ha asociado con mayor riesgo de ECV (Durrington PN et al, 2001, Mackness B et al, 2001, Wheeler JG et al, 2004, Tomás M et al, 2004). Aunque, otros estudios llevados a cabo en Europa (Aubó C et al, 2000), EEUU (Turban S et al, 2001) y Japón (Suehiro T et al, 1996) mostraron una tendencia aumentada de ECV en los individuos con genotipo QQ. También se ha observado el alelo R se asocia más consistentemente con riesgo de ECV en diabéticos que en población general (Letellier C et al, 2002).

En nuestra población de elevado riesgo cardiovascular, se observaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de c-HDL según el genotipo. Los individuos homocigotos QQ presentaron mayores niveles de c-HDL que los heterocigotos QR, y los homocigotos RR, que presentaron los niveles más bajos. Sin embargo, esta asociación se ha mostrado ampliamente modulada por condiciones fisiopatológicas como la obesidad y la DMT2, así como, por factores ambientales, mostrando que el polimorfismo Q192R es altamente susceptible a FR cardiovascular. Concretamente, se detectó que en individuos obesos, diabéticos, fumadores o con baja adherencia a la DM, el polimorfismo Q192R no se asoció con niveles de c-HDL. Por lo contrario, en individuos no obesos, no diabéticos, no fumadores o con alta adherencia a la DM se observó que los homocigotos QQ presentaron mayores niveles de c-HDL que los heterocigotos QR, y los homocigotos RR. Además, se observó que el alelo Q era más susceptible a la influencia de estos factores con respecto a su efecto sobre los niveles de c-HDL que el alelo R.

Varios estudios ha mostrado que la actividad de PON1 se reduce en individuos con DMT2 (Letellier C et al, 2002, Abbott CA et al, 1995, Sakai T et al, 1998), con obesidad (Beltowski J et al, 2003) y síndrome metabólico, íntimamente ligado a DMT2 y obesidad (Senti M et al, 2003). El mecanismo mediante el cual la actividad de la PON1 se reduce en la DMT2 es desconocido. Se piensa que puede

estar asociado con la glicación provocada por el aumento de glucosa en plasma lo que daría lugar al aumento de la peroxidación lipídica en las partículas de HDL (Ferretti G et al, 2001). También, se ha observado que en individuos fumadores la actividad de la PON1 está disminuida con respecto a los no fumadores (James R et al, 2000, Ferre N et al, 2003, Senti M et al, 2003). La dieta también influye en la actividad de PON1. Estudios experimentales en animales han mostrado que dietas proaterogénicas reducen la actividad de la PON1, lo que se correlaciona con un descenso en c-HDL (Hedrick C et al, 2000, Mackness M et al, 2000). En humanos, se ha observado que una dieta alta en grasas *trans* reduce la actividad de PON1 (de Roos MNG et al, 2002), sin embargo, el ácido oleico procedente del aceite de oliva se ha asociado con un aumento en la actividad de PON1 (Wallace AJ et al, 2001, Tomas M et al, 2001). También, se ha mostrado, en estudios *in vitro*, que los polifenoles procedentes de la fruta o del vino protegen o aumentan la actividad de PON1 (Kaplan M et al, 2001, Hayek T et al, 1997). Tanto el aceite de oliva como la fruta y el vino son alimentos característicos de la DM (Márquez-Sandoval F et al, 2008). Todos estos hallazgos ponen de manifiesto que FR cardiovascular como la DMT2, obesidad, el tabaco o la dieta influyen sobre la actividad de PON1, de modo que las diferencias entre los alelos Q y R del polimorfismo Q192R del gen de PON1 pueden desaparecer en presencia de dichos FR cardiovascular, como se ha observado en los resultados de este estudio en cuanto a la concentración de c-HDL. Con respecto a la mayor susceptibilidad del alelo Q con respecto a estos FR cardiovascular, otros investigadores también han sugerido que el efecto beneficioso del genotipo QQ sobre la protección de la oxidación de HDL y LDL puede ser anulada por factores ambientales relacionados con la actividad de la PON1 tales como el tabaco, la dieta, el estrés oxidativo y las enfermedades crónicas (como la DMT2 y la obesidad) (Cherki M et al, 2007).

En conclusión, en población de elevado riesgo cardiovascular el polimorfismo Q192R se ha asociado con niveles de c-HDL. Esta asociación se ha mostrado altamente modulada por FR cardiovascular como la DMT2, obesidad, el tabaco o la adherencia a la DM, sobretudo en individuos con genotipo QQ.

5.4.1.7 Polimorfismo -75A/G del gen de ApoA1

La ApoA1 es la apolipoproteína mayoritaria de la molécula de HDL, y el principal activador de la LCAT (Segrest JP et al, 2000), por lo que el locus de la ApoA1 es un candidato para estudiar la variabilidad genética de los niveles de c-HDL. En este trabajo se ha estudiado un polimorfismo localizado en el promotor de ApoA1 (-75G/A).

La frecuencia obtenida en la población del estudio PREDIMED en el nodo de Valencia fue de 0,172, encontrándose dentro del rango de frecuencia observadas en

otras poblaciones europeas (Souverein OW et al, 2005) y otras poblaciones caucásicas (Ordovás JM et al, 2002(a), Rúaño G et al, 2006). Sin embargo, es considerablemente menor que la obtenida por Morcillo S et al (2008) en población del sur de España (0,24) aunque, esta cifra es discordante con otras encontradas en países europeos y en otros estudios en el este de España (Carmena-Ramón RF et al, 1998), que concuerdan más con la obtenida en nuestra población.

La asociación del polimorfismo -75G/A con la concentración de c-HDL ha sido ampliamente examinada, desde el estudio inicial en el Reino Unido (Jeenah M et al, 1990), mostrando que hombres con el alelo A presentaban mayores concentraciones de c-HDL y ApoA1 que los homocigotos GG. En el mismo año Pagani F et al (1990) encontraba la misma asociación en mujeres italianas. Numerosos estudios se han sucedido, pero sin embargo, han mostrado controversia en sus resultados (Juo SHH et al, 1999). Incluso estudios *in vitro* dedicados a descubrir el efecto del polimorfismo de APOA1, han mostrado variabilidad en los resultados, puesto que, algunos investigadores han observado que el alelo A se asocia con baja eficiencia transcripcional (Tuteja R et al, 1992, Smith JD et al, 1992), otros, con alta eficiencia transcripcional (Angotti E et al, 1994), o incluso, otros no han encontrado ningún efecto (Danek GM et al, 1998). En nuestra población del estudio PREDIMED del nodo de Valencia no se ha encontrado asociación entre el alelo A y la concentración de c-HDL.

Es posible que el hecho de tratarse de una población de elevado riesgo cardiovascular pueda influir en dicha asociación. De hecho, Morcillo S et al (2008) observó que la asociación del alelo A con niveles de c-HDL desaparecía tanto en mujeres como en hombres diabéticos y se presentaba en individuos no diabéticos. Algunas investigaciones han encontrado que la expresión de ApoA1 en diabéticos se altera, sugiriendo que elevadas concentraciones de glucosa producen un descenso en la regulación del gen con la consecuente disminución de los niveles de ApoA1 y c-HDL (Ma Y et al, 2003). En individuos con hipercolesterolemia familiar tampoco se encontró asociación (Carmena-Ramón RF et al, 1998). Además, recientemente, se ha observado una interacción entre el polimorfismo -75G/A y la menopausia, de modo que, en mujeres premenopáusicas el alelo A mostraba mayores concentraciones de c-HDL y, sin embargo, el alelo A tuvo el impacto opuesto sobre la concentración de c-HDL tras la menopausia (Katerina H et al, 2010). Las mujeres incluidas en la población de PREDIMED son postmenopáusicas así que la asociación entre el polimorfismo -75G/A y c-HDL puede estar alterada.

Por otro lado, también se han descrito interacciones gen*ambiente que pueden explicar la controversia entre los diferentes estudios. Destacan la interacción con AGP de la dieta (Ordovas JM et al, 2002(a)) y con consumo de tabaco de modo que

el alelo A solo se asocia con incremento de c-HDL en no fumadores (Talmud PJ et al, 1994, Saha N et al, 1994, Sigurdsson G Jr et al, 1992). De hecho, no se ha encontrado asociación entre -75G/A y c-HDL en población con elevado prevalencia de fumadores (Civeira F et al, 1993). En nuestra población no se disponen de datos de consumo de AGP así que no fue posible reproducir el estudio de Ordovas JM et al (2002)(a), sin embargo, no se encontró interacción con adherencia a la DM ni con ninguno de sus componentes. En cuanto a la interacción gen*tabaco, la tendencia seguía la misma dirección que la encontrada en otros estudios pero no se alcanzó la significación estadística (Pinteracción APOA1*tabaco=0,112), probablemente debido a baja prevalencia de fumadores en nuestra población junto con la baja frecuencia del alelo A.

Por otro lado, en nuestro estudio se encontró una asociación entre el alelo A y menores niveles de c-LDL. Varios investigadores también han encontrado asociación entre el polimorfismo -75G/A y variabilidad de c-LDL (Xu CF et al, 1993, Mata P et al, 1998). Carmena-Ramón RF et al, 1998, de forma similar a nuestros resultados, no encontró asociación con c-HDL pero observó que los portadores del alelo A presentaban menores concentraciones de c-LDL tanto en hombres como en mujeres con hipercolesterolemia familiar en una población mediterránea. Se ha propuesto que -75G/A debe estar en desequilibrio de ligamiento con otro polimorfismo en un gen vecino que realmente sea responsable de la asociación con c-LDL (Minnich A et al, 1995).

Además, algunos estudios han mostrado interacciones entre el polimorfismo -75G/A y diferente respuesta del c-LDL tras diferentes tipos de intervención dietética basadas en cambios en la grasa de la dieta. Así, en un estudio en el que los participantes consumieron primero una dieta alta en AGS, seguida de una dieta rica en AGM y una dieta rica en AGP, se observó un efecto hipocolesterolémico, asociado con la dieta rica en AGP, mayor en mujeres con genotipo GA que en GG (Mata P et al, 1998). Sin embargo, otro estudio de intervención donde los participantes consumieron primero una dieta baja en grasa y después una dieta rica en AGM, observaron que tras la dieta rica en AGM, la concentración de c-LDL aumentó en individuos GA y no en GG (López-Miranda J et al, 1994). Aunque las intervenciones dietéticas y las características de la población eran diferentes en ambos estudios, los portadores del alelo A fueron más respondedores a los cambios dietéticos que los individuos con genotipo GG (Mata P et al, 1998). Sin embargo, otros estudios no han encontrado interacciones gen*dieta con -75G/A sobre los niveles de c-LDL (Meng QH et al, 1997, Carmena-Ramón RF et al, 1998).

En este trabajo se añade evidencia de la interacción entre el polimorfismo -75G/A y la dieta para determinar la concentración de c-LDL, y concretamente, a la influencia de la dieta sobre los portadores del alelo A, como se ha observado en los

estudios anteriores (López-Miranda J et al, 1994, Mata P et al, 1998). En este caso, no se estudia un nutriente sino un patrón dietético como la DM o el consumo de alimentos típicos de ella. Así pues, en nuestra población de elevado riesgo cardiovascular, los portadores del alelo A solo mostraban menor concentración de c-LDL en aquellos individuos que consumen una dieta con alto grado de adherencia a la DM, patrón dietético caracterizado por elevada cantidad de AGM y AGP y baja cantidad de AGS (Willett W et al, 1995). Sin embargo, los individuos portadores del alelo A que consumían una dieta con baja adherencia a la DM, mostraron niveles de c-LDL similares a los individuos con genotipo GG. En nuestro estudio, se observó que el componente de la DM determinante en la interacción con adherencia a la DM fue el consumo de carnes rojas, hamburguesas, salchichas o embutidos, alimentos ricos en AGS (Mata P et al, 1994) y no lo fueron alimentos ricos en AGM o AGP como AOVE, FS o pescado (Márquez-Sandoval F et al, 2008, Kris-Etherton PM et al, 1999, Roche HM et al, 2000, Alonso A et al, 2003). El consumo elevado de AGS se ha asociado con un aumento en los niveles de c-LDL (Lahoz C et al, 2000, Mensik RP et al, 2003). De esto modo, el alelo A mostró un efecto protector solo en aquellos individuos que consumían menos de 1 vez al día carnes rojas o sus derivados cárnicos. En individuos con mayor consumo no se observó este efecto (Pinteracción APOA1*consumo de carnes rojas y derivados=0,020). De todos modos, son necesarios más estudios que den consistencia a estas interacciones y que pongan de manifiesto el papel de los diferentes tipos de grasa de la dieta en la asociación del polimorfismo -75G/A con niveles de c-LDL.

En conclusión, en población mediterránea de elevado riesgo cardiovascular no se ha encontrado asociación entre el polimorfismo -75G/A y la concentración de c-HDL en concordancia con otros estudios en población de alto riesgo cardiovascular. Sin embargo, se ha observado una asociación del alelo A con menores niveles de c-LDL que además, se ha mostrado modulada por la adherencia a la DM y el consumo de carnes rojas y otros productos cárnicos derivados de ella.

5.4.2 Discusión los polimorfismos relacionados con obesidad y fenotipos intermedios de ECV.

Recientemente, estudios de asociación a escala genómica, dedicados a encontrar genes relacionados con DMT2, identificaron una variante en el gen de la FTO (rs9939609) que predispone a DMT2 a través de su efecto sobre el IMC (Frayling TM et al, 2007, Dina C et al, 2007, Andreasen CH et al, 2008, Scuteri A et al, 2007). Posteriormente, numerosos estudios independientes realizados en diversas poblaciones, han mostrado una fuerte asociación entre obesidad y fenotipos relacionados con la obesidad, tales como porcentaje de grasa corporal,

IMC, perímetro de la cintura y cadera o peso corporal, y el polimorfismo rs9939609, además de otros localizados en el gen de la FTO (Rampersaud E et al, 2008, Grant SFA et al, 2008).

En este trabajo se han estudiado las variantes rs9939609, rs3751812 y rs1861868 del gen de FTO. La frecuencia obtenida de polimorfismo rs9939609 en la población PREDIMED en el nodo de Valencia es similar a la encontrada en otras poblaciones españolas (González-Sánchez JL et al, 2008) y en otros países europeos (aproximadamente 0,450) (Frayling TM et al, 2007, Peeters A et al, 2008, Andreasen CH et al, 2008, Jacobsson JA et al, 2009). Con respecto a la frecuencia de las variantes rs3751812 y rs1861868 también son acordes con cifras obtenidas en poblaciones caucásicas (Grant SFA et al, 2008, Rampersaud E et al, 2008). Los polimorfismos rs3751812 y rs9939609 se encontraron en elevado estado de desequilibrio de ligamiento ($D'=0,961$, $r^2=0,915$), coincidiendo con otros estudios en población caucásica (Grant SFA et al, 2008). Sin embargo, estas dos variantes no se encontraron en desequilibrio de ligamiento en africanos ($r^2=0,058$) (Grant SFA et al, 2008). El polimorfismo rs1861868 no se encontró en desequilibrio de ligamiento con rs9939609 ($D'=0,411$, $r^2=0,109$), tal y como mostraron Rampersaud E et al (2008) que obtuvieron unas cifras similares a las de este estudio ($D'=0,440$, $r^2=0,170$).

Los alelos minoritarios de los tres polimorfismos han mostrado asociación con mayor riesgo de obesidad y parámetros relacionados con ella como IMC y perímetro de la cintura, tanto en adultos como en niños (Frayling TM et al, 2007, Peeters A et al, 2008, Dina C et al, 2007, Andreasen CH et al, 2008, Grant SFA et al, 2008, Rampersaud E et al, 2008). Sin embargo, en nuestra población de PREDIMED de elevado riesgo cardiovascular no se encontró asociación con obesidad, IMC o cintura con ninguno de los 3 polimorfismos. Consistentemente tampoco se encontró asociación con DMT2 y concentración de glucosa. Una razón podría subyacer en el hecho de que dichas asociaciones se han puesto de manifiesto en niños, adolescentes o población adulta de mediana edad y no en población de edad avanzada como la que se estudia en este trabajo. De hecho, Jacobsson JA et al (2009), recientemente, no encontraron asociación entre el polimorfismo rs9939609 e IMC en una población europea de avanzada edad. Además, dos estudios más mostraron que con la edad la asociación entre variantes del gen de la FTO y obesidad o IMC tiende a disminuir (Frayling TM et al, 2007, Qi L et al, 2008). Qi L et al (2008), observó que esta tendencia se mostraba solo en hombres y no en mujeres, pero en nuestra población no se encontraron diferencias por sexo. Más estudios en población de edad avanzada serán necesarios para dar consistencia a estas observaciones.

Por otro lado, se ha determinado que el gen de la FTO codifica para una 2-oxoglutarato demetilasa dependiente de ácido nucleico, pero su relación con incremento de la masa grasa no se conoce (Gerken T et al, 2007). Existe evidencia de que la FTO se expresa en el hipotálamo y en el tejido adiposo y se ha mostrado implicada en la homeostasis energética (Gerken T et al, 2007, Freddiksson R et al, 2008). Así, se ha sugerido que FTO puede estar asociada con obesidad a través de su efecto sobre la regulación del balance energético en el hipotálamo (Tou JC et al, 2002, Grill HJ et al, 2006). Algunos individuos con alelos del riesgo de FTO pueden tener alterado el ajuste o coordinación entre la regulación del apetito y el gasto de energía ya sea por exceso de apetito o ingesta energética o por una reducción en el gasto de energía. De este modo, el efecto de variantes de FTO sobre la grasa corporal podría estar modulado por factores ambientales (Berentzen T et al, 2008).

En este trabajo, se ha dado consistencia a estos hallazgos ya que se encontró una interacción entre el polimorfismo rs9939609 y actividad física que modula la asociación de esta variante con IMC y perímetro de la cintura. Los resultados mostraron que el alelo A solo se asociaba con mayor IMC y perímetro de cintura en individuos sedentarios y, sin embargo, en individuos activos esta asociación desaparece. Estos resultados son consistentes con los hallados en otros estudios realizados en diferentes poblaciones étnicas, en niños, adolescentes y adultos. Andreasen CH et al (2008) mostraron que baja actividad física podía acentuar el efecto de rs9939609 sobre la acumulación de la grasa corporal. Otros estudios posteriores también han mostrado de manera similar la influencia de la vida sedentaria sobre la asociación del alelo A de rs9939609 y parámetros relacionados con la obesidad (Jacobsson JA et al, 2009, Ruiz JR et al, 2010, Lee HJ et al, 2010). Rampersaud E et al (2008) mostraron también una interacción gen*actividad física que determinaba el IMC para el polimorfismo rs1861868. De este modo, observaron un efecto similar al que se ha descrito en el polimorfismo rs9939609, el alelo A solo se asoció con mayor IMC en individuos con baja actividad física y, no se encontró este efecto en individuos con elevada actividad física. Sin embargo, en nuestra población no se encontró una interacción gen*actividad física para el polimorfismo rs1861868 (Pinteracción rs1861868*actividad física=0,978 para la cintura, Pinteracción rs1861868*actividad física=0,770 para IMC). Con respecto al polimorfismo rs3751812, la interacción gen*actividad física no llegó a ser estadísticamente significativa (Pinteracción rs3751812*actividad física =0,109 para la cintura, Pinteracción rs3751812*actividad física =0,071 para IMC) a pesar de estar en desequilibrio de ligamiento con rs9939609. Probablemente será debido a que el tamaño de muestra para este polimorfismo es menor que para rs9939609, y por lo tanto, menor el poder estadístico.

En conclusión, los polimorfismos rs9939609, rs3751812 y rs1861868 localizados en el gen de la FTO no han mostrado asociación con IMC, perímetro de la cintura o riesgo de obesidad en población mediterránea de elevado riesgo cardiovascular. Se ha observado que la asociación entre el polimorfismo rs9939609 con IMC y perímetro de la cintura estaba modulada por la actividad física, poniendo de manifiesto la importancia de la actividad física para prevenir la obesidad en individuos con el alelo A del polimorfismo rs9939609.

5.4.3 Discusión los polimorfismos relacionados con DMT2 y fenotipos intermedios de ECV.

A pesar de que existe amplia evidencia de que los genes modulan el riesgo de DMT2, el impacto real de la mayoría de ellos no se conoce bien todavía (Almind K et al, 2001). Desarrollar la arquitectura genética de la DMT2 es dificultoso ya que se trata de una enfermedad de naturaleza poligénica (varios genes con un efecto modesto están implicados) y heterogénea (diversos genes están implicados en diferentes individuos). Además, a ello se une las posibles interacciones gen*ambiente y gen*gen que añaden complejidad al estudio. Así en este trabajo, se han estudiado diversos polimorfismos en genes que se han asociado con DMT2 en varias investigaciones, tales como la variante Pro12Ala en el gen de PPARG2, Gly482Ser en el gen de PPARGC1 y variantes en el gen de TCF7L2.

5.4.3.1 Polimorfismo Pro12Ala del gen de PPARG2

El papel del polimorfismo Pro12Ala en la modulación del riesgo de DMT2 ha sido intensamente investigado en diversas poblaciones (Stumvoll M et al, 2002). En nuestra población de elevado riesgo cardiovascular del estudio PREDIMED se obtuvo una frecuencia del alelo 12Ala de 0,090. Esta cifra es consistente con la obtenida en otros estudios en población española en los que la frecuencia alélica se encuentra entre 0,084-0,090 (Ochoa MC et al, 2004(a), González-Sánchez JL et al, 2002). Se ha observado que la frecuencia de dicho alelo presenta un gradiente en Europa, ya que el alelo 12Ala es más frecuente en el centro y norte de Europa (encontrando mayor frecuencia en Finlandia 0,169), que en el sur (siendo poblaciones de Italia y Cerdeña las que presentan menores valores, 0,046-0,054) (Scacchi R et al, 2007).

Poblaciones del este de Asia (chinos, japoneses, malayos y coreanos) presentan frecuencias del alelo 12Ala bajas. También es baja en africanos, con lo que se piensa que el alelo Pro12 es el ancestral y el alelo 12Ala proviene de poblaciones no africanas (Ruiz-Narváez E, 2005). Además, puesto que el receptor

de PPARG está implicado en la regulación lipídica, en la homeostasis de la glucosa y en la diferenciación de los adipocitos, se ha considerado que el alelo Pro12 puede actuar como alelo ahorrador que optimiza el depósito de grasa corporal, lo que permitiría la supervivencia de las poblaciones africanas en periodos en los que los recursos alimentarios son escasos (Ruiz-Narváez E, 2005, Argmann CA et al, 2005). El caso contrario ocurre con el alelo 12Ala que ha sido relacionado con la disminución del almacenamiento de AG en el tejido adiposo dejando este sustrato disponible para procesos como la termogénesis (Ruiz-Narváez E, 2005, Scacchi R et al, 2007).

Actualmente, poblaciones con un estilo de vida caracterizado por el sedentarismo y dietas opulentas, el alelo Pro12, que antiguamente era favorable, se convierte en perjudicial incrementando el riesgo de desarrollar DMT2. El efecto contrario puede ocurrir con el alelo 12Ala (Deeb SS et al, 1998, Ruiz-Narváez E, 2005, Scacchi R et al, 2007). De hecho, se ha observado que el alelo 12Ala es menos eficiente en la estimulación de los genes diana de PPARG y predispone a menores niveles de acumulación en el tejido adiposo, lo que conduce a una mejora de la sensibilidad a la insulina, efecto íntimamente relacionado en la patogénesis de la DMT2 (Gouda HN et al, 2010).

En consistencia con ello, muchos estudios han mostrado un efecto protector sobre el riesgo de DMT2 del alelo 12Ala incluyendo varios metanálisis (Altshuler D et al, 2002, Lohmueller KE et al, 2003, Parikh H et al, 2004, Gouda HN et al, 2010). Sin embargo, diversos autores han mostrado que la asociación entre el polimorfismo Pro12Ala y DMT2 es extremadamente heterogénea entre estudios (Ludovico O et al, 2007, Gouda HN et al, 2010), poniendo de manifiesto la necesidad de investigar posibles interacciones gen*ambiente y gen*gen que puedan influir en dicha asociación. Se ha observado que la reducción del riesgo de DMT2 debida a la variante 12Ala es mayor en el norte de Europa que en Europa central e inexistente en el sur de Europa (Ludovico O et al, 2007). Los resultados obtenidos en nuestro estudio en población mediterránea son consistentes con estas observaciones puesto que no se encontró asociación entre el polimorfismo Pro12Ala y el riesgo de DMT2.

Ludovico O et al (2007), en su metanálisis, observaron que la heterogeneidad encontrada en los estudios en asiáticos y otras poblaciones podía ser explicada en gran medida por el IMC, sin embargo, detectaron que no era así en el caso de la heterogeneidad encontrada en Europa. En nuestra población tampoco se observó un efecto del IMC que modulase la asociación entre Pro12Ala y el riesgo de DMT2. Por otro lado, Scacchi R et al (2007) asociaron la existencia del gradiente observado en Europa a la diferencia en los hábitos dietéticos, de modo que, en las poblaciones, donde se consume una dieta rica en lípidos (>30% de la ingesta

energética) la reducción del riesgo de DMT2 en portadores del alelo 12Aa es mayor que en aquellas poblaciones en las que el consumo de lípidos no excede el 30% del total de la ingesta energética como en las poblaciones de origen mediterráneo. Nuestra población es de origen mediterráneo, con un grado de adherencia a la DM elevado (9 ± 2 puntos sobre 14), pudiendo explicar la falta de asociación entre el polimorfismo Pro12Aa con DMT2. Sin embargo, no se encontraron diferencias en dicha asociación al estratificar la población en individuos con baja adherencia a la DM y alta adherencia a la DM. Así que se examinó si algún otro factor ambiental podría influir en la asociación de la Pro12Aa con DMT2 en nuestra población.

Se encontró una interacción entre la actividad física y el polimorfismo Pro12Aa que determinaba la concentración plasmática de glucosa. Se observó que en individuos sedentarios, el genotipo Pro12Pro presentaba mayores concentraciones de glucosa que el alelo 12Aa y, sin embargo, en individuos no sedentarios no se encontraron diferencias en la concentración de glucosa entre individuos con genotipo Pro12Pro y portadores del alelo 12Aa. Así pues, se observó que el genotipo Pro12Pro era más sensible a un estilo de vida sedentario o no sedentario con respecto a la concentración de glucosa. Dos estudios han examinado la interacción entre el polimorfismo Pro12Aa y el nivel de actividad física. Franks P et al (2004) estudiaron la correlación entre actividad física y niveles de insulina en homocigotos Pro12Pro y portadores del alelo 12Aa, en una población caucásica. No encontraron una interacción estadísticamente, sin embargo, cuando estudiaron de manera conjunta la actividad física y la dieta encontraron efectos aditivos. Así, observaron que individuos homocigotos Pro12Pro con bajo nivel de actividad física y reducida razón de AGP/AGS en su dieta mostraban mayores niveles de insulina que aquellos con alta actividad física y elevada razón AGP/AGS. Por razones de pérdida de poder estadístico puesto que la frecuencia del alelo 12Aa es baja y la de individuos sedentarios también, no ha sido posible evaluar el efecto conjunto de la actividad física y la adherencia a la DM en nuestra población. Sin embargo, tanto la hiperinsulinemia como la hiperglucemia son estados relacionados con la resistencia a la insulina y la DMT2 (Palma-Gámiz JL, 2007), así que nuestros resultados y los de Franks P et al (2004) presentan la misma tendencia, mostrando mayor susceptibilidad del alelo Pro12 a los factores ambientales.

Otro estudio, realizado por Nelson TL et al (2007)(a) también encontró una interacción estadísticamente significativa del alelo Pro12 y actividad física que resultaba en un aumento del riesgo de DMT2 en población no hispana. Observaron que el alelo Pro12 se asociaba significativamente con mayor riesgo de DMT2 en aquellos individuos con baja actividad física (OR=2,37 IC95% (1,14-4,94)). En nuestro estudio, los individuos homocigotos Pro12Pro mostraron mayor riesgo de

DMT2 pero no se alcanzó la significación estadística (OR=1,73 IC95% (0,89-3,33) P=0,105).

Por otro lado, en la población del estudio PREDIMED se encontró que los portadores del alelo 12Ala mostraban menores niveles de PAD tras ajustar por variables de confusión. Con respecto a la asociación del polimorfismo Pro12Ala con tensión arterial existe controversia entre las publicaciones realizadas. Algunos investigadores han mostrado que el polimorfismo Pro12Ala se asocia significativamente con tensión arterial (Rodríguez-Esparragón FJ et al, 2003, Yliharsila H et al, 2004, Sookoians S et al, 2005), otros, en cambio, no han encontrado asociación (Goumi-Berthold I et al, 2008, Swarbrick M et al, 2001). Esta controversia sugiere que diversos factores pueden influir en esta asociación.

Por un lado, en individuos diabéticos y obesos mórbidos (Douglas J et al, 2001) y en familiares de DMT2 (Hasstedt J et al, 2001) se ha mostrado asociación entre el polimorfismo Pro12Ala y mayores niveles de PAS y PAD. Sin embargo, Östgren CJ et al (2003), coincidiendo con nuestro estudio, observó que los individuos con genotipo Pro12Ala y Ala12Ala presentaban menor PAD que los individuos con genotipo Pro12Pro, y que dicha asociación parece no explicarse por la resistencia a la insulina o el sobrepeso puesto que la asociación se mantuvo significativa tras ajustar por parámetros relacionados. Estas observaciones son compatibles con el hecho que antagonistas de PPAR γ han mostrado que previene la HTA independientemente de su capacidad para mejorar la sensibilidad a la insulina (Wilson T et al, 2000). Además, estudios *in vitro* han mostrado relación entre PPAR y la actividad del sistema renina-angiotensina-aldosterona que regula la presión arterial (Takeda K et al, 2000, Sugawara A et al, 2001). Östgren CJ et al (2003) propone también que tal vez estén implicados otros marcadores de resistencia a la insulina como los adipocitoquinas, pero no se disponen de datos en toda nuestra población.

Por otro lado, otro factor que puede influir en la relación entre Pro12Ala y la presión arterial es el sexo. De hecho, en nuestra población encontramos que la asociación entre el alelo 12Ala y menores niveles de PAS y PAD solo se mantuvo en hombres y no en mujeres. Además se detectó una interacción gen*sexo que determinaba los niveles de PAS. Esta interacción no alcanzó la significación estadística con respecto a la PAD. Östgren CJ et al, 2003 también mostraron diferencias según el sexo, ya que el descenso de PAD en portadores del alelo 12Ala se mostró más marcado en hombres, aunque tampoco encontraron una interacción gen*sexo que determinara los niveles de PAD.

Asimismo, puede que también influyan factores ambientales dado que se ha mostrado, en este trabajo, la influencia de la actividad física sobre el efecto del

polimorfismo Pro12Ala en la concentración glucosa. Sin embargo, no se encontró una interacción entre el polimorfismo Pro12Ala y la actividad física que determinara los niveles de PAD (Pinteracción Pro12Ala*actividad física=0,401). La interacción gen*actividad física sobre PAD no se comprobó estratificando por sexo ya que el tamaño de los grupos y el poder estadístico quedaba muy reducido.

En conclusión, en población mediterránea de elevado riesgo cardiovascular no se encontró asociación con riesgo de DMT2 en consistencia con el gradiente norte sur observado en Europa. Se observó que dicha asociación estaba modulada por la realización de actividad física, mostrándose el genotipo Pro12Pro más sensible a un estilo de vida sedentario. Además, se observó un efecto protector del alelo 12Ala sobre PAS y PAD en hombres, mostrándose una interacción gen*sexo en el caso de PAS, sin embargo, posteriores estudios son necesarios para confirmar la asociación con tensión arterial y las diferencias por sexo.

5.4.3.2 Polimorfismo Gly482Ser del gen de PPARGC1 γ

El polimorfismo Gly482Ser localizado en el gen de PPARGC1 γ tampoco se asoció con concentración de glucosa y riesgo de DMT2 en nuestra población de elevado riesgo cardiovascular.

Las frecuencias alélicas encontradas en la población estudiada son similares a las de otros estudios en países europeos (Esterbauer H et al, 2002, Ambye L et al, 2005, Oberkofler H et al, 2003, Vohl MC et al, 2005, Lacquemant C et al, 2002).

La ausencia de asociación entre el polimorfismos Gly482Ser con DMT2 es consistente con otros estudios en población europea (Lacquemant C et al, 2002, Ambye L et al, 2005, Barroso I et al, 2003), americana (Nelson TL et al, 2007(b)), japonesa (Hara K et al, 2002) y en indios Pima (Muller YL et al, 2003). Sin embargo, otros investigadores si han detectado un mayor riesgo de DMT2 asociado al alelo 482Ser (Ek J et al, 2001, Kunej T et al, 2004). En el metanálisis realizado por Barroso I et al (2006) se muestra un efecto modesto del polimorfismo Gly482Ser sobre el riesgo de DMT2, sin embargo, subraya la necesidad de estudios a gran escala que confirmen esta asociación. Otros estudios han encontrado asociación entre el polimorfismo Gly482Ser con obesidad (Esterbauer H et al, 2002) o HTA (Oberkofler H et al, 2003), pero en nuestra población no se han detectado dichos efectos, coincidiendo con otros estudios incluidos en estos dos metanálisis (Barroso I et al, 2006, Vimalaswaran KS et al, 2008).

Sin embargo, se encontró una asociación en nuestra población entre el polimorfismo Gly482Ser con concentración de CT y c-LDL mostrando el genotipo Ser482Ser un perfil lipídico más perjudicial que los genotipos Gly482Ser y

Gly482Gly. A nivel molecular, se ha observado que PPARGC1 γ es un coactivador para el receptor X hepático α que constituye un importante factor transcripcional que contribuye a la regulación celular de la homeostasis del colesterol (Wang YB et al, 2005). Sin embargo, existen escasos estudios epidemiológicos que hayan examinado el efecto de este polimorfismo sobre niveles de lípidos. La mayoría de ellos han estudiado la relación con c-HDL puesto que es un factor implicado en el síndrome metabólico. Ek J et al (2001) observaron que los homocigotos Ser482Ser presentaban menos concentración de c-HDL. Sin embargo, Vohl MC et al (2005) detectaron mayores niveles de c-HDL en obesos mórbidos no diabéticos con genotipo Gly482Ser que con genotipo Gly482Gly, pero no encontraron asociación con CT y c-LDL. Por otro lado, Zambrano M et al (2009) observaron que los niveles de c-LDL eran mayores en individuos Ser482Ser con respecto a individuos con genotipo Gly482Ser y Gly482Gly en diabéticos. Zhang S et al (2007) encontraron mayor concentración de CT y c-LDL en portadores del alelo 482Ser que en homocigotos Gly482Gly en controles sanos no diabéticos. En nuestro estudio no se encontraron diferencias entre diabéticos y no diabéticos en el efecto del polimorfismo Gly482Ser sobre concentración de CT y c-LDL, aunque puede ser debido a la presencia simultánea de otros FR cardiovascular. Por otro parte, Nikitin AG et al (2010), no encontraron asociación entre el polimorfismo Gly482Ser y niveles de lípidos tanto en casos de CI y como en controles. Tampoco observaron impacto sobre el riesgo de CI. Sin embargo, otros estudios han mostrado mayor riesgo de CI (Zhang S et al, 2007), y mayor severidad de aterosclerosis en la carótida (Iglseeder B et al, 2006).

Por otro lado, también se ha observado que el gen PPARGC1 γ tiene un papel importante en la respuesta metabólica al ejercicio (Baar K et al, 2002). En nuestra población no se encontró interacción gen*actividad física que regulara el efecto del polimorfismo Gly482Ser sobre niveles de lípidos, DMT2, obesidad o HTA.

En conclusión, en población mediterránea de elevado riesgo cardiovascular el polimorfismo Gly482Ser no parece tener efecto sobre el riesgo de DMT2. Sin embargo, este polimorfismo se asoció con mayores niveles de CT y c-LDL lo que podría relacionarse con incremento del riesgo de ECV, pero son necesarios más estudios para confirmar esta asociación y establecer los factores que puedan influir.

5.4.3.3 Polimorfismos rs7901695, rs7903146, rs12255372 del gen de TCF7L2

En el presente trabajo se ha encontrado una importante asociación de los polimorfismos rs7903146 y rs12255372 con una mayor prevalencia de DMT2 en los portadores del alelo T de ambos polimorfismos, en población española de alto riesgo cardiovascular. El polimorfismo rs7901695 también fue estudiado pero,

aunque mostró la misma tendencia en cuanto al riesgo de DMT2 que los otros dos polimorfismos, la asociación no alcanzó el nivel de significación estadística.

Las frecuencias alélicas de estas variantes obtenidas en la población estudiada y en diabéticos y no diabéticos son similares a las observadas en otros países del sur de Europa (Cauchi S et al, 2006, Vaxillaire M et al, 2008, Melzer D et al, 2006, González-Sánchez JL et al, 2008) y, sin embargo, son elevadas si se compara con poblaciones del norte de Europa (Saxena R et al, 2006, Helgason A et al, 2007). Se ha observado que el alelo C del polimorfismo rs7901695, el alelo T de rs7903146 y el alelo T de rs12255372 tienen mayor frecuencia en caucásicos, europeos y no europeos, africanos e hindúes, que en asiáticos de la zona este (Tong Y et al, 2009). Además, existe amplia evidencia de que los 3 polimorfismos están en desequilibrio de ligamiento (Lyssenko V et al, 2007, Grant SF et al, 2006, Helgason A et al, 2007, González-Sánchez JL et al, 2008), hecho confirmado en nuestro estudio.

Por otro lado, la asociación entre el polimorfismo rs7901695, rs7903146 y rs12255372 con mayor prevalencia de DMT2 ya ha sido previamente observada en múltiples estudios. Entre los primeros estudios destaca el llevado a cabo por Grant SF et al (2006). Descubrieron un microsatélite (DG10S478) en el intrón 3 del gen de TCF7L2 que se asociaba con DMT2 en una muestra de casos y controles de Islandia. Este grupo replicó sus resultados en dos poblaciones caucásicas más. Los polimorfismos rs7901695, rs7903146 y rs12255372 se encontraron en fuerte desequilibrio de ligamiento con DG10S478 y presentaron asociación con DMT2. Las variantes rs12255372 y rs7903146 mostraron potentes y similares asociaciones con DMT2 (RR=1,52, $p=2,5*10^{-16}$; RR=1,54, $p=2,1*10^{-17}$ respectivamente) (Grant SF et al, 2006).

Tras este hallazgo, numerosos estudios se han sucedido en varias poblaciones. Diversos metanálisis han mostrado gran consistencia en los resultados obtenidos con respecto a las variantes rs7901695, rs7903146 y rs12255372 y riesgo de DMT2 en diferentes grupos étnicos que engloban caucásicos, africanos y asiáticos (Cauchi S et al, 2007, Tong Y et al, 2009, Florez JC, 2007). Entre ellos, los polimorfismos rs12255372 y rs7903146 son los que más fuertemente se han asociado con DMT2 (Saxena R et al, 2006, Helgason A et al, 2007). Además, existe evidencia de que el polimorfismo rs7903146 es el que mayor efecto produce sobre el riesgo de DMT2 en población caucásica (Cauchi S et al, 2007, Florez JC, 2008). El riesgo estimado en este estudio es menor que el obtenido por Grant SF et al (2006) y en poblaciones francesas (entre 1,45 y 1,70) (Vaxillaire M et al, 2008, Cauchi S et al, 2006) y otras poblaciones del norte de Europa (1,40-1,37) (Saxena R et al, 2006, Florez JC, 2008). También es menor al riesgo global estimado en los metanálisis de Cauchi S et al (2007), Florez JC (2007) y Tong Y et al (2009), (1,46, 1,44 y 1,42 respectivamente). Sin embargo, es similar al encontrado en población española

(1,29) (González-Sánchez JL et al, 2008) y en población italiana mayor de 65 años (Melzer D et al, 2006). Con respecto al polimorfismo rs12255372, el riesgo estimado en nuestro estudio es menor que el obtenido en poblaciones francesas (1,60) (Cauchi S et al, 2006), pero superior al obtenido en otras poblaciones del norte de Europa (1,42) (Lyssenko V et al, 2007) y españolas (1,37) (González-Sánchez JL et al, 2008). Es similar al obtenido por Grant SF et al (2006) en el primer estudio (1,52).

Se observa que generalmente, el efecto del polimorfismo rs7903146 sobre el riesgo de DMT2 es superior al de rs12255372. Sin embargo, en nuestra población se ha encontrado un mayor efecto por parte del polimorfismo rs12255372. Otro estudio, realizado en población general de la zona central de España, estimaron también una OR mayor para el polimorfismo rs12255372 que para rs7903146 (1,37 vs 1,29 respectivamente), aunque la diferencia no fue tan elevada como en nuestro estudio (González-Sánchez JL et al, 2008). Este grupo investigador también encontró asociación entre el polimorfismo rs7901695 y riesgo de DMT2 (OR=1,59 IC95% (1,10-2,34) $p=0,020$), en contraste con nuestra población donde no se encontró dicho efecto, a pesar de encontrarse en desequilibrio de ligamiento con rs7903146 y rs12255372. Probablemente será debido a las variaciones en las frecuencias alélicas, ya que el efecto del polimorfismo rs7901695 sigue la misma tendencia que la observada en los otros dos polimorfismos.

Los polimorfismos rs7903146 y rs12255372 también se asociaron con concentración plasmática de glucosa. Se ha mostrado evidencia de un efecto aditivo del alelo T, ya que a medida que aumenta el número de alelos T, en ambos casos, la concentración de glucosa es mayor. Este efecto se ha mostrado en numerosos estudios (Vaxillaire M et al, 2008, Melzer Det al, 2006, Stolerman ES et al, 2009, Bo S et al, 2009). Al comparar los niveles de glucosa entre homocigotos mutados frente a homocigotos salvajes de los polimorfismos rs7903146 (TT vs CC) y rs12255372 (TT vs GG) el incremento en el nivel de glucosa es mayor en el polimorfismo rs7903146 que en el rs12255372 (7,7% vs 7,1%, respectivamente). Sin embargo, al comparar dichos niveles entre portadores del alelo de riesgo (T en ambos casos) frente a homocigotos salvajes, el efecto es mayor en el polimorfismo rs12255372 que en el rs7903146 (6,4% vs 5,7%). Al analizar la combinación de genotipos de rs12255372 y rs7903146 se observa que tanto al comparar homocigotos mutados (TT/TT) frente a homocigotos salvajes (CC/GG) en ambos polimorfismos, como al comparar portadores de los alelos de riesgo (T en ambos casos) frente a homocigotos salvajes (CC/GG), se potencia el efecto sobre la concentración de glucosa. En el primer caso (TT/TT vs CC/GG) se obtuvo un incremento de un 9,3% en la concentración de glucosa. En el segundo caso (portadores del alelo T en ambos casos vs CC/GG), un aumento de 7,9%, menor que el anterior.

Por otro lado, también se observó una asociación entre las variantes de TCF7L2 estudiadas e IMC. Los homocigotos del alelo minoritario en los 3 polimorfismos mostraron menor IMC que heterocigotos y homocigotos salvajes en los 3 casos, pero las diferencias fueron estadísticamente significativas únicamente en el caso del polimorfismo rs7903146. Este efecto se ha observado en varios estudios, Lyssenko V et al (2007), observaron que los individuos con genotipo TT mostraban menor IMC que CT y TT, en una población del este de Finlandia. En el estudio *Diabetes Prevention Program* se observó el mismo efecto sobre IMC y cintura (Florez Jc et al, 2006), y también en población italiana mayor de 65 años sobre cintura (Melzer D et al, 2006). Es interesante que un polimorfismo pueda conferir mayor riesgo de DMT2 al mismo tiempo que disminuye el IMC. Los mecanismos involucrados en este proceso no están definidos. En nuestra población, además, se ha detectado una interacción entre cada uno de los tres polimorfismos del gen de TCF7L2 estudiados y el consumo de FS para determinar el IMC y el riesgo de obesidad. De este modo, se detectó que, en individuos que consumían 3 veces o más a la semana FS, se mostraba un efecto alélico protector frente al IMC y el riesgo de obesidad para los 3 polimorfismos estudiados. Sin embargo, en individuos con menor consumo de FS no se detectó este efecto. La interacción fue estadísticamente significativa en el caso de los polimorfismos rs7901695 y rs12255372 tanto para el IMC como para el riesgo de obesidad, y con respecto al polimorfismo rs7903146 solo para el riesgo de obesidad. Por su alto valor calórico, existe preocupación de que el consumo de FS provoque un aumento de peso corporal, pero varios estudios, entre ellos el estudio piloto del proyecto PREDIMED, han mostrado que la ingesta diaria de FS no ejerce ningún efecto sobre la obesidad o incluso, han observado una relación inversa entre el consumo frecuente de FS e IMC (Estruch R et al, 2006, Rajaram S et al, 2006). En el presente estudio, se ha puesto de manifiesto además, el beneficio que puede suponer la ingesta frecuente de FS (30g, 3 o más veces a la semana) para los individuos portadores de los alelos minoritarios (heterocigotos y, sobretodo, homocigotos para dichos alelos) de los polimorfismos rs7901695, rs7903146 y rs12255372 del gen de TCF7L2, sobre la obesidad.

Por otra parte, varios estudios han mostrado que variantes en el gen de TCF7L2 son las que ejercen mayor efecto sobre el riesgo de DMT2 con respecto a otras localizadas en genes como Pro12Ala en el gen de PPARG2 y Gly482ser en el gen de PPARGC1 γ , que se han asociado de manera reproducible con DMT2 (Saxena R et al, 2006, Florez JC, 2008, Cauchi S et al, 2007). En nuestro estudio se ha confirmado este hecho ya que las variantes de PPARG2 y PPARGC1 γ no han mostrado asociación con DMT2. Así pues, actualmente se considera prioritario investigar el mecanismo de acción de los alelos de riesgo de los polimorfismos de TCF7L2 sobre el metabolismo de la glucosa. El más estudiado ha sido rs7903146. De este modo, se ha observado de forma consistente en diversos estudios, que el

alelo T de este polimorfismo se asocia con defecto en la secreción de insulina en las células β pancreáticas y no con resistencia a la insulina como han mostrado otras variantes como Pro12Ala en el gen de PPARG2 (Lyssenko V et al, 2007, Florez JC et al, 2006, Saxena R et al, 2006, Stolerman ES et al, 2009, Loos RJF et al, 2007, Florez JC, 2008). Esta evidencia se ve reforzada con el hecho de que el alelo T confiere mayor riesgo de DMT2 independientemente de FR como IMC, edad, sexo, historia familiar de DMT2 (Cauchi S et al, 2007, Lyssenko V et al, 2008), fármacos (Florez JC et al, 2006) y cambios en el estilo de vida (Florez JC et al, 2006, Bo S et al, 2009, Wang J et al, 2007), ya que genes implicados en la resistencia a la insulina han mostrado ser más susceptibles a factores como IMC o ambientales (Florez JC, 2008). En nuestra población no se encontró interacción con el sexo, IMC o factores ambientales que modularan la asociación entre rs7903146 y la concentración de glucosa o el riesgo de DMT2, en contraste con el caso del polimorfismo Pro12Ala donde se encontró un interacción gen*actividad física sobre los niveles de glucosa.

Sin embargo, se ha observado que cambios en el estilo de vida pueden mitigar el efecto del alelo T sobre DMT2 (Florez JC et al, 2006, Bo S et al, 2009, Wang J et al, 2007) y que dietas ricas en cereales integrales (Kallio P et al, 2007), y dietas programadas para la reducción del peso disminuyen la expresión de TCF7L2 en el tejido adiposo lo que sugiere que los nutrientes pueden estar implicados en la expresión de este gen (Cauchi S et al, 2008). Tal vez, el hecho de que en nuestra población el efecto del polimorfismo rs7903146 sea menor, como se observa también en otras poblaciones españolas e italianas (Melzer D et al, 2006, González-Sánchez JL et al, 2008), sea debido a que se trata de una población del sur de Europa donde se consume una dieta tipo mediterráneo. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre los individuos que consumen una dieta con elevada o baja adherencia a la DM, ni con ninguno de sus componentes. Quizás esté implicado algún nutriente de manera más específica. De modo que serán necesarios más estudios en poblaciones mediterráneas en los que se analice la influencia de la dieta y sus componentes.

En conclusión, variantes del gen de TCF7L2 han sido asociadas con DMT2 en población española de elevado riesgo cardiovascular constituyendo importantes marcadores de riesgo para su posterior estudio en cuanto a posible utilidad clínica, análisis de interacciones gen*ambiente y respuesta a los tratamientos. De forma paradójica, dichas variantes han mostrado un efecto beneficioso sobre la obesidad, sobretodo en aquellos individuos que consumen FS frecuentemente.

5.4.4. Discusión los polimorfismos relacionados con marcadores de inflamación y fenotipos intermedios de ECV.

En el presente estudio, se ha investigado la influencia de los polimorfismos -765G>C del gen de COX-2 y -174G>C de IL-6 sobre marcadores de inflamación en suero en una población mediterránea de alto riesgo cardiovascular. Las asociaciones fueron mayores y más homogéneas en los dos sexos para -765G>C de COX-2. Los portadores del alelo C presentaron menores concentraciones de IL-6 e ICAM. Varios estudios han mostrado el efecto protector de esta variante, asociado a un descenso en la actividad del promotor de COX-2 (Papafili A et al, 2002, Cipollone F et al, 2004, Orbe J et al, 2006, Colaizzo D et al, 2006, Cipollone F et al, 2006). Papafili A et al, (2002) encontró menores niveles de PCR en portadores del alelo C tras cirugía coronaria. En contraste con nuestros resultados, ellos no encontraron asociación con IL-6. Sin embargo, Orbe J et al (2006), en población sana española, observaron menor concentración de IL-6 y PCR en portadores del alelo C. Además, detectaron menor expresión de COX-2 y aterosclerosis subclínica. Estos resultados son compatibles con los obtenidos por Cipollone F et al, (2004) ya que mostraron que el alelo C se asociaba con menor riesgo de IAM e ictus. Ni Papafili A et al, (2002), Orbe J et al, (2006) o Cipollone F et al, 2004, estudiaron la relación entre el polimorfismo de COX-2 con ICAM y VCAM. En nuestro estudio, se encontró una asociación entre -765G>C con menor nivel de ICAM en suero pero no con VCAM. Tras consultar la literatura, este es el primer estudio que obtiene estos resultados. Aunque ICAM y VCAM son considerados marcadores de activación endotelial y aterosclerosis, existen varios estudios que han mostrado diferencias entre los dos marcadores basadas en su especificidad (Blankenberg S et al, 2001, Ridker PM et al, 2000(a), Calabresi L et al, 2002, de Lemos JA et al, 2000).

Cuando se analizó el efecto del polimorfismo -174G>C de IL-6, se encontró menos consistencia en las asociaciones con las concentraciones de IL-6 que en el caso del polimorfismo -765G>C de COX-2. Aunque existen numerosos estudios, la consistencia entre ellos es baja (Mysliwska J, et al, 2006, Mayosi BM et al, 2005, Fishman D et al, 1998, Samuel JM et al, 2008, Bruunsgaard H et al, 2004, Basso F et al, 2002, Nauck M et al, 2002). Fishman D et al, (1998) demostró *in vitro* el efecto sobre la función de IL-6 del polimorfismo -174G>C mostrando menor expresión en el alelo C. Sin embargo, los resultados discrepantes en los estudios epidemiológicos y la identificación de regiones reguladoras en el promotor (Samuel JM et al, 2008), sugieren que la regulación de la expresión de IL-6 es más compleja. Existen estudios que asocian el alelo C con mayor concentración de IL-6 (Mayosi BM et al, 2005, Bruunsgaard H et al, 2004), y estudios en los que no se ha encontrado asociación (Basso F et al, 2002, Nauck M et al, 2002). Estas discrepancias también se ha observado cuando se ha examinado la relación entre -

174G>C y riesgo cardiovascular (Humpries SE et al, 2001, Bruunsgaard H et al, 2004, Basso F et al, 2002, Nauck M et al, 2002, Lieb W et al, 2004, Sekuri C et al, 2007). Este hecho podría ser debido a la existencia de una modulación relevante por parte de las características de la población. De hecho, en nuestra población se encontró una interacción con el sexo. En mujeres, la concentración de IL-6 no varió entre genotipos y en hombres, aumentó en portadores del alelo C. Aunque algunos estudios han mostrado un incremento en los niveles de PCR en portadores del alelo C (Humpries SE et al, 2001, Sie MP et al, 2006, Vickers MA et al, 2002), en nuestra población de alto riesgo cardiovascular no se ha encontrado dicho efecto. Sin embargo, este polimorfismo se asoció con mayor concentración de ICAM.

Por otro lado, se estudió también si los polimorfismos -765G>C en el gen de COX-2 y -174G>C en el gen de IL-6 modulaban el efecto de una intervención dietética con DM, administrada durante 3 meses, sobre el descenso en la concentración de IL-6, PCR, ICAM y VCAM ya que en el estudio piloto del estudio PREDIMED general se observó un efecto beneficioso de la DM sobre estos marcadores (Estruch R et al, 2006) y también en otros estudios (Esposito K et al, 2004, Chrysohoou C et al, 2004). En nuestra población no se encontraron interacciones gen*dieta para los marcadores de inflamación analizados. En el caso del polimorfismo de COX-2, aunque en la visita inicial la concentración de IL-6 fue mayor en los individuos homocigotos GG, la intervención con DM, tanto en el grupo con suplemento de AOVE y como de FS, redujo la concentración de IL-6. La misma situación se dió con ICAM. Este fenómeno, en el que una intervención dietética reduce la concentración de marcadores de riesgo en individuos con elevada concentración asociada al genotipo antes de iniciar la intervención, se ha denomina interacción gen*dieta “biológica” (Corella D et al, 2005). Este término ha sido aplicado normalmente para enfermedades monogénicas, sin embargo, actualmente, se ha utilizado en intervenciones dietéticas con una finalidad clínica para prevenir enfermedades. Una interacción estadística existe si el grado o dirección del efecto del factor 1 (por ejemplo el polimorfismo) difiere según los valores del efecto 2 (por ejemplo la intervención dietética). De acuerdo con esto, la gran mayoría de publicaciones que han examinado interacciones gen*dieta se han centrado en interacciones estadísticamente significativas (Corella D et al, 2005). Sin embargo, es necesario que las interacciones biológicas sean consideradas cuando se diseñen intervenciones dietéticas preventivas y terapéuticas dirigidas a modificar fenotipos específicos en individuos genéticamente susceptibles.

Una de las limitaciones de este estudio es que una importante parte de las diferencias observadas en los marcadores de inflamación podrían deberse a los suplementos de AOVE y FS ya que la adherencia a ellos es superior a la de patrones dietéticos generales.

En conclusión, el polimorfismo -765G>C en el gen de COX-2 es un marcador genético relevante de concentraciones de IL-6 e ICAM en una población mediterránea de elevado riesgo cardiovascular. No se encontraron interacciones gen*dieta, por lo que la intervención dietética con DM+AOVE o DM+FS reduce las concentraciones de marcadores de inflamación a pesar de los genotipos estudiados. También, esta intervención, además de ser beneficiosa para la población general, podría ser especialmente favorable para aquellos individuos que tengan un genotipo de COX-2 e IL-6 que provoque elevadas concentraciones de marcadores de inflamación. Esta observación es considerada una interacción gen*dieta biológica.

5.4.5. Discusión los polimorfismos relacionados con marcadores de estrés oxidativo y fenotipos intermedios de ECV.

En el presente trabajo, se ha examinado el efecto del polimorfismo C242T de la subunidad *p22phox* de NADPH oxidasa sobre marcadores de estrés oxidativo, niveles de lípidos, variables antropométricas y presión arterial.

La frecuencia del alelo T (0,355) es similar a la encontrada en otros países europeos (Stanger O et al, 2001, Schächinger V et al, 2001) y otras poblaciones caucásicas (Cai H et al, 1999, Azumi H et al, 1999). Sin embargo, es menor que la obtenida en poblaciones italianas (0,41-0,47) (Di Castelnuovo A et al, 2008, Arca M et al, 2008). En asiáticos la frecuencia del alelo T es muy baja (alrededor de 0,010) (Saha N et al, 1999, Hayaishi-Okano R et al, 2003).

El polimorfismo C242T supone una sustitución de histidina por tirosina en posición 72 y este cambio provoca la pérdida de la función oxidativa de la proteína *p22phox*, con el consecuente descenso en la producción de ROS y del estrés oxidativo en la vasculatura (Whitehead AS et al, 2001). En nuestra población de elevado riesgo cardiovascular se encontró que los portadores del alelo T presentaban mayor concentración de GSH que los homocigotos CC. El GSH es un importante antioxidante producido por las células del organismo que contribuye a mantener el poder antioxidante de enzimas como la glutatión peroxidasa y también de la vitamina C y E. Un aumento de estrés oxidativo va acompañado de una disminución de la actividad de la mayoría de las enzimas antioxidantes como la catalasa y glutatión peroxidasa, así como del aumento de la razón GSSG/GSH (aumento de GSSG y disminución de GSH) (Fandos M et al, 2010). Así pues, la pérdida de función de *p22phox* provocada por el polimorfismo C242T es compatible con la asociación con GSH encontrada en nuestra población. Sin embargo, no se encontró asociación entre el polimorfismo C242T y concentración de GSSG o la razón de GSSG/GSH, componentes también del sistema antioxidante del glutatión.

Tampoco se observó influencia sobre la actividad de la catalasa. No existen estudios que examinen el efecto de C242T sobre estos marcadores de estrés oxidativo para comparar nuestros resultados. La mayoría de las publicaciones que han analizado dicho efecto se han centrado en el MDA, un importante indicador de la peroxidación lipídica. Ninguna de ellas ha mostrado asociación entre el polimorfismo C242T y la concentración de MDA de manera consistente con nuestros resultados (Stanger O et al, 2001, Nakano T et al, 2003, Paik IY et al, 2009). Sin embargo, Arca M et al (2008) encontraron mayor concentración de 8-oxo-dG, marcador de daño oxidativo del ADN, en homocigotos CC comparado con los portadores del alelo T en individuos con ECV documentada, en población italiana. En nuestro estudio no se encontró asociación con 8-oxo-dG. De todos modos, sería conveniente realizar estos análisis con mayor número de individuos para conseguir mayor poder estadístico.

Por otro lado, el polimorfismo C242T no mostró influencia sobre concentración de lípidos, glucosa o variables antropométricas. Nakano T et al (2003) no encontraron asociación con niveles de lípidos (CT, c-HDL, c-LDL y TG) e IMC en población japonesa y Arca M et al (2008) tampoco con lípidos (CT, c-HDL, c-LDL y TG), glucosa e IMC, de manera consistente con nuestros resultados.

Por otra parte, se ha puesto de manifiesto que la HTA es el FR que más se relaciona con un perfil de estrés oxidativo anormal (Fandos M et al, 2010). Además, se ha mostrado que el polimorfismo C242T es un importante determinante para la función vasodilatadora del endotelio (Schächinger V et al, 2001, Shimokata K et al, 2004) mostrando el alelo T mayor respuesta. Por ello, se examinó la asociación del polimorfismo C242T con los niveles de PAS y PAD y riesgo de HTA. Los resultados no mostraron diferencias según el genotipo en cuanto a PAS, PAD o riesgo de HTA en población de elevado riesgo cardiovascular. Raijmakers MT et al (2002) tampoco encontró influencia del polimorfismo C242T y preclampsia. Sin embargo, Moreno MU et al (2006) detectó un efecto protector del alelo T sobre HTA en un estudio de casos y controles en población general española.

Con respecto al efecto del polimorfismo C242T sobre el riesgo de ECV también existen resultados contradictorios reflejados en el metanálisis realizado por Di Castelnuovo A et al (2008) y en la revisión de San José G et al (2008). Algunas publicaciones han mostrado que el alelo T protege frente a aterosclerosis, otros no han mostrado asociación y algunos incluso han detectado que el alelo T favorece la progresión de aterosclerosis. Así pues, podría ocurrir que las discrepancias entre estudios se produjeran por diferencias en las poblaciones estudiadas o por la influencia de factores ambientales. De hecho, He MA et al (2007) encontraron una importante interacción entre el polimorfismo C242T y el consumo de tabaco que

modulaba el riesgo de ECV. Mostraron que en no fumadores, los portadores del alelo T presentaban menor riesgo de ECV que los homocigotos CC y, sin embargo, en fumadores, ocurría al contrario, los portadores del alelo T mostraban mayor riesgo de ECV comparado con homocigotos CC. Así pues, se examinó la influencia del tabaco en nuestra población. Se encontró que la concentración de GSH era mayor en los portadores del alelo T con respecto a los homocigotos CC en individuos no fumadores, sin embargo, en individuos fumadores no se encontró asociación. La interacción no alcanzó la significación estadística ($P_{interacción}=0,125$). Cabe destacar el reducido tamaño de muestra sobretodo en el grupo de fumadores, lo que hace necesario confirmar estas observaciones en estudios con mayor número de muestra. Por otro lado, a pesar de la influencia del consumo de tabaco sobre la asociación entre C242T y GSH, no se encontraron diferencias en cuanto a la relación de C242T con PAS, PAD e HTA entre fumadores y no fumadores.

También se estudiaron las posibles interacciones con otros factores ambientales. La adherencia a la DM también puede influir sobre el estrés oxidativo puesto que en dicho patrón dietético se incluyen alimentos que contienen sustancias antioxidantes como el AOVE, FS o el vino (Fito M et al, 2007). También, la actividad física moderada se ha observado que reduce el estrés oxidativo (Arquer A et al, 2009). Sin embargo, no se encontraron diferencias entre individuos que consumen una dieta con elevado o bajo grado de adherencia a la DM o entre sedentarios y no sedentarios en cuanto a la concentración de marcadores de estrés oxidativo, y tampoco interacciones con el polimorfismo C242T. Posiblemente, si se aumenta el tamaño de muestra se puedan apreciar dichas diferencias.

En conclusión, en población mediterránea de elevado riesgo cardiovascular, los portadores del alelo T del polimorfismo C242T de la subunidad *p22phox* de la NADPH oxidasa ha mostrado asociación con mayor concentración de GSH, un importante antioxidante. Esta asociación se ha observado que está modulada por el hábito tabáquico. Estudios con mayor tamaño de muestra serán necesarios para confirmar estos resultados.

5.4.6. Discusión de otros polimorfismos relacionados con fenotipos intermedios de ECV.

5.4.6.1. Polimorfismo C677T del gen de MTHFR

La frecuencia del polimorfismo C677T localizado en el gen de la enzima MTHFR presenta una distribución heterogénea según la zona geográfica. De hecho, en Europa se ha encontrado un gradiente geográfico de las frecuencias alélicas. La prevalencia del genotipo TT es mayor en el sur (12-15% en España e Italia) (presenta valores intermedios en Francia y Hungría (8-10%), y menor en el norte de Europa (4-7% en Finlandia, Helsinki, norte de los Países Bajos y Rusia) (Wilcken B et al, 2003). La prevalencia del genotipo TT obtenida en nuestra población PREDIMED, siendo incluso ligeramente más elevada (17,4%), confirma dicho gradiente. La frecuencia del alelo T en nuestra población fue 0,418, cercana a la estimada en poblaciones españolas e italianas (entre 0,330-0,410) (Wilcken B et al, 2003). Curiosamente en China y América también se han detectado gradientes. En China la frecuencia del alelo T decrece de norte a sur y en América aumenta de norte a sur encontrado un pico en Méjico (frecuencia del alelo T 0,570). En africanos la frecuencia del alelo T es baja (aproximadamente 0,030) (Wilcken B et al, 2003).

Por otro lado, la MTHFR es una enzima clave implicada en el metabolismo de la homocisteína (Finkelstein JD et al, 1990). El polimorfismo C677T produce una versión termolábil de la enzima que presenta menor actividad, con lo que se incrementa los niveles de homocisteína (Kang SS et al, 1988). Resultados de varios estudios han encontrado una relación gradual entre los niveles de homocisteína en plasma y riesgo o severidad de ECV (Arnesen E et al, 1995). Homocigosidad (TT) para el polimorfismo C677T se ha asociado con hiperhomocisteinemia, particularmente en individuos con baja ingesta de folatos (Kluijtmans LAJ et al, 1996, Ma J et al, 1996). De este modo, se han llevado a cabo diversas investigaciones para examinar el papel del polimorfismo C677T sobre el riesgo de ECV. Numerosos estudios han encontrado que el alelo T se asocia con mayor riesgo de ECV (Kluijtmans LAJ et al, 1996, Ueland PM et al, 1993, Klerk M et al, 2002, Inamoto N et al, 2003, Rassoul F et al, 2008), sin embargo, otros no han encontrado asociación (Brattstrom L et al, 1998, Brugada R et al, 1997, Fletcher O et al, 1998).

Para el polimorfismo C677T se ha descrito una importante interacción gen*dieta con la ingesta de ácido fólico, vitamina del complejo B que se encuentra en verduras de hoja verde, frutas, legumbres y cereales integrales, que puede explicar los inconsistentes resultados obtenidos al estudiar el riesgo de IAM (Klerk

et al, 2002, Lewis SF et al, 2005). En personas con un dieta pobre en ácido fólico se detecta una mayor concentración sérica de homocisteína en los homocigotos TT, en comparación con los demás genotipos. Ello les confiere un mayor riesgo de ECV. Sin embargo, al consumir una dieta rica en ácido fólico se compensa el efecto del polimorfismo, de modo que los individuos TT presentan una concentración sérica de homocisteína normal. Tal interacción gen*dieta puede explicar también la mayor prevalencia del genotipo TT en los países del sur de Europa en comparación con los del norte, ya que en Europa meridional, la DM aporta cantidades de ácido fólico (Dedoussis GV et al, 2004).

Por otro lado, diversos estudios han mostrado una asociación positiva entre los niveles de homocisteína y variables relacionadas con la obesidad como grasa corporal, IMC y perímetro de la cintura (Gallisti V et al, 2000, Guzelmeric K et al, 2007), y también con resistencia a la insulina (Giltay J et al, 1998, Schachter M et al, 2003, Bjorck J et al, 2006). Así pues, en nuestro estudio se examinó el efecto del polimorfismo C677T sobre obesidad y DMT2 y variables relacionadas como IMC, cintura y niveles de glucosa. Los resultados mostraron que el alelo T se asociaba con mayor riesgo de obesidad y DMT2, así como, con mayores niveles de glucosa en población mediterránea de elevado riesgo cardiovascular. Las diferencias entre portadores del alelo T y homocigotos CC en cuanto a IMC y cintura quedaron en el límite de la significación estadística.

Existen escasos estudios que examinen la relación entre el polimorfismo C677T y el riesgo de obesidad o DMT2. Nuestros resultados aportan consistencia a otras investigaciones que han mostrado asociación entre el alelo T y mayor IMC en individuos con ECV documentada (Wilcken DE et al, 1996), y en mujeres postmenopáusicas (Lambrinouadaki I et al, 2008), y con incremento de riesgo de desarrollar síndrome metabólico, estrechamente relacionado con obesidad y resistencia a la insulina (Di Renzo L et al, 2007). El mecanismo mediante el cual el polimorfismo C677T actúa sobre la obesidad y DMT2 no está definido. Se ha propuesto que variantes génicas como C677T reducen el catabolismo de la homocisteína a nivel celular lo que provoca disfunción endotelial que puede causar resistencia a la insulina, estado metabólico relacionado con aumento de IMC y perímetro de la cintura (Lambrinouadaki I et al, 2008). Sin embargo, otros estudios no han mostrado asociación entre el polimorfismo C677T y obesidad o DMT2 (Russo Gt et al, 2006, Tavakkoly Bazzaz J et al, 2010). Así pues, futuras investigaciones serán necesarias para determinar la influencia de C677T sobre enfermedades como obesidad y DMT2, así como los mecanismos biológicos que subyacen a estos procesos.

Como se ha comentado anteriormente, las discrepancias entre estudios en el efecto de C677T sobre el riesgo de ECV pueden ser explicadas por interacción con

la ingesta de ácido fólico. Así pues, la falta de consistencia en los diversos resultados encontrados con respecto a la asociación de C677T con obesidad y DMT2, también podrían ser explicados por interacciones gen*dieta. De hecho, se ha observado que mayor adherencia a la DM se asocia con menores niveles de homocisteína en individuos con genotipo TT y CT (Dedoussis GV et al, 2004). Así se estudió el efecto de la mayor o menor adherencia a la DM, pero no se encontraron interacciones estadísticamente significativas entre el polimorfismo C677T y la adherencia a la DM que determinara el riesgo de obesidad o DMT2. Sin embargo, se detectó que la asociación del polimorfismo C677T con IMC y riesgo de obesidad estaba influenciada por el consumo de repostería comercial y el consumo preferente de carnes blancas como pollo, pavo o conejo frente a carnes rojas o productos cárnicos derivados. Se detectó que los individuos con genotipo CC eran más susceptibles a los cambios dietéticos, de este modo, mostraban mayor o menor IMC en función del consumo de repostería comercial y el consumo de carnes blancas o rojas. Los portadores del alelo T, tanto heterocigotos como homocigotos, no mostraron diferencia en el IMC según el consumo de repostería comercial y el consumo de carnes blancas o rojas, y además presentaban valores de IMC similares al de los individuos con genotipo CC con elevado consumo de repostería comercial y mayor consumo de carnes rojas frente a carnes blancas. Los productos de repostería comercial se caracterizan por presentar niveles elevados de AGS provenientes de aceites de coco y palma o mantequillas, que pueden incrementar el tamaño o número, estrés de adipocitos y el peso (Ludwig DS, 2002, Mozaffarian D et al, 2007). La carne también contiene AGS, pero el pollo, el pavo o el conejo son más recomendables ya que contiene menor aporte de grasa (Plaza Pérez I et al, 2000, Mata P et al, 1994) que las carnes rojas, como la ternera o el cerdo o los productos cárnicos derivados de ellas que contienen mayor aporte de grasa (Mata P et al, 1994). Así pues, los AGS podrían estar involucrados en la interacción entre el polimorfismo C677T y el consumo de repostería comercial o el consumo preferente de un tipo u otro de carne sobre el IMC y el riesgo de obesidad.

En conclusión, en población mediterránea de elevado riesgo cardiovascular se ha observado que los portadores del alelo T del polimorfismo C677T de MTHFR tienen mayor riesgo de obesidad y DMT2. EL consumo de repostería comercial y de carnes blancas o rojas parece influir en estas asociaciones. Posteriores estudios serán necesarios para confirmar estos resultados y descubrir los mecanismos biológicos involucrados.

5.4.6.2. Polimorfismos de las subunidades de AMPK

La AMPK es un complejo proteico heterotrimérico clave en el control de la homeostasis energética, de modo que variaciones genéticas en los genes de las

diferentes subunidades de AMPK se han propuesto como genes candidatos de obesidad y DMT2 (Winder WW et al, 1999).

En este trabajo se han obtenido las frecuencias alélicas en población mediterránea de elevado riesgo cardiovascular y se ha estudiado la asociación con obesidad y DMT2 de diversos polimorfismos de genes de las subunidades de AMPK: rs2796495 de la subunidad $\alpha 2$ (PRKAA2), rs4213 de la subunidad $\beta 1$ (PRKAB1), rs1036852 de la subunidad $\beta 2$ (PRKAB2), rs2293445 de la subunidad $\gamma 1$ (PRKAG1), rs8961 de la subunidad $\gamma 2$ (PRKAG2) y rs1467320 de la subunidad $\gamma 3$ (PRKAG3).

Existen escasas investigaciones dedicadas a examinar dichas variantes. Únicamente, se encontraron referencias bibliográficas de las frecuencias alélicas de los polimorfismos rs1036852 de la subunidad PRKAB2 y rs2796495 de la subunidad PRKAA2, pero en indios Pima o poblaciones asiáticas (Prochazka M et al, 2002, Horikoshi M et al, 2006, Keshawarz P et al, 2008), de modo que no es posible realizar comparaciones entre las frecuencias alélicas obtenidas en nuestra población con las halladas en otros estudios en poblaciones caucásicas. De este modo, se han comparado las frecuencias alélicas con las obtenidas en el proyecto HapMap. Así pues, en la tabla 5.1 se muestran las frecuencias alélicas para europeos (HapMap-CEU), chinos (HapMap-HCB), japoneses (HapMap-JPT) y africanos (HapMap-YRI) a partir de las cifras obtenidas de la base de datos de HapMap (<http://hapmap.org>) y se compararon con las frecuencias halladas en nuestra población.

Las frecuencias alélicas obtenidas en nuestra población son similares a las cifras que figuran en la base de datos del proyecto HapMap para europeos. La frecuencia del alelo T del polimorfismo rs2796495 de PRKAA2 es levemente menor en asiáticos y en africanos similar a europeos. Destaca que el alelo G de la variante rs4213 de PRKAB1 no se encuentra en asiáticos y la frecuencia entre africanos y europeos es similar. El alelo G del polimorfismo rs1036852 de PRKAB2 es muy poco frecuente en asiáticos y africanos, contrastando con la elevada frecuencia en europeos. El alelo A de la variante rs2293445 de PRKAG1 no varía de manera marcada entre poblaciones, siendo su frecuencia levemente elevada en japoneses y menor en africanos con respecto a europeos. La frecuencia del alelo T del polimorfismo rs8961 de PRKAG2 es menor en asiáticos que en europeos y muy elevada en africanos. Con respecto a la variante rs1467320 de PRKAG3, el alelo A es poco frecuente en europeos y aumenta en asiáticos. En africanos, no se disponen de datos. Ninguno de estos polimorfismos se encontró en desequilibrio de ligamiento.

Tabla 5.1 Frecuencias alélicas de los polimorfismos de las subunidades de AMPK para europeos (HapMap-CEU), chinos (HapMap-HCB), japoneses (HapMap-JPT) y africanos (HapMap-YRI) obtenidas en el proyecto HapMap y comparadas con las de la población PREDIMED del nodo de Valencia.

Polimorfismo	Alelo	CEU	HCB	JPT	YRI	PREDIMED
PRKAA2 rs2796495	C	0,567	0,614	0,625	0,508	0,570
	T	0,433	0,386	0,375	0,492	0,430
PRKAB1 rs4213	T	0,658	1	1	0,542	0,626
	G	0,342	0	0	0,458	0,374
PRKAB2 rs1036852	A	0,467	0,933	0,932	0,967	0,466
	G	0,533	0,067	0,068	0,033	0,534
PRKAG1 rs2293445	A	0,350	0,305	0,464	0,267	0,381
	G	0,650	0,695	0,536	0,733	0,619
PRKAG2 rs8961	C	0,638	0,744	0,705	0,167	0,668
	T	0,367	0,256	0,295	0,833	0,332
PRKAG3 rs1467320	G	0,861	0,557			0,841
	A	0,139	0,433			0,159

Por otro lado, se examinó la asociación de las variantes genéticas seleccionadas de las subunidades de AMPK con obesidad y DMT2. En este estudio se encontró asociación con menor riesgo de obesidad para el polimorfismo rs2796495 de la subunidad PRKAA2 tras ajustar por edad y sexo (OR=0,66 IC95%(0,49-0,87) P=0,003). Las asociaciones de las variantes alélicas para los polimorfismos rs4213 de PRKAB1 y rs1036852 de PRKAB2 quedaron en el límite de la significación estadística (OR=0,78 IC95%(0,61-1,01) P=0,062 y OR=0,75 IC95%(0,56-1,01) P=0,062, respectivamente). Además, los individuos con genotipo GG del polimorfismo rs1036852 de PRKAB2 presentaron menor IMC que aquellos con genotipo AG y AA. Los demás polimorfismos no mostraron asociación con obesidad. Tampoco se observó efecto sobre el riesgo de DMT2 en ninguna de las variantes estudiadas.

Existen escasas investigaciones que hayan analizado los polimorfismos seleccionados para el presente estudio con obesidad y DMT2, para poder contrastar los resultados obtenidos. Únicamente, Horikoshi M et al (2006) no encontraron asociación entre el polimorfismo PRKAA2 con IMC y con riesgo de DMT2 en

población japonesa, coincidiendo con nuestros resultados. Tampoco, Keshawarz P et al (2008) hallaron asociación de este polimorfismo con riesgo de DMT2, también en población japonesa. Además, otro estudio en el que analizaron un cluster de 5 polimorfismos en fuerte desequilibrio de ligamiento entre los que se incluía el polimorfismo rs1036852 de PRKAB2, no se observó asociación de dicho cluster con riesgo de DMT2 en una población de indios Pima (Prochazka M et al, 2002). Existen varios artículos basados en investigaciones dedicadas a estudiar variantes genéticas de subunidades de AMPK como PRKAA2, PRKAB2, PRKAB1, PRKAG2 y PRKAG3 que han encontrado un efecto sobre la obesidad, DMT2 y metabolismo lipídico pero son diferentes a las seleccionadas para este estudio (Spencer-Jones NJ et al, 2006, Weyrich Pet al, 2007, Sun NW et al, 2006, Jabloski KA et al, 2010, Nouira S et al, 2009, Xu M et al, 2005).

Por otro lado, la subunidad α es la subunidad catalítica, sin embargo también es reguladora ya que cuenta con una región autoinhibitoria, la cual previene que la enzima sea fosforilada cuando no hay depleción de ATP (Hardie DG et al, 2001). Las subunidades β y γ son únicamente reguladoras. Ambas subunidades son reguladas por las concentraciones de AMP y ATP (Winder WW et al, 1996, Hardie DG et al, 2004). La subunidad β constituye la plataforma para la unión de las otras 2 subunidades. Dependiendo de la relación AMP/ATP, se unirá AMP o ATP a la subunidad γ (Adams J et al, 2004). Si la relación AMP/ATP es elevada, el AMP se une a la subunidad γ , lo que ocasionará un cambio conformacional en la subunidad α , lo que permite su fosforilación y activación (Hawley SA et al, 1996, Woods A et al, 2003). Bajo condiciones normales, el ATP es más abundante que el AMP, por lo tanto, la relación AMP/ATP disminuye, el exceso de ATP se une a la subunidad γ evitando que se lleve a cabo el cambio conformacional y la enzima permanecerá no fosforilada y en su forma inactiva (Adams J et al, 2004).

Los efectos biológicos que pueden desempeñar los polimorfismos sobre la función de AMPK no están definidos (Hardie DG et al, 2007, Kahn BB et al, 2005). Se han encontrado variantes genéticas que provocan un descenso de la actividad de AMPK (*low-of-function*) y otras que aumentan la actividad de AMPK (*gain-of-function*) (Minokoshi Y et al, 2004, Arad M et al, 2002, Arad M et al, 2004, Sidhu JS et al, 2005). Un aumento de la actividad de AMPK implicaría un incremento de la ingesta de glucosa por parte del músculo, una disminución de la gluconeogénesis en el hígado, aumento de la oxidación de AG en el hígado, disminución de la síntesis de AG en el hígado y el tejido adiposo y un incremento de la biogénesis mitocondrial (Yu LF et al, 2010). Todos estos procesos pueden estar relacionados con un efecto beneficioso sobre la obesidad. De este modo, el alelo T del polimorfismo rs2796495 de PRKAA2, puesto que se ha asociado con menor riesgo de obesidad, puede inferir un aumento de la expresión o la actividad de la AMPK. Las variantes rs4213 y rs1036852 de PRKAB1 y PRKAB2

respectivamente, presentaron la misma tendencia. De todos modos, futuras investigaciones son necesarias para contrastar dichos efectos.

Por otro lado, entre algunas publicaciones sobre variantes genéticas de subunidades de AMPK y su efecto sobre obesidad, DMT2 o metabolismo lipídico existen discrepancias en cuanto a los resultados obtenidos (Spencer-Jones NJ et al, 2006, Keshawarz P et al, 2008). Esto podría deberse a la existencia de modulación de los efectos por las características de la población.

Así pues, se encontró una interacción entre el polimorfismo rs4213 de PRKAB1 y el sexo que modulaba el IMC (Pinteracción rs4213*sexo=0,003). En hombres, el genotipo GG mostró mayor IMC que los genotipos TG y TT y, sin embargo, en mujeres el efecto fue contrario, el genotipo GG mostró menor IMC que los genotipos TG y TT. Además, las mujeres portadoras del alelo G presentaron menor riesgo de obesidad y los hombres portadores del alelo G mayor riesgo de obesidad pero en este caso no se alcanzó la significación estadística. Esta interacción podría deberse a diferencias en factores ambientales entre hombres y mujeres que pudieran afectar de manera contraria a la actividad de AMPK.

De este modo, se estudiaron posibles interacciones entre los polimorfismos seleccionados y factores ambientales. Se detectó influencia de la adherencia a la DM. Así, se encontró una interacción entre el polimorfismo rs1467320 de PRKAG3 con adherencia a la DM que determinaba la concentración de glucosa y el riesgo de DMT2. De este modo, los portadores del alelo A presentaron menores concentraciones de glucosa si consumían una dieta con alto grado de adherencia a la DM y, sin embargo, mayores concentraciones de glucosa si consumían una dieta con bajo grado de adherencia a la DM. Aunque las diferencias entre portadores del alelo A e individuos con genotipo GG, en las concentraciones de glucosa, no alcanzaron la significación estadística en ambos casos, si se obtuvo una interacción estadísticamente significativa (Pinteracción rs1467320*adherencia DM=0,034). Además, en individuos con alta adherencia a la DM, los portadores del alelo A mostraron menor riesgo de DMT2 (OR=0,66 IC95%(0,43-1,02), p=0,064 quedando la OR al límite de la significación estadística), y en individuos con baja adherencia a la DM, los portadores del alelo A mostraron mayor riesgo de DMT2 (OR=1,64 IC95%(1,10-2,40), p=0,016). Entre los componentes de la dieta, el que mayor influencia tuvo en esta interacción fue el consumo de carne roja y otros productos cárnicos derivados. De hecho, en aquellos individuos que consumían más de 1 vez a la semana dichos alimentos, el alelo A mostró una asociación con mayor concentración de glucosa y riesgo de DMT2 con respecto al genotipo GG. Esta asociación no se observó en individuos cuyo consumo de carne roja o embutidos era menor, encontrándose una interacción estadísticamente significativa tanto para la glucosa como para el riesgo de DMT2 (Pinteracción rs1467320*consumo de

carnes rojas y derivados=0,034, Pinteracción rs1467320*consumo de carnes rojas y derivados=0,004, respectivamente). Las carnes rojas, hamburguesas, salchichas o embutidos contienen elevadas cantidades de AGS (Mata P et al, 1994). Los AGS pueden inducir el desarrollo de resistencia a la insulina (Boden G et al, 1996, Hunnicut JW et al, 1994). También, varios estudios han demostrado la relación entre la oxidación de AG y la sensibilidad a la insulina (Dobbins RL et al, 2001, Oh W et al, 2005, Abu-Elheiga L et al, 2003, Perdomo G et al, 2004). Así pues, puesto que la AMPK es un regulador clave en la oxidación de AG, estudios experimentales con animales se han realizado para estudiar el papel de la AMPK en la relación entre dietas altas en grasa saturada y resistencia a la insulina (Liu Y et al, 2006). Liu Y et al (2006) observaron en ratas que un consumo durante 5 meses de una dieta alta en grasa saturada provocaba un descenso de un 58,7% en los niveles de la subunidad catalítica de la AMPK (subunidad α), indicando que dicha dieta puede afectar a su expresión. El descenso de la expresión de la subunidad α implicaría un descenso en la oxidación de AG y mayor riesgo de desarrollar resistencia a la insulina, aunque este proceso no está claramente definido. La subunidad γ es fundamental en el proceso de activación de la subunidad α . Así, la grasa saturada procedente de la carne roja o embutidos podría afectar la actividad de la subunidad α a través de su efecto sobre la subunidad γ , lo que podría influir en la asociación del polimorfismo rs1467320 de PRKAG3 sobre la glucosa y el riesgo de DMT2. Sería interesante que se realizaran más estudios experimentales y epidemiológicos para contrastar dichas asociaciones.

También se observó que el efecto del polimorfismo rs2796495 de PRKAA2 sobre el IMC, perímetro de la cintura y el riesgo de obesidad observado la población de PREDIMED del nodo de Valencia estaba modulado por la adherencia a la DM. Concretamente, solo se observó un efecto protector del alelo T frente al IMC, cintura y riesgo de obesidad en aquellos individuos que consumen una dieta con alta adherencia a la DM (OR=0,58 IC95%(0,38-0,88), p=0,010). Sin embargo, no se detectó efecto del alelo T en individuos con baja adherencia a la DM sobre el IMC, cintura y riesgo de obesidad (OR=0,79 IC95%(0,53-1,19), p=0,263). La interacción fue estadísticamente significativa tanto para IMC, perímetro de la cintura como para obesidad (P interacción rs2796495*adherencia DM=0,049 para IMC, P interacción rs2796495*adherencia DM=0,025 para perímetro de la cintura, P interacción rs2796495*adherencia DM=0,018 para obesidad). Además, se estudió qué componente de la DM era determinante en la interacción gen*dieta encontrada. Se observó que se trataba del consumo de pescado. De este modo, el efecto protector del alelo T frente al IMC, perímetro de la cintura y riesgo de obesidad sólo se observó en aquellos individuos que consumían 3 o más veces a la semana pescado, y no en aquellos cuyo consumo de pescado era menor. El pescado aporta una cantidad importante de AGP n-3 que se han asociado con efectos favorables sobre la obesidad, resistencia a la insulina y

DMT2 (Flachs P et al, 2009, Kopecky J et al, 2009). En estudios experimentales con animales, se ha observado que los AGP n-3 estimulan la activación de AMPK en los adipocitos y en el hígado de manera potente (Lorente-Cebrián S et al, 2009, Suchankova G et al, 2005). Otro estudio reciente ha mostrado un incremento de la absorción intestinal de glucosa a través de la activación de AMPK tras el consumo de AGP n-3 en cerdos (Gabler NK et al, 2008). Además, otros investigadores han mostrado que el efecto protector del tratamiento con AGP n-3 sobre los niveles plasmáticos de TG y de AG libres y la resistencia a la insulina depende de la actividad de la subunidad PRKAA2 de la AMPK, de modo que dicha subunidad es esencial para mantener dichos parámetros en respuesta al tratamiento con AGP n-3 (Jelenik T et al, 2010). Así pues, el efecto de los AGP n-3 procedentes del pescado y del polimorfismo rs2796495 sobre la actividad de PRKAA2 podrían conferir una marcada diferencia en los individuos portadores del alelo T (sobre todo en los homocigotos TT) sobre parámetros antropométricos como IMC o perímetro de la cintura y el riesgo de obesidad en respuesta al consumo elevado de pescado, como se ha observado en este estudio.

En conclusión, variantes genéticas de la subunidades de AMPK han mostrado una asociación con menor IMC y riesgo de obesidad pero no con DMT2. Se ha observado que factores como el sexo o componentes de la dieta como el consumo de carnes rojas y embutidos o consumo de pescado, pueden modular el efecto de estas variantes genéticas sobre el riesgo de obesidad y DMT2, así como, sobre parámetros relacionados con estas enfermedades como IMC, perímetro de la cintura y concentración plasmática de glucosa.

5.5 Discusión del efecto sobre fenotipos intermedios de la combinación genotípica entre polimorfismos

En este apartado se presenta la discusión del efecto la combinación genotípica los polimorfismos que se han asociado con niveles de c-HDL, c-LDL, glucosa e IMC.

Los polimorfismos TaqIB y rs183130 del gen de CETP, Q192R de PON1 y R219K de ABCA1 mostraron asociación con niveles de c-HDL.

Con respecto a los polimorfismos TaqIB y rs183130 del gen de CETP, en el apartado de discusión de los polimorfismos de la CETP, se ha examinado el efecto de los genotipos homocigotos para los alelos B1 y B2 del polimorfismo TaqIB y C y T del polimorfismo rs183130, así como la combinación de los genotipos favorables (B2B2/TT) frente a los no favorables (B1B1/CC). Ambos polimorfismos

presentaron efectos aditivos. Se observó un efecto mayor sobre la concentración de c-HDL del polimorfismo rs183130 que del TaqIB coincidiendo con otros estudios (Thompson JF et al, 2007, Corella D et al, 2010, Spirin V et al, 2007). Los individuos B2B2 (polimorfismo TaqIB) mostraron un incremento de 12,6% de c-HDL con respecto a los individuos B1B1. Dicho incremento fue mayor en los individuos TT (polimorfismo rs183130) con respecto a los CC (14,5%). Además, el análisis de combinación de los genotipos de ambos polimorfismos mostró un efecto mayor puesto que los individuos homocigotos para los alelos minoritarios de cada uno de ellos (B2B2/TT) presentaron un 17,7% más de c-HDL que los individuos con 2 copias de los alelos B1 y C (B1B1/CC). Se mostraron la misma tendencia pero menor magnitud en los efectos de los polimorfismos TAqIB y rs183130 del gen de CETP en otro estudio también con población de PREDIMED con mayor número de muestra (Corella D et al, 2010).

Sin embargo, al estudiar la concentración de c-HDL en los individuos portadores de los alelos minoritarios (B2 para el polimorfismo TaqIB y T para rs183130) con respecto a los homocigotos B1B1 (TaqIB) y CC (rs183130) se observó un mayor efecto del polimorfismo TaqIB que del polimorfismo rs183130 (8,4% vs 6,1%). Además, al combinar los genotipos favorables (portadores del alelo B2 /portadores del alelo T) y los genotipos no favorables (B1B1/CC) se observó que el aumento en los niveles plasmáticos de c-HDL, en los individuos portadores de los alelos favorables con respecto a los individuos homocigotos para los alelos no favorables, fue de 8,4%, de modo que no se potencia el efecto ya que el incremento es equivalente al asociado al polimorfismo TaqIB únicamente.

Por otro lado, los portadores del alelo R del polimorfismo Q192R mostraron menor concentración de c-HDL que los individuos homocigotos QQ. Concretamente, la diferencia fue de un 3,1%. Este efecto fue menor que el observado en los polimorfismos TaqIB y rs183130 del gen de CETP (8,4% y 6,1% respectivamente). Al estudiar la combinación de alelos favorables y menos favorables para los polimorfismos TaqIB y rs183130 del gen de CETP y Q192R de PON1 (Portadores de B2/Portadores C/QQ vs B1B1/CC/ Portadores de alelo R) se observó un incremento de la concentración de c-HDL de 10,4%, superior al producido por cada uno de los polimorfismos de manera individual. No se observó una interacción gen*gen estadísticamente significativa entre CETP y PON1 (Pinteracción TaqIB*Q192R= 0,501, Pinteracción rs183130*Q192R= 0,168).

Los portadores del alelo K del polimorfismo R219K de ABCA1 presentaron mayor concentración de c-HDL con respecto a los homocigotos RR. Concretamente, el incremento fue de 3,9%, menor que el observado en los polimorfismos TaqIB y rs183130 del gen de CETP y levemente mayor al producido por el polimorfismo Q192R de PON1. Sin embargo, al estudiar la combinación de

alelos favorables y menos favorables para los polimorfismos TaqIB y rs183130 del gen de CETP y R219K de ABCA1 (Portadores de B2/Portadores C/Portadores de K vs B1B1/CC/RR) se observó un incremento de la concentración de c-HDL de 12,4%, superior al producido por cada uno de los polimorfismos de forma separada pero también superior al efecto de la combinación de genotipos favorables de los polimorfismos de CETP y PON1. No se observó una interacción gen*gen estadísticamente significativa entre CETP y ABCA1 (Pinteracción TaqIB*R219K= 0,220, Pinteracción rs183130*R219K= 0,436).

Esto podría deberse a que CETP y ABCA1 son enzimas clave en el transporte reverso de colesterol, y por tanto, determinantes para los niveles de c-HDL (Sampietro T et al, 2006, Attie AD et al, 2001, Oram JF et al, 2001) y PON1 actúa más en la protección frente a la oxidación de lipoproteínas (Mackness MI et al, 1991, Aviram M et al, 1998, Shih DM et al, 1998, Oda MN et al, 2002) y además, se ha mostrado muy susceptible a factores de riesgo cardiovascular tanto metabólicos como ambientales coincidiendo con otros estudios (Deakin SP et al, 2004). Así pues, ABCA1 es un transportador de membrana que interviene en la salida de colesterol de las células de tejidos periféricos al exterior, donde es transferido a las partículas de HDL nacientes. La CETP está implicada en la transferencia de ésteres de colesterol desde las HDL hacia lipoproteínas no HDL (VLDL y LDL), proceso que determina que una fracción importante del colesterol transportado en las HDL sea metabolizado por medio de los receptores de la familia de rLDL (Assmann G et al, 2004, Corella D et al, 2005, Sampietro T et al, 2006). El alelo K del polimorfismo R219K de ABCA1 provoca un aumento de la actividad de ABCA1 (Clee Sm et al, 2001, Singaraja RR et al, 2003) y los alelos B2 y T de los polimorfismos TaqIB y rs183130 de CETP, un descenso en la actividad de CETP (Ordovás JM et al, 2000, Boekholdt SM et al, 2005, Thompson JF et al, 2007), con lo que, un aumento de la salida de colesterol de las células de tejidos periféricos unido a un descenso en el catabolismo de HDL daría lugar un aumento de los niveles de c-HDL mayor que el provocado pero uno de estos procesos por separado.

Por otro lado, los polimorfismos E2/E3/E4 de APOE y -75G/A del gen de ApoA1 mostraron asociación con los niveles de c-LDL. La diferencia en el efecto entre el alelo E3 y E4 del polimorfismo de APOE y los individuos portadores del alelo A frente a los homocigotos GG fue casi el doble (7,8% vs 4,5%, respectivamente). La asociación del alelo E4 con mayores niveles de c-LDL es de las más sólidas y potentes que se han estudiado (Davignon J et al, 1988, Dallongeville J et al, 1992, Bennet A et al, 2007), además, se ha observado que las diferencias de c-LDL entre genotipos persisten incluso al tener en cuenta la posible influencia de la edad, variables antropométricas y de estilo de vida. Con respecto al polimorfismo -75A/G de ApoA1, pocos estudios han encontrado asociación con c-

LDL (Xu CF et al, 1993, Mata P et al, 1998, Carmena-Ramón RF et al, 1998), y no parece ser la variante funcional en este efecto (Minnich A et al, 1995) y además, esta asociación se ha mostrado modulada por la dieta tanto en este estudio como en otros (López-Miranda J et al, 1994, Mata P et al, 1998).

Sin embargo, al estudiar la combinación de genotipos favorables de los polimorfismos E2/E3/E4 de APOE y -75G/A del gen de ApoA1 frente a los genotipos de riesgo (E3/portadores de A vs E4/GG) se observó un efecto superior (10%) que el mostrado por los polimorfismos de manera individual. No se observó una interacción gen*gen estadísticamente significativa entre APOE y APOA1 (Pinteracción=0,256)

Por otro lado, en nuestro estudio, los polimorfismos rs7903146 de TCF7L2, rs1036852 de la subunidad PRKAB2 y R219K de ABCA1 mostraron un efecto protector frente al IMC. Se ha observado que el descenso en el IMC asociado al polimorfismo rs7903146 es mayor que el que se ha detectado para los polimorfismos 1036852 de la subunidad PRKAB2 de AMPK y R219K de ABCA1. De hecho, los portadores del alelo T mostraron un 2,7% menos de IMC que los homocigotos CC (rs7903146), los portadores del alelo G un descenso de un 2,0% frente a los homocigotos AA (rs1036852), y los portadores del alelo K un 1,7% con respecto a los homocigotos RR (R219K). Este hallazgo es interesante ya que el alelo T del polimorfismo rs7903146 que confiere menor IMC, se ha asociado también con mayor riesgo de DMT2 coincidiendo con múltiples estudios (Cauchi S et al, 2007, Florez JC, 2007, Tong Y et al, 2009).

Al analizar la combinación de genotipos favorables (Portadores de T/ Portadores de G/ Portadores de K) frente a los no favorables (CC/AA/RR) se observó un efecto más potente que el producido por los polimorfismos de manera individual. Concretamente, el descenso en el IMC fue de 6,3%, lo que corresponde a casi 2 Kg/m², cifra que puede ser determinante para que un individuo presente normopeso, sobrepeso u obesidad (OMS, 1998). No se observó una interacción gen*gen estadísticamente significativa entre TCF7L2, PRKAB2 y ABCA1 (Pinteracción TCF7L2*R219K=0,325, Pinteracción PRKAB2*R219K=0,178, Pinteracción TCF7L2*PRKAB2=0,380).

Por otro lado, los polimorfismos que mostraron asociación con concentración de glucosa fueron rs7903146, rs12255372 del gen de TCF7L2, R219K de ABCA1, y C677T de MTHFR.

En el apartado de discusión de los polimorfismos de TCF7L2 ya se presentó el efecto de las variantes rs7903146 y rs12255372 sobre los niveles de glucosa. Ambos polimorfismos se mostraron en desequilibrio de ligamiento. Al comparar

niveles de glucosa entre portadores del alelo de riesgo (T en ambos casos) frente a homocigotos salvajes, el efecto es mayor en el polimorfismo rs12255372 que en el rs7903146 (6,4% vs 5,7%). Al analizar la combinación de genotipos de rs12255372 y rs7903146, se observa que, al comparar portadores de los alelos de riesgo (T en ambos casos) frente a homocigotos salvajes (CC/GG), se potencia el efecto sobre la concentración de glucosa, obteniendo un aumento de 7,9%.

Por otro lado, el polimorfismo R219K de ABCA1 y el polimorfismo C677T de la MTHFR también mostraron asociación con niveles de glucosa. La diferencia en la concentración de glucosa entre los portadores de los alelos mutados y los homocigotos salvajes de los polimorfismos rs7903146 y rs12255372 fue superior que la encontrada para los polimorfismos de ABCA1 (4,6%) y similar a la de la variante de MTHFR (5,5%). Sin embargo, a pesar de que el efecto del polimorfismo de ABCA1 es menor que el de MTHFR, el aumento en el efecto encontrado al comparar la combinación de los genotipos más favorables con respecto a los menos favorables de los polimorfismos de TCF7L2 y de ABCA1 es mayor (13,6%) que cuando se combinan los genotipos de los polimorfismos de TCF7L2 con los de la variante de MTHFR (9,8%). Este efecto podría estar relacionado con el hecho de que las variantes de los genes de TCF7L2 y ABCA1 actúan a nivel de la célula β pancreática y sobre la secreción de insulina (Florez JC, 2008, Stolerman ES et al, 2009, Florez JC et al, 2006, Brunham LR et al, 2008) y en cuanto a la variante C677T del gen de la MTHFR parece que su relación con DMT2 puede ser a través de su efecto en el metabolismo de la homocisteína y su relación con resistencia a la insulina (Lambrinouadaki I et al, 2008). En todo caso es necesaria la realización de más estudios. No se encontró interacción entre estos genes (Pinteracción rs7903146*ABCA1=0,870, Pinteracción rs12255372*ABCA1=0,650, Pinteracción rs7903146*MTHFR=0,462, Pinteracción rs12255372 * MTHFR=0,119).

En conclusión, los polimorfismos del gen de CETP han mostrado mayor efecto sobre los niveles de c-HDL, el polimorfismo de APOE sobre la concentración de c-LDL, el polimorfismo rs7903146 del gen de TCF7L2 sobre IMC y variantes de este mismo gen sobre los niveles de glucosa. Los polimorfismos Q192R de PON1 y R219K han potenciado el efecto de las variantes de CETP sobre los niveles de c-HDL, -75 G/A del gen de ApoA1 el efecto de la variante E2/E3/E4 de APOE sobre la concentración de c-LDL, rs1036852 y R219K, el efecto de rs7903146 sobre el IMC, y R219K y C677T, el efecto de las variantes de TCF7L2 sobre los niveles de glucosa.

5.6 Discusión de las interacciones gen*gen

En esta sección se discuten las interacciones gen*gen entre el polimorfismo TaqIB y E2/E3/E4 del APOE y entre las variantes TaqIB y rs183130 de CETP y -514C/T del gen de LH sobre los niveles de c-HDL.

Como se ha observado en el apartado de discusión del polimorfismo E2/E3/E4 del APOE, la mayoría de los estudios no han obtenido una asociación entre las variantes alélicas de APOE y niveles plasmáticos de c-HDL (Pablos-Méndez A et al, 1997, Schaefer EJ et al, 1994, Muros M et al, 1996, Hsueh WC et al, 2000), coincidiendo con los resultados obtenidos en este trabajo. Sin embargo, otras investigaciones han detectado una tendencia de menores niveles de c-HDL en los portadores de E4 y mayores en los portadores de E2 (Tan CE et al, 2003, Kataoka S et al, 1996, Tiret L, 1994). En otros estudios, sólo se encuentra una asociación entre el alelo E4 con menores niveles de c-HDL (Dallongeville J et al, 1992, Gómez-Coronado D et al, 1999).

Se ha mostrado que la asociación del genotipo de APOE sobre los niveles de lípidos puede ser modulada por edad, sexo, grupo étnico, dieta, tabaquismo, consumo de alcohol, actividad física y la presencia de DMT2 (Davignon J et al, 1988, Bernstein MS et al, 2002, Corella D et al, 2001(b), Masson LF et al, 2003, Shin M et al, 2005, Ordovas JM et al, 1995). Además, de interacciones gen*ambiente, también se han detectado interacciones gen*gen. Así pues, recientemente, un estudio realizado en población general española ha mostrado que el efecto de polimorfismo de APOE sobre los niveles de c-HDL dependía del polimorfismo TaqIB de CETP (Sorlí JV et al, 2006). Se mostró que los menores niveles de c-HDL asociados a la forma E4 se observaron sólo en el caso de los portadores de la variante B1 del polimorfismo TaqIB de CETP, mientras que los portadores de E4 y B2 presentaban mayores niveles de c-HDL, y de forma inversa, los portadores del alelo E2 mostraron mayores niveles de c-HDL con la variante B1 y menores con la variante B2. La isoforma E3 presentó una situación intermedia. Miltiadous G et al, 2005 encontraron los mismos resultados en individuos normolipémicos. Esta interacción podría explicar los inconsistentes resultados obtenidos en otros trabajos sobre la asociación entre APOE y niveles de c-HDL. Sin embargo, en la población PREDIMED de elevado riesgo cardiovascular esta interacción no fue detectada. Una explicación podría subyacer en las características específicas que tiene esta población de modo que algún otro factor puede influir en dicha interacción. De hecho, se ha observado que en diabéticos la actividad de CETP, que varía en función del polimorfismo TaqIB, no influye en la relación entre APOE y niveles de TG y c-HDL (Chaaba R et al, 2008). Puesto que la interacción entre APOE y CETP se ha observado en individuos sanos (Sorlí JV et

al, 2006, Miltiadous G et al, 2005), más estudios son necesarios en población del alto riesgo para confirmar la influencia del estado metabólico en dicha interacción.

Por otro lado, la aparente controversia entre la actividad de la LH y el riesgo de ECV podría ser explicada por la interacción con factores genéticos, metabólicos o ambientales. Así, se han descrito interacciones con variantes en el gen de CETP que modulan los niveles de c-HDL y el riesgo de ECV (Isaacs A et al, 2007, van Acker BAC et al, 2008, Hirano K et al, 1995, Jansen H et al, 2002). En el estudio realizado por van Acker BAC et al (2008) se mostró una asociación entre los polimorfismos TaqIB y -514C/T, de manera que los individuos B2B2/TT mostraban mayores concentraciones de c-HDL. Isaacs A et al (2007) encontraron la interacción entre -514C/T de LIPC y otra variante de CETP, I405V, que aumenta también los niveles de c-HDL. Así, los individuos VV/TT mostraron mayores niveles de c-HDL. En este estudio se mostró también la interacción entre variantes en los genes de CETP y LIPC para modular los niveles de c-HDL. Concretamente, se observó una interacción entre el polimorfismo -514C/T y rs183130 de CETP. El polimorfismo -514C/T del gen LIPC solo mostró asociación con mayores niveles de c-HDL en individuos portadores del alelo T del polimorfismo rs183130 de CETP, mostrando los individuos portadores del alelo T, para ambos polimorfismos, un aumento marcado de c-HDL (9,5% con respecto a individuos CC/CC para ambos polimorfismos). Pero, no se encontró efecto de la variante de LIPC en los homocigotos CC para el polimorfismo rs183130 de CETP (Pinteracción $gen*gen=0,010$). Sin embargo, en nuestra población no se encontró interacción entre los polimorfismos TaqIB del gen de CETP y -514C/T de LIPC. Otros autores tampoco han observado esta interacción (Talmud PJ et al, 2002, Whiting BM et al, 2005).

Se ha propuesto que la interacción entre las variantes de los genes de CETP y LIPC puede ser debida a la disminución en la eficiencia de la LH en el catabolismo de las partículas de c-HDL pobres en TG (Rader DG et al, 2006). Asimismo, la CETP transfiere TG a las subespecies de c-HDL. Este enriquecimiento en TG de las partículas de HDL aumenta la habilidad de la LH para modelar estas partículas (Barter PJ et al, 2002(b)). Así pues, un descenso de la actividad de CETP atribuible a los alelos favorables del gen de CETP (como al alelo T del polimorfismo rs183130 de CETP) podría conducir a la disminución del enriquecimiento en TG de las partículas de c-HDL y una consecuente reducción en la eficacia de la LH para catabolizar estas partículas, sumado a la disminución de la actividad de la LH provocada únicamente por el polimorfismo -514 C/T (Rader DG et al, 2006).

Por otro lado, curiosamente, los individuos homocigotos de los alelos que se asocian con mayor concentración de c-HDL para los polimorfismos de ambos

genes (CETP y LIPC), a pesar de presentar un marcado aumento en los niveles de c-HDL, no han mostrado menor riesgo de ECV (Isaacs A et al, 2007), e incluso su genotipo ha sido asociado con mayor riesgo de ECV (Hirano K et al, 1995, Jansen H et al, 2002, van Acker BAC et al, 2008).

En conclusión, en población de elevado riesgo cardiovascular no se ha observado una interacción entre los polimorfismos TaqIB de CETP y E2/E3/E4 de APOE y -514 C/T de LIPC sobre los niveles de c-HDL pero, la asociación entre el polimorfismo -514C/T en el promotor del gen de LH y concentraciones de c-HDL parece estar modulada por la variante rs183130 del gen de la CETP.

Los resultados obtenidos nos permiten llegar a las siguientes conclusiones:

1. En el estudio piloto llevado a cabo en los primeros participantes del estudio PREDIMED, pudimos comprobar que la intervención nutricional con dieta mediterránea es capaz de producir cambios en los patrones de consumo de alimentos aumentando la adherencia a la dieta mediterránea y que esta mayor adherencia se asocia significativamente con cambios favorables en las concentraciones plasmáticas de lípidos, marcadores de inflamación y de daño endotelial.
2. La validación del cuestionario semicuantitativo de frecuencia de consumo de alimentos en población de edad avanzada y elevado riesgo cardiovascular, con características similares a los pacientes participantes en el estudio PREDIMED ha permitido obtener buenos resultados en cuanto a su validez y fiabilidad.
3. Tras determinar la prevalencia de los polimorfismos TaqIB y rs183130 en CETP, -514C/T en LIPC, Ser447X en LPL, E2/E3/E4 en APOE, -75A/G en APOA1, R219K en ABCA1, Q192R en PON1, C242T en *p22phox*, C677T en MTHFR, -174G/C en IL-6, -765G/C en COX-2, rs9939609, rs3751812 y rs1861868 en FTO, Pro12Ala en PPARG2, Gly482Ser en PPARGC1, rs7903146, rs7901695 y rs12255372 de TCF7L2 y variantes de las subunidades de AMPK, concretamente, rs2796495 de PRKAA2, rs4213 PRKAB1, rs1036852 PRKAB2, rs2293445 PRKAG1, rs8961 PRKAG2 y rs1467320 PRKAG3 en individuos, de población mediterránea, con alto riesgo cardiovascular, hemos podido constatar que todos ellos tienen una frecuencia alélica del alelo menos frecuente superior al 1%, siendo los más prevalentes los polimorfismos rs9939609, rs3751812 y rs1861868 en el gen de FTO (0,435, 0,436, 0,444 respectivamente). Los polimorfismos menos prevalentes han sido los que determinan los alelos E2 y E4 del polimorfismo de APOE (0,059 y 0,090 respectivamente) y el alelo 12Ala del gen de PPARG2 (0,090).

4. La mayoría de estos polimorfismos se asocian significativamente con fenotipos intermedios de riesgo cardiovascular (concentraciones plasmáticas de lípidos, glucosa, marcadores de estrés oxidativo y de inflamación, presión arterial, peso, IMC y/o perímetro de cintura), replicando asociaciones ya descritas en otras poblaciones e incluso encontrando asociaciones nuevas descritas por primera vez. Entre las diferentes asociaciones significativas, las más relevantes en esta población son las siguientes: el polimorfismo E2/E3/E4 de APOE con niveles de c-LDL, las variantes de CETP con c-HDL, el polimorfismo R219K de ABCA1 con niveles de c-HDL, glucosa, IMC y cintura en mujeres, variantes del gen de TCF7L2 con glucosa e IMC, los polimorfismos de los genes de COX-2 e IL-6 con niveles de IL-6 e ICAM y el polimorfismo C677T del gen de MTHFR con concentraciones plasmáticas de glucosa.
5. En cuanto a la asociación de estos polimorfismos con obesidad, diabetes, hipercolesterolemia e hipertensión, los resultados más relevantes han sido los siguientes: el polimorfismo E2/E3/E4 de APOE con hipertensión, la variante R219K del gen de ABCA1 con obesidad y diabetes en mujeres, las variantes rs7903146 y rs12255372 de TCF7L2 con diabetes, el polimorfismo C677T del gen de MTHFR con obesidad y diabetes; y el polimorfismo rs2796495 de PRKAA2 con obesidad.
6. Además de las asociaciones individuales de estos polimorfismos con los distintos fenotipos de riesgo cardiovascular, hemos encontrado también importantes interacciones gen*gen considerando variantes en distintos genes que actúan sobre el mismo fenotipo. Entre ellas la más relevante ha sido la observada entre los polimorfismos rs183130 en el gen de CETP y -514C/T en el gen LIPC para determinar los niveles plasmáticos de c-HDL.
7. Las variables ambientales, fundamentalmente del estilo de vida también presentan interacciones con los polimorfismos estudiados determinando fenotipos intermedios de riesgo cardiovascular, entre ellas destacamos la interacción de la variante rs183130 en el gen de CETP con tabaco sobre los niveles de c-HDL, las interacciones gen*dieta encontradas en los genes de ApoA1 sobre los niveles de c-LDL, ABCA1 sobre glucosa, IMC, riesgo de diabetes y obesidad, LIPC sobre niveles de TG y c-HDL, TCF7L2 sobre IMC y riesgo de obesidad, PRKAG3 sobre glucosa y riesgo de diabetes y PRKAA2 sobre cintura, IMC y riesgo de obesidad y, por último, las interacciones gen*actividad física observadas en el gen de FTO sobre IMC y cintura y PPARG2 sobre los niveles de glucosa.

8. Algunos de estos polimorfismos también se asocian con mayor riesgo de enfermedad cardiovascular, presentando asimismo modulaciones ambientales, por lo que podemos concluir que en las variables bioquímicas y clínicas estudiadas relacionadas con el riesgo cardiovascular, existe una importante interacción entre factores genéticos y ambientales que las determinan, cuyo conocimiento en profundidad permitirá establecer estrategias más eficaces de prevención personalizada en base al genoma y a las distintas variables ambientales con las que interactúa.

En este Capítulo se han incluido todas las referencias manejadas a lo largo de esta tesis según el orden alfabético:

Abbott CA, Mackness MI, Kumar S, Boulton AJ, Durrington PN. Serum paraoxonase activity, concentration, and phenotype distribution in diabetes mellitus and its relationship to serum lipids and lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1812-8.

Abu-Elheiga L, Oh W, Kordari P, Wakil SJ. Acetyl-CoA carboxylase 2 mutant mice are protected against obesity and diabetes induced by high-fat/high- carbohydrate diets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:10207-12.

Adams J, Chen ZP, Van Denderen BJ, Morton CJ, Parker MW, Witters LA, Stapleton D, Kemp BE. Intracellular control of AMPK via the gamma1 subunit AMP allosteric regulatory site. *Protein Sci*. 2004;13:155-65.

Adkins S, Gan KN, Mody M, La Du BN. Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/arylesterase: glutamine or arginine at position 191, for the respective A or B allozymes. *Am J Hum Genet*. 1993;52:598-608.

Advisory Committee on the Dietary Guidelines for Americans. Dietary guidelines for Americans. Report of the Dietary Guidelines. Secretary of Agriculture, U.S. Department of Agriculture, Washington, DC. 1995.

Agerholm-Larsen B, Tybjaerg-Hansen A, Schnohr P, Steffensen R, Nordestgaard BG. Common cholesteryl ester transfer protein mutations, decreased HDL cholesterol, and possible decreased risk of ischemic heart disease: The Copenhagen City Heart Study. *Circulation* 2000;102:2197-2203

Agudo A, Goñi F, Etxeandia A, Vives A, Millán E, López R, Amiano P, Ardanaz E, Barricarte A, Chirlaque MD, Dorronsoro M, Jakšzyn P, Larrañaga N, Martínez C, Navarro C, Rodríguez L, Sánchez MJ, Tormo MJ, González CA. Polychlorinated biphenyls in Spanish adults: determinants of serum concentrations. *Environ Res*. 2009;109:620-8.

Ahlzen M, Johansson LE, Cervin C, Tornqvist H, Groop L, Ridderstrale M Expression of the transcription factor 7-like 2 gene (TCF7L2) in human adipocytes is down regulated by insulin. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;370:49-52

Ahn Y, Kwon E, Shim JE, Park MK, Joo Y, Kimm K, Park C, Kim DH. Validation and reproducibility of food frequency questionnaire for Korean genome epidemiologic study. *Eur J Clin Nutr* 2007;61:1435-1441.

Ainsworth BE, Haskell WL, Whitt MC, Irwin ML, Swartz AM, Strath SJ, O'Brien WL, Bassett DR Jr, Schmitz KH, Emplaincourt PO, Jacobs DR Jr, Leon AS. Compendium of physical activities: an update of activity codes and MET intensities. *Med. Sci. Sports Exerc* 2000;32(suppl.):S498-S504.

Alegría E, Castellano JM, Alegría A. Obesidad, síndrome metabólico y diabetes: implicaciones cardiovasculares y actuación terapéutica. *Rev Esp Cardiol* 2008;61:752-64

Allayee HK, Dominguez M, Aouizerat BE, Krauss RM, Rotter JI, Lu J, Cantor RM, de Bruin TW, Lusis AJ. Contribution of the hepatic lipase gene to the atherogenic lipoprotein phenotype in familial combined hyperlipidemia. *J. LipidRes* 2000;41:245-252.

Almind K, Doria A, Kahn CR. Putting the genes for type II diabetes on the map. *Nat Med* 2001;7:277-9.

Alonso A, de la Fuente C, Martin-Arnau AM, de Irala J, Martinez JA, Martinez-Gonzalez MA. Fruit and vegetable consumption is inversely associated with blood pressure in a Mediterranean population with a high vegetable-fat intake :the Seguimiento Universidad de Navarra (SUN) Study. *Br J Nutr* 2004;92:311-9.

Alonso A, Martínez-González MA, Serrano-Martínez M. Fish omega-3 fatty acids and risk of coronary heart disease. *Med Clin (Barc)*. 2003;121:28-35.

Altshuler D, Hirschhorn JN, Klannemark M, Lindgren CM, Vohl MC, Nemesh J, Lane CR, Schaffner SF, Bolk S, Brewer C, Tuomi T, Gaudet D, Hudson TJ, Daly M, Groop L, Lander ES. The common PPARgamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 2000;26:76-80.

Alvarez León EE, Henríquez P, Serra-Majem L. Mediterranean diet and metabolic syndrome: A cross-sectional study in the Canary Islands. *Public Health Nutr*. 2006;9:1089-98.

Ambring A, Friberg P, Axelsen M, Laffrenzen M, Taskinen MR, Basu S, Johansson M. Effects of a mediterranean-inspired diet on blood lipids, vascular function and oxidative stress in healthy subjects. *MClinSci*. 2004;106:519-25.

Ambye L, Rasmussen S, Fenger M, Jorgensen T, Borch-Johnsen K, Madsbad S, Urhammer SA. Studies of the Gly482Ser polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha) gene in Danish subjects with the metabolic syndrome. *Diabetes Res Clin Pract* 2005;67:175-179.

Andersen RV, Wittrup HH, Tybjaerg-Hansen A, Steffensen R, Schnohr P, Nordestgaard BG. Hepatic lipase promoter SNPs associated with increased HDL cholesterol and paradoxically an increased risk of ischemic heart disease: the copenhagen city heart study. *Atherosclerosis*. 2001; Supplement 2, Abstract W12.1.

Anderson KM, Castelli WP, Levy D. Cholesterol and mortality: 30 years of follow-up from the Framingham Study. *JAMA*.1987;257:2176-80

Andreasen CH, Stender-Petersen KL, Mogensen MS, Torekov SS, Wegner L, Andersen G, Nielsen AL, Albrechtsen A, Borch-Johnsen K, Rasmussen SS, Clausen JO, Sandbaek A, Lauritzen T, Hansen L, Jørgensen T, Pedersen O, Hansen T. Low physical activity accentuates the effect of the FTO rs9939609 polymorphism on body fat accumulation. *Diabetes*. 2008;57:95-101.

Andreoli A, Lauro S, Di Daniele N, Sorge R, Celi M, Volpe SL. Effect of a moderately hypoenergetic mediterranean diet and exercise program on body cell mass and cardiovascular risk factors in obese women. *Eur J Clin Nutr*. 2008;62:892-7.

Androulakis ES, Tousoulis D, Papageorgiou N, Tsioufis C, Kallikazaros I, Stefanadis C. Essential hypertension: is there a role for inflammatory mechanisms? *Cardiol Rev.* 2009;17:216-21.

Angiolillo DJ, Biasucci LM, Liuzzo G, Crea F. La inflamación en los síndromes coronarios agudos: mecanismos e implicaciones clínicas. *Rev Esp Cardiol.* 2004;57: 433-46.

Angotti E, Mele E, Costanzo F, Avvedimento EV. A polymorphism (G→A transition) in the γ 78 position of the apolipoprotein A-I promoter increases transcription efficiency. *J Biol Chem* 1994;269:17371-4.

Anthopoulos PG, Hamodrakas SJ, Bagos PG. Apolipoprotein E polymorphisms and type 2 diabetes: a meta-analysis of 30 studies including 5423 cases and 8197 controls. *Mol Genet Metab.* 2010;100:283-91.

Antoniades C, Tousoulis D, Stefanadis C. Effect of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms on oxidative stress, inflammatory status and coronary atherosclerosis: an example of transient phenotype. *J Am Coll Cardiol.* 2007;49:1226-7

Appel LJ, Moore TJ, Obarzanek E, Vollmer WM, Svetkey LP, Sacks FM, Bray GA, Vogt TM, Cutler JA, Windhauser MM, Lin PH, Karanja N. A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure. DASH Collaborative Research Group. *N Engl J Med.* 1997;336:1117-24.

Arad M, Benson DW, Perez-Atayde AR, McKenna WJ, Sparks EA, Kanter RJ, McGarry K, Seidman JG, Seidman CE. Constitutively active AMP kinase mutations cause glycogen storage disease mimicking hypertrophic cardiomyopathy. *J. Clin. Invest.* 2002;109:357-362.

Arad M, Moskowitz IP, Patel VV, Ahmad F, Perez-Atayde AR, Sawyer DB, Walter M, Li GH, Burgon PG, Maguire CT, Stapleton D, Schmitt JP, Guo XX, Pizard A, Kupersmidt S, Roden DM, Berul CI, Seidman CE, Seidman JG. Transgenic mice overexpressing mutant PRKAG2 define the cause of Wolff-Parkinson-White syndrome in glycogen storage cardiomyopathy. *Circulation* 2003;107:2850-6.

Aranceta J, Pérez Rodrigo C, Serra Majem L, Ribas Barba L, Quiles Izquierdo J, Vioque J, Tur Marí J, Mataix Verdú J, Llopis González J, Tojo R, Foz Sala M; Grupo colaborativo para el Estudio de la Obesidad en España. Prevalencia de la obesidad en España: resultados del estudio SEEDO 2000. *Med Clin (Barc).* 2003;120:608-12.

Arca M, Conti B, Montali A, Pignatelli P, Campagna F, Barillà F, Tanzilli G, Verna R, Vestri A, Gaudio C, Violi F. C242T polymorphism of NADPH oxidase p22phox and recurrence of cardiovascular events in coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:752-7.

Argmann CA, Cock TA, Auwerx J. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma: the more the merrier? *Eur J Clin Invest* 2005;35:82-92.

Arnesen E, Refsum H, Børnaa KH, Ueland PM, Førde OH, Nordrehaug JE. Serum total homocysteine and coronary heart disease. *Int J Epidemiol.* 1995;24:704-9.

Arquer A, Elousa R, Marrugat, J. Actividad física y estrés oxidativo. *Apunts MedEsport* 2010;45:31-40.

Asensi MD, Sastre J, Pallardó FV, García de la Asunción J, Estrela JM, Viña J. A high-performance liquid chromatography method for measurement of oxidized glutathione in biological samples. *Anal Biochem* 1994;217:323–328.

Assadpoor-Piranjani M, Pordal AH, Beyranvand MR. Measurement of oxidized low-density lipoprotein and superoxide dismutase activity in patients with hypertension. *Arch Iran Med*. 2009;12:116-20.

Assmann G, Gotto AM Jr. HDL cholesterol and protective factors in atherosclerosis. *Circulation* 2004;109;III-8-III-14

Assmann G, Schulte H, von Eckardstein A, Huang Y. High density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk. The PROCAM experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* 1996;124:S11–S20 (Suppl.).

Attie AD, Kastelein JP, Hayden MR. Pivotal role of ABCA1 in reverse cholesterol transport influencing HDL levels and susceptibility to atherosclerosis. *J Lipid Res* 2001;42:1717-26.

Aubó C, Sentí M, Marrugat J, Tomás M, Vila J, Sala J, Masiá R. Risk of myocardial infarction associated with Gln/Arg 192 polymorphism in the human paraoxonase gene and diabetes mellitus. The REGICOR Investigators. *Eur Heart J*. 2000;21:33-8.

Aviram M, Hardak E, Vaya J, Mahmood S, Milo S, Hoffman A, Billicke S, Draganov D, Rosenblat M. Human serum paraoxonase (PON) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions: PON1 esterase and peroxidase-like activities. *Circulation*, 2000;101:2510–2517.

Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parmo SL, La Du BN. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest*. 1998;101:1581-90.

Azumi H, Inoue N, Ohashi Y, Terashima M, Mori T, Fujita H, Awano K, Kobayashi K, Maeda K, Hata K, Shinke T, Kobayashi S, Hirata K, Kawashima S, Itabe H, Hayashi Y, Imajoh-Ohmi S, Itoh H, Yokoyama M. Superoxide generation in directional coronary atherectomy specimens of patients with angina pectoris: important role of NAD(P)H oxidase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1838–1844.

Azumi H, Inoue N, Takeshita S, Rikitake Y, Kawashima S, Hayashi Y, Itoh H, Yokoyama M. Expression of NADH/NADPH oxidase p22phox in human coronary arteries. *Circulation* 1999;100:1494–1498.

Baar K, Wende AR, Jones TE, Marison M, Nolte LA, Chen M, Kelly DP, Holloszy JO. Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. *FASEB J* 2002;16:1879-86.

Bach A, Serra-Majem L, Carrasco JL, Roman B, Ngo J, Bertomeu I, Obrador B. The use of indexes evaluating the adherence to the Mediterranean diet in epidemiological studies: a review. *Public Health Nutrition*. 2006;9,132-146.

Baena JM, Del Val JL, Tomás J, Martínez JL, Martín R, González I. Epidemiología de las enfermedades cardiovasculares y factores de riesgo en atención primaria. *RevEsp Cardiol*. 2005;58:367-73.

- Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF κ B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 141-179.
- Baker JL, Olsen LW, Sørensen TI. Childhood body-mass index and the risk of coronary heart disease in adulthood. *N Engl J Med.* 2007;357:2329-37.
- Balding DJ. A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nat Rev Genet* 2006;7:781-791.
- Ballou SP, Lozanski G. Induction of inflammatory cytokine release from cultured human monocytes by C-reactive protein. *Cytokine* 1992;4:361-8.
- Banegas JR, Rodríguez-Artalejo F, Ruilope LM, Graciani A, Luque M, de la Cruz-Troca JJ, García-Robles R, Tamargo J, Rey-Calero J. Hypertension magnitude and management in the elderly population of Spain. *J Hypertens.*2002;20:2157-64.
- Banegas JR. Epidemiología de la hipertensión arterial en España. Situación actual y perspectivas. *Hipertensión.* 2005;22:353-62.
- Bansilal S, Farkouh ME, Fuster V. Role of insulin resistance and hyperglycemia in the development of atherosclerosis. *Am J Cardiol* 2007;99:6B-14B.
- Barnoya J, Glantz SA. Cardiovascular effects of secondhand smoke: nearly as large as smoking. *Circulation.* 2005;111:2684-98.
- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005;21:263-5.
- Barroso I, Luan J, Sandhu MS, Franks PW, Crowley V, Schafer AJ, Rahilly SO, Wareham NJ. Meta-analysis of the Gly482Ser variant in PPARGC1A in type 2 diabetes and related phenotypes *Diabetologia* 2006;49:501-505.
- Barroso I, Luan J, Middelberg RP, Harding AH, Franks PW, Jakes RW, Clayton D, Schafer AJ, O'Rahilly S, Wareham NJ. Candidate gene association study in type 2 diabetes indicates a role for genes involved in beta-cell function as well as insulin action. *PLoS Biol* 2003;1:E20
- Barter PJ, Baker PW, Rye KA. Effect of high-density lipoproteins on the expression of adhesion molecules in endothelial cells. *Curr Opin Lipidol* 2002;13:285-288. (a)
- Barter PJ. Hugh Sinclair lecture: the regulation and remodelling of HDL by plasma factors. *Atheroscler* 2002;Suppl 3:39-47. (b)
- Baskin DG, Figlewicz LD, Seeley RJ, Woods SC, Porte D Jr, Schwartz MW. Insulin and leptin: dual adiposity signals to the brain for the regulation of food intake and body weight. *Brain Res* 1999;848:114-123.
- Basso F, Lowe GD, Rumley A, McMahon AD, Humphries SE. Interleukin-6-174G.C polymorphism and risk of coronary heart disease in West of Scotland coronary prevention study (WOSCOPS). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:599-604.

Baynes C, Henderson AD, Anyaoku V, Richmond W, Hughes CL, Johnston DG, Elkeles RS. 1991. The role of insulina insensitivity and hepatic lipase in the dyslipidaemia of type 2 diabetes. *Diabet. Med.* 1991;8:560-566.

Bays H, Blonde L, Rosenson R. Adiposopathy: how do diet, exercise and weight loss drug therapies improve metabolic disease in overweight patients? *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2006;4:871-95.

Bazzano LA, Serdula MK, Liu S. Dietary intake of fruits and vegetables and risk of cardiovascular disease. *Curr Atheroscler Rep.* 2003;5:492-9.

Beaty TH, Khoury MJ. Interface of genetics and epidemiology. *Epidemiol Rev.* 2000;22:120-5.

Beauchamp GK, Keast RS, Morel D, Lin J, Pika J, Han Q, Lee CH, Smith AB, Breslin PA. Phytochemistry: ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature.* 2005;437:45-6.

Behrendt D, Ganz P. Endothelial function: from vascular biology to clinical applications. *Am J Cardiol.* 2002;90:40L-48L.

Beisiegel U, Weber W, Bengtsson-Olivecrona G. Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low density lipoprotein receptor-related protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88:8342-8346.

Bellido Casado J, Martín Escudero JC, Dueñas Laita A, Mena Martí FJ, Arzua Mouronte D, Simal Blanco F. Hábito tabáquico en una población general: descripción de la prevalencia, grado de consolidación y fase de abandono. *Arch Bronconeumol.* 2001;37:75-80.

Beltowski J, Wojcicka G, Jamroz A. Leptin decreases plasma paraoxonase 1 (PON1) activity and induces oxidative stress: the possible novel mechanism for proatherogenic effect of chronic hyperleptinemia. *Atherosclerosis* 2003;170:21-9.

Belza MJ, Quiroga J, Beland F, Zunzunegui MV. La hipertensión en las personas ancianas: prevalencia, conocimiento, tratamiento y control. *Aten Primaria.* 1997;19:367-71.

Bennet AM, Di Angelantonio E, Ye Z, Wensley F, Dahlin A, Ahlbom A, Keavney B, Collins R, Wiman B, de Faire U, Danesh J. Association of apolipoprotein E genotypes with lipid levels and coronary risk. *JAMA.* 2007;298:1300-11.

Benoist F, Lau P, McDonnell M, Doelle H, Milne R, McPherson R. Cholesteryl ester transfer protein mediates selective uptake of high density lipoprotein cholesteryl esters by human adipose tissue. *J Biol Chem* 1997;272:23572-23577

Berentzen T, Kring SI, Holst C, Zimmermann E, Jess T, Hansen T, Pedersen O, Toubro S, Astrup A, Sørensen TI. Lack of association of fatness-related FTO gene variants with energy expenditure or physical activity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93:2904-8.

Berlin JA, Colditz GA. A meta-analysis of physical activity in the prevention of coronary heart disease. *Am J Epidemiol.* 1990;132:612-28.

Bernstein MS, Costanza MC, James RW, Morris MA, Cambien F, Raoux S, Morabia A. Physical activity may modulate effects of ApoE genotype on lipid profile. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:133-40.

Bertomeu V, Castillo-Castillo. Situación de la enfermedad cardiovascular en España. Del riesgo a la enfermedad. *Rev Esp Cardiol Supl.* 2008;8:2E-9E.

Bertomeu V, Fácila L, González-Juanatey JR, Cea-Calvo L, Aznar J, Mazón P, Bertomeu González V. Control de las cifras de presión arterial en los pacientes hipertensos con hipertrofia ventricular: estudio VIIDA. *Rev Esp Cardiol.* 2007;60:1257-63.

Bhavani AB, Sastry KB, Reddy NK, Padma T. Lipid profile and apolipoprotein E polymorphism in essential hypertension. *Indian Heart J* 2005;57:151-157.

Bijnen FC, Caspersen DJ, Mosterd WL. Physical inactivity as a risk factor for coronary heart disease: a WHO and International Society and Federation of Cardiology position statement. *Bull World Health Organ.* 1994;72:1-4.

Bishop-Bailey D, Pepper JR, Larkin SW, Mitchell JA. Differential induction of cyclooxygenase-2 in human arterial and venous smooth muscle: role of endogenous prostanoids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:1655-61.

Bjartveit K, Tverdal A. Health consequences of smoking 1-4 cigarettes per day. *Tobacco Control.* 2005;14:315-20.

Bjorck J, Hellgren M, Rastam L, Lindblad U. Associations between serum insulin and homocysteine in a Swedish population – a potential link between the metabolic syndrome and hyperhomocysteinemia: the Skaraborg project. *Metabolism: Clinical and Experimental* 2006;55:1007–1013.

Black AE, Coward WA, Cole TJ, Prentice AM. Human energy expenditure in affluent societies: an analysis of 574 doublylabelled water measurements. *Eur J Clin Nutr* 1996;50:72–92.

Blair SN, Kampert JB, Kohl HW 3rd, Barlow CE, Macera CA, Paffenbarger RS Jr, Gibbons LW. Influences of cardio-respiratory fitness and other precursors on cardiovascular disease and all-cause mortality in men and women. *JAMA.* 1996;276:205-10.

Blair SN, Kohl HW 3rd, Barlow CE, Paffenbarger RS Jr, Gibbons LW, Macera CA. Changes in physical fitness and all-cause mortality: A prospective study of healthy and unhealthy men. *JAMA.* 1995;273:1093-8.

Blair SN, LaMonte MJ, Nichaman MZ. The evolution of physical activity recommendations: how much is enough? *Am J Clin Nutr.*2004;79:S913-20.

Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, Peetz D, Hafner G, Tiret L, Meyer J. Circulating cell adhesion molecules and death in patients with coronary artery disease. *Circulation.* 2001;104:1336–42.

Bo S, Gambino R, Ciccone G, Rosato R, Milanesio N, Villosio P, Pagano G, Cassader M, Gentile L, Durazzo M, Cavallo-Perin P. Effects of TCF7L2 polymorphisms on glucose values after a lifestyle intervention. *Am J Clin Nutr* 2009;90:1502–8.

Boden G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* 1996;46:3-10.

Boekholdt SM, Sacks FM, Jukema JW, Shepherd J, Freeman DJ, McMahon AD, Cambien F, Nicaud V, de Groot GJ, Talmud PJ, Humphries SE, Miller GJ, Eiriksdottir G, Gudnason V, Kauma H, Kakko S, Savolainen MJ, Arca M, Montali A, Liu S, Lanz HJ, Zwinderman AH, Kuivenhoven JA, Kastelein JJ. Cholesteryl ester transfer protein TaqIB variant, high-density lipoprotein cholesterol levels, cardiovascular risk, and efficacy of pravastatin treatment: individual patient meta-analysis of 13,677 subjects. *Circulation* 2005;111:278-287

Boemi M, James RW, Romagnoli F, Gerber P, Pometta D, Fumelli P. Gender differences in a type 2 (non-insulin-dependent) diabetic population with respect to apolipoprotein E phenotype frequencies. *Diabetologia*. 1993;36:229-33.

Boraita A. Ejercicio, piedra angular de la prevención cardiovascular. *Rev Esp Cardiol*. 2008;61:514-28

Borggreve SE, Hillege HL, Wolffenbuttel BH, de Jong PE, Zuurman MW, van der Steege G, van Tol A, Dullaart RP; PREVENT Study Group. An increased coronary risk is paradoxically associated with common cholesteryl ester transfer protein gene variations that relate to higher high-density lipoprotein cholesterol: a population-based study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91:3382-8.

Bosner SM, Lange LG, Stenson WF, Ostlund RE Jr. Percent cholesterol absorption in normal women and men quantified with dual stable isotopic tracers and negative ion mass spectrometry. *J Lipid Res*. 1999;40:302-8.

Bourcier T, Sukhova G, Libby P. The nuclear factor κ -B signaling pathway participates in dysregulation of vascular smooth muscle cells in vitro and in human atherosclerosis. *J Biol Chem* 1997;272:15817-15824.

Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative analysis of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA* 1995;274:1049-57.

Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest* 1968;21:77-89.

Brand K, Eisele T, Kreusel U, Page M, Page S, Haas M, Gerling A, Kaltschmidt C, Neumann FJ, Mackman N, Baeuerle PA, Walli AK, Neumeier D. Dysregulation of monocytic nuclear factor- κ B by oxidized low-density lipoprotein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17: 1901-1909.

Brand K, Page S, Rogler G, Bartsch A, Brandl R, Knuechel R, Page M, Kaltschmidt C, Baeuerle PA, Neumeier D. Activated transcription factor nuclear factor- κ B is present in the atherosclerotic lesion. *J Clin Invest* 1996; 97: 1715-1722.

Brand-Herrmann SM, Kuznetsova T, Wiechert A, Stolarz K, Tikhonoff V, Schmidt-Petersen K, Telgmann R, Casiglia E, Wang JG, Thijs L, Staessen JA, Brand E; European Project on Genes in Hypertension Investigators. Alcohol intake modulates the genetic association between HDL cholesterol and the PPAR γ 2 Pro12Ala polymorphism. *J Lipid Res* 2005;46:913-9.

Brattstrom L, Wilcken DE, Ohrvik J, Brudin L. Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis. *Circulation* 1998;98:2520-6.

Bray GA, Lovejoy JC, Smith SR, DeLany JP, Lefevre M, Hwang D, Ryan DH, York DA. The influence of different fats and fatty acids on obesity, insulin resistance and inflammation. *J Nutr.* 2002;132:2488-91.

Brewer HB Jr, Gregg RE, Hoeg JM, Fojo SS. Apolipoproteins and lipoproteins in human plasma. *Clin Chem* 1988;34: 4-8

Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986;232:34-47.

Brugada R, Marian AJ. A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase gene is not a major risk of coronary artery disease or myocardial infarction. *Atherosclerosis.* 1997;128:107-12.

Brunham LR, Kruit JK, Pape TD, Timmins JM, Reuwer AQ, VasANJI Z, Marsh BJ, Rodrigues B, Johnson JD, Parks JS, Verchere CB, Hayden MR. Beta-cell ABCA1 influences insulin secretion, glucose homeostasis and response to thiazolidinedione treatment. *Nat Med* 2007;13:340-7.

Brunham LR, Kruit JK, Verchere CB, Hayden MR. Cholesterol in islet dysfunction and type 2 diabetes. *J Clin Invest.* 2008;118:403-8.

Brunham LR, Singaraja RR, Hayden MR. Variations on a gene: rare and common variants in ABCA1 and their impact on HDL cholesterol levels and atherosclerosis. *Annu Rev Nutr.* 2006;26:105-29.

Bruunsgaard H, Christiansen L, Pedersen AN, Schroll M, Jorgensen T, Pedersen BK. The IL-6-174G.C polymorphism is associated with cardiovascular diseases and mortality in 80-year-old humans. *Exp Gerontol.* 2004;39:255-61.

Bucala R, Tracey KJ, Cerami A. Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes. *J Clin Invest* 1991;87:432-438.

Buchanan TA, Xiang AH, Peters RK. Protection from type 2 diabetes persists in the TRIPOD cohort eight months after stopping troglitazone. *Diabetes* 2001;50 Suppl 2:A81.

Bueno H, Hernández R, Hernández AV. Diabetes mellitus tipo 2 y enfermedad cardiovascular en España: una revisión descriptiva. *Rev Esp Cardiol Supl.* 2008;8:53C-61C

Bulló M, Casas-Agustench P, Amigó-Correig P, Aranceta J, Salas-Salvadó J. 2007 Inflammation, obesity and comorbidities: the role of diet. *Public Health Nutrition: Public Health Nutrition:* 10(10A), 1164-1172.

Buttriss, J, Nugent A.. LIPGENE: an integrated approach to tackling the metabolic syndrome. *Proc. Nutr. Soc.* 2005;64:345-347.

Cachofeiro V, Miana M, Martín-Fernández B, de las Heras N, Lahera V. Obesidad, inflamación y disfunción endotelial. *Rev Esp Obes* 2006;4:195-204.

Cade J, Thompson R, Burley V, Warm D. Development, validation and utilisation of food-frequency questionnaires —a review. *Public Health Nutr* 2002;5:567-587.

Cai H, Duarte N, Wilcken DE, Wang XL. NADH/NADPH oxidase p22 phox C242T polymorphism and coronary artery disease in the Australian population. *Eur J Clin Invest* 1999;29:744-748.

Calabresi L, Gomaschi M, Villa B, Omoboni L, Dmitrieff C, Franceschini G. Elevated soluble cellular adhesion molecules in subjects with low HDL-cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:656-61.

Carbajal A, Cuadrado C, Núñez C, Beltrán B, Toledano G, Moreiras O. Estudio TRANSFAIR. (II) Ingesta de ácidos grasos -cis y trans- con la dieta total en España. *Clin Invest Arterioscler* 2000;12:256-262.

Carluccio MA, Siculella L, Ancora MA, Massaro M, Scoditti E, Storelli C, Visioli F, Distanti A, De Caterina R. Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: Antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2003;23:622-629.

Carmena-Ramon RF, Ordovas JM, Ascaso JF, Real J, Priego MA, Carmena R. Influence of genetic variation at the apo A-I gene locus on lipid levels and response to diet in familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 1998;139:107-13.

Carnethon MR, Gidding SS, Nehgme R, Sidney S, Jacobs DR Jr, Liu K. Cardiorespiratory fitness in young adulthood and the development of cardiovascular disease risk factors. *JAMA.* 2003;290:3092-100.

Carr MC, Hokanson JE, Zambon A, Deeb SS, Barrett PH, Purnell JQ, Brunzell JD. The contribution of intraabdominal fat to gender differences in hepatic lipase activity and low/high density lipoprotein heterogeneity. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:2831-2837.

Castell JV, Gómez Lechón MJ, David M, Fabra R, Trullenque R, Heinrich PC. Acute-phase response of human hepatocytes: regulation of acute-phase protein synthesis by interleukin-6. *Hepatology* 1990;12:1.179-1.186.

Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PW, Abbott RD, Kalousdian S, Kannel WB. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study. *Jama* 1986;256:2835-2838.

Cattin L, Fiscaro M, Tonizzo M, Valenti M, Danek GM, Fonda M, Da Col PG, Casagrande S, Pincetri E, Bovenzi M, Baralle F. Polymorphism of the apolipoprotein E gene and early carotid atherosclerosis defined by ultrasonography in asymptomatic adults. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:91-4.

Cauchi S, Choquet H, Gutiérrez-Aguilar R, Capel F, Grau K, Proença C, Dina C, Duval A, Balkau B, Marre M, Potoczna N, Langin D, Horber F, Sørensen TI, Charpentier G, Meyre D, Froguel P. Effects of TCF7L2 polymorphisms on obesity in European populations. *Obesity (Silver Spring)* 2008;16:476-82.

Cauchi S, El Achhab Y, Choquet H, Dina C, Krempler F, Weitgasser R, Nejjari C, Patsch W, Chikri M, Meyre D, Froguel P. TCF7L2 is reproducibly associated with type 2 diabetes in various ethnic groups: a global meta-analysis. *J Mol Med.* 2007;85:777-82.

Cauchi S, Meyre D, Choquet H, Dina C, Born C, Marre M, Balkau B, Froguel P; DESIR Study Group. TCF7L2 variation predicts hyperglycemia incidence in a French general population: the data from an epidemiological study on the Insulin Resistance Syndrome (DESIR) study. *Diabetes.* 2006;55:3189-92.

- Ceciliani F, Giordano A, Spagnolo V. The systemic reaction during inflammation: the acute-phase proteins. *Protein and peptide letters* 2002;9:211-223.
- Cena H, Roggi C, Turconi G. Development and validation of a brief food frequency questionnaire for dietary lutein and zeaxanthin intake assessment in Italian women. *Eur J Nutr* 2008;47:1-9.
- Cermak J, Key NS, Bach RR, Balla J, Jacob HS, Vercellotti GM. C-reactive protein induces human peripheral blood monocytes to synthesize tissue factor. *Blood* 1993;82:513-20.
- Cesari M, Penninx BW, Newman AB, Kritchevsky SB, Nicklas BJ, Sutton-Tyrrell K, Rubin SM, Ding J, Simonsick EM, Harris TB, Pahor M. Inflammatory markers and onset of cardiovascular events: results from the Health ABC study. *Circulation*. 2003;108:2317-22.
- Chaaba R, Attia N, Hammami S, Smaoui M, Ben Hamda K, Mahjob S, Hammami M. [The effect of apolipoprotein e polymorphism on plasma cholesteryl ester transfer protein activity in type 2 diabetic patients] *Mol Biol (Mosk)*. 2008;42:931-6.
- Chahoud G, Aude YW, Mehta JL. Dietary recommendations in the prevention and treatment of coronary heart disease: do we have the ideal diet yet? *Am J Cardiol* 2004;94:1260-7.
- Chandak GR, Janipalli CS, Bhaskar S, Kulkarni SR, Mohankrishna P, Hattersley AT, Frayling TM, Yajnik CS. Common variants in the TCF7L2 gene are strongly associated with type 2 diabetes mellitus in the Indian population. *Diabetologia* 2007;50:63-67
- Channon KM. Oxidative stress and coronary plaque stability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1751-1752.
- Chapman Mj, Assmann G, Fruchart Jc, Sheperd J, Sirtori C. Raising High-Density Lipoprotein Cholesterol With Reduction Of Cardiovascular Risk: The Role Of Nicotinic Acid – A Position Paper Developed By The European Consensus Panel On Hdl-C. *Curr Med Res Opin* 2004;20:1253-1268
- Chapman MJ. Therapeutic elevation of HDL-cholesterol to prevent atherosclerosis and coronary heart disease. *Pharmthera* 2006;111 893-908.
- Chen H, Liu C, Sun S, Mei Y, Tong E. Cytokine-induced cell surface expression of adhesion molecules in vascular endothelial cells in vitro. *J Tongji Med Univ*. 2001;21:68-71.
- Chen L, Patsch W, Boerwinkle E. 1996. HindIII DNA polymorphism in the lipoprotein lipase gene and plasma lipid phenotypes and carotid artery atherosclerosis. *Hum Gene* 1996;98:551-556.
- Chen W, Srinivasan SR, Elkasabany A, Ellsworth DL, Boerwinkle E, Berenson GS. Influence of lipoprotein lipase serine 447 stop polymorphism on tracking of triglycerides and HDL cholesterol from childhood to adulthood and familial risk of coronary artery disease: the Bogalusa Heart Study. *Atherosclerosis*. 2001;159:367-373.
- Chen Y, Ahsan H, Parvez F, Howe GR. Validity of a food frequency questionnaire for a large prospective cohort study in Bangladesh. *Br J Nutr* 2004;92:851-859.
- Chen Z, Boreham J. Smoking and cardiovascular disease. *Semin Vasc Med*. 2002;2:243-52.

Cherki M, Berrougui H, Isabelle M, Cloutier M, Koumbadinga GA, Khalil A. Effect of PON1 polymorphism on HDL antioxidant potential is blunted with aging. *Exp Gerontol.* 2007;42:815-24.

Chiason JL, Gomis R, Hanefeld M, Josse RG, Karasik A, Laakso M. The Stop-NIDDM Trial: an international study on the efficacy of an alpha-glucosidase inhibitor to prevent type 2 diabetes in a population with impaired glucose tolerance. Rationale, design and preliminary screening data. Study to Prevent Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1998;346:393-403.

Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT Jr, Roccella EJ; Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. National Heart, Lung, and Blood Institute; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA* 2003;289:2560-72

Chrysohoou C, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Das UN, Stefanadis C. Adherence to the Mediterranean diet attenuates inflammation and coagulation process in healthy adults: The ATTICA Study. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44:152-8.

Chu NF, Spiegelman D, Hotamisligil GS, Rifai N, Stampfer M, Rimm EB. Plasma insulin, leptin, and soluble TNF receptors levels in relation to obesity-related atherogenic and thrombotic cardiovascular disease risk factors among men. *Atherosclerosis* 2001;157:495-503.

Cipollone F, Fazia ML. COX-2 and atherosclerosis. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2006;47 Suppl 1:S26-36.

Cipollone F, Patrono C. Cyclooxygenase-2 polymorphism: putting a brake on the inflammatory response to vascular injury? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1516-1518.

Cipollone F, Toniato E, Martinotti S, Fazia M, Iezzi A, Cuccurullo C, Pini B, Ursi S, Vitullo G, Averna M, Arca M, Montali A, Campagna F, Uchino S, Spigonardo F, Taddei S, Viridis A, Ciabattini G, Notarbartolo A, Cuccurullo F, Mezzetti A; Identification of New Elements of Plaque Stability (INES) Study Group. A polymorphism in the cyclooxygenase 2 gene as an inherited protective factor against myocardial infarction and stroke. *JAMA.* 2004;291:2221-8.

Civeira F, Pocovi M, Cenarro A, Garces C, Ordovas JM. Adenine for guanine substitution _78 base pairs to the apolipoprotein (APO) A-I gene: relation with high-density lipoprotein cholesterol and apoA-I concentrations. *Clin Genet* 1993;44:307-12.

Clark AM, Hartling L, Vandermeer B, McAlister FA. Metaanalysis: secondary prevention programs for patients with coronary artery disease. *Ann Intern Med.* 2005;143:659-72.

Clayton D, McKeigue PM. Epidemiological methods for studying genes and environmental factors in complex diseases. *Lancet* 2001; 358:1356-60.

Clee SM, Zwinderman AH, Engert JC, Zwarts KY, Molhuizen HO, Roomp K, Jukema JW, van Wijland M, van Dam M, Hudson TJ, Brooks-Wilson A, Genest J Jr, Kastelein JJ, Hayden MR. Common genetic variation in ABCA1 is associated with altered lipoprotein levels and a modified risk for coronary artery disease. *Circulation.* 2001;103:1198-205.

Cockerill GW, Huehns TY, Weerasinghe A, Stocker C, Lerch PG, Miller NE, Haskard DO. Elevation of plasma high-density lipoprotein concentration reduces interleukin-1-induced expression of E-selectin in an in vivo model of acute inflammation. *Circulation* 2001;103:108–112.

Cockerill GW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ. High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1987-1994

Cohen JC, Vega GL, Grundy SM. Hepatic lipase: new insights from genetic and metabolic studies. *Curr. Opin. Lipidol.* 1999;10:259–267.

Colaizzo D, Fofi L, Tiscia G, Guglielmi R, Cocomazzi N, Prencipe M. The COX-2 G/C -765 polymorphism may modulate the occurrence of cerebrovascular ischemia. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2006;17:93–6.

Collins RG, Velji R, Guecara NV, Hicks MJ, Chan L, Beaudet AL. P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp Med.* 2000;191:189-194.

Comuzzie AG, Williams JT, Martin LJ, Blangero J. Searching for genes underlying normal variation in human adiposity. *J Mol Med* 2001;79:57-70

Corella D, Carrasco P, Fitó M, Martínez-González MA, Salas-Salvadó J, Arós F, Lapetra J, Guillén M, Ortega-Azorín C, Warnberg J, Fiol M, Ruiz-Gutierrez V, Serra-Majem L, Martínez JA, Ros E, Estruch R. Gene-environment interactions of CETP gene variation in a high cardiovascular risk Mediterranean population. *J Lipid Res.* 2010;51:2798-807.

Corella D, Guillen M, Portoles O, Sabater A, Cortina S, Folch J, Saiz C. Polimorfismos en el gen de la apolipoproteína E y riesgo de hipercolesterolemia: un estudio de casos y controles en población laboral de Valencia. *Med Clin (Barc)* 2000;115:170-175. (a)

Corella D, Guillén M, Portolés O, Sorlí JV, Alonso V, Folch J, Sáiz C. Gender specific associations of the Trp64Arg mutation in the beta3-adrenergic receptor gene with obesity-related phenotypes in a Mediterranean population: interaction with a common lipoprotein lipase gene variation. *J Intern Med.* 2001;250:348-60.(a)

Corella D, Guillén M, Sáiz C, Portolés O, Sabater A, Folch J, Ordovas JM. Associations of LPL and APOC3 gene polymorphisms on plasma lipids in a Mediterranean population: interaction with tobacco smoking and the APOE locus. *J Lipid Res.* 2002;43:416-27.

Corella D, Ordovas JM. Single nucleotide polymorphisms that influence lipid metabolism: Interaction with dietary factors. *Annu. Rev. Nutr.* 2005;25:341–90

Corella D, Sáiz C, Guillén M, Portolés O, Mulet F, González JI, Ordovas JM. Association of TaqIB polymorphism in the cholesteryl ester transfer protein gene with plasma lipid levels in a healthy Spanish population. *Atherosclerosis* 2000;152:367-376. (b)

Corella D, Tucker K, Lahoz C, Coltell O, Cupples LA, Wilson PW, Schaefer EJ, Ordovas JM. Alcohol drinking determines the effect of the APOE locus on LDL-cholesterol concentrations in men: the Framingham Offspring Study. *Am J Clin Nutr* 2001; 73: 736-45.(b)

Corella D, González JI, Bulló M, Carrasco P, Portolés O, Díez-Espino J, Covas MI, Ruíz-Gutierrez V, Gómez-Gracia E, Arós F, Fiol M, Herrera MC, Santos JM, Sáez G, Lamuela R, Lahoz C, Vinyoles E, Ros E, Estruch R. Polymorphisms cyclooxygenase-2 -765G>C and interleukin-6 -174G>C are associated with serum inflammation markers in a high cardiovascular risk population and do not modify the response to a Mediterranean diet supplemented with virgin olive oil or nuts. *J Nutr.* 2009;139:128-34.

Corrao G, Rubbiati L, Bagnardi V, Zambon A, Poikolainen K. 2000 Alcohol and coronary heart disease: a meta-analysis. *Addiction* 95:1505-1523.

Costas J. Estudios genéticos de asociación de enfermedades multifactoriales complejas. *Neural Supl* 2005;1:44-50.

Daimon M, Kido T, Baba M, Oizumi T, Jimbu Y, Kameda W, Yamaguchi H, Ohnuma H, Tominaga M, Muramatsu M, Kato T. Association of the ABCA1 gene polymorphisms with type 2 DM in a Japanese population. *Biochem Biophys Res Com* 2005;329:205-210.

Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem* 2006;52:601-623.

Dallongeville J, Lussier-Cacan S, Davignon J. Modulation of plasma triglycerides levels by apoE phenotype: a metaanalysis. *J Lipid Res* 1992;33:447-54.

Danek GM, Valenti M, Baralle FE, Romano M. The A/G polymorphism in the -78 position of the apolipoprotein A-I promoter does not have a direct effect on transcriptional efficiency. *Biochim Biophys Acta* 1998;1398:67-74.

Dapcich V, Salvador Castell G, Ribas Barba L, Pérez Rodrigo C, Aranceta Bartrina J, Serra Majem L. Guía de la alimentación saludable. Editado por la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC). Madrid, 2004.

Davies HG, Richter RJ, Keifer M, Broomfield CA, Sowalla J, Furlong CE. The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin. *Nat Genet.* 1996;14:334-336

Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 1988;8:1-21.

de Lemos JA, Hennekens CH, Ridker PM. Plasma concentration of soluble vascular cell adhesion molecule-1 and subsequent cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol.* 2000;36:423-6.

de Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Delaye J, Mamelle N. Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation.* 1999;16;99:779-85

de Roos MNG, Schouten EG, Scheek LM., van Tol A, Katan, MB. Replacement of dietary saturated fat with trans fat reduces serum paraoxonase activity in healthy men and women. *Metab., Clin. Exp.* 2002;51:1534-1537

de Roos NM, Siebelink E, Bots ML, van Tol A, Schouten EG, Katan MB. Trans monounsaturated fatty acids and saturated fatty acids have similar effects on postprandial flow-mediated vasodilation. *Eur J Clin Nutr.* 2002;56:674-9.

Deakin SP, James RW. Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-1. *Clin Sci*, 2004;107:435-447

Deckelbaum RJ, Fisher EA, Winston M, Kumanyika S, Lauer RM, Pi-Sunyer FX, St Jeor S, Schaefer EJ, Weinstein IB. Summary of a scientific conference on preventive nutrition: pediatrics to geriatrics. *Circulation* 1999;100:450-456

Dedoussis GV, Panagiotakos DB, Chrysohoou C, Pitsavos C, Zampelas A, Choumerianou D, Stefanadis C. Effect of interaction between adherence to a Mediterranean diet and the methylenetetrahydrofolate reductase 677C>T mutation on homocysteine concentrations in healthy adults: the ATTICA Study. *Am J Clin Nutr*. 2004;80:849-54.

Dedoussis GV, Panagiotakos DB, Louizou E, Mantoglou I, Chrysohoou C, Lamnisou K, Pitsavos C, Stefanadis C. Cholesteryl ester-transfer proteina (CETP) polymorphism and the association of acute coronary syndromes by obesity status in Greek subjects: the CARDIO2000-GENE study. *Hum Hered*. 2007;63:155-61.

Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, Pihlajamaki J, Mykkanen L, Kuusisto J, Laakso M, Fujimoto W, Auwerx J. A Pro12Ala substitution in PPARgamma2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nat Genet* 1998;20:284-287

Deeb SS, Peng R. The C-514T polymorphism in the human hepatic lipase gene promoter diminishes its activity. *J Lipid Res* 2000;41:155-158

DeGraba TJ, Sirén AL, Penix L, McCarron RM, Hargraves R, Sood S, Pettigrew KD, Hallenbeck JM. Increased endothelial expression of intercellular adhesion molecule-1 in symptomatic versus asymptomatic human carotid atherosclerotic plaque. *Stroke*. 1998;29:1405-10.

DellaPenna D. Nutritional genomics: manipulating plant micronutrients to improve human health. *Science* 1999;285:375-379

Demant T, Bedford D, Packard CJ, Shepherd J. Influence of apolipoprotein E polymorphism on apolipoprotein B-100 metabolism in normolipemic subjects. *J Clin Invest* 1991;88:1490-501.

Demerath E, Towne B, Blangero J, Siervogel RM. The relationship of soluble ICAM-1, VCAM-1, P-selectin and E-selectin to cardiovascular disease risk factors in healthy men and women. *Ann Hum Biol*. 2001;28:664-78.

Despres JP, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*. 2006;444:881-7.

Devaraj S, Xu DY, Jialal I. C-reactive protein increases plasminogen activator-1 expression and activity in human aortic endothelial cells. *Circulation* 2003;107:398-404.

Di Castelnuovo A, Soccio M, Iacoviello L, Evangelista V, Consoli A, Vanuzzo D, Diviacco S, Carluccio M, Rignanese L, De Caterina R. The C242t Polymorphism Of The P22phox Component Of Nad(P)H Oxidase And Vascular Risk. Two Case-Control Studies And A Meta-Analysis. *Thromb Haemost*. 2008;99:594-601

Di Renzo L, Bigioni M, Del Gobbo V, Premrov MG, Barbini U, Di Lorenzo N, De Lorenzo A. Interleukin-1 (IL-1) receptor antagonist gene polymorphism in normal weight obese syndrome: relationship to body composition and IL-1 alpha and beta plasma levels. *Pharmacol Res* 2007;55:131-138.

Diabetes Prevention Program Research Group. Reduction in incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or Metformin. *N Engl J Med*. 2002;346:393-403.

Dietschy JM, Turley SD, Spady DK. Role of the liver in the maintenance of cholesterol and low-density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. *J Lipid Res*. 1993;34:1637-59.

Dina C, Meyre D, Gallina S, Durand E, Korner A, Jacobson P, Carlsson LM, Kiess W, Vatin V, Lecoq C, Delplanque J, Vaillant E, Pattou F, Ruiz J, Weill J, Levy-Marchal C, Horber F, Potoczna N, Hercberg S, Le SC, Bougneres P, Kovacs P, Marre M, Balkau B, Cauchi S, Chevre JC, Froguel P. Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat Genet* 2007;39:724-726

Djoussé L, Arnett DK, Coon H, Province MA, Moore LL, Ellison RC. Fruit and vegetable consumption and LDL cholesterol: the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study. *Am J Clin Nutr*. 2004;79:213-7.

Djoussé L, Hunt SC, Arnett DK, Province MA, Eckfeldt JH, Ellison RC. Dietary linolenic acid is inversely associated with plasma triacylglycerol: the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study. *Am J Clin Nutr*. 2003;78:1098-102.

Djoussé L, Myers RH, Province MA, Hunt SC, Eckfeldt JH, Evans G, Peacock JM, Ellison RC. Influence of apolipoprotein E, smoking, and alcohol intake on carotid atherosclerosis: National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study. *Stroke* 2002;1357-61.

Dobbins RL, Szczepaniak LS, Bentley B, Esser V, Myhill J, McGarry JD. Prolonged inhibition of muscle carnitine palmitoyltransferase-1 promotes intramyocellular lipid accumulation and insulin resistance in rats. *Diabetes*. 2001;50:123-30.

Domínguez-Berjón MF, Borrell C, Nebot M, Plasencia A. La actividad física de ocio y su asociación con variables sociodemográficas y otros comportamientos relacionados con la salud. *Gac Sanit* 1998;12:100-9.

Dong ZM, Chapman SM, Brown AA, Frenette PS, Hynes RO, Wagner DD. The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J Clin Invest*. 1998;102:45-152.

Douglas JA, Erdos MR, Watanabe RM, Braun A, Johnston CL, Oeth P, Mohlke KL, Valle TT, Ehnholm C, Buchanan TA, Bergman RN, Collins FS, Boehnke M, Tuomilehto J. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 Pro12Ala variant. Association with type 2 diabetes and trait differences. *Diabetes* 2001;50:886-890.

Drexler H. Factors involved in the maintenance of endothelial function. *Am J cardiol*. 1998;82:3S-4S.

Dugi KA, Brandauer K, Schmidt N, Nau B, Schneider JG, Mentz S, Keiper T, Schaefer JR, Meissner C, Kather H, Bahner ML, Fiehn W, Kreuzer J. Low hepatic lipase activity is a novel risk factor for coronary artery disease. *Circulation* 2001;104:3057-3062.

Dullaart RP, Beusekamp BJ, Riemens SC. High-density lipoprotein cholesterol is related to the TaqIB cholesteryl ester transfer protein gene polymorphism and smoking, but not to moderate alcohol consumption in insulin-dependent diabetic men. *Scand J Clin Lab Invest*. 1998;58:251-8.

Dullaart RP, Sluiter WJ. Common variation in the CETP gene and the implications for cardiovascular disease and its treatment: an updated analysis. *Pharmacogenomics*. 2008;9:747-63.

Dumartheray EW, Krieg MA, Cornuz J, Whittamore DR, Lovell DP, Burckhardt P, Lanham-New SA. Validation and reproducibility of a semi-quantitative food frequency questionnaire for use in elderly Swiss women. *J Hum Nutr Diet* 2006;19:321–330.

Durak I, Koksall I, Kacmaz M, Buyukkocak S, Cimen BM, Ortuz HS. Hazelnut supplementation enhances plasma antioxidant potential and lowers plasma cholesterol levels. *Clin Chim Acta* 1999;284:113-5.

Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol*, 2001;21:473–480

Dzau VJ. Tissue angiotensin and pathobiology of vascular disease: A unifying hypothesis [Theodore Cooper Lecture]. *Hypertension* 2001;37:1047–1052.

Eaton CB, Nafziger AN, Strogatz DS, Pearson TA. Self reported physical activity in a rural county: A New York County Health Census. *Am J Public Health* 1994; 84: 29-32.

Eckel RH, Kahn R, Robertson RM, Rizza RA. Preventing cardiovascular disease and diabetes: a call to action from the American Diabetes Association and the American Heart Association. *Circulation* 2006;113:2943-6.

Eckel RH, Yost TJ, Jensen DR. Alterations in lipoprotein lipase in insulin resistance. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1995;19:16–21.

Edwards k, Kwaw I, Matud J, Kurtz I. Effect of pistacho nuts on serum lipid levels in patients with moderate hypercholesterolemia. *J Am Coll Nutr* 1999;18:229-32.

Egashira K, Inou T, Hirooka Y, Yamada A, Urabe Y, Takeshita A. Evidence of impaired endothelium-dependent coronary vasodilatation in patients with angina pectoris and normal coronary angiograms. *N Engl J Med* 1993; 328:1659-1664

Eichner JE, Dunn ST, Perveen G, Thompson DM, Stewart KE, Stroehla BC. Apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular disease: a HuGE review. *Am J Epidemiol*. 2002;155:487-95.

Eichner JE, Kuller LH, Ferrell RE, Meilahn EN, Kamboh MI. Phenotypic effects of apolipo protein structural variation on lipid profiles. *Arteriosclerosis*. 1990;10:379-385.

Eichner JE, Kuller LH, Orchard TJ, et al. Relation of apolipoprotein E phenotype to myocardial infarction and mortality from coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1993;71:160–5.

Ek J, Andersen G, Urhammer SA, Gaede PH, Drivsholm T, Borch-Johnsen K, Hansen T, Pedersen O.. Mutation analysis of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 (PGC-1) and relationships of identified amino acid polymorphisms to Type II diabetes mellitus. *Diabetologia* 2001;44:2220–2226

Ek J, Urhammer SA, Sorensen TI, Andersen T, Auwerx J, Pedersen O. Homozygosity of the Pro12Ala variant of the peroxisome proliferation-activated receptor-gamma2 (PPAR-gamma2): divergent modulating effects on body mass index in obese and lean Caucasian men. *Diabetologia* 1999;42:892-895

- Elbaz A, Dufouil C, Alperovitch A. Interaction between genes and environment in neurodegenerative diseases. *Comptes Rendus Biologies*. 2007;330:318-28.
- Elizondo-Armendáriz JJ, Guillén Grima F, Aguinaga Ontoso I. Prevalencia de actividad física y su relación con variables sociodemográficas y estilos de vida en la población de 18 a 65 años de Pamplona. *Rev Esp Salud Publica*. 2005;79:559-567.
- Elosua R, Marrugat J, Molina L, Pons S, Pujol E. Validation of the Minnesota Leisure Time Physical Activity Questionnaire in Spanish men. The MARATHOM Investigators. *Am J Epidemiol*. 1994;139:1197-209.
- Elosua R. Actividad física: un eficiente y olvidado elemento de la prevención cardiovascular, desde la infancia hasta la vejez *Rev Esp Cardiol*. 2005;58:887-90
- Emeis J, Kooistra T. Interleukin-1 and lipopolysaccharide induce an inhibitor of t-PA in vivo and in cultured endothelial cells. *J Exp Med* 1986;163:1.860-1.866.
- Endemann G, Stanton LW, Madden KS, Bryant CM, White RT, Protter AA. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem*. 1993; 268:11811-11816.
- Engeli S, Böhnke J, Feldpausch M, Gorzelniak K, Janke J, Bártkai S, Pacher P, Harvey-White J, Luft FC, Sharma AM, Jordan J. Activation of the peripheral endocannabinoid system in human obesity. *Diabetes* 2005;54:2838–2843.
- Engeli S, Gorzelniak K, Kreutz R, Runkel N, Distler A, Sharma AM. Co-expression of renin-angiotensin system genes in human adipose tissue. *J Hypertens* 1999;17:555–560.
- EPIC Group of Spain. Relative validity and reproducibility of a diet history questionnaire in Spain. I. *Foods*. *Int J Epidemiol* 1997;26 Suppl 1:S91-S99.
- Espinosa O, Jimenez-Almazan J, Chaves FJ, Tormos MC, Clapes S, Iradi A, Salvador A, Fandos M, Redón J, Sáez GT. Urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG) a reliable oxidative stress marker in hypertension. *Free Radic Res* 2007;41:546–554.
- Esposito K, Marfella R, Ciotola M, Di Palo C, Giugliano F, Giugliano G, D'Armiento M, D'Andrea F, Giugliano D. Effect of a Mediterranean style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome. *JAMA* 2004;292:1440–6.
- Esposito K, Pontillo A, Di Palo C, Giugliano G, Masella M, Marfella R, Giugliano D. Effect of weight loss and lifestyle changes on vascular inflammatory markers in obese women: a randomized trial. *JAMA* 2003;289:1799–804.
- Esterbauer H, Oberkofler H, Linnemayr V, Iglseder B, Hedegger M, Wolfsgruber P, Paulweber B, Fastner G, Krempler F, Patsch W. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 gene locus: associations with obesity indices in middle-aged women. *Diabetes* 2002;51:1281–1286
- Estruch R, Martínez-González MA, Corella D, Salas-Salvadó J, Ruiz-Gutiérrez V, Covas MI, Fiol M, Gómez-Gracia E, López-Sabater MC, Vinyoles E, Arós F, Conde M, Lahoz C, Lapetra J, Sáez G, Ros E; PREDIMED Study Investigators. Effects of a Mediterranean-style diet on cardiovascular risk factors: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2006;145:1–11.

Etingen OR, Hajjar DP, Hajjar KA, Harpel PC, Nachman RL. Lipoprotein(a) regulates plasminogen activator inhibitor-1 expression in endothelial cells: A potential mechanism for thrombogenesis. *J Biol Chem* 1991;226:2.459-2.465

Eto M, Watanabe K, Makino I. Increased frequencies of apolipoprotein ϵ 2 and ϵ 4 alleles in patients with ischemic heart disease. *Clin Genet* 1989;36:183-8.

Evans AE, Zhang W, Moreel JF, Bard JM, Ricard S, Poirier O, Tiret L, Fruchart JC, Cambien F. Polymorphisms of the apolipoprotein B and E genes and their relationship to plasma lipid variables in healthy Chinese men. *Hum Genet* 1993;92:191-7.

Fagard RH. Exercise characteristics and the blood pressure response to dynamic physical training. *Med Sci Sports Exerc.* 2001;33:S484-S492

Fan Y, Laaksonen R, Janatuinen T, Vesalainen R, Nuutila P, Koivula T, Knuuti J, Lehtimäki T. Hepatic lipase gene variation is related to coronary reactivity in healthy young men. *Eur J Clin Invest* 2001;31:574-580.

Fandos M, Corella D, Guillén M, Portolés O, Carrasco P, Iradi A, Martínez-González MA, Estruch R, Covas MI, Lamuela-Raventós RM, Michavilla MT, Cerdá C, Torregrosa R, Redón J, Chaves FF, Tormos MC, Ocete D, Sáez GT. Impact of cardiovascular risk factors on oxidative stress and DNA damage in a high risk Mediterranean population. *Free Radic Res.* 2009;43:1179-86.

Fernández A, Schiaffino A, García M, Salto E, Villalbí JR, Borrás JM. Prevalencia del consumo de tabaco en España entre 1945 y 1995. Reconstrucción a partir de las Encuestas Nacionales de Salud. *Med Clin (Barc).* 2003;120:14-6.

Fernández-Ballart JD, Piñol JL, Zazpe I, Corella D, Carrasco P, Toledo E, Perez-Bauer M, Martínez-González MA, Salas-Salvado J, Martín-Moreno JM. Relative validity of a semi-quantitative food-frequency questionnaire in an elderly Mediterranean population of Spain. *Br J Nutr.* 2010;103:1808-16

Fernández-Jarne E, Martínez-Losa E, Prado-Santamaría M, Brugarolas-Brufau C, Serrano-Martínez M, Martínez-González MA. Risk of first non-fatal myocardial infarction negatively associated with olive oil consumption: a case-control study in Spain. *Int J Epidemiol* 2002;31:474-480.

Fernandez-Real JM, Vayreda M, Richart C, Gutierrez C, Broch M, Vendrell J, Ricart W. Circulating IL-6 levels, blood pressure and insulin sensitivity in apparently healthy men and women. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:1154-9.

Ferrara LA, Raimondi AS, d'Episcopo L, Guida L, Dello Russo A, Marotta T. Olive oil and reduced need for antihypertensive medications. *Arch Intern Med* 2000;160:837-842.

Ferrario CM, Strawn WB. Role of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System and Proinflammatory Mediators in Cardiovascular Disease. *Am J Cardiol* 2006;98:121-128.

Ferré N, Camps J, Fernández-Ballart J, Arijá V, Murphy MM, Ceruelo S, Biarnés E, Vilella E, Tous M, Joven J. Regulation of serum paraoxonase activity by genetic, nutritional, and lifestyle factors in the general population. *Clin Chem.* 2003;49:1491-1497

Ferretti G, Bacchetti T, Marchionni C, Caldarelli L, Curatola G. Effect of glycation of high density lipoproteins on their physicochemical properties and on paraoxonase activity. *Acta Diabetol.* 2001;38:163–169

Festa A, D'Agostino R Jr, Mykkänen L, Tracy RP, Zaccaro DJ, Hales CN, Haffner SM. Relative contribution of insulin and its precursors to fibrinogen and PAI-1 in a large population with different states of glucose tolerance. The Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:562-568.

Fidanza F. Indicadores bioquímicos de la ingesta alimentaria. *Rev Esp Nutr Comunitaria* 2002;8:46-50

Finkelstein JD. Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem* 1990;1:228–37.

Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest.* 1998;102:1369–76.

Fitó M, Cladellas M, de la Torre R, Martí J, Alcántara M, Pujadas-Bastardes M, Marrugat J, Bruguera J, López-Sabater MC, Vila J, Covas MI; members of the SOLOS Investigators. Antioxidant effect of virgin olive oil in patients with stable coronary heart disease: A randomized, crossover, controlled, clinical trial. *Atherosclerosis* 2005;181:149-158.

Fitó M, Guxens M, Corella D, Sáez G, Estruch R, de la Torre R, Francés F, Cabezas C, López-Sabater Mdel C, Marrugat J, García-Arellano A, Arós F, Ruiz-Gutierrez V, Ros E, Salas-Salvadó J, Fiol M, Solá R, Covas MI; for the PREDIMED Study Investigators. Effect of a traditional Mediterranean diet on lipoprotein oxidation: a randomized controlled trial. *Arch Intern Med* 2007;167:1195-1203.

Flachs P, Rossmeisl M, Bryhn M, Kopecky J. Cellular and molecular effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on adipose tissue biology and metabolism. *Clin Sci (Lond).* 2009;116:1-16.

Fletcher O, Kessling AM. MTHFR association with arteriosclerotic vascular disease? *Hum Genet.* 1998;103:11-21.

Flight I, Clifton P. Cereal grains and legumes in the prevention of coronary heart disease and stroke: a review of the literature. *Eur J Clin Nutr.* 2006;60:1145-59.

Florez JC, Jablonski KA, Bayley N, Pollin TI, de Bakker PI, Shuldiner AR, Knowler WC, Nathan DM, Altshuler D; Diabetes Prevention Program Research Group. TCF7L2 polymorphisms and progression to diabetes in the Diabetes Prevention Program. *N Engl J Med* 2006;355:241–50.

Florez JC. Newly identified loci highlight beta cell dysfunction as a key cause of type 2 diabetes: where are the insulin resistance genes? *Diabetologia.* 2008;51:1100-10.

Florez JC. The new type 2 diabetes gene TCF7L2. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2007;10:391-6.

Formiga F, Alia P, Navarro MA, Pujol R. Apolipoprotein E genotypes in nonagenarians. *J Am Geriatr Soc* 2006;54:1471-1473.

Fox C, Coady S, Sorlie P, Levy D, Meigs JB, D'Agostino RB Jr. Trends in cardiovascular complications of diabetes. *JAMA* 2004;292:2495-9.

Franks PW, Luan J, Browne PO, Harding AH, O'Rahilly S, Chatterjee VK, Wareham NJ. Does peroxisome proliferator-activated receptor gamma genotype (Pro12Ala) modify the association of physical activity and dietary fat with fasting insulin level? *Metabolism* 2004;53:11-6.

Franz MJ, Bantle JP, Beebe CA, Brunzell JD, Chiasson JL, Garg A, Holzmeister LA, Hoogwerf B, Mayer-Davis E, Mooradian AD, Purnell JQ, Wheeler M. Evidence-based nutrition principles and recommendations for the treatment and prevention of diabetes and related complications. *Diabetes Care*. 2002;25:148-98.

Fraser GE, Sabaté J, Beeson WL, Strahan TM. A possible protective effect of nut consumption on risk of coronary heart disease. *Arch Intern Med* 1992;152:1416-1424.

Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, Perry JR, Elliott KS, Lango H, Rayner NW, Shields B, Harries LW, Barrett JC, Ellard S, Groves CJ, Knight B, Patch AM, Ness AR, Ebrahim S, Lawlor DA, Ring SM, Ben-Shlomo Y, Jarvelin MR, Sovio U, Bennett AJ, Melzer D, Ferrucci L, Loos RJ, Barroso I, Wareham NJ, Karpe F, Owen KR, Cardon LR, Walker M, Hitman GA, Palmer CN, Doney AS, Morris AD, Smith GD, Hattersley AT, McCarthy MI. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science*. 2007;316:889-894.

Fredriksson R, Hägglund M, Olszewski PK, Stephansson O, Jacobsson JA, Olszewska AM, Levine AS, Lindblom J, Schiöth HB. The obesity gene, FTO, is of ancient origin, up-regulated during food deprivation and expressed in neurons of feeding-related nuclei of the brain. *Endocrinology*. 2008;149:2062-71.

Freeman M, Ekkel Y, Rohrer L, Penman M, Freedman NJ, Chisolm GM, Krieger M. Expression of type I and type II bovine scavenger receptors in Chinese hamster ovary cells: Lipid droplet accumulation and nonreciprocal cross competition by acetylated and oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:4931-4935.

Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:847-50.

Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499-502

Frikke-Schmidt R, Tybjaerg-Hansen A, Steffensen R, Jensen G, Nordestgaard BG. Apolipoprotein E genotype: epsilon32 women are protected while epsilon43 and epsilon44 man are susceptible to ischemic heart disease: the Copenhagen City Heart Study. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:1192-9.

Frisdal E, Klerkx AH, Le Goff W, Tanck MW, Lagarde JP, Jukema JW, Kastelein JJ, Chapman MJ, Guerin M. Functional interaction between -629C/A, -971G/A and -1337C/T polymorphisms in the CETP gene is a major determinant of promoter activity and plasma CETP concentration in the REGRESS Study. *Hum Mol Genet* 2005;14:2607-18.

Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat. Genet.* 1995;10:111-13

Fuentes F, López-Miranda J, Sánchez E, Sánchez F, Paez J, Paz-Rojas E, Marín C, Gómez P, Jimenez-Perepérez J, Ordovás JM, Pérez-Jiménez F. Mediterranean and low-fat diets improve endothelial function in hypercholesterolemic men. *Ann Intern Med* 2001;134:1115–1119.

Fumeron F, Betoulle D, Luc G, Behague I, Ricard S, Poirier O, Jemaa R, Evans A, Arveiler D, Marques-Vidal P. Alcohol intake modulates the effect of a polymorphism of the CETP gene on plasma high density lipoprotein and the risk of myocardial infarction. *J Clin Invest*. 1995;96:1664-71.

Fung TT, McCullough ML, Newby PK, Manson JE, Meigs JB, Rifai N, Willett WC, Hu FB. Diet-quality scores and plasma concentrations of markers of inflammation and endothelial dysfunction. *AmJClinNutr*. 2005;82:163–73.

Fung TT, Rexrode KM, Mantzoros CS, Manson JE, Willett WC, Hu FB. Mediterranean diet and incidence of and mortality from coronary heart disease and stroke in women. *Circulation*. 2009;119:1093-100.

Fung TT, Schulze M, Manson JE, Willett WC, Hu FB. Dietary patterns, meat intake, and the risk of type 2 diabetes in women. *Arch Intern Med*. 2004;164:2235-40.(a)

Fung TT, Stampfer MJ, Manson JE, Rexrode KM, Willett WC, Hu FB. Prospective study of major dietary patterns and stroke risk in women. *Stroke*. 2004;35:2014-9.(b)

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288:373-6.

Fuster V, Gotto AM, Libby P, Loscalzo J, McGill HC. 27th Bethesda Conference: matching the intensity of risk factor management with the hazard for coronary disease events. Task force 1. Pathogenesis of coronary disease: the biologic role of risk factors. *J Am Coll Cardiol* 1996;27:964-976.

Fuzikawa AK, Peixoto SV, Taufer M, Moriguchi EH, Lima-Costa MF. Association of ApoE polymorphisms with prevalent hypertension in 1406 older adults: the Bambuí Health Aging Study (BHAS). *Braz J Med Biol Res*. 2008;41:89-94.

Gabay C and Kuser I. Acute-Phase Proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999;340:448-454.

Gabler NK, Radcliffe JS, Spencer JD, Webel DM, Spurlock ME. Feeding long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids during gestation increases intestinal glucose absorption potentially via the acute activation of AMPK. *J Nutr Biochem* 2008;20:17–25.

Gabriel R, Alonso M, Segura A, Tormo MJ, Artigao LM, Banegas JR, Brotons C, Elosua R, Fernández-Cruz A, Muñoz J, Reviriego B, Rigo F. Prevalencia, distribución y variabilidad geográfica de los principales factores de riesgo cardiovascular en España. Análisis agrupado de datos individuales de estudios epidemiológicos poblacionales: estudio ERICE. *Rev Esp Cardiol*. 2008;61:1030-40

Gagne SE, Larson MG, Pimstone SN, Schaefer EJ, Kastelein JJ, Wilson PW, Ordovas JM, Hayden MR. A common truncation variant of lipoprotein lipase (Ser447X) confers protection against coronary heart disease: the Framingham Offspring Study. *Clin Genet* 1999;55:450-454

Galis Z, Sukhova G, Lark M, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1994;94:2493-503.

Gallisti S, Sudi k, Mangge H, Erwa W, Borkenstein M. Insuline is an independent correlate of plasma homocysteine levels in obese children and adolescents. *Diabetes Care* 2000;23:1348-1352.

Gao G, Fernandez CS, Stapleton D, Auster AS, Widmer J, Dyck JRB, Kemp BE, Witters LA. Non-catalytic b- and g-subunit isoforms of the 50-AMP-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* 1996;271:8675-81.

García-Lorda P, Megias I, Salas-Salvadó J. Nut consumption, body weight and insulin resistance. *Eur J Clin Nutr* 2003;S8-S11.

Garenc C, Pérusse L, Gagnon J, Chagnon YC, Bergeron J, Després JP, Province MA, Leon AS, Skinner JS, Wilmore JH, Rao DC, Bouchard C. Linkage and association studies of the lipoprotein lipase gene with postheparin plasma lipase activities, body fat, and plasma lipid and lipoprotein concentrations: the HERITAGE Family Study. *Metabolism* 2000;49:432-439

Gauldie J, Richards C, Northemann W, Fey G, Baumann H. IFN β 2/BSF2/IL-6 is the monocyte-derived HSF that regulates receptor-specific acute phase gene regulation in hepatocytes. *Ann NY Acad Sci* 1989;557:46-57.

Hakonson JE, Cheng S, Snell-Bergeon JK, Fijal BA, Grow MA, Hung C, Erlich HA, Erlich J, Eckel RH, Rewers M. A common promoter polymorphism in the hepatic lipase gene (LIPC-480C>T) is associated with an increase in coronary calcification in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2002;51:1208-1213.

Gerdes LU, Gerdes C, Kervinen K, Savolainen M, Klausen IC, Hansen PS, Kesäniemi YA, Faergeman O. The apolipoprotein E4 allele determines prognosis and the effect on prognosis of simvastatin in survivors of myocardial infarction. A substudy of the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Circulation* 2000;101:1366-71.

Gerken T, Girard CA, Tung YC, Webby CJ, Saudek V, Hewitson KS, Yeo GS, McDonough MA, Cunliffe S, McNeill LA, Galvanovskis J, Rorsman P, Robins P, Prieur X, Coll AP, Ma M, Jovanovic Z, Farooqi IS, Sedgwick B, Barroso I, Lindahl T, Ponting CP, Ashcroft FM, O'Rahilly S, Schofield CJ. The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate dependent nucleic acid demethylase. *Science*. 2007;318:1469-1472.

Giltay EJ, Hoogeveen EK, Elbers JMH, Gooren LJG, Asscheman H, Stehouwer CDA. Insulin resistance is associated with elevated plasma total homocysteine levels in healthy, non-obese subjects. *Atherosclerosis* 1998;139:197-198.

Ginsberg HN, Kris-Etherton P, Dennis B, Elmer PJ, Ershow A, Lefevre M, Pearson T, Roheim P, Ramakrishnan R, Reed R, Stewart K, Stewart P, Phillips K, Anderson N. Effects of reducing dietary saturated fatty acids on plasma lipids and lipoproteins in healthy subjects: The DELTA Study, protocol 1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:441-449.

Giugliano D, Marfella R, Coppola L, Verrazzo G, Acampora R, Giunta R, Nappo F, Lucarelli C, D'Onofrio F. Vascular effects of acute hyperglycemia in humans are reversed by L-arginine. Evidence for reduced availability of nitric oxide during hyperglycemia. *Circulation* 1997;95:1783-1790.

Glavac D, Dean M. Optimization of the Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations. *Human Mutation* 1993;2:404-414.

Glick M. Screening for traditional risk factors for cardiovascular disease: a review for oral health care providers. *J Am Dent Assoc.* 2002;133:291-300

Goday A. Epidemiología de la diabetes y sus complicaciones no coronarias. *Rev Esp Cardiol.* 2002;55:657-70.

Gofman JW, Young W, Tandy R. Ischemic heart disease, atherosclerosis and longevity. *Circulation.* 1966;34:679-97.

Goldby FS, Beilin U. How an acute rise in arterial pressure damages arterioles. Electron microscopic changes during angiotensin infusion. *Cardiovasc Res* 1972;6:569-584.

Goldenberg I, Moss AJ, Block R, Ryan D, Corsetti JP, McNitt S, Eberly SW, Zareba W. Polymorphism in the cholesteryl ester transfer protein gene and the risk of early onset myocardial infarction among cigarette smokers. *Ann Noninvasive Electrocardiol.* 2007;12:364-74.

Goldschmid M, Barrett-Connor E, Edelstein S, Wingard DL, Cohn BA, Herman WH. Dyslipemia and ischemic heart disease mortality among men and women with diabetes. *Circulation.* 1994;89:991-7.

Goldstein LB, Adams R, Alberts MJ, Appel LJ, Brass LM, Bushnell CD, Culebras A, DeGraba TJ, Gorelick PB, Guyton JR, Hart RG, Howard G, Kelly-Hayes M, Nixon JV, Sacco RL; American Heart Association; American Stroke Association Stroke Council. Primary prevention of ischemic stroke: a guideline from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council: cosponsored by the Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease Interdisciplinary Working Group; Cardiovascular Nursing Council; Clinical Cardiology Council; Nutrition, Physical Activity, and Metabolism Council; and the Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group: the American Academy of Neurology affirms the value of this guideline. *Stroke.* 2006;37:1583-633.

Gómez-Coronado D, Alvarez JJ, Entrala A, Olmos JM, Herrera E, Lasuncion MA. Apolipoprotein E in men and women from a Spanish population: allele frequencies and influence on plasma lipids and apolipoproteins. *Atherosclerosis* 1999;147:167-176

González CA, Navarro C, Martínez C. The European Prospective Investigation on Diet, Cancer, and Health (EPIC) in Spain. Group EPIC of Spain. *Med Clin (Barc)* 1994;102:781-785.

Gonzalez Sanchez JL, Serrano Rios M, Fernandez Perez C, Laakso M, Martinez Larrad MT. Effect of the Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma-2 gene on adiposity, insulin sensitivity and lipid profile in the Spanish population. *Eur J Endocrinol* 2002;147:495-501.

González-Juanatey JR, Alegría-Ezquerria E, Aznar-Costa J, Bertomeu-Martínez V, Franch-Nadal J, Palma-Gámiz JL. Conocimiento y aplicación de las guías de práctica clínica sobre riesgo cardiovascular en las consultas generales y especializadas. *Rev Esp Cardiol* 2006;59:801-6.

González-Sánchez JL, Martínez-Larrad MT, Zabena C, Pérez-Barba M, Serrano-Ríos M. Association of variants of the TCF7L2 gene with increases in the risk of type 2 diabetes and the proinsulin:insulin ratio in the Spanish population. *Diabetologia.* 2008;51:1993-7.

González-Sánchez JL, Zabena C, Martínez-Larrad MT, Martínez-Calatrava MJ, Pérez-Barba M, Serrano-Ríos M. Variant rs9939609 in the FTO gene is associated with obesity in an adult population from Spain. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009;70:390-3.

Gopaul NK, Anggard EE, Mallet AI, Betteridge DJ, Wolff SP, Nourooz-Zadeh J. Plasma 8-epi-PGF2 alpha levels are elevated in individuals with non-insulin dependent diabetes mellitus. *FEBS Lett* 1995; 368: 225-9.

Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, Neaton JD, Castelli WP, Knoke JD, Jacobs DR Jr, Bangdiwala S, Tyroler HA. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation* 1989;79:8-15.(a)

Gordon DJ, Rifkind BM. High-density lipoprotein--the clinical implications of recent studies. *N Engl J Med* 1989;321:1311-6.(b)

Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Daqber TR. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease: the Framingham study. *Am J Med*. 1977;2:707-14.

Gotto, AM, Jr, Pownall HJ, Havel RJ. Introduction to the plasma lipoproteins. *Methods Enzymol*. 1986;128:3-41.

Gouda HN, Sagoo GS, Harding AH, Yates J, Sandhu MS, Higgins JP. The association between the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 (PPARG2) Pro12Ala gene variant and type 2 diabetes mellitus: a HuGE review and meta-analysis. *Am J Epidemiol*. 2010;171:645-55.

Goulet J, Lamarche B, Nadeau G, Lemieux S. Effect of a nutritional intervention promoting the Mediterranean food pattern on plasma lipids, lipoproteins and body weight in healthy French-Canadian women. *Atherosclerosis*. 2003;170:115-24.

Gouni-Berthold I, Giannakidou E, Müller-Wieland D, Faust M, Kotzka J, Berthold HK, Krone W. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 Pro12Ala and endothelial nitric oxide synthase-4a/b gene polymorphisms are not associated with hypertension in diabetes mellitus type 2. *J Hypertens* 2005;23:301-308.

Gozin A, Franzini E, Andrieu V, Da Costa L, Rollet-Labelle E, Pasquier C. Reactive oxygen species activate focal adhesion kinase, paxillin and p130cas tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 1998;25:1021-1032.

Gramenzi A, Gentile A, Fasoli M, Negri E, Parazzini F, La Vecchia C. Association between certain foods and risk of acute myocardial infarction in women. *BMJ*. 1990;300:771-3.

Graninger M, Reiter R, Drucker C, Minar E, Jilma B. Angiotensin receptor blockade decreases markers of vascular inflammation. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004;44:335-339.

Grant SF, Li M, Bradfield JP, Kim CE, Annaiah K, Santa E, Glessner JT, Casalunovo T, Frackelton EC, Otiemo FG, Shaner JL, Smith RM, Imielinski M, Eckert AW, Chiavacci RM, Berkowitz RI, Hakonarson H. Association analysis of the FTO gene with obesity in children of Caucasian and African ancestry reveals a common tagging SNP. *PLoS One* 2008;3:e1746.

Grant SF, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Manolescu A, Sainz J, Helgason A, Stefansson H, Emilsson V, Helgadottir A, Styrkarsdottir U, Magnusson KP, Walters GB, Palsdottir E, Jonsdottir T, Gudmundsdottir T, Gylfason A, Saemundsdottir J, Wilensky RL, Reilly MP, Rader DJ, Bagger Y, Christiansen C, Gudnason V, Sigurdsson G, Thorsteinsdottir U, Gulcher JR, Kong A, Stefansson K. Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 2006;38:320–323

Grau M, Subirana I, Elosua R, Solanas P, Ramos R, Masiá R, Cordón F, Sala J, Juvinyà D, Cerezo C, Fitó M, Vila J, Covas MI, Marrugat J. Trends in cardiovascular risk factor prevalence (1995-2000-2005) in northeastern Spain. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2007;14:653-9.

Greenwald RA. Handbook of methods for oxygen radical research. Boca Raton, FL: CRC Press Inc; 1987.

Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 2000; 86: 494–501.

Griffin JH, Fernández JA, Deguchi H. Plasma lipoproteins, hemostasis and thrombosis. *Thromb Haemost* 2001;86:386-394.

Griffin JH, Kojima K, Banka CL, Curtiss LK, Fernández JA. High-density lipoprotein enhancement of anticoagulant activities of plasma protein S and activated protein C. *J Clin Invest* 1999;103:219-227.

Grill HJ. Distributed neural control of energy balance: contributions from hindbrain and hypothalamus. *Obesity (Silver Spring)* 2006;14:216–221

Gross JL, Moscatelli D, Jaffer EA, Rifkin DB. Plasminogen activation and collagenase production by cultured capillary endothelial cells. *J Cell Biol* 1982;95:974-981

Groves CJ, Zeggini E, Minton J, Frayling TM, Weedon MN, Rayner NW, Hitman GA, Walker M, Wiltshire S, Hattersley AT, McCarthy MI. Association analysis of 6,736 U.K. subjects provides replication and confirms TCF7L2 as a type 2 diabetes susceptibility gene with a substantial effect on individual risk. *Diabetes* 2006;55:2640–2644

Grundy SM, Benjamin IJ, Burke GL, Chait A, Eckel RH, Howard BV, Mitch W, Smith SC Jr, Sowers JR. Diabetes and cardiovascular disease. A statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation* 1999;100:1134-1146.

Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, Gordon DJ, Krauss RM, Savage PJ, Smith SC Jr, Spertus JA, Costa F; American Heart Association; National Heart, Lung, and Blood Institute. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation.*2005;112:2735-52

Grundy SM. Dietary fat: at the heart of the matter. *Science* 2001;293: 801–4.

Guerra R, Wang J, Grundy SM, Cohen JC. A hepatic lipase (LIPC) allele associated with high plasma concentrations of high density lipoprotein cholesterol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:4532–7.

Guerra, R., J. Wang, S. M. Grundy, and J. C. Cohen. A hepatic lipase (LIPC) allele associated with high plasma concentrations of high density lipoprotein cholesterol. *Proc. Natl Acad Sci USA* 1977; 94: 4532–4537.

Gutiérrez-Fisac JL, López-García E, Banegas JL, Graciani Pérez-Regadera A, Rodríguez-Artalejo F. Prevalence of overweight and obesity in Spain: cross-sectional study of a national sample of persons aged 60 and over. *Obes Res.* 2004;12:710-5.

Guyton JR, Klemp KF. Development of the lipid-rich core in human atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:4-11.

Guzelmeric K, Alkan N, Pirmoglou M, Unal O, Turan C. Chronic inflammation and elevated homocysteine levels are associated with increased body mass index in women with polycystic ovary. *Gynecological Endocrinology* 2007;23:505–510.

Haffner SM, Mykkanen L, Festa A, Burke JP, Stern MP. Insulin-resistant prediabetic subjects have more atherogenic risk factors than insulin-sensitive prediabetic subjects. Implications for preventing coronary heart disease during the prediabetic state. *Circulation* 2000;101:975-980.

Haffner SM. The metabolic syndrome: inflammation, diabetes mellitus, and cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 2006;97:3A–11A.

Hagberg JM, Wilund KR, Ferrell RE. Apo E gene and gene-environment effects on plasma lipoprotein-lipid levels. *Physiol Genomics* 2000;4:101-108

Hait PH, Burgess DR, Vitti GF, Hamilton JA. Interleukin-4 stimulates human monocytes to produce tissue-type plasminogen activator. *Blood* 1989;74:1.282-1.285.

Hajduk SL, Moore DR, Vasudevacharya J, Siqueira H, Torri AF, Tytler EM, Esko JD. Lysis of *Trypanosoma brucei* by a toxic subspecies of human high density lipoprotein. *J Biol Chem* 1989;264:5210–5217.

Hajer GR, Timon W, van Haeften TW, Visseren FLJ. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *European Heart Journal*. 2008. doi:10.1093/eurheartj/ehn387

Haller H. Endothelial function: general considerations. *Drugs* 1997; 53: 1-10.

Hallman DM, Boerwinkle E, Saha N, Sandholzer C, Menzel HJ, Császár A, Utermann G. The apolipoprotein E polymorphism: A comparison of allele frequencies and effects in nine populations. *Am J Hum Genet* 1991;49:338-349

Ham SA, Yore MM, Fulton JE, Kohl HW, Div of Nutrition and Physical Activity, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, CDC. Prevalence of no leisure-time physical activity — 35 States and the District of Columbia, 1988-2002. *MMWR Morb Mort Wkly Rep.* 2004;53:82-6.

Hambrecht R, Wolf A, Gielen S, Linke A, Hofer J, Erbs S, Schoene N, Schuler G. Effect of exercise on coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2000;342:454.

Han SN, Leka LS, Lichtenstein AH, Ausman LM, Schaefer EJ, Meydani SN. Effect of hydrogenated and saturated, relative to polyunsaturated, fat on immune and inflammatory responses of adults with moderate hypercholesterolemia. *J Lipid Res.* 2002;43:445-52.

Hanis CL, Hewett-Emmett D, Douglas TC, Bertin TK, Schull WJ. Effects of the apolipoprotein E polymorphism on levels of lipids, lipoproteins, and apolipoproteins among Mexican-Americans in Starr County, Texas. *Arterioscler Thromb* 1991;11:362-70.

Hara K, Tobe K, Okada T, Kadowaki H, Akanuma Y, Ito C, Kimura S, Kadowaki T. A genetic variation in the PGC-1 gene could confer insulin resistance and susceptibility to Type II diabetes. *Diabetologia* 2002 ;45:740-743

Harada T, Imai Y, Nojiri T, Morita H, Hayashi D, Maemura K, Fukino K, Kawanami D, Nishimura G, Tsushima K, Monzen K, Yamazaki T, Mitsuyama S, Shintani T, Watanabe N, Seto K, Sugiyama T, Nakamura F, Ohno M, Hirata Y, Yamazaki T, Nagai R. A common Ile 823 Met variant of ATP-binding cassette transporter A1 gene (ABCA1) alters high density lipoprotein cholesterol level in Japanese population. *Atherosclerosis* 2003;169:105-112.

Hardie DG, Hawley SA. AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. *Bioessays.* 2001;23:1112-9.

Hardie DG. Role of AMP-activated protein kinase in the metabolic syndrome and in heart disease. *FEBS Lett.* 2008;582:81-9.

Hardie DG. The AMP-activated protein kinase pathway-new players upstream and downstream. *J Cell Sci* 2004;117:5479-87.

Harker LA, Ross R, Slichter SJ, Scott CR. Homocystine-induced arteriosclerosis: the role of endothelial cell injury and platelet response in its genesis. *J Clin Invest* 1976;58:731-41.

Harrison DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest* 1997;100:2153-2157.

Hart CL, Hole DJ, Smith GD. Risk factors and 20-year stroke mortality in men and women in the Renfrew/Paisley study in Scotland. *Stroke.* 1999;30:1999-2007.

Haskell WL, Lee IM, Pate RR, Powell KE, Blair SN, Franklin BA, Macera CA, Heath GW, Thompson PD, Bauman A. Physical Activity and Public Health Updated Recommendation for Adults From the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Circulation.* 2007;116:1081-93.

Haskell WL. Cardiovascular disease prevention and lifestyle interventions: effectiveness and efficacy. *J Cardiovasc Nurs.* 2003;18:245-55.

Haslam DW, James WP. Obesity. *Lancet.* 2005;366:1197-209.

Hasstedt SJ, Ren QF, Teng K, Elbein SC. Effect on the peroxisome proliferator-activated receptor gamma pro12ala variant on obesity, glucose homeostasis, and blood pressure in members of familial type 2 diabetic kindreds. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:536-541.

Hawley SA, Davison M, Woods A, Davies SP, Beri RK, Carling D, Hardie DG. Characterization of the AMP-activated protein kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 1996;271:27879-87.

Hayaishi-Okano R, Yamasaki Y, Kajimoto Y, Sakamoto K, Ohtoshi K, Katakami N, Kawamori D, Miyatsuka T, Hatazaki M, Hazama Y, Hori M. Association of NAD(P)H oxidase p22 phox gene variation with advanced carotid atherosclerosis in Japanese type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2003;26:458-463.

Hayashi T, Iwamoto Y, Kaku K, Hirose H, Maeda S. Replication study for the association of TCF7L2 with susceptibility to type 2 diabetes in a Japanese population. *Diabetologia* 2007;50:980-984.

Hayek T, Fuhrman B, Vaya J, Rosenblat M, Belinky P, Coleman R, Elis A, Aviram M. Reduced progression of atherosclerosis in the apolipoprotein E deficient mice following consumption of red wine, or its polyphenols quercetin, or catechin, is associated with reduced susceptibility of LDL to oxidation and to aggregation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2744-2752

He J, Vupputuri S, Allen K, Prerost MR, Hughes J, Whelton PK. Passive smoking and the risk of coronary heart disease: a metanálisis of epidemiologic studies. *N Engl J Med.* 1999;340:920-6.

He K, Song Y, Daviglius ML, Liu K, Van Horn L, Dyer AR, Greenland P. Accumulated evidence on fish consumption and coronary heart disease mortality: a meta-analysis of cohort studies. *Circulation.* 2004;109:2705-11.

He MA, Cheng LX, Jiang CZ, Zeng HS, Wang J, Wang F, Chen Y, Yang M, Tan H, Zheng HY, Hu FB, Wu TC. Associations of polymorphism of P22phox C242T, plasma levels of vitamin E, and smoking with coronary heart disease in China. *Am. Heart J.* 2007;640:e1-e6

Heart OutcomesPrevention Evaluation (HOPE) Study Investigators. Effects of ramipril on cardiovascular and microvascular outcomes in people with diabetes mellitus: results of de HOPE study and MICRO-HOPE substudy. *Lancet* 2000;355:253-9.

Hedrick CC, Hassan K, Hough GP, Yoo JH, Simzar S, Quinto CR, Kim SM, Dooley A, Langi S, Hama SY, Navab M, Witztum JL, Fogelman AM. Short term feeding of atherogenic diet to mice results in reduction of HDL and paraoxonase that may be mediated by an immune response. *Arterioscler ThrombVasc. Biol.* 2000;20:1946-1952

Hegele RA. Paraoxonasa-genes and disease. *Ann Med* 1999;31:217-24.

Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Munzel T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001;104:2673-2678.

Helgason A, Pálsson S, Thorleifsson G, Grant SF, Emilsson V, Gunnarsdottir S, Adeyemo A, Chen Y, Chen G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Hinney A, Hansen T, Andersen G, Borch-Johnsen K, Jorgensen T, Schäfer H, Faruque M, Dumaty A, Zhou J, Wilensky RL, Reilly MP, Rader DJ, Bagger Y, Christiansen C, Sigurdsson G, Hebebrand J, Pedersen O, Thorsteinsdottir U, Gulcher JR, Kong A, Rotimi C, Stefánsson K. Refining the impact of TCF7L2 gene variants on type 2 diabetes and adaptive evolution. *Nat Genet* 2007;39:218-225

Helsing E, Trichopoulou A. The Mediterranean diet and food culture-a symposium. *European Journal of Clinical Nutrition* 1989;43:1-92

Herbert A, Liu C, Karamohamed S, Schiller J, Liu J, Yang Q, Wilson PW, Cupples LA, Meigs JB. The -174 IL-6 GG genotype is associated with a reduced risk of type 2 diabetes mellitus in a family sample from the National Heart, Lung and Blood Institute's Framingham Heart Study. *Diabetologia*. 2005;48:1492-5.

Herman MP, Sukhova GK, Libby P, Gerdes N, Tang N, Horton DB, Kilbride M, Breitbart RE, Chun M, Schönbeck U. . Expression of neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase-8) in human atheroma: a novel collagenolytic pathway suggested by transcriptional profiling. *Circulation* 2001;104:1899-904.

Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y. Endothelial Function and Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases. *Circ J* 2009;73:411-418

Hirano K, Yamashita S, Kuga Y, Sakai N, Nozaki S, Kihara S, Arai T, Yanagi K, Takami S, Menju M, Ishigama M, Yoshida Y, Kameda-Takemura K, Hayashi K, Matsuzawa Y. Atherosclerotic disease in marked hyperalphalipoproteinemia. Combined reduction of cholesteryl ester transfer protein and hepatic triglyceride lipase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1995;15:1849-1856.

Hirano K, Yamashita S, Matsuzawa Y. Pros and cons of inhibiting cholesteryl ester transfer protein. *Curr Opin Lipidol.* 2000;11:589-96.

Hirano T. Lipoprotein abnormalities in diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl* 1999; 71: S22-S24.

Horikoshi M, Hara K, Ito C, Nagai R, Froguel P, Kadowaki T. A genetic variation of the transcription factor 7-like 2 gene is associated with risk of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetologia* 2007;50:747-751

Horikoshi M, Hara K, Ohashi J, Miyake K, Tokunaga K, Ito C, Kasuga M, Nagai R, Kadowaki T. A polymorphism in the AMPKalpha2 subunit gene is associated with insulin resistance and type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetes* 2006;55:919-923.

Horikoshi M, Hara K, Ohashi J, Miyake K, Tokunaga K, Ito C, Kasuga M, Nagai R, Kadowaki T. A polymorphism in the AMPKalpha2 subunit gene is associated with insulin resistance and type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetes* 2006;55:919-923

Horne BD, Carlquist JF, Cannon-Albright LA, Muhlestein JB, McKinney JT, Kolek MJ, Clarke JL, Anderson JL, Camp NJ. High-resolution characterization of linkage disequilibrium structure and selection of tagging singlenucleotide polymorphisms: application to the cholesteryl ester transfer protein gene. *Ann Hum Genet.*2006; 70:524-34.

Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 1995;95:2409-2415.

Howard BV, Gidding SS, Lui K. Association of apolipoprotein E phenotype with plasma lipoproteins in African-American and white young adults: the CARDIA Study. *Coronary Artery Risk Development in Young Adults. Am J Epidemiol* 1998;148:859-868.

Howard BV, Van Horn L, Hsia J, Manson JE, Stefanick ML, Wassertheil-Smoller S, Kuller LH, LaCroix AZ, Langer RD, Lasser NL, Lewis CE, Limacher MC, Margolis KL, Mysiw WJ, Ockene JK, Parker LM, Perri MG, Phillips L, Prentice RL, Robbins J, Rossouw JE, Sarto GE, Schatz IJ, Snetselaar LG, Stevens VJ, Tinker LF, Trevisan M, Vitolins MZ, Anderson GL, Assaf AR, Bassford T, Beresford SA, Black HR, Brunner RL, Brzyski RG, Caan B, Chlebowski RT, Gass M, Granek I, Greenland P, Hays J, Heber D, Heiss G, Hendrix SL, Hubbell FA, Johnson KC, Kotchen JM. Low-fat dietary pattern and risk of cardiovascular disease: the Women's Health Initiative Randomized Controlled Dietary Modification Trial. *JAMA*. 2006;8;295:655-66

Hsueh WC, Mitchell BD, Hixson JE, Rainwater DL. Effects of the ApoE polymorphism on plasma lipoproteins in Mexican Americans. *Ann Epidemiol* 2000;10:524-531

<http://hapmap.org>

Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ, Colditz G, Liu S, Solomon CG, Willett WC. Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. *N Engl J Med* 2001;345:790-797.

Hu FB, Sigal RJ, Rich-Edwards JW, Colditz GA, Solomon CG, Willett WC, Speizer FE, Manson JE. Walking compared with vigorous physical activity and risk of type 2 diabetes in women: a prospective study. *JAMA* 1999;282:1433-1439

Hu FB, Stampfer MJ, Manson JE, Rimm E, Colditz GA, Rosner BA, Hennekens CH, Willett WC. Dietary fat intake and the risk of coronary heart disease in women. *N Engl J Med* 1997;337:1491-1499.

Hu FB, Stampfer MJ, Manson JE, Rimm EB, Colditz GA, Rosner BA, Speizer FE, Hennekens CH, Willett WC. Frequent nut consumption and risk of coronary heart disease in women: prospective cohort study. *Br Med J* 1998;317:1341-1345.

Huang ZY, Guo HW, Xu ZH, Xue K. Association of gene polymorphism at cholesterol ester transfer protein locus with obesity and response to dietary intervention in obesity. *Wei Sheng Yan Jiu* 2006;35:447-449

Humbert R, Adler DA, Disteché CM, Hassett C, Omiecinski CJ, Furlong CE. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat Genet.*, 1993;3:73-76

Humphries SE, Gable D, Cooper JA, Ireland H, Stephens JW, Hurel SJ, Li KW, Palmén J, Miller MA, Cappuccio FP, Elkeles R, Godsland I, Miller GJ, Talmud PJ. Common variants in the TCF7L2 gene and predisposition to type 2 diabetes in UK European Whites, Indian Asians and Afro-Caribbean men and women. *J Mol Med* 2006;84:1-10

Humphries SE, Luong LA, Ogg MS, Hawe E, Miller GJ. The interleukin-6 – 174G/C promoter polymorphism is associated with risk of coronary heart disease and systolic blood pressure in healthy men. *Eur Heart J* 2001;22:2243-52.(a)

Humphries SE, Nicaud V, Margalef J, Tiret L, Talmud PJ. Lipoprotein lipase gene variation is associated with a paternal history of premature coronary artery disease and fasting and postprandial plasma triglycerides: the European Atherosclerosis Research Study (EARS). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:526-534

Humphries SE, Talmud PJ, Hawe E, Bolla M, Day INM, Miller GJ. ApoE4 increases the risk of coronary heart disease in middle-aged men who smoke: Second Northwick Park Heart Study. *Lancet* 2001;358:115–9.(b)

Hunnicutt JW, Hardy RW, Williford J, McDonald JM. Saturated fatty acid-induced insulin resistance in rat adipocytes. *Diabetes*. 1994;43:540-5.

Hunter DJ. Gene-environment interactions in human diseases. *Nat Rev Genet*. 2005;6:287-98.

Hwang SJ, Ballantyne CM, Sharrett AR, Smith LC, Davis CE, Gotto AM Jr, Boerwinkle E. Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Circulation*. 1997;96:4219-25.

Iglseider B, Oberkofler H, Felder TK, Klein K, Tregouet DA, Patsch W. Associations of PPARGC1A haplotypes with plaque score but not with intima-media thickness of carotid arteries in middle-aged subjects. *Stroke* 2006;37:2260–2265.

Imazu M, Yamamoto H, Toyofuku M, Watanabe T, Okubo M, Egusa G, et al. Association of apolipoprotein E phenotype with hypertension in Japanese-Americans: data from the Hawaii-Los Angeles-Hiroshima Study. *Hypertens Res* 2001;24:523-529.

Inaba T, Gotoda T, Shimano H, Shimada M, Harada K, Kozaki K, Watanabe Y, Hoh E, Motoyoshi K, Yazaki Y, Yamada N. Platelet-derived growth factor induces c-fms and scavenger receptor genes in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1992;267:13107-13112.

Inamoto N, Katsuya T, Kokubo Y, Mannami T, Asai T, Baba S, Ogata J, Tomoike H, Ogihara T. Association of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism with carotid atherosclerosis depending on smoking status in a Japanese general population. *Stroke* 2003;34:1628–1633.

Inazu A, Nishimura Y, Terada Y, Mabuchi H. Effects of hepatic lipase gene promoter nucleotide variations on serum HDL cholesterol concentration in the general Japanese population. *J Hum Genet* 2001;46:172–177

Informe de una Consulta Mixta de Expertos OMS/FAO: Dieta, Nutrición y Prevención de Enfermedades Crónicas. Ginebra. 2003.

Informe sobre la salud en el mundo 2002: Reducir los riesgos y promover una vida sana. Ginebra: Organización Mundial de la Salud, 2002.

Iniesta R, Guinó E, Moreno V. Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gac Sanit* 2005;19:333-41.

Inoue N, Kawashima S, Kanazawa K, Yamada S, Akita H, Yokoyama M. Polymorphism of the NADH/NADPH Oxidase p22 phox Gene in Patients With Coronary Artery Disease *Circulation*. 1998;97:135-137.

Isaacs A, Aulchenko YS, Hofman A, Sijbrands EJ, Sayed-Tabatabaei FA, Klungel OH, Maitland-van der Zee AH, Stricker BH, Oostra BA, Witteman JC, van Duijn CM. Epistatic effect of cholesteryl ester transfer protein and hepatic lipase on serum high-density lipoprotein cholesterol levels. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92:2680-7.

Isaacs A, Sayed-Tabatabaei FA, Njajou OT, Witteman JC, van Duijn CM. The -514 C>T hepatic lipase promoter region polymorphism and plasma lipids: a meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:3858-63.

Isbir T, Yilmaz H, Bihorac A, Akoglu E. Mild-to-moderate hypertension and apolipoprotein E gene polymorphism. *Am J Hypertens* 1997;10:827-828.

Ishida T, Tanaka K. Effects of fibrin and fibrinogen degradation products on the growth of rabbit aortic smooth muscle cells in culture. *Atherosclerosis* 1982;44:161-174.

Ishihara J, Todoriki H, Inoue M, Tsugane S; JPHC FFQ Validation Study Group. Validity of a self-administered food-frequency questionnaire in the estimation of amino acid intake. *Br J Nutr* 2009;101:1393-1399.

Jablonski KA, McAteer JB, de Bakker PI, Franks PW, Pollin TI, Hanson RL, Saxena R, Fowler S, Shuldiner AR, Knowler WC, Altshuler D, Florez JC; Diabetes Prevention Program Research Group. Common variants in 40 genes assessed for diabetes incidence and response to metformin and lifestyle intervention in the diabetes prevention program. *Diabetes.* 2010;59:2672-81.

Jacobs DR Jr, Adachi H, Mulder I, Kromhout D, Menotti A, Nissinen A, Blackburn H. Cigarette smoking and mortality risk: twenty-five-year follow-up of the Seven Countries Study. *Arch Intern Med* 1999;159:733-40.

Jacobs DR Jr, Anderson JT, Hannan P, Keys A., Blackburn H.. Variability in individual serum cholesterol response to change in diet. *Arteriosclerosis* 1983;3:349-356.

Jacobsson JA, Risérus U, Axelsson T, Lannfelt L, Schiöth HB, Fredriksson R. The common FTO variant rs9939609 is not associated with BMI in a longitudinal study on a cohort of Swedish men born 1920-1924. *BMC Med Genet.* 2009;9:10-131.

James RW, Boemi M, Giansanti R, Fumelli P, Pometta D. Underexpression of the apolipoprotein E4 isoform in an Italian population. *Arterioscler Thromb* 1993;13:1456-1459

James RW, Leviev I, Righetti A. Smoking is associated with reduced serum paraoxonase activity and concentration in coronary artery disease patients. *Circulation* 2000;101:2252-2257

Jansen H, Verhoeven AJ, Sijbrands EJ. Hepatic lipase: a pro- or anti-atherogenic protein? *J Lipid Res.* 2002;43:1352-62.

Jansen H., Verhoeven AJ, Weeks L, Kastelein JJ, Halley DJ, van den Ouweland A, Jukema JW, Seidell JC, Birkenhager JC. Common C-to-T substitution at position -480 of the hepatic lipase promoter associated with a lowered lipase activity in coronary artery disease patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2837-2842.

Jeenah M, Kessling A, Miller N, Humphries SE. G to A substitution in the promoter region of the apolipoprotein AI gene is associated with elevated serum apolipoprotein AI and high density lipoprotein cholesterol concentrations. *Mol. Biol. Med.* 1990;7:233-41.

Jelenik T, Rossmeisl M, Kuda O, Jilkova ZM, Medrikova D, Kus V, Hensler M, Janovska P, Miksik I, Baranowski M, Gorski J, Hébrard S, Jensen TE, Flachs P, Hawley S, Viollet B, Kopecky J. AMP-activated protein kinase $\alpha 2$ subunit is required for the preservation of hepatic insulin sensitivity by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Diabetes.* 2010;59:2737-46.

Jemaa R, Elasmı M, Naouali C, Feki M, Kallel A, Souissi M, Sanhaji H, Hadj Taïeb S, Souheil O, Kaabachi N. Apolipoprotein E polymorphism in the Tunisian population: frequency and effect on lipid parameters. *Clin Biochem* 2006;39:816-820.

Jemaa R, Tuzet S, Portos C, Betoulle D, Apfelbaum M, Fumeron F. Lipoprotein lipase gene polymorphisms: associations with hypertriglyceridemia and body mass index in obese people. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1995;19:270-274

Jensen MK, Mukamal KJ, Overvad K, Rimm EB. Alcohol consumption, TaqIB polymorphism of cholesteryl ester transfer protein, high-density lipoprotein cholesterol, and risk of coronary heart disease in men and women. *Eur Heart J* 2008;29:104-12.

Jerrard-Dunne P, Sitzer M, Risley P, Steckel DA, Buehler A, von Kegler S, Markus HS; Carotid Atherosclerosis Progression Study. Interleukin-6 promoter polymorphism modulates the effects of heavy alcohol consumption on early carotid artery atherosclerosis: the Carotid Atherosclerosis Progression Study (CAPS). *Stroke* 2003;34:402-7.

Ji J, Herbison CE, Mamotte CD, Burke V, Taylor RR, van Bockxmeer FM. Hepatic lipase gene -514 C/T polymorphism and premature coronary heart disease. *J Cardiovasc Risk* 2002; 9:105-113.

Jiang R, Jacobs DR Jr, Mayer-Davis E, Szklo M, Herrington D, Jenny NS, Kronmal R, Barr RG. Nut and seed consumption and inflammatory markers in the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Am J Epidemiol.* 2006;163:222-31.

Jiang R, Manson JE, Stampfer MJ, Liu S, Willett WC, Hu FB. Nut and peanut butter consumption and risk of type 2 diabetes in women. *JAMA.* 2002;288:2554-60.

Jiang XC, Moulin P, Quinet E, Goldberg IJ, Yacoub LK, Agellon LB, Compton D, Schnitzer-Polokoff R, Tall AR. Mammalian adipose tissue and muscle are major sources of lipid transfer proteına mRNA. *J Biol Chem* 1991;266:4631-4639.

Jiménez LG, Martín-Moreno JM. Cuestionario de frecuencia de consumo alimentario. In: *Nutrici3n y Salud P3blica – M3todos, bases cientıficas y aplicaciones*, ed. LI Serra, J Aranceta, pp. 120-125 Espa1a: MASSON, 2006.

Jin T, Liu L. The Wnt signaling pathway effector TCF7L2 and type 2 diabetes mellitus. *Mol Endocrinol.* 2008;22:2383-92.

Johansson I, Hallmans G, Wikman A, Biessy C, Riboli E, Kaaks R. Validation and calibration of food-frequency questionnaire measurements in the Northern Sweden Health and Disease cohort. *Public Health Nutr* 2002; 5:487-96.

Jonason T, Bergstrom R. Cessation of smoking in patients with intermittent claudication. Effects on the risk of peripheral vascular complications, myocardial infarction and mortality. *Acta Med Scand.* 1987;221:253-60.

Jones A, Geczy CL. Thrombin and factor Xa enhance the production of interleukin-1. *Immunology* 1990;71:236-241.

Jones PJH, Pappu AS, Hatcher L, Li ZC, Illingworth DR, Connor WE. Dietary cholesterol feeding suppresses human cholesterol synthesis measured by deuterium incorporation and urinary mevalonic acid levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16:1222-8.

Jousilahti P, Vartiainen E, Tuomilehto J, Puska P. Sex, age, cardiovascular risk factors, and coronary heart disease: a prospective follow-up study of 14,786 middle-aged men and women in Finland. *Circulation* 1999;99:1165-72.

Jung SH, Park HS, Kim KS, Choi WH, Ahn CW, Kim BT, Kim SM, Lee SY, Ahn SM, Kim YK, Kim HJ, Kim DJ, Lee KW. Effect of weight loss on some serum cytokines in human obesity: increase in IL-10 after weight loss. *J Nutr Biochem* 2008;19:371-375.

Juo SH, Han Z, Smith JD, Colangelo L, Liu K. Promoter polymorphisms of hepatic lipase gene influence HDL(2) but not HDL(3) in African American men: CARDIA study. *J Lipid Res* 2001;42:258-264.

Juo SH, Wyszynski DF, Beaty TH, Huang HY, Bailey-Wilson JE. Mild association between the A/G polymorphism in the promoter of the apolipoprotein A-I gene and apolipoprotein A-I levels: a metaanalysis. *Am J Med Genet* 1999;82:235-41.

Kadish JL, Butterfield CE, Folkman J. The effects of fibrin on cultured vascular endothelial cells. *Tissue Cell* 1979;33:130-135.

Kahara T, Takamura T, Hayakawa T, Nagai Y, Yamaguchi H, Katsuki T, Katsuki K, Katsuki M, Kobayashi K. PPARgamma gene polymorphism is associated with exercise-mediated changes of insulin resistance in healthy men. *Metabolism*. 2003;52:209-12.

Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab*. 2005;1:15-25.

Kakko S, Kelloniemi J, von Rohr P, Hoeschele I, Tamminen M, Brousseau ME, Kesäniemi YA, Savolainen MJ. ATP-binding cassette transporter A1 locus is not a major determinant of HDL-C levels in a population at high risk for coronary heart disease. *Atherosclerosis* 2003;166:285-90.

Kallio P, Kolehmainen M, Laaksonen DE, Kekäläinen J, Salopuro T, Sivenius K, Pulkkinen L, Mykkänen HM, Niskanen L, Uusitupa M, Poutanen KS. Dietary carbohydrate modification induces alterations in gene expression in abdominal subcutaneous adipose tissue in persons with the metabolic syndrome: the FUNGENUT Study. *Am J Clin Nutr* 2007;85:1417-27.

Kamboh MI, Aston CE, Ferrell RE, Hamman RF. Impact of apolipoprotein E polymorphism in determining interindividual variation in total cholesterol and low density lipoprotein cholesterol in Hispanics and non-Hispanic whites. *Atherosclerosis*. 1993;98:201-11.

Kamboh MI, Sepehnia B, Ferrell RE. Common polymorphism of apolipoprotein E in blacks. *Dis Markers* 1989;7:49-55

Kang SS, Wong PW, Zhou JM, Sora J, Lessick M, Ruggie N, Grcevich G. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase in patients with coronary artery disease. *Metabolism* 1988;37:611-13.

Kannel WB, Castelli WP, Gordon T. Cholesterol in the prediction of atherosclerotic disease. New perspectives based on the Framingham Study. *Ann Intern Med*. 1979;90:85-91.

Kannel Wb. Blood pressure as a cardiovascular risk factor :prevention and treatment. *JAMA* 1996;275:1571-6.

Kaplan M, Hayek T, Raz A, Coleman R, Dornfeld L, Vaya J, Aviram M. Pomegranate juice supplementation to atherosclerotic mice reduces macrophage lipid peroxidation, cellular cholesterol accumulation and development of atherosclerosis. *J. Nutr.* 2001;131:2082–2089

Kaplan NM. The deadly quartet an the insulin resistance syndrom: an historical overview. *Hypertens Res* 1996;19:S9-S11

Karathanasis SK. Apolipoprotein multigene family: tandem organization of human apolipoprotein A-I, C-III and AIV genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1985;82:6374–78

Kardia SL, Modell SM, Peyser PA. Family-centered approaches to understanding and preventing coronary heart disease. *Am J Prev Med.* 2003;24:143-51.

Karvonen J, Kauma H, Kervinen K, Ukkola O, Rantala M, Päivänsalo M, Savolainen MJ, Kesäniemi YA. Apolipoprotein E polymorphism affects carotid artery atherosclerosis in smoking hypertensive men. *J Hypertens* 2002;20:2371-8.

Katan MB, Beynen AC, de Vries JH, Nobels A.. Existence of consistent hypo- and hyperresponders to dietary cholesterol in man. *Am J Epidemiol.* 1986;123:221–234.

Katan MB, Grundy SM, Willett WC. Should a low-fat, high-carbohydrate diet be recommended for everyone? Beyond low-fat diets. *N Engl J Med.* 1997;337:563–566.

Katan MB, Zock PL, Mensink RP. Trans fatty acids and their effects on lipoproteins in humans. *Annu Rev Nutr.* 1995;15:473-93.

Kataoka S, Robbins DC, Cowan LD, Go O, Yeh JL, Devereux RB, Fabsitz RR, Lee ET, Welty TK, Howard BV. Apolipoprotein E polymorphism in American Indians and its relation to plasma lipoproteins and diabetes. *The Strong Heart Study. Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:918-925

Katerina H, Michaela S, Michal V, Helena S, Jana Z, Jaroslav H, Richard C. Interaction of common sequence variants and selected risk factors in determination of HDL cholesterol levels. *Clin Biochem.* 2010;43:754-8.

Kathiresan S, Willer CJ, Peloso GM, et al. Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia. *Nat Genet.* 2009;41:56-65.

Keaney JF. Atherosclerosis: From lesion formation to plaque activation and endothelial dysfunction. *Mol Aspects Med* 2000;21:99-166.

Kern Pa, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G. Adipose tissue tumor necrosis factor and IL-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;280:E745-E751.

Kern PA. Potential role of TNF α and lipoprotein lipase as candidate genes for obesity. *J Nutr* 1997;127:1917S-1922S.

Keshavarz P, Inoue H, Nakamura N, Yoshikawa T, Tanahashi T, Itakura M. Single nucleotide polymorphisms in genes encoding LKB1 (STK11), TORC2 (CRTC2) and AMPK α 2-subunit (PRKAA2) and risk of type 2 diabetes. *Mol Genet Metab.* 2008;93:200-9.

Keys A, Menotti A, Aravanis C, Blackburn H, Djordjevic BS, Buzina R, Dontas AS, Fidanza F, Karvonen MJ, Kimura N. The Seven Countries Study: 2,289 deaths in 15 years. *Prev Med.* 1984;13:141-54.

Keys A, Menotti A, Karvonen MJ, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Djordjevic BS, Dontas AS, Fidanza F, Keys MH. The diet and the 15-year death rate in the Seven Countries Study. *Am J Epidemiol* 1986;124:903-915.

Keys A. Atherosclerosis: a problem in newer Public Health. *J Mt Sinai Hosp.* 1953;20:118-39.

Kinlay S, Libby P, Ganz P. Endothelial function and coronary artery disease. *Curr Opin Lipidol.* 2001;12:383-9.

Kipnis V, Subar AF, Midthune D, Freedman LS, Ballard-Barbash R, Troiano RP, Bingham S, Schoeller DA, Schatzkin A, Carroll RJ. Structure of dietary measurement error: results of the OPEN biomarker study. *Am J Epidemiol* 2003;158:14-21.

Kirstein M, Brett J, Radoff S, Ogawa S, Stern D, Vlassara H. Advanced protein glycosylation induces transendothelial human monocyte chemotaxis and secretion of platelet-derived growth factor: role in vascular disease of diabetes and aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:9010-9014.

Kitjaroentham A, Hananantachai H, Tungtrongchitr A, Pooudong S, Tungtrongchitr R. R219K polymorphism of ATP binding cassette transporter A1 related with low HDL in overweight/obese Thai males. *Arch Med Res.* 2007;38:834-8.

Klag MJ, Ford DE, Mead LA, He J, Whelton PK, Liang KY, Levine DM. Serum cholesterol in young men and subsequent cardiovascular disease. *N Engl J Med.* 1993;328:313-8.

Klerk M, Verhoef P, Clarke R, Blom HJ, Kok FJ, Schouten EG. MTHFR studies collaboration group. MTHFR 677C>T polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis. *JAMA* 2002;288:2023-2031

Klimov AN, Gurevich VS, Nikiforova AA, Shatilina LV, Kuzmin AA, Plavinsky SL, Teryukova NP. Antioxidative activity of high density lipoproteins in vivo. *Atherosclerosis* 1993;100:13-18.

Klipstein-Grobusch K, den Breeijen JH, Goldbohm RA, Geleijnse JM, Hofman A, Grobbee DE, Witteman JC. Dietary assessment in the elderly: validation of a semiquantitative food frequency questionnaire. *Eur J Clin Nutr* 1998;52:588-596.

Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, Boers GH, Frosst P, Stevens EM, van Oost BA, den Heijer M, Trijbels FJ, Rozen R, Blom HJ. Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease. *Am J Hum Genet.* 1996;58:35-41.

Knoops KT, de Groot LC, Kromhout D, Perrin AE, Moreiras-Varela O, Menotti A, van Staveren WA. Mediterranean diet, lifestyle factors, and 10-year mortality in elderly European men and women: the HALE project. *JAMA.* 2004;292:1433-9.

Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, Nathan DM; Diabetes Prevention Program Research Group. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med.* 2002;346:393-403.

Ko YL, Hsu LA, Hsu KH, Ko YH, Lee YS. The interactive effects of hepatic lipase gene promoter polymorphisms with sex and obesity on high-density-lipoprotein cholesterol levels in Taiwanese-Chinese. *Atherosclerosis*. 2004;172:135-42.

Kodama T, Freeman M, Rohrer L, Zabrecky J, Matsudaira P, Krieger M. Type I macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils. *Nature* 1990;343:531-535.

Kohsaka S, Volcik KA, Folsom AR, Wu KK, Ballantyne CM, Willerson JT, Boerwinkle E. Increased risk of incident stroke associated with the cyclooxygenase 2 (COX-2) G-765C polymorphism in African-Americans: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Atherosclerosis*. 2008;196:926-30.

Kondo I, Berg K, Drayna D, Lawn R. DNA polymorphism at the locus for human cholesteryl ester transfer protein (CETP) is associated with high density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein levels. *Clin Genet*. 1989;35:49-56.

Kong C, Nimmo L, Elatrozy T, Anyaoku V, Hughes C, Robinson S, Richmond W, Elkeles RS. Smoking is associated with increased hepatic lipase activity, insulin resistance, dyslipidaemia and early atherosclerosis in Type 2 diabetes. *Atherosclerosis*. 2001;156:373-378.

König A, Bouzan C, Cohen JT, Connor WE, Kris-Etherton PM, Gray GM, Lawrence RS, Savitz DA, Teutsch SM. A quantitative analysis of fish consumption and coronary heart disease mortality. *Am J Prev Med*. 2005;29:335-46.

Kopecky J, Rossmeisl M, Flachs P, Kuda O, Brauner P, Jilkova Z, Stankova B, Tvrzicka E, Bryhn M. n-3 PUFA: bioavailability and modulation of adipose tissue function. *Proc Nutr Soc*. 2009;68:361-9.

Kranzhofer R, Schmidt J, Pfeiffer CA, Hagl S, Libby P, Kubler W. Angiotensin induces inflammatory activation of human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1623-9.

Krauss RM, Eckel RH, Howard B, Appel LJ, Daniels SR, Deckelbaum RJ, Erdman JW Jr, Kris-Etherton P, Goldberg IJ, Kotchen TA, Lichtenstein AH, Mitch WE, Mullis R, Robinson K, Wylie-Rosett J, St Jeor S, Suttie J, Tribble DL, Bazzarre TL. AHA Dietary Guidelines: revision 2000: a statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the American Heart Association. *Circulation* 2000;102:2284-99.

Krieger M, Herz J. Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: Macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu Rev Biochem* 1994;63:601-637.

Kris-Etherton PM, Zhao G, Binkoski AE, Coval SM, Etherton TD. The effect of nuts on coronary heart disease risk. *Nutr Rev* 2001;59:103-111.

Kris-Etherton PM, for the Nutrition Committee. AHA Science Advisory. Monounsaturated fatty acids and risk of cardiovascular disease. *Circulation* 1999;100:1253-1258.

Kromhout D, Coulander CDL. Diet, prevalence and 10-year mortality from coronary heart disease in 871 middle-aged men: the Zutphen Study. *Am J Epidemiol* 1984;119:733-741.

Kuivenhoven JA, Groenemeyer BE, Boer JM, Reymer PW, Berghuis R, Bruin T, Jansen H, Seidell JC, Kastelein JJ. Ser447stop mutation in lipoprotein lipase is associated with elevated HDL cholesterol levels in normolipidemic males. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:595-599.

Kujala UM, Kaprio J, Sarna S, Koskenvuo M. Relationship of leisure- time physical activity and mortality: The Finnish twin cohort. *JAMA*. 1998;279:440-4.

Kuller LH, Tracy RP, Shaten J, Meilahn EN. Relation of C-reactive protein and coronary heart disease in the MRFIT nested case-control study. Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Am J Epidemiol* 1996;144:537-47.

Kunej T, Globocnik Petrovic M, Dovc P, Peterlin B, Petrovic D. A Gly482Ser polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 (PGC-1) gene is associated with type 2 diabetes in Caucasians. *Folia Biol (Praha)*. 2004;50:157-8.

Kushi LH, Folsom AR, Prineas RJ, Mink PJ, Wu Y, Bostick RM. Dietary antioxidant vitamins and death from coronary heart disease in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1996;334:1156-1162.

Kushner I, Rzewnicki D, Samols D. What does minor elevation of C-reactive protein signify? *Am J Med* 2006;119:166, e17-28.

Laaksonen DE, Niskanen L, Nyyssönen K, Punnonen K, Tuomainen TP, Valkonen VP, Salonen R, Salonen JT. C-reactive protein and the development of the metabolic syndrome and diabetes in middle-aged men. *Diabetologia* 2004;47:1403-10.

Labarrere CA, Zaloga GP. C-reactive protein: from innocent bystander to pivotal mediator of atherosclerosis. *Am J Med* 2004;117:499-507.

Lacquemant C, Chikri M, Boutin P, Samson C, Froguel P. No association between the G482S polymorphism of the proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 (PGC-1) gene and Type II diabetes in French Caucasians. *Diabetologia* 2002;45:602-3.

Lahoz C, Mostaza JM. La aterosclerosis como enfermedad sistémica. *Rev Esp Cardiol*. 2007;60:184-95.

Lahoz C, Peña R, Mostaza Jm. Lípidos, Dieta Mediterránea Y Enfermedad Coronaria. *Cardiovasc Risk Factors* 2000; 9:303-309.

Lama More RA, Alonso Franch A, Gil-Campos M, Leis Trabazo R, Martínez Suárez V, Moráis López A, Moreno Villares JM, Pedrón Giner MC; Comité de Nutrición de la AEP. Obesidad Infantil. Recomendaciones del Comité de Nutrición de la Asociación Española de Pediatría. Parte I. Prevención. Detección precoz. Papel del pediatra. *An Pediatr (Barc)*. 2006;65:607-15.

Lambrinoudaki I, Kaparos G, Papadimitriou D, Sergentanis TN, Creatsa M, Alexandrou A, Logothetis E, Christodoulakos G, Kouskouni E. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism is associated with central adiposity and increased androgenicity in healthy postmenopausal women. *Eur J Endocrinol*. 2008;159:233-41.

LaMonte MJ, Barlow CE, Jurca R, Kampert JB, Church TS, Blair SN. Cardiorespiratory fitness is inversely associated with the incidence of metabolic syndrome: a prospective study of men and women. *Circulation*. 2005;112:505-12.

Larsen LF, Jespersen J, Marckmann P. Are olive oil diets antithrombotic? Diets enriched with either olive, rapeseed or sunflower oil affect postprandial factor VII differently. *Am J Clin Nutr* 1999;70:976-982.

- Lau DCW, Dhillon B, Yan H, Szmitko PE, Verma S. Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288: H2031-41.
- Lavedrine F, Zimou D, Ravel A, Balducci F, Alary J. Blood cholesterol and walnut consumption: a cross-sectional survey in France. *Prev Med* 1999;28:33-9.
- Lavi S, Prasad A, Yang EH, Mathew V, Simari RD, Rihal CS, Lerman LO, Lerman A. Smoking is associated with epicardial coronary endothelial dysfunction and elevated white blood cell count in patients with chest pain and early coronary artery disease. *Circulation*. 2007;115:2621-7.
- Law MR, Wald NJ, Thompson SG. By how much and how quickly does reduction in serum cholesterol concentration lower risk of ischemic heart disease. *BMJ*. 1994;308:367-72.
- Lawlor DA, Day IN, Gaunt TR, Hinks LJ, Briggs PJ, Kiessling M, Timpson N, Smith GD, Ebrahim S. The association of the PON1 Q192R polymorphism with coronary heart disease: findings from the British Women's Heart and Health cohort study and a meta-analysis. *BMC Genet*. 2004;5:17.
- Leatham EW, Bath PMW, Tose JA, Camm AJ. Increased monocyte tissue factor expression in coronary disease. *Br Heart J* 1995;73:10-3.
- Lebovitz HE. Insulin resistance: a common link between type 2 diabetes and cardiovascular disease. *Diabetes Obes Metab*. 2006;8:237-49.
- Lederle FA, Nelson DB, Joseph AM. Smokers' relative risk for aortic aneurysm compared with other smoking-related diseases: a systematic review. *J Vasc Surg*. 2003;38:329-34.
- Lee CD, Folsom AR, Blair SN. Physical activity and stroke risk: a meta-analysis. *Stroke*. 2003;34:2475-81
- Lee HJ, Kim IK, Kang JH, Ahn Y, Han BG, Lee JY, Song J. Effects of common FTO gene variants associated with BMI on dietary intake and physical activity in Koreans. *Clin Chim Acta*. 2010 11;411:1716-22.
- Lee IM., Skerrett PJ. Physical activity and all-cause mortality: what is the dose-response relation? *Med. Sci. Sports Exerc*. 2001;33:S459-S471.
- Lee J, Tan CS, Chia KS, Tan CE, Chew SK, Ordovas JM, Tai ES. The lipoprotein lipase S447X polymorphism and plasma lipids: interactions with APOE polymorphisms, smoking, and alcohol consumption. *J Lipid Res* 2004;45:1132-9.
- Lefevre M, Champagne CM, Tulley RT, Rood JC, Most MM. Individual variability in cardiovascular disease risk factor responses to low-fat and low-saturated-fat diets in men: body mass index, adiposity, and insulin resistance predict changes in LDL cholesterol. *Am J Clin Nutr* 2005;82:957-63
- Leon AS, Rice T, Mandel S, Després JP, Bergeron J, Gagnon J, Rao DC, Skinner JS, Wilmore JH, Bouchard C. Blood lipid response to 20 weeks of supervised exercise in a large biracial population: the HERITAGE Family Study. *Metabolism*. 2000;49:513-520.
- Leon AS, Sanchez O. Meta-analysis of the effects of aerobic exercise training on blood lipids. *Circulation*. 2001;104:II-414-II-415.

Letellier C, Durou MR, Jouanolle AM, Le Gall JY, Poirier JY, Ruelland A. Serum paraoxonase activity and paraoxonase gene polymorphism in type 2 diabetic patients with or without vascular complications. *Diabetes Metab.* 2002;28:297-304

Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R. Agespecific relevance of usual blood pressure to vascular mortality. *Lancet.* 2002;360:1903-13.

Lewis SJ, Ebrahim S, Davey Smith G. Meta-analysis of MTHFR 677C>T polymorphism and coronary heart disease: does totality of evidence support causal role for homocysteine and preventive potential of folate? *BMJ.* 2005;5:331-1053.

Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr, Lippy P. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit endothelium. *Arterioscler Thromb* 1993;13:197-204.

Li S, Chen W, Srinivasan SR, Boerwinkle E, Berenson GS. Influence of lipoprotein lipase gene Ser447Stop and beta1-adrenergic receptor gene Arg389Gly polymorphisms and their interaction on obesity from childhood to adulthood: the Bogalusa Heart Study. *Int J Obes (Lond).* 2006;30:1183-8.

Li TY, Zhang C, Asselbergs FW, Qi L, Rimm E, Hunter DJ, Hu FB. Interaction between dietary fat intake and the cholesterol ester transfer protein TaqIB polymorphism in relation to HDL-cholesterol concentrations among US diabetic men. *Am J Clin Nutr.* 2007;86:1524-9.

Li X, Du Y, Du Y, Huang X. Association of apolipoprotein E gene polymorphism with essential hypertension and its complications. *Clin Exp Med* 2003;2:175-179.

Libby P, Ridker P, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002;105:1135-43.(a)

Libby P, Simon DI. Inflammation and thrombosis: the clot thickens. *Circulation* 2001;103:1718-20.

Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420:868-74.(b)

Lichtenstein AH, Ausman LM, Jalbert SM, Vilella-Bach M, Jauhiainen M, McGladdery S, Erkkila AT, Ehnholm C, Frohlich J, Schaefer EJ. Efficacy of a Therapeutic Lifestyle Change/Step 2 diet in moderately hypercholesterolemic middle-aged and elderly female and male subjects. *J Lipid Res.* 2002;43:264-273.

Lieb W, Pavlik R, Erdmann J, Mayer B, Holmer SR, Fischer M, Baessler A, Hengstenberg C, Loewel H, Doering A, Riegger GA, Schunkert H. . No association of interleukin-6 gene polymorphism (-174 G/C) with myocardial infarction or traditional cardiovascular risk factors. *Int J Cardiol.* 2004;97:205-12.

Lind L. Circulating markers of inflammation and atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2003;169:203-214.

Lindi V, Schwab U, Louheranta A, Laakso M, Vessby B, Hermansen K, Storlien L, Riccardi G, A Rivellese A; KANWU Study Group. Impact of the Pro12Ala polymorphism of the PPAR-gamma2 gene on serum triacylglycerol response to n-3 fatty acid supplementation. *Mol Genet Metab.* 2003;79:52-60.

Linton MF, Fazio S. National Cholesterol Education Program (NCEP)- the third Adult Treatment Panel (ATP III). A practical approach to risk assessment to prevent coronary artery disease and its complications. *Am J Cardiol.* 2003;92:19i-26i.

Liotta LA, Goldfarb RH, Brundage R, Siegal GP, Terranova V, Garbisa S. Effect of plasminogen activator (urokinase), plasmin, and thrombin on glycoprotein and collagenous components of basement membrane. *Cancer Res* 1981;41:4.629-4.636.

Little J, Khoury MJ, Bradley L, Clyne M, Gwinn M, Lin B, Lindegren ML, Yoon P. The human genome project is complete. How do we develop a handle for the pump? *Am J Epidemiol* 2003;157:667-73.

Liu RH. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *Am J Clin Nutr.* 2003;78:517S-520S.

Liu S, Manson JE, Lee IM, Cole SR, Hennekens CH, Willett WC, Buring JE. Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease: the Women's Health Study. *Am J Clin Nutr.* 2000;72:922-8.

Liu S, Schmitz C, Stampfer MJ, et al. prospective study of TaqIB polymorphism in the gene coding for cholesteryl ester transfer protein and risk of myocardial infarction in middle-aged men. *Atherosclerosis.* 2002;161:469-74.

Liu Y, Wan Q, Guan Q, Gao L, Zhao J. High-fat diet feeding impairs both the expression and activity of AMPKa in rats' skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;339:701-7.

Llisterri JL, Rodríguez G, Alonso FJ, Lou S, División JA, Santos JA. Control de la presión arterial en la población hipertensa española atendida en atención primaria. Estudio PRESCAP 2002. *Med Clin (Barc)* 2004;122:165-71.

Lock K, Pomerleau J, Causer L, Altmann DR, McKee M. The global burden of disease attributable to low consumption of fruit and vegetables: implications for the global strategy on diet. *Bull World Health Organ.* 2005;83:100-8.

Lohmueller KE, Pearce CL, Pike M, Lander ES, Hirschhorn JN. Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nat Genet* 2003;33:177-82.

Loos RJ, Franks PW, Francis RW, Barroso I, Gribble FM, Savage DB, Ong KK, O'Rahilly S, Wareham NJ. TCF7L2 polymorphisms modulate proinsulin levels and β -cell function in a British European population. *Diabetes* 2007;56:1943-1947.

Lopez-Miranda J, Ordovas JM, Espino A, Marin C, Salas J, Lopez-Segura F, Jimenez-Perez J, Perez-Jimenez F. Influence of mutation in human apolipoprotein A-1 gene promoter on plasma LDL cholesterol response to dietary fat. *Lancet* 1994;343:1246-9.

Lopez-Ridaura R, Willett WC, Rimm EB, Liu S, Stampfer MJ, Manson JE, Hu FB. Magnesium intake and risk of type 2 diabetes in men and women. *Diabetes Care.* 2004;27:134-40.

Lorente-Cebrián S, Bustos M, Marti A, Martinez JA, Moreno-Aliaga MJ. Eicosapentaenoic acid stimulates AMP-activated protein kinase and increases visfatin secretion in cultured murine adipocytes. *Clin Sci (Lond).* 2009;117:243-9.

Loscalzo J, Weinfeld M, Fless GM, Scanu A. Lipoprotein(a), fibrin binding, and plasminogen activation. *Arteriosclerosis* 1990;10:240-245.

Loscalzo J. The relation between atherosclerosis and thrombosis. *Circulation* 1992;86:95-99.

Louhija J, Miettinen HE, Kontula K, Tikkanen MJ, Miettinen TA, Tilvis RS. Aging and genetic variation of plasma apolipoproteins: relative loss of the apolipoprotein E4 phenotype in centenarians. *Arterioscler Thromb* 1994;14:1084–9.

Lowe GD, Rumley A, McMahon AD, Ford I, O'Reilly DS, Packard CJ. Interleukin-6, fibrin D-dimer, and coagulation factors VII and XIIIa in prediction of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:1529–1534.

Lu H, Inazu A, Moriyama Y, Higashikata T, Kawashiri MA, Yu W, Huang Z, Okamura T, Mabuchi H. Haplotype analyses of cholesteryl ester transfer protein gene promoter: a clue to an unsolved mystery of TaqIB polymorphism. *J Mol Med*. 2003;81:246-55.

Luan J, Browne PO, Harding AH, Halsall DJ, O'Rahilly S, Chatterjee VK, Wareham. Evidence for genenutrient interaction at the PPARgamma locus. *Diabetes* 2001;50:686-689.

Luc G, Arveiler D, Evans A, Amouyel P, Ferrieres J, Bard JM, Elkhailil L, Fruchart JC, Ducimetiere P; PRIME Study Group. Circulating soluble adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 and incident coronary heart disease: the PRIME Study. *Atherosclerosis*. 2003;170:169–76.

Luc G, Bard JM, Arveiler D. Impact of apolipoprotein E polymorphism on lipoproteins and risk of myocardial infarction:the ECTIM Study. *Arterioscler Thromb* 1994;14: 1412–1419

Lucotte G, Loirat F, Hazout S. Pattern of gradient of apolipoprotein E allele *4 frequencies in western Europe. *Hum Biol* 1997;69(2):253-262

Ludovico O, Pellegrini F, Di Paola R, Minenna A, Mastroianno S, Cardellini M, Marini MA, Andreozzi F, Vaccaro O, Sesti G, Trischitta V. Heterogeneous effect of peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 Ala12 variant on type 2 diabetes risk. *Obesity (Silver Spring)*. 2007;15:1076-81.

Ludwig DS. The glycemic index: physiological mechanisms relating to obesity, diabetes, and cardiovascular disease. *JAMA*. 2002;287:2414-23.

Lum H, Roebuck KA. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001; 280: C719-C741.

Lundberg JO, Feelisch M, Björne H, Jansson EA, Weitzberg E. Cardioprotective effects of vegetables: is nitrate the answer? *Nitric Oxide*. 2006;15:359-62.

Lund-Kats S, Wehrli S, Zaiou M, Newhouse Y, Weisgraber KH, Phillips MC. Effect of polymorphism on the microenvironment of the LDL receptor binding region of human apo E. *J Lipid Res* 2001;42:894-901

Lusis AJ, Weinreb A, Drake TA. Genetics of atherosclerosis. Topol EJ, editor. *Textbook of cardiovascular medicine*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1998;2389-496.

Lyssenko V, Lupi R, Marchetti P, Del Guerra S, Orho-Melander M, Almgren P, Sjögren M, Ling C, Eriksson KF, Lethagen AL, Mancarella R, Berglund G, Tuomi T, Nilsson P, Del Prato S, Groop L. Mechanisms by which common variants in the TCF7L2 gene increase risk of type 2 diabetes. *J Clin Invest*. 2007;117:2155-63.

- Lyssenko V, Jonsson A, Almgren P, Pulizzi N, Isomaa B, Tuomi T. Clinical risk factors, DNA variants, and the development of type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2008; 20;359:2220-32.
- Ma J, Stampfer MJ, Hennekens CH, Frosst P, Selhub J, Horsford J, Malinow MR, Willett WC, Rozen R. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, plasma folate, homocysteine, and risk of myocardial infarction in U.S. Physicians. *Circulation* 1996;94:2410–16.
- Ma Y, Thomas GNM., Critchley J, Cockram C, Chan J Tomlinson, B. Association of two apolipoprotein A-I gene MspI polymorphisms with high density lipoprotein (HDL)- cholesterol levels and indices of obesity in selected healthy Chinese subjects and in patients with early-onset type 2 diabetes. *Clinical Endocrinology*, 2003;59:442–449.
- Mackenbach JP. The Mediterranean diet story illustrates that “why” questions are as important as “how” questions in disease explanation. *J. Clin. Epidemiol.* 2007;60:105–109.
- Mackness B, Davies GK, Turkie W, Lee E, Roberts DH, Hill E, Roberts C, Durrington PN, Mackness MI. Paraoxonase status in coronary heart disease: are activity and concentration more important than genotype? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:1451-7
- Mackness B, Durrington PN, Mackness MI. Polymorphisms of paraoxonase genes and low-density lipoprotein lipid peroxidation. *Lancet.* 1999;353:468-9.
- Mackness M, Boullier A, Hennuyer N, Mackness B, Hall M, Tailleux A, Duriez P, Delfly B, Durrington P, Fruchart JC, Duverger N, Caillaud JM, Castro G. Paraoxonase activity is reduced by a pro-atherosclerotic diet in rabbits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000;269,232–236
- Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett.* 1991;286:152-4.
- Madamanchi NR, Runge MS. Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. *Circ Res*, 2007;100:460–73
- Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:29-38.
- Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC Jr, Weisgraber KH. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res* 1984;25:1277-1294.
- Mahley RW, Rall SC Jr. Type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia): the role of apolipoprotein E in normal and abnormal lipoprotein metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The metabolic and molecular bases of inherited disease.* New York: McGraw-Hill, 1995:1953–80.
- Majors A, Ehrhart LA, Pezacka EH. Homocysteine as a risk factor for vascular disease: enhanced collagen production and accumulation by smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2074-81.
- Malik I, Danesh J, Whincup P, Bhatia V, Papacosta O, Walker M, Lennon L, Thomson A, Haskard D. Soluble adhesion molecules and prediction of coronary heart disease: a prospective study and metaanalysis. *Lancet.* 2001;358:971-6.

Malik VS, Hu FB. Popular weight-loss diets: from evidence to practice. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2007;4:34-41.

Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G, Grassi G, Heagerty AM, Kjeldsen SE, Laurent S, Narkiewicz K, Ruilope L, Rynkiewicz A, Schmieder RE, Boudier HA, Zanchetti A. 2007 Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens* 2007;25:1105 – 1187.

Mancini M, Stamler J. Diet for preventing cardiovascular diseases: light from Ancel Keys, distinguished centenarian scientist. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2004;14:52-7.

Manson JE, Greenland P, LaCroix AZ, Stefanick ML, Mouton CP, Oberman A, Perri MG, Sheps DS, Pettinger MB, Siscovick DS. Walking compared with vigorous exercise for the prevention of cardiovascular events in women. *New Engl. J. Med* 2002;347:716–725.

Manson JE, Hu FB, Rich-Edwards JW, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Speizer FE, Hennekens CH. A prospective study of walking as compared with vigorous exercise in the prevention of coronary heart disease in women. *N Engl J Med.* 1999;341:650-8.

Marcus BH, Albrecht AE, King TK, Parisi AF, Pinto BM, Roberts M, Niaura RS, Abrams DB. The efficacy of exercise as an aid for smoking cessation in women: a randomized controlled trial. *Arch Intern Med.* 1999;159:1229–1234

Marfella R, Esposito K, Giunta R, Coppola G, De Angelis L, Farzati B, Paolisso G, Giugliano D. Circulating adhesion molecules in humans: role of hyperglycemia and hyperinsulinemia. *Circulation* 2000;101:2247-2251.

Márquez-Sandoval F, Bulló M, Vizmanos B, Casas-Agustench P, Salas-Salvadó J. Un patrón de alimentación saludable: la dieta Mediterránea tradicional. *Antropo* 2008;16:11-22

Martí A, Moreno-Aliaga MJ, Ochoa MC, Marrades P, Santos JL, Martínez JA. Genética de la obesidad en humanos: rumbos de investigación. *Rev Esp Obes* 2004;2:351-362.

Martínez-González J, Llorente-Cortes V, Badimon L. Biología celular y molecular de las lesiones ateroscleróticas. *Rev Esp Cardiol* 2001;54:218-31.

Martínez-González MA, Sánchez-Villegas A. The emerging role of Mediterranean diets in cardiovascular epidemiology: monounsaturated fats, olive oil, red wine or the whole pattern? *Eur J Epidemiol.* 2004;19:9-13.(a)

Martínez-González MA, Fernández-Jarne E, Serrano-Martínez M, Wright M, Gomez-Gracia E. Development of a short dietary intake questionnaire for the quantitative estimation of adherence to a cardioprotective Mediterranean diet. *Eur J Clin Nutr.* 2004;58:1550-2.(b)

Martin-Moreno JM, Boyle P, Gorgojo L, Maisonneuve P, Fernandez-Rodriguez JC, Salvini S, Willett WC. Development and validation of a food frequency questionnaire in Spain. *Int J Epidemiol.* 1993;22:512-9.

Masana L, Cabré P, Solà R. Importancia de los frutos secos. Revisión y aportaciones españolas a su estudio. *Clin Invest Arteriosclerosis* 2000;12:27-30.

Massiéra F, Bloch-Faure M, Ceiler D, Murakami K, Fukamizu A, Gasc JM, Quignard-Boulangé A, Negrel R, Ailhaud G, Seydoux J, Meneton P, Teboul M. Adipose angiotensinogen is involved in adipose tissue growth and blood pressure regulation. *FASEB J* 2001;15:2727–2729.

Masson LF, McNeill G, Avenell A. Genetic variation and the lipid response to dietary intervention: a systematic review. *Am J Clin Nutr.* 2003;77:1098-111.

Mata P, De Oya M, Pérez-Jiménez F, Ros E. Dieta Y Enfermedades Cardiovasculares. Recomendaciones De La Sociedad Española De Arteriosclerosis. *Clin Invest Arterioscler* 1994;6:43-61

Mata P, Lopez-Miranda J, Pocovi M, Alonso R, Lahoz C, Marin C, Garces C, Cenarro A, Perez-Jimenez F, de Oya M, Ordovas JM. Human apolipoprotein A-I gene promoter mutation influences plasma low-density lipoprotein cholesterol response to dietary fat saturation. *Atherosclerosis* 1998;137:367–76.

Mataix J. Tablas De Composición De Alimentos. [Food Composition Tables]. 4th Ed. Granada, Spain: Univ Of Granada; 2003.

Mathews CK, van Holde KE, Ahern KG. *Biochemistry*. San Francisco, CA: Addison Wesley Longman, Inc.2000.

Matsunaga A, Sasaki J, Han H, Huang W, Kugi M, Koga T, Ichiki S, Shinkawa T, Arakawa K. Compound heterozygosity for an apolipoprotein A1 gene promoter mutation and a structural nonsense mutation with apolipoprotein A1 deficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:348–55.

Mayosi BM, Avery PJ, Baker M, Gaukrodger N, Imrie H, Green FR, Farrall M, Watkins H, Keavney B. Genotype at the -174G/C polymorphism of the interleukin-6 gene is associated with common carotid artery intimal-medial thickness: family study and meta-analysis. *Stroke*.2005;36:2215–9.

McCaskie PA, Beilby JP, Chapman CM, Hung J, McQuillan BM, Thompson PL, Palmer LJ. Cholesteryl ester transfer protein gene haplotypes, plasma high-density lipoprotein levels and the risk of coronary heart disease. *Hum Genet.* 2007;121:401-11.

McManus K, Antinoro L, Sacks F. A randomized controlled trial of a moderate-fat, low-energy diet compared with a low fat, low-energy diet for weight loss in overweight adults. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2001;25:1503-11.

McNamara DJ, Kolb R, Parker TS, Batwin H, Samuel P, Brown CD, Ahrens EH Jr. Heterogeneity of cholesterol homeostasis in man: response to changes in dietary fat quality and cholesterol quantity. *J Clin Invest.* 1987;79:1729-39.

McNaughton SA, Hughes MC, Marks GC. Validation of a FFQ to estimate the intake of PUFA using plasma phospholipid fatty acids and weighed foods records. *Br J Nutr* 2007;97:561–568.

Mead JR, Cryer A, Ramji DP. Lipoprotein lipase, a key role in atherosclerosis? *FEBS Lett.* 2000;462:1–6.

Medrano MJ, Cerrato E, Boix R, Delgado-Rodríguez M. Factores de riesgo cardiovascular en la población española: metaanálisis de estudios transversales. *Med Clin (Barc).* 2005;124:606-12.

Meirhaeghe A, Fajas L, Helbecque N, Cottel D, Auwerx J, Deeb SS, Amouyel P. Impact of the Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma2 Pro12Ala polymorphism on adiposity, lipids and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000;24:195-199

Melzer D, Murray A, Hurst AJ, Weedon MN, Bandinelli S, Corsi AM, Ferrucci L, Paolisso G, Guralnik JM, Frayling TM. Effects of the diabetes linked TCF7L2 polymorphism in a representative older population. *BMC Med*. 2006;20:4-34.

Mendez MA, Popkin BM, Jakszyn P, Berenguer A, Tormo MJ, Sánchez MJ, Quirós JR, Pera G, Navarro C, Martínez C, Larrañaga N, Dorransoro M, Chirlaque MD, Barricarte A, Ardanaz E, Amiano P, Agudo A, González CA. Adherence to a Mediterranean diet is associated with reduced 3-year incidence of obesity. *J Nutr* 2006;136:2934-8.

Meng QH, Pajukanta P, Valsta L, Aro A, Pietinen P, Tikkanen MJ. Influence of apolipoprotein A-1 promoter polymorphism on lipid levels and responses to dietary change in Finnish adults. *J Intern Med* 1997;241:373-8.

Mensink RP, Katan MB. Effect of dietary fatty acids on serum lipids and lipoproteins. A meta-analysis of 27 trials. *Arterioscler Thromb*. 1992;12:911-9

Mensink RP, Zock PL, Kester AD, Katan MB. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *Am J Clin Nutr*. 2003;77:1146-55.

Miltioudou G, Hatzivassiliou M, Liberopoulos E, Bairaktari E, Tselepis A, Cariolou M, Elisaf M. Gene polymorphisms affecting HDL-cholesterol levels in the normolipidemic population. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2005;15:219-224

Ministerio de Sanidad y Consumo. Encuesta Nacional de Salud de España 2006. Disponible en <http://www.msc.es/esdaEstudios/estadisticas/encuestaNacional/encuesta2006.htm>

Minnich A, DeLangavant G, Lavigne J, Roederer G, Lussier-Cacan S, Davignon J. G→A substitution at position -75 of the apolipoprotein A-I gene promoter—evidence against a direct effect on HDL cholesterol levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1740-5.

Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, Kim YB, Lee A, Xue B, Mu J, Fougère F, Ferré P, Birnbaum MJ, Stuck BJ, Kahn BB. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 2004;428:569-574.

Miranda N, Tovar AR, Palacios B, Torres N. La AMPK como sensor de energía celular y su función en el organismo. *Rev Invest Clin* 2007;59:458-469

Mirmiran P, Noori N, Zavareh MB, Azizi F. Fruit and vegetable consumption and risk factors for cardiovascular disease. *Metabolism*. 2009;58:460-8.

Miró-Casas E, Covas Mi, Fitó M, Farré-Albadalejo M, Marrugat J, De La Torre R. Tyrosol And Hydroxytyrosol Are Absorbed From Moderate And Sustained Doses Of Virgin Olive Oil In Humans. *Eur J Clin Nutr*. 2003;57:186-90

Misra MK, Sarwat M, Bhakuni P, Tuteja R, Tuteja N. Oxidative stress and ischemic myocardial syndromes. *Med Sci Monit* 2009;15:209-219.

Mitchell JA, Larkin SW, Williams TJ. Cyclo-oxygenase-2: regulation and relevance in inflammation. *Biochem Pharmacol.* 1995;50:1535–1542.

Mitrou PN, Kipnis V, Thiébaud AC, Reedy J, Subar AF, Wirfält E, Flood A, Mouw T, Hollenbeck AR, Leitzmann MF, Schatzkin A. Mediterranean dietary pattern and prediction of all-cause mortality in a US population: results from the NIH-AARP Diet and Health Study. *Arch Intern Med.* 2007;167:2461-8.

Molag ML, de Vries JH, Ocké MC, Dagnelie PC, van den Brandt PA, Jansen MC, van Staveren WA, van't Veer P. Design characteristics of food frequency questionnaires in relation to their validity. *Am J Epidemiol* 2007;166:1468–1478.

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-142.

Mora S, Cook N, Buring JE, Ridker PM, Lee IM. Physical activity and reduced risk of cardiovascular events: potential mediating mechanisms. *Circulation.* 2007;116:2110-8.

Morcillo S, Cardona F, Rojo-Martínez G, Almaraz MC, Esteva I, Ruiz-De-Adana MS, Olveira G, García-Fuentes E, Gómez-Zumaquero JM, Soriguer F. Effect of the combination of the variants -75G/A APOA1 and Trp64Arg ADRB3 on the risk of type 2 diabetes (DM2). *Clin Endocrinol (Oxf).* 2008;68:102-7.

Morcillo S, Rojo-Martínez G, Cardona F, Almaraz Mde L, de Adana Mde L, Esteva I, Cardona I, Soriguer F. Effect of the interaction between the fatty acid binding protein 2 gene Ala54Thr polymorphism and dietary fatty acids on peripheral insulin sensitivity: a crosssectional study. *Am J Clin Nutr.* 2007;86:1232-7.

Moreiras O, Carbajal A, Cabrera L. *Tablas de Composición de Alimentos (Food Composition Tables)*. Madrid: Ediciones Pirámide, S.A. 2005.

Moreno MU, San José G, Fortuño A, Beloqui O, Díez J, Zalba G. The C242T CYBA polymorphism of NADPH oxidase is associated with essential hypertension. *J Hypertens.* 2006;24:1299-306.

Moreno PR, Fuster V. The year in atherothrombosis. *JACC* 2004;11:2099-110.

Mori H, Ikegami H, Kawaguchi Y, Seino S, Yokoi N, Takeda J, Inoue I, Seino Y, Yasuda K, Hanafusa T, Yamagata K, Awata T, Kadowaki T, Hara K, Yamada N, Gotoda T, Iwasaki N, Iwamoto Y, Sanke T, Nanjo K, Oka Y, Matsutani A, Maeda E, Kasuga M. The Pro12Ala substitution in PPAR-gamma is associated with resistance to development of diabetes in the general population: possible involvement in impairment of insulin secretion in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes* 2001;50:891-894

Morrow JD, Frei B, Longmire AW, Gaziano JM, Lynch SM, Shyr Y, Strauss WE, Oates JA, Roberts LJ 2nd. Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage. *N Engl J Med.* 1995;332:1198-203

Morrow JD, Frei B, Longmire AW, Gaziano JM, Lynch SM, Shyr Y, Strauss WE, Oates JA, Roberts LJ II. Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage. *N Engl J Med* 1995; 332: 1198–203.

Motti C, Dessí M, Gnasso A, Irace C, Indigeno P, Angelucci CB, Bernardini S, Fucci G, Federici G, Cortese C. A multiplex PCR-based DNA assay for the detection of paraoxonase gene cluster polymorphisms. *Atherosclerosis* 2001;158:35–40.

Mozaffarian D, Willett WC. Trans fatty acids and cardiovascular risk: A unique cardiometabolic imprint? *Curr Atheroscler Rep.* 2007;9:486-93.

Mukherjee M, Shetty KR. Variations in high-density lipoprotein cholesterol in relation to physical activity and Taq 1B polymorphism of the cholesteryl ester transfer protein gene. *Clin Genet.* 2004;65:412-8

Muller YL, Bogardus C, Pedersen O, Baier L. A Gly482ser missense mutation in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 is associated with altered lipid oxidation and early insulin secretion in Pima Indians. *Diabetes* 2003;52:895–898

Mulvihill N, Foley B, Crean P, Walsh M. Prediction of cardiovascular risk using soluble cell adhesion molecules. *Eur Heart J.* 2002;23:1569 –74.

Mulvihill NT, Foley JB, Murphy RT, Curtin R, Crean PA, Walsh M. Risk stratification in unstable angina and non-Q wave myocardial infarction using soluble cell adhesion molecules. *Heart.* 2001;85:623–7.

Muñiz P, Valls V, Perez-Broseta C, Iradi A, Climent JV, Oliva MR, Saez GT. The role of 8-hydroxy - 2'-deoxyguanosine in rifamycin-induced DNA damage. *Free Radic Biol Med* 1995;18:747–755.

Murakami K, Okubo H, Sasaki S. Effect of dietary factors on incidence of type 2 diabetes: a systematic review of cohort studies. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2005;51:292-310.

Muros M, Rodríguez-Ferrer C. Apolipoprotein E polymorphism influence on lipids, apolipoproteins and Lp(a) in a Spanish population underexpressing apo E4. *Atherosclerosis* 1996;121:13-21

Myers J, Kaykha A, George S, Abella J, Zaheer N, Lear S, Yamazaki T, Froelicher V. Fitness versus physical activity patterns in predicting mortality in men. *Am J Med.* 2004;117:912-8.

Mysliwska J, Wieckiewicz J, Hak L, Siebert J, Rogowski J, Szyndler K, Mysliwski A. Interleukin 6 polymorphism corresponds to the number of severely stenosed coronary arteries. *Eur Cytokine Netw.* 2006;17:181–8.

Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J, Badimon JJ, Stefanadis C, Moreno P, Pasterkamp G, Fayad Z, Stone PH, Waxman S, Raggi P, Madjid M, Zarrabi A, Burke A, Yuan C, Fitzgerald PJ, Siscovick DS, de Korte CL, Aikawa M, Airaksinen KE, Assmann G, Becker CR, Chesebro JH, Farb A, Galis ZS, Jackson C, Jang IK, Koenig W, Lodder RA, March K, Demirovic J, Navab M, Priori SG, Rekhater MD, Bahr R, Grundy SM, Mehran R, Colombo A, Boerwinkle E, Ballantyne C, Insull W Jr, Schwartz RS, Vogel R, Serruys PW, Hansson GK, Faxon DP, Kaul S, Drexler H, Greenland P, Muller JE, Virmani R, Ridker PM, Zipes DP, Shah PK, Willerson JT. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part II. *Circulation* 2003;108:1772-8.

Nakano T, Matsunaga S, Nagata A, Maruyama T. NAD(P)H oxidase p22phox Gene C242T polymorphism and lipoprotein oxidation. *Clin Chim Acta.* 2003;335:101-7.

Nakashima Y, Raines EW, Plump AS, Breslow JL, Ross R. Upregulation of vCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:842-851.

Natarajan P, Ray KK, Cannon CP. High-density lipoprotein and coronary heart disease: current and future therapies. *J Am Coll Cardiol.* 2010;55:1283-99.

Nauck M, Winkelmann BR, Hoffmann MM, Bohm BO, Wieland H, Marz W. The interleukin-6 G(-174)C promoter polymorphism in the LURIC cohort: no association with plasma interleukin-6, coronary artery disease, and myocardial infarction. *J Mol Med.* 2002;80:507-13.

Navab M, Berliner JA, Subbanagounder G, Hama S, Lusis AJ, Castellani LW, Reddy S, Shih D, Shi W, Watson AD, Van Lenten BJ, Vora D, Fogelman AM. HDL and the inflammatory response induced by LDL-derived oxidized phospholipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:481-488.

Navarro-López F. Bases Genéticas De La Enfermedad Coronaria. *Rev Esp Cardiol* 2002;55:413-31

Neal B, MacMahon S, Chapman N. Effects of ACE inhibitors, calcium antagonists, and other blood-pressure-lowering drugs. *Lancet.* 2000;356:1955-64.

Neeli H, Rader DJ. Cholesteryl ester transfer protein (CETP) inhibitors: is there life after torcetrapib? *Cardiol Clin.* 2008;26:537-46.

Nelson ME, Rejeski WJ, Blair SN, Duncan PW, Judge JO, King AC, Macera CA, Castaneda-Sceppa C. Physical Activity and Public Health in Older Adults. Recommendation from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Circulation.* 2007;116:1094-105.

Nelson TL, Fingerlin TE, Moss LK, Barmada MM, Ferrell RE, Norris JM. Association of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene with type 2 diabetes mellitus varies by physical activity among non-Hispanic whites from Colorado. *Metabolism.* 2007;56:388-93.(a)

Nelson TL, Fingerlin TE, Moss L, Barmada MM, Ferrell RE, Norris JM. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha gene (PGC-1alpha) is not associated with type 2 diabetes mellitus or body mass index among Hispanic and non Hispanic Whites from Colorado. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2007;115:268-75.(b)

Nestle M. Mediterranean diets: historical and research overview. *Am J Clin Nutr.* 1995;61:1313S-1320S.

Nettleton JA, Katz R. n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in type 2 diabetes: a review. *J Am Diet Assoc.* 2005;105:428-40.

Niemiec P, Zak I, Wita K. The 242t Variant Of The Cyba Gene Polymorphism Increases The Risk Of Coronary Artery Disease Associated With Cigarette Smoking And Hypercholesterolemia. *Coron Artery Dis.* 2007;18:339-46.

Nikitin AG, Chistiakov DA, Minushkina LO, Zateyshchikov DA, Nosikov VV. Association of the CYBA, PPARGC1A, PPARG3, and PPARD gene variants with coronary artery disease and metabolic risk factors of coronary atherosclerosis in a Russian population. *Heart Vessels.* 2010;25:229-36.

Niu W, Guo X, Su Y, Qiu C. Apolipoprotein E and lowdensity lipoprotein receptor gene polymorphisms in dyslipidemias-associated essential hypertension. *J Hum Hypertens* 2007;21:337-339.

Niu W, Qi Y, Qian Y, Gao P, Zhu D. The relationship between apolipoprotein E epsilon2/epsilon3/epsilon4 polymorphisms and hypertension: a meta-analysis of six studies comprising 1812 cases and 1762 controls. *Hypertens Res.* 2009;32:1060-6.

Nofer JR, van der Giet M, Tölle M, Wolinska I, von Wnuck Lipinski K, Baba HA, Tietge UJ, Gödecke A, Ishii I, Kleuser B, Schäfers M, Fobker M, Zidek W, Assmann G, Chun J, Levkau B. HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. *J Clin Invest* 2004;113:569–581.

Noone E, Roche HM, Black I, Tully AM, Gibney MJ. Effect of postprandial lipaemia and Taq1B polymorphism of the cholesteryl ester transfer protein (CETP) gene on CETPmass, activity, associated lipoproteins and plasma lipids. *Br J Nutr* 2000;84:203-209

Nordskog BK, Blixt AD, Morgan WT, Fields WR, Hellmann GM. Matrix-degrading and pro-inflammatory changes in human vascular endothelial cells exposed to cigarette smoke condensate. *Cardiovasc Toxicol* 2003;3:101-17.

Nouira S, Arfa I, Kammoun I, Abid A, Ouragini H, Dorboz I, Ghazouani W, Fadhel SB, Zorgati MM, Ammar SB, Blousa-Chabchoub S, Kachboura S, Abdelhak S. Identification of two novel variants in PRKAG2 gene in Tunisian type 2 diabetic patients with family history of cardiovascular disease. *Diabetes Res Clin Pract.* 2010;87:e7-10.

Obarzanek E, Kimm SY, Barton BA, Van Horn L, Kwiterovich PO Jr, Simons-Morton DG, Hunsberger SA, Lasser NL, Robson AM, Franklin FA Jr, Lauer RM, Stevens VJ, Friedman LA, Dorgan JF, Greenlick MR. Long-term safety and efficacy of a cholesterol-lowering diet in children with elevated low-density lipoprotein cholesterol: Seven-year results of the Dietary Intervention Study in Children (DISC). *Pediatrics.* 2001;107:256-264.

Oberkofler H, Holzl B, Esterbauer H, Xie M, Iglseeder B, Krempler F, Paulweber B, Patsch W. Peroxisome proliferator-activated receptorgamma coactivator-1 gene locus: associations with hypertension in middle-aged men. *Hypertension* 2003;41:368–372.

Ochoa MC, Martí A, Azcona C, Chueca M, Oyarzábal M, Pelach R, Patiño A, Moreno-Aliaga MJ, Martínez-González MA, Martínez JA; Grupo de Estudio Navarro de Obesidad Infantil (GENOI). Gene-gene interaction between PPARgamma 2 and ADR beta 3 increases obesity risk in children and adolescents. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004;28:37-41.(a)

Ochoa MC, Martí A, Martínez JA. Estudios sobre la obesidad en genes candidatos. *Med Clin (Barc)* 2004;122:542-551(b).

Oda MN, Bielicki JK, Ho TT, Berger T, Rubin EM, Forte TM. Paraonase 1 overexpression in mice and its effect on highdensity lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;290:921-7.

O'Donnell CJ, Ridker PM, Glynn RJ, Berger K, Ajani U, Manson JE, Hennekens CH. Hypertension and borderline isolated systolic hypertension increase risks of cardiovascular disease and mortality in male physicians. *Circulation.* 1997;95:1132-7.

Ogawa K, Tsubono Y, Nishino Y, Watanabe Y, Ohkubo T, Watanabe T, Nakatsuka H, Takahashi N, Kawamura M, Tsuji I, Hisamichi S. Validation of a food frequency questionnaire for cohort studies in rural Japan. *Public Health Nutr* 2003;6:147-57.

Oh W, Abu-Elheiga L, Kordari P, Gu Z, Shaikenov T, Chirala SS, Wakil SJ. Glucose and fat metabolism in adipose tissue of acetyl-CoA carboxylase 2 knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:1384-9.

Oja P. Dose response between total volumen of physical activity and health and fitness. *Med Sci Sports Exerc*. 2001;33:S452-3.

Oram JF, Lawn RM. ABCA1: The gatekeeper for eliminating excess tissue cholesterol. *J Lipid Res* 2001;42:1173-9.

Orbe J, Beloqui O, Rodriguez JA, Belzunce MS, Roncal C, Paramo JA. Protective effect of the G-765C COX-2 polymorphism on subclinical atherosclerosis and inflammatory markers in asymptomatic subjects with cardiovascular risk factors. *Clin Chim Acta*. 2006;368:138-43.

Ordovas JM, Corella D, Cupples LA, Demissie S, Kelleher A, Coltell O, Wilson PW, Schaefer EJ, Tucker K. PUFA modulate the effects of the APOA1 G-A polymorphism on HDL-C in a sex-specific manner: the Framingham Study. *Am J Clin Nutr* 2002;75: 38-46.(a)

Ordovas JM, Corella D, Demissie S, Cupples LA, Couture P, Coltell O, Wilson PW, Schaefer EJ, Tucker KL. Dietary fat intake determines the effect of a common polymorphism in the hepatic lipase gene promoter on HDL lipoprotein metabolism: evidence of a strong dose effect in this gene-nutrient interaction in the Framingham Study. *Circulation* 2002 29;106:2315-21.(b)

Ordovas JM, Corella D. Genes, diet and plasma lipids: the evidence from observational studies. *World Rev Nutr Diet* 2004; 93: 41-76.(a)

Ordovas JM, Cupples LA, Corella D, Otvos JD, Osgood D, Martinez A, Lahoz C, Coltell O, Wilson PW, Schaefer EJ. Association of Cholesteryl Ester Transfer Protein-TaqIB polymorphism with variations in lipoprotein subclasses and coronary heart disease risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1323-1329.

Ordovas JM, Kaput J, Corella D. Nutrition in the genomics era: Cardiovascular disease risk and the Mediterranean diet. *Mol Nutr Food Res*. 2007;51:1293-1299.

Ordovas JM, Lopez-Miranda J, Mata P, Perez-Jimenez F, Lichtenstein AH, Schaefer EJ. Gene-diet interaction in determining plasma lipid response to dietary intervention. *Atherosclerosis* 1995;118:S11-27.

Ordovas JM, Mooser V. Nutrigenomics and nutrigenetics. *Curr Opin Lipidol* 2004;15:101-108. (c)

Ordovas JM, Peterson JP, Santaniello P, Cohn JS, Wilson PW, Schaefer EJ. Enzyme linked immunosorbent assay for human apolipoprotein B. *J Lipid Res* 1987;28:1216-1224.

Ordovas JM. Interacciones entre genes y entorno y factores de riesgo cardiovascular. *Rev Esp Cardiol Supl*. 2009;9:39B-51B

Ordovas JM. Nutrigenetics, plasma lipids, and cardiovascular risk. *J Am Diet Assoc*. 2006;106:1074-1081.

- Ordovas JM, Corella D. Nutritional genomics. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2004; 5:71–118.(b)
- Organización Mundial de la Salud (OMS)/World Health Organisation (WHO). Preparation and use of food-based dietary guidelines. WHO Technical Report Series 880, WHO Geneva 1998.
- Organización Mundial de la Salud (OMS)/World Health Organisation (WHO). Diabetes programme. Facts and figures. WHO European Region, 2000. Available from: http://www.who.int/diabetes/facts/world_figures/en/index4.html
- Organización Mundial de la Salud (OMS)/World Health Organisation (WHO). International Statistical Classification of Disease and Related Health Problems 10th Revision (ICD-10). Version for 2007.
- Organización Mundial de la Salud (OMS)/World Health Organisation (WHO). Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation on obesity. Geneva: World Health Organization, 1998:1-276
- Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the Polymerase Chain Reaction. *Genomics* 1989;5:874-879
- Ostgren CJ, Lindblad U, Melander O, Melander A, Groop L, Råstam L. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma P12Ala polymorphism and the association with blood pressure in type 2 diabetes: Skaraborg Hypertension and Diabetes Project. *J Hypertens.* 2003;21:1657-1662.
- Otarod JK, Goldberg IJ. Lipoprotein lipase and its role in regulation of plasma lipoproteins and cardiac risk. *Curr Atheroscler Rep.* 2004;6:335–342.
- Pablos-Méndez A, Mayeux R, Ngai C, Shea S, Berglund L. Association of Apo E polymorphism with plasma lipid levels in a multiethnic elderly population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:3534-3541
- Packard CJ, Shepherd J. Lipoprotein heterogeneity and apolipoprotein B metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:3542-3556.
- Paffenbarger RS Jr, Hyde RT, Wing AL, Lee IM, Jung DL, Kampert JB. The association of changes in physical-activity level and other lifestyle characteristics with mortality among men. *N Engl J Med.* 1993;328:538-45.
- Pagani F, Giudici GA, Baralle FE, Vergani C. Association of a polymorphism in the apoA-I gene promoter with hyperalphalipoproteinemia. *Eur. J. Epidemiol.* 1992;8:54–58
- Pagani F, Sidoli A, Giudici GA, Barenghi L, Vergani C, Baralle FE. Human apolipoprotein A-I gene promoter polymorphism: association with hyperalphalipoproteinemia. *J Lipid Res* 1990;31:1371–7.
- Paik IY, Jin CH, Jin HE, Kim YI, Cho SY, Roh HT, Suh AR, Suh SH. Effects of the NADPH oxidase p22phox C242T polymorphism on endurance exercise performance and oxidative DNA damage in response to aerobic exercise training. *Mol Cells.* 2009;27:557-62.
- Palma Gámiz JL. La diabetes mellitus entendida como una enfermedad cardiovascular de origen metabólico. *Rev Esp Cardiol Supl.* 2007;7:12H-19H

Palou A, Bonet ML, Pico C, Rodriguez AM. Nutrigenómica y obesidad. *Rev Med Univ Navarra* 2004;48:36-48.

Panagiotakos DB, Pitsavos C, Stefanadis C. Dietary patterns: A Mediterranean diet score and its relation to clinical and biological markers of cardiovascular disease risk. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2006;16:559–68.

Panagiotakos DB, Pitsavos C, Zampelas A, Chrysohoou C, Griffin BA, Stefanadis C, Toutouzas P. Fish consumption and the risk of developing acute coronary syndromes: the CARDIO2000 study. *Int J Cardiol*. 2005;102:403-9.

Panagiotakos DB, Tzima N, Pitsavos C, Chrysohoou C, Zampelas A, Toussoulis D, Stefanadis C. The association between adherence to the Mediterranean diet and fasting indices of glucose homeostasis: The ATTICA Study. *J Am Coll Nutr*. 2007;26:32–8.

Papadopoulou S, Edlund H. Attenuated Wnt signaling perturbs pancreatic growth but not pancreatic function. *Diabetes* 2005;54:2844-2851

Papafili A, Hill MR, Brull DJ, McAnulty RJ, Marshall RP, Humphries SE, Laurent GJ. A common promoter variant in cyclooxygenase-2 represses gene expression: evidence for a role in the acute phase inflammatory response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1631–6.

Parikh H, Groop L. Candidate genes for type 2 diabetes. *Rev Endocr Metab Disord* 2004;5:151-76.

Pasceri V, Willerson JT, Yeh ETH. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation* 2000;102:2165-8.

Pate RR, Davis MG, Robinson TN, Stone EJ, McKenzie TL, Young JC. Promoting physical activity in children and youth. A leadership role for schools. A scientific statement from the American Heart Association Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism (Physical Activity Committee) in collaboration with the Councils on Cardiovascular Disease in the Young and Cardiovascular Nursing Promoting Physical Activity in Children and Youth. *Circulation*. 2006;114:1214-24.

Pate RR, Pratt M, Blair SN, Haskell WL, Macera CA, Bouchard C, Buchner D, Ettinger W, Heath GW, King AC. Physical activity and public health: a recommendation from the Centers for Disease Control and Prevention and the American College of Sports Medicine. *JAMA*. 1995;273:402–407.

Pearson TA. Alcohol and heart disease. *Circulation* 1996;94:3023–5.

Peeters A, Beckers S, Verrijken A, Roevens P, Peeters P, Van Gaal L, Van Hul W. Variants in the FTO gene are associated with common obesity in the Belgian population. *Mol Genet Metab*. 2008;93:481-4.

Perdomo G, Commerford SR, Richard AM, Adams SH, Corkey BE, O'Doherty RM, Brown NF. Increased beta-oxidation in muscle cells enhances insulin-stimulated glucose metabolism and protects against fatty acid-induced insulin resistance despite intramyocellular lipid accumulation. *J Biol Chem*. 2004;279:27177-86.

Pérez-Martínez P, López-Miranda J, Cruz-Teno C, Delgado-Lista J, Jiménez-Gómez Y, Fernández JM, Gómez MJ, Marín C, Pérez-Jiménez F, Ordovás JM. Adiponectin gene variants are associated with insulin sensitivity in response to dietary fat consumption in Caucasian men. *J Nutr*. 2008;138:1609-14.

Pérez-Martínez P, Pérez-Jiménez F, Ordovás JM, Moreno JA, Moreno R, Fuentes F, Ruano J, Gómez P, Marín C, López-Miranda J. The APOB -516C/T polymorphism is associated with differences in insulin sensitivity in healthy males during the consumption of diets with different fat content. *Br J Nutr.* 2007;97:622-7.

Perugini C, Bagnati M, Cau C, Bordone R, Zoppis E, Paffoni P, Re R, Albano E, Bellomo G. Distribution of lipid-soluble antioxidants in lipoproteins from healthy subjects I. Correlation with plasma antioxidant levels and composition of lipoproteins. *Pharmacol Res.* 2000; 41:55-65.

Perula de Torres LA, Lluch C, Ruiz R, Espejo J, Tapia G, Mengual P. Prevalencia de actividad física y su relación con variables sociodemográficas y ciertos estilos de vida en escolares cordobeses. *Rev Esp Salud Pública* 1998;72:233-44.

Petersen S, Peto V, Rayner M, Leal J, Luengo-Fernandez R, Gray A. European cardiovascular disease statistics. BHF: London 2005.

Pietinen P, Ascherio A, Korhonen P, Hartman AM, Willett WC, Albanes D, Virtamo J. Intake of fatty acids and risk of coronary heart disease in a cohort of Finnish men: the Alpha Tocopherol, Betacarotene Cancer Preventive Study. *Am J Epidemiol* 1997;145:876-887.

Pihlajamäki J, Karjalainen L, Karhapää P, Vauhkonen I, Taskinen MR, Deeb SS, Laakso M. G -250A Substitution in promoter of hepatic lipase gene is associated with dyslipidemia and insulin resistance in healthy control subjects and in members of families with familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:1789-1795.

Pi-Sunyer X. A clinical view of the obesity problem. *Science.* 2003;299:859-60.

Pitsavos C, Panagiotakos D, Trichopoulou A, Chrysohoou C, Dedoussis G, Chloutsios Y, Choumerianou D, Stefanadis C. Interaction between Mediterranean diet and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation on oxidized low density lipoprotein concentrations: the ATTICA study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2006;16:91-99.

Pitsavos C, Panagiotakos DB, Tzima N, Lentzas Y, Chrysohoou C, Das UN, Stefanadis C. Diet, exercise, and C-reactive protein levels in people with abdominal obesity: The ATTICA epidemiological study. *Angiology.* 2007;58:225-33.

Plan Integral de Cardiopatía Isquémica 2004-2007. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo; 2003.

Plaza Pérez I, Villar Alvarez F, Mata López P, Pérez Jiménez F, Maiquez Galán A, Casasnovas Lenguas JA, Banegas Banegas JR, Tomás Abadal L, Rodríguez Artalejo F, Gil López E. Control of cholesterolemia in Spain, 2000. A tool for cardiovascular prevention. *Rev Esp Cardiol.* 2000;53:815-37.

Polidori MC, Mecocci P, Stahl W, Sies H. Cigarette smoking cessation increases plasma levels of several antioxidant micronutrients and improves resistance towards oxidative stress. *Br J Nutr* 2003;90:147-150.

Polychronopoulos E, Panagiotakos DB, Polystipioti A. Diet, life style factors and hypercholesterolemia in elderly men and women from Cyprus. *Lipids Health Dis.* 2005;6:4:17.

Porchay I, Péan F, Bellili N, Royer B, Cogneau J, Chesnier MC, Caradec A, Tichet J, Balkau B, Marre M, Fumeron F. ABCA1 single nucleotide polymorphisms on high-density lipoprotein-cholesterol and overweight: the D.E.S.I.R. study. *Obesity (Silver Spring)*. 2006;14:1874-9.

Posner BM, Cobb JL, Belanger AJ, Cupples LA, D'Agostino RB, Stokes J 3rd. Dietary lipid predictors of coronary heart disease in men. The Framingham Study. *Arch Intern Med*. 1991;151:1181-7.

Pou KM, Massaro JM, Hoffmann U, Vasan RS, Maurovich-Horvat P, Larson MG, Keaney JF Jr, Meigs JB, Lipinska I, Kathiresan S, Murabito JM, O'Donnell CJ, Benjamin EJ, Fox CS. Visceral and subcutaneous adipose tissue volumes are cross-sectionally related to markers of inflammation and oxidative stress: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2007;116:1234-1241.

Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 2001;286:327-34.

Price DT, Loscalzo J. Cellular adhesion molecules and atherogenesis. *Am J Med*. 1999;107:85-97.

Price JF, Mowbray PI, Lee AJ, Rumley A, Lowe GD, Fowkes FG. Relationship between smoking and cardiovascular risk factors in the development of peripheral arterial disease and coronary artery disease: Edinburgh Artery Study. *Eur Heart J* 1999;20:344-53.

Prochaska JO, DiClemente CC. *The transtheoretical approach: crossing traditional boundaries of change*. Homewood (IL): Dow Jones- Irving, 1983.

Prochazka M, Farook VS, Ossowski V, Wolford JK, Bogardus C. Variant screening of PRKAB2, a type 2 diabetes mellitus susceptibility candidate gene on 1q in Pima Indians. *Mol Cell Probes*. 2002;16:421-7.

Psaltopoulou T, Naska A, Orfanos P, Trichopoulos D, Mountokalakis T, Trichopoulou A. Olive oil, the Mediterranean diet, and arterial blood pressure: the Greek European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Am J Clin Nutr*. 2004;80:1012-8.

Puigserver P, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev* 2003;24:78-90

Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 1998;92:829-839.

Puranik R, Celermajor DS. Smoking and endothelial function. *Prog Cardiovasc Dis* 2003;45:443-58.

Pyorala M, Miettinen H, Halonen P, Laakso M, Pyorala K. Insulin resistance syndrome predicts the risk of coronary heart disease and stroke in healthy middle-aged men. The 22-year followup results of the Helsinki Policemen Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:538-544.

Qi L, Kang K, Zhang C, van Dam RM, Kraft P, Hunter D, Lee CH, Hu FB. Fat mass-and obesity-associated (FTO) gene variant is associated with obesity: longitudinal analyses in two cohort studies and functional test. *Diabetes* 2008;57:3145-3151.

Qi L, van Dam RM, Meigs JB, Manson JE, Hunter D, Hu FB. Genetic variation in IL6 gene and type 2 diabetes: tagging-SNP haplotype analysis in large-scale case-control study and meta-analysis. *Hum Mol Genet*. 2006;15:1914-20.

- Rabbani R, Topol EJ. Strategies to achieve coronary arterial plaque stabilization. *Cardiovasc Res* 1999;41:402-17.
- Rader DJ. High-density lipoproteins and atherosclerosis. *Am J Cardiol* 2002;90:62i-70i.
- Rader DJ. Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies. *J Clin Invest* 2006;116:3090-3100
- Rahman MM, Laher I. Structural and functional alteration of blood vessels caused by cigarette smoking: an overview of molecular mechanisms. *Curr Vasc Pharmacol* 2007;5:276-92.
- Raijmakers MT, Roes EM, Steegers EA, Peters WH. The C242T-polymorphism of the NADPH/NADH oxidase gene p22phox subunit is not associated with pre-eclampsia. *J. Hum. Hypertens.* 2002;16:423-425
- Rajagopalan S, Meng XP, Ramasamy S, Harrison DG, Galis ZS. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest.* 1996;98:2572-2579.
- Rajaram S, Sabaté J. Nuts, Body Weight And Insulin Resistance. *Br J Nutr* 2006;96:79-86.
- Rajavashisth TB, Andalibi A, Territo MC, Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ. Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature* 1990;344:254-7.
- Rampersaud E, Mitchell BD, Pollin TI, Fu M, Shen H, O'Connell JR, Ducharme JL, Hines S, Sack P, Naglieri R, Shuldiner AR, Snitker S. Physical activity and the association of common FTO gene variants with body mass index and obesity. *Arch Intern Med* 2008;168:1791-1797
- Ramprasad MP, Fischer W, Witztum JL, Sambrano GR, Quehenberger O, Steinberg D. The 94- to 97-kDa mouse macrophage membrane protein that recognizes oxidized low density lipoprotein and phosphatidylserine-rich liposomes is identical to macrosialin, the mouse homologue of human CD68. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:9580-9584.
- Rassoul F, Richter V, Hentschel B, Geisel J, Herrmann W, Kuntze T. Plasma homocysteine levels and 677C>T methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism in patients with coronary artery disease of different severity. *Indian J Med Res* 2008;127:154-158
- Rastas S, Mattila K, Verkkoniemi A, Niinistö L, Juva K, Sulkava R, Lämsimies E. Association of apolipoprotein E genotypes, blood pressure, blood lipids and ECG abnormalities in a general population aged 85+. *BMC Geriatr* 2004;4:1.
- Reaven GM. Banting Lecture 1988: Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes.* 1988;37:1595-607.
- Redón J, Oliva MR, Tormos C, Giner V, Chaves J, Iradi A, Sáez GT. Antioxidant activities and oxidative byproducts in human hypertension. *Hypertension* 2003;41:1096-2001.

Riboli E, Hunt KJ, Slimani N, Ferrari P, Norat T, Fahey M, Charrondière UR, Hémon B, Casagrande C, Vignat J, Overvad K, Tjønneland A, Clavel-Chapelon F, Thiébaud A, Wahrendorf J, Boeing H, Trichopoulos D, Trichopoulou A, Vineis P, Palli D, Bueno-De-Mesquita HB, Peeters PH, Lund E, Engeset D, González CA, Barricarte A, Berglund G, Hallmans G, Day NE, Key TJ, Kaaks R, Saracci R. European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): study populations and data collection. *Public Health Nutr* 2002; 5:1113-1124.

Ridderstråle M, Johansson LE, Rastam L, Lindblad U. Increased risk of obesity associated with the variant allele of the PPARGC1A Gly482Ser polymorphism in physically inactive elderly men. *Diabetologia*. 2006;49:496-500.

Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1997;336:973-79.

Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 2000; 342:836-43.(a)

Ridker PM, Hennekens CH, Roitman-Johnson B, Stampfer MJ, Allen J. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet*. 1998;351:88-92.

Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation*. 2000;101:1767-1772.(b)

Ridker PM. Alanine for proline substitution in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma-2 (PPARG2) gene and the risk of incident myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:859-63

Rip J, Nierman MC, Ross CJ, Jukema JW, Hayden MR, Kastelein JJ, Stroes ES, Kuivenhoven JA. Lipoprotein lipase S447X: a naturally occurring gain-of-function mutation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:1236-45.

Robbins AS, Manson JE, Lee IM, Satterfield S, Hennekens CH. Cigarette smoking and stroke in a cohort of U.S. male physicians. *Ann Intern Med*. 1994;120:458-62.

Robertson RM, Smaha L. Can a Mediterranean-style diet reduce heart disease?. *Circulation* 2001;103:1821-1822.

Robitaille J, Despres JP, Perusse L, Vohl MC. The PPAR-gamma P12A polymorphism modulates the relationship between dietary fat intake and components of the metabolic syndrome: results from the Quebec Family Study. *Clin Genet* 2003;63:109-116

Roche HM, Gibney MJ. Effect of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids on fasting and postprandial triacylglycerol metabolism. *Am J Clin Nutr*. 2000;71:232S-7S.

Rockefeller University. Linkage programs home page. 2004. En: (<http://linkage.rockefeller.edu/ott/linkutil.htm>).

Rodríguez VM, Portillo MP, Picó C, Macarulla MT, Palou A. Olive oil feeding up-regulates uncoupling protein genes in rat brown adipose tissue and skeletal muscle. *Am J Clin Nutr* 2002;75:213-220.

Rodríguez-Esparragon FJ, Rodríguez-Perez JC, Macías-Reyes A, Alamo-Santana F. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2-Pro12Ala and endothelial nitric oxide synthase-4a/b gene polymorphisms are associated with essential hypertension. *J Hypertens*. 2003;21:1649-1655.

Rohde LE, Hennekens CH, Ridker PM. Cross-sectional study of soluble intercellular adhesion molecule-1 and cardiovascular risk factors in apparently healthy men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:1595-9.

Ros E, Núñez I, Pérez-Heras A, Serra M, Gilabert R, Casals E, Deulofeu R. A walnut diet improves endothelial function in hypercholesterolemic subjects: a randomized crossover trial. *Circulation*. 2004;109:1609-14.

Ros E. Dietary cis-monounsaturated fatty acids and metabolic control in type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr*. 2003;78:617S-625S.

Ros E. Intestinal absorption of triglyceride and cholesterol. Dietary and pharmacological inhibition to reduce cardiovascular risk. *Atherosclerosis*. 2000;151:357-79.

Rosenberg L, Kaufman DW, Helmrich SP, Shapiro S. The risk of myocardial infarction after quitting smoking in men under 55 years of age. *N Engl J Med*. 1985;313:1511-14.

Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-26.

Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801-9.

Ruan X, Ma L, Wang S, Lindpaintner K, Liu X, Wang B, Peng Z, Ma X, Cheng M, Zhang J, Liu L, Wang X. TAQIB and I405V polymorphisms of CETP are moderately associated with obesity risk in the Chinese adult population. *Acta Diabetol*. 2010;47:217-24.

Ruaño G, Seip RL, Windemuth A, Zöllner S, Tsongalis GJ, Ordovas J, Otvos J, Bilbie C, Miles M, Zoeller R, Visich P, Gordon P, Angelopoulos TJ, Pescatello L, Moyna N, Thompson PD. Apolipoprotein A1 genotype affects the change in high density lipoprotein cholesterol subfractions with exercise training. *Atherosclerosis*. 2006;185:65-9.

Rubbo H, Trostchansky A, Botti H, Batthyány C. Interactions of nitric oxide and peroxynitrite with low-density lipoprotein. *Biol Chem*. 2002;383:547-552

Rudkowska I. Fish oils for cardiovascular disease: Impact on diabetes. *Maturitas*. 2010;67:25-8

Ruiz JR, Labayen I, Ortega FB, Legry V, Moreno LA, Dallongeville J, Martínez-Gómez D, Bokor S, Manios Y, Ciarapica D, Gottrand F, De Henauw S, Molnár D, Sjöström M, Meirhaeghe A; HELENA Study Group. Attenuation of the effect of the FTO rs9939609 polymorphism on total and central body fat by physical activity in adolescents: the HELENA study. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2010;164:328-33.

Ruiz-Narváez E. Is the Ala12 variant of the PPAR γ gene an "unthrifty allele"? *J Med Genet* 2005;42:547-50.

Ruiz-Ortega RI, Lorenzo O, Suzuki Y, Rupérez M, Egido J. Proinflammatory actions of angiotensins. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2001;10:321-329.

Russo GT, Di Benedetto A, Alessi E, Ientile R, Antico A, Nicocia G, La Scala R, Di Cesare E, Raimondo G, Cucinotta D. Mild hyperhomocysteinemia and the common C677T polymorphism of methylene tetrahydrofolate reductase gene are not associated with the metabolic syndrome in Type 2 diabetes. *J Endocrinol Invest* 2006;29:201–207

Sabaté J, Ros E, Salas-Salvadó J. Nuts: nutrition and health outcomes. *BJN* 2006;96:S1-S2.

Sabaté J. Nut consumption and body weight. *Am J Clin Nutr.* 2003;78:647S-650S.

Sackett DL, Rosenberg WN. On the need for evidence-based medicine. *J Public Health Med* 1995;17:330–334.

Sacks FM, Svetkey LP, Vollmer WM, Appel LJ, Bray GA, Harsha D, Obarzanek E, Conlin PR, Miller ER 3rd, Simons-Morton DG, Karanja N, Lin PH; DASH-Sodium Collaborative Research Group. Effects on blood pressure of reduced dietary sodium and the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) diet. DASH-Sodium Collaborative Research Group. *N Engl J Med.* 2001;344:3-10.

Sacks, FM. The role of high-density lipoprotein (HDL) cholesterol in the prevention and treatment of coronary heart disease: Expert group recommendations. *Am J Cardiol* 2002; 90: 139-143

Sadoshima J. Cytokine actions of angiotensin II. *Circ Res.* 2000;86:1187–1189.

Sáez GT, Tormos C, Giner V, Chaves J, Lozano JV, Iradi A, Redón J. Factors related to the impact antihypertensive treatment in antioxidant activities and oxidative stress by-products in human hypertension. *Am J Hypertens* 2004;17:809–816.

Sahoo GS, Tatt I, Salanti G, Butterworth AS, Sarwar N, van Maarse M, Jukema JW, Wiman B, Kastelein JJ, Bennet AM, de Faire U, Danesh J, Higgins JP. Seven lipoprotein lipase gene polymorphisms, lipid fractions, and coronary disease: a HuGE association review and meta-analysis. *Am J Epidemiol.* 2008;168:1233-46.

Saha N, Sanghera DK, Kamboh MI. The p22 prox polymorphism C242T is not associated with CHD risk in Asian Indians and Chinese. *Eur J Clin Invest* 1999;29:999–1002.

Saha N, Tay JSH, Low PS, Humphries SE. Guanidine to adenine (G/A) substitution in the promoter region of the apolipoprotein AI gene is associated with elevated serum apolipoprotein AI levels in Chinese non-smokers. *Genet Epidemiol* 1994;11:255–64.

Sakai T, Matsuura B, Onji M. Serum paraoxonase activity and genotype distribution in Japanese patients with diabetes mellitus. *Intern Med* 1998;37:581-4.

Salah D, Bohnet K, Gueguen R, Siest G, Visvikis S. Combined effects of lipoprotein lipase and apolipoprotein E polymorphisms on lipid and lipoprotein levels in the Stanislas cohort. *J Lipid Res* 1997;38:904-912

Salas-Salvadó J, Bonada A, Trallero R, Saló ME. *Nutrición y dietética clínica*. Editorial Masson. Barcelona. 2002 ;84 :7592-617-7.

Salas-Salvadó J, Bulló M, Pérez-Heras A, Ros E. Dietary fibre, nuts and cardiovascular diseases. *British Journal of Nutrition* 2006;96:S45-S51.

Salas-Salvadó J, Rubio MA, Barbany M, Moreno B; Grupo Colaborativo de la SEEDO. Consenso SEEDO 2007 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapéutica. *Med Clin (Barc)*. 2007;128:184-96.

Salmerón J, Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ, Colditz GA, Rimm EB, Willett WC. Dietary fat intake and risk of type 2 diabetes in women. *Am J Clin Nutr*. 2001;73:1019-26.

Sambola A, Fuster V, Badimon JJ. Papel de los factores de riesgo en la trombogenicidad sanguínea y los síndromes coronarios agudos. *Rev Esp Cardiol* 2003;56:1001-9.

Sambola A, Osende J, Hathcock J, Degen M, Nemerson Y, Fuster V, Crandall J, Badimon JJ. Role of risk factors in the modulation of tissue factor activity and blood thrombogenicity. *Circulation*. 2003;107:973-7.

Sampietro T, Bigazzi F, Dal Pino B, Puntoni M, Bionda A. HDL: The "new" target of cardiovascular medicine. *IJCard* 2006;108 143-154.

Samuel JM, Kelberman D, Smith AJ, Humphries SE, Woo P. Identification of a novel regulatory region in the interleukin-6 gene promoter. *Cytokine*. 2008;42:256-69.

San José G, Fortuño A, Beloqui O, Díez J, Zalba G. NADPH oxidase CYBA polymorphisms, oxidative stress and cardiovascular diseases. *Clin Sci (Lond)*. 2008;114:173-82.

Sanchez PL, Morinigo JL, Pabon P, Martin F, Piedra I, Palacios IF, Martin-Luengo C. Prognostic relations between inflammatory markers and mortality in diabetic patients with non-ST elevation acute coronary syndrome. *Heart* 2004;90:264-9.

Santos JL, Boutin P, Verdich C, Holst C, Larsen LH, Toubro S, Dina C, Saris WH, Blaak EE, Hoffstedt J, Taylor MA, Polak J, Clement K, Langin D, Astrup A, Froguel P, Pedersen O, Sorensen TI, Martinez JA; NUGENOB* consortium. Genotype-by-nutrient interactions assessed in European obese women. A case-only study. *Eur J Nutr*. 2006;45:454-62.

Sarwar N, Danesh J, Eiriksdottir G, Sigurdsson G, Wareham N, Bingham S, Boekholdt SM, Khaw KT, Gudnason V. Triglycerides and the risk of coronary heart disease: 10,158 incident cases among 262,525 participants in 29 Western prospective studies. *Circulation*. 2007;115:450-8.

Saxena R, Gianniny L, Burt NP, Lyssenko V, Giuducci C, Sjögren M, Florez JC, Almgren P, Isomaa B, Orho-Melander M, Lindblad U, Daly MJ, Tuomi T, Hirschhorn JN, Ardlie KG, Groop LC, Altshuler D. Common single nucleotide polymorphisms in TCF7L2 are reproducibly associated with type 2 diabetes and reduce the insulin response to glucose in nondiabetic individuals. *Diabetes* 2006;55:2890-2895

Saxena R, Voight BF, Lyssenko V, Burt NP, de Bakker PI, Chen H, Roix JJ, Kathiresan S, Hirschhorn JN, Daly MJ, Hughes TE, Groop L, Altshuler D, Almgren P, Florez JC, Meyer J, Ardlie K, Bengtsson Boström K, Isomaa B, Lettre G, Lindblad U, Lyon HN, Melander O, Newton-Cheh C, Nilsson P, Orho-Melander M, Råstam L, Speliotes EK, Taskinen MR, Tuomi T, Guiducci C, Berglund A, Carlson J, Gianniny L, Hackett R, Hall L, Holmkvist J, Laurila E, Sjögren M, Sterner M, Surti A, Svensson M, Svensson M, Tewhey R, Blumenstiel B, Parkin M, Defelice M, Barry R, Brodeur W, Camarata J, Chia N, Fava M, Gibbons J, Handsaker B, Healy C, Nguyen K, Gates C, Sougnez C, Gage D, Nizzari M, Gabriel SB, Chirn GW, Ma Q, Parikh H, Richardson D, Rieke D, Purcell S. Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science* 2007;316:1331-1336.

Scacchi R, Gambina G, Martini MC, Broggio E, Vilardo T, Corbo RM. Different pattern of association of paraoxonase Gln192→Arg polymorphism with sporadic late-onset Alzheimer's disease and coronary artery disease. *Neurosci Lett* 2003;339:17-20.

Scacchi R, Pinto A, Rickards O, Pacella A, De Stefano GF, Cannella C, Corbo RM. An analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR-gamma 2) Pro12Ala polymorphism distribution and prevalence of type 2 diabetes mellitus (T2DM) in world populations in relation to dietary habits. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2007;17:632-41.

Schächinger V, Britten MB, Dimmeler S, Zeiher AM. NADH/NADPH oxidase p22 phox gene polymorphism is associated with improved coronary endothelial vasodilator function. *Eur Hear J* 2001;22:96-101.

Schächter F, Faure-Delanef L, Guénot F, Rouger H, Froguel P, Lesueur-Ginot L, Cohen D. Genetic associations with human longevity at the APOE and ACE loci. *Nat Genet* 1994;6:29-32.

Schachter M, Raziell A, Friedler S, Strassburger D, Bern O, Ron-EI R. Insulin resistance in patients with polycystic ovary syndrome is associated with elevated homocysteine. *Human Reproduction* 2003;18:721-727.

Schaefer EJ, Lamon-Fava S, Johnson S, Ordovas JM, Schaefer MM, Castelli WP, Wilson PW. Effects of gender and menopausal status on the association of apolipoprotein E phenotype with plasma lipoprotein levels: results from the Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1994;14:1105-13.

Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL, Wautier JL, Stern D. Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ Res* 1999;84:489-97.

Schroder H, Marrugat J, Vila J, Covas MI, Elosua R. Adherence to the traditional mediterranean diet is inversely associated with body mass index and obesity in a spanish population. *J Nutr* 2004;134:3355-61.

Schwanke CH, da Cruz I, Leal NF, Scheibe R, Moriguchi Y, Moriguchi EH. Analysis of the association between apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular risk factors in an elderly population with longevity. *Arq Bras Cardiol* 2002;78:561-579.

Scott LJ, Bonnycastle LL, Willer CJ, Sprau AG, Jackson AU, Narisu N, Duren WL, Chines PS, Stringham HM, Erdos MR, Valle TT, Tuomilehto J, Bergman RN, Mohlke KL, Collins FS, Boehnke M. Association of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) variants with type 2 diabetes in a Finnish sample. *Diabetes* 2006;55:2649-2653

Scott LJ, Mohlke KL, Bonnycastle LL, Willer CJ, Li Y, Duren WL, Erdos MR, Stringham HM, Chines PS, Jackson AU, Prokunina-Olsson L, Ding CJ, Swift AJ, Narisu N, Hu T, Pruim R, Xiao R, Li XY, Conneely KN, Riebow NL, Sprau AG, Tong M, White PP, Hetrick KN, Barnhart MW, Bark CW, Goldstein JL, Watkins L, Xiang F, Saramies J, Buchanan TA, Watanabe RM, Valle TT, Kinnunen L, Abecasis GR, Pugh EW, Doheny KF, Bergman RN, Tuomilehto J, Collins FS, Boehnke M. A genome-wide association study of type2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science* 2007;316:1341-1345.

Scuteri A, Sanna S, Chen WM, Uda M, Albai G, Strait J, Najjar S, Nagaraja R, Orrú M, Usala G, Dei M, Lai S, Maschio A, Busonero F, Mulas A, Ehret GB, Fink AA, Weder AB, Cooper RS, Galan P, Chakravarti A, Schlessinger D, Cao A, Lakatta E, Abecasis GR. Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits. *PLoS Genet.* 2007;3:e115.

Segrest JP, Li L, Anantharamaiah GM, Harvey SC, Liadaki KN, Zannis V. Structure and function of apolipoprotein A-I and high-density lipoprotein. *Curr. Opin. Lipidol.* 2000;11:105–15

Sekuri C, Cam FS, Sagcan A, Ercan E, Tengiz I, Alioglu E, Berdeli A. No association of interleukin-6 gene polymorphism (-174 G/C) with premature coronary artery disease in a Turkish cohort. *Coron Artery Dis.* 2007;18:333–7.

Sentí M, Tomás M, Elosua R, Sala J, Masià R, Marrugat J. The paraoxonase-1 codon 192 polymorphism is associated with fasting total cholesterol and LDL-cholesterol concentrations only in postmenopausal women. The REGICOR study. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:677-83.

Sentí M, Tomás M, Fitó M, Weinbrenner T, Covas MI, Sala J, Masià R, Marrugat J. Antioxidant paraoxonase I activity in the metabolic syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003;88:5422–5426

Senti; M, Tomás M, Anglada R, Elosua R, Marrugat J, Covas MI, Fitó M. Interrelationship of smoking, paraoxonase activity, and leisure time physical activity: a population based study. *Eur. J. Intern. Med.* 2003;14:178–184

Serra Majem L, Helsing E. Changing patterns of fat intake in Mediterranean countries. *European Journal of Clinical Nutrition* 1993;47: S1–S100.

Serra-Majem L, Roman B, Estruch R. Scientific evidence of interventions using the Mediterranean diet: a systematic review. *Nutr Rev.* 2006;64:S27-S47.

Serra-Majem L, Trichopoulou A, Ngo de la Cruz J, Cervera P, García Alvarez A, La Vecchia C, Lemtouni A, Trichopoulos D; International Task Force on the Mediterranean Diet. Does the definition of the Mediterranean diet need to be updated? *Public Health Nutrition:* 2004;7:927–929.

Shai I, Schwarzfuchs D, Henkin Y, Shahar DR, Witkow S, Greenberg I, Golan R, Fraser D, Bolotin A, Vardi H, Tangi-Rozental O, Zuk-Ramot R, Sarusi B, Brickner D, Schwartz Z, Sheiner E, Marko R, Katorza E, Thiery J, Fiedler GM, Blüher M, Stumvoll M, Stampfer MJ; Dietary Intervention Randomized Controlled Trial (DIRECT) Group. Weight loss with a low carbohydrate, Mediterranean, or low fat diet. *N Engl J Med* 2008;17;359:229-241.

Sharrett AR, Ballantyne CM, Coady SA, Heiss G, Sorlie PD, Catellier D, Patsch W; Atherosclerosis Risk in Communities Study Group. Coronary heart disease prediction from lipoprotein cholesterol levels, triglycerides, lipoprotein(a), apolipoproteins A-I and B, and HDL density subfractions: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Circulation* 2001;104:1108–1113.

Sheu WH, Jeng CY, Young MS, Le WJ, Chen YT. Coronary artery disease risk predicted by insulin resistance, plasma lipids, and hypertension in people without diabetes. *Am J Med Sci* 2000;319:84-88.

Shih DM, Gu L, Xia YR, Navab M, Li WF, Hama S, Castellani LW, Furlong CE, Costa LG, Fogelman AM, Lusis AJ. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature.* 1998;394:284-7.

Shimokata K, Yamada Y, Kondo T, Ichihara S, Izawa H, Nagata K, Murohara T, Ohno M, Yokota M. Association of gene polymorphisms with coronary artery disease in individuals with or without nonfamilial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2004;172:167–173

Shimo-Nakanishi Y, Urabe T, Hattori N, Watanabe Y, Nagao T, Yokochi M, Hamamoto M, Mizuno Y. Polymorphism of the lipoprotein lipase gene and risk of atherothrombotic cerebral infarction in the Japanese. *Stroke*. 2001;32:1481–1486.

Shin MH, Kim HN, Cui LH, Kweon SS, Park KS, Heo H, Nam HS, Jeong SK, Chung EK, Choi JS. The effect of apolipoprotein E polymorphism on lipid levels in Korean adults. *J Korean Med Sci*. 2005;20:361–6.

Shohet RV, Vega GL, Anwar A, Cigarroa JE, Grundy SM, Cohen JC. Hepatic lipase (LIPC) promoter polymorphism in men with coronary artery disease. Allele frequency and effects on hepatic lipase activity and plasma HDL-C concentrations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1975–1978

Shu XO, Yang G, Jin F, Liu D, Kushi L, Wen W, Gao YT, Zheng W. Validity and reproducibility of the food frequency questionnaire used in the Shanghai Women's Health Study. *Eur J Clin Nutr* 2004;58:17–23.

Sidhu JS, Rajawat YS, Rami TG, Gollob MH, Wang Z, Yuan R, Marian AJ, DeMayo FJ, Weilbacher D, Taffet GE, Davies JK, Carling D, Khoury DS, Roberts R. Transgenic mouse model of ventricular preexcitation and atrioventricular reentrant tachycardia induced by an AMP-activated protein kinase loss-of-function mutation responsible for Wolff–Parkinson–White syndrome. *Circulation* 2005;111:21–9.

Sie MP, Sayed-Tabatabaei FA, Oei HH, Uitterlinden AG, Pols HA, Hofman A, van Duijn CM, Witteman JC. Interleukin 6 –174G/C promoter polymorphism and risk of coronary heart disease: results from the Rotterdam Study and a meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:212–7.

Sigurdsson G Jr, Gudnason V, Sigurdsson G, Humphries SE. Interaction between a polymorphism of the Apo A-I promoter region and smoking determines plasma levels of HDL and Apo A-I. *Arterioscler Thromb* 1992;12:1017–22.

Simón A, Castro A, Kaski JC. Avances en el conocimiento de la disfunción endotelial y su aplicación en la práctica clínica. *Rev Esp Cardiol* 2001;54:211–217.

Simone Ortega. 1080 Recetas de cocina. Alianza Editorial. 15ª Edición. 2005

Singaraja RR, Brunham LR, Visscher H, Kastelein JJ, Hayden MR. Efflux and atherosclerosis: the clinical and biochemical impact of variations in the ABCA1 gene. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2003;23:1322–32

Singh RB, Dubnov G, Niaz MA, Ghosh S, Singh R, Rastogi SS, Manor O, Pella D, Berry EM. Effect of an Indo-Mediterranean diet on progression of coronary artery disease in high risk patients (Indo-Mediterranean Diet Heart Study): a randomized single-blind trial. *Lancet* 2002;360:1455–61.

Skibola CF, Smith MT, Kane E, Roman E, Rollinson S, Cartwright RA, Morgan G. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. *Proc Natl Acad Sci* 1999;96:12810–12815.

Skoglund-Andersson C, Ehrenborg E, Fisher RM, Olivecrona G, Hamsten A, Karpe F. Influence of common variants in the CETP, LPL, HL and APO E genes on LDL heterogeneity in healthy, middle-aged men. *Atherosclerosis* 2003;167:311-317

Slentz CA, Duscha BD, Johnson JL, Ketchum K, Aiken LB, Samsa GP, Houmard JA, Bales CW, Kraus WE. Effects of the amount of exercise on body weight, body composition, and measures of central obesity: STRRIDE — a randomized controlled study. *Arch Intern Med.* 2004;164:31-9.

Slimani N, Torrent M, Fariols N. European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): Food Composition Tables—Spain. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1991.

Smith JD, Brinton EA, Breslow JL. Polymorphism in the human apolipoprotein A-I gene promoter region. Association of the minor allele with decreased production rate in vivo and promoter activity in vitro. *J Clin Invest* 1992;89:1796–800.

Smith JK. Exercise and atherogenesis. *Exerc Sport Sci Rev.* 2001;29:49-53.

Soccio M, Toniato E, Evangelista V, et al. Oxidative stress and cardiovascular risk: the role of vascular NAD(P)H oxidase and its genetic variants. *Eur J Clin Invest* 2005;35:305–314.

Sociedad de Cardiología Española. Informe SEC 2009 sobre la incidencia de la enfermedades cardiovasculares. Según las estadísticas del Instituto Nacional de Estadística. Defunciones según la causa de muerte, 2007. Disponible en: <http://www.ine.es>

Sofi F, Cesari F, Abbate R, Gensini GF, Casini A. Adherence to Mediterranean diet and health status: meta-analysis. *BMJ.* 2008;11;337:a1344. doi: 10.1136/bmj.a1344.

Song Y, Stampfer MJ, Liu S. Meta-analysis: apolipoprotein E genotypes and risk for coronary heart disease. *Ann Intern Med.* 2004;141:137-47.

Sookoian S, García SI, Porto PI, Dieuzeide G, González CD, Pirola CJ. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and its coactivator-1 alpha may be associated with features of the metabolic syndrome in adolescents. *J Mol Endocrinol.* 2005;35:373-380.

Sorescu D, Weiss D, Lassègue B, Clempus RE, Szöcs K, Sorescu GP, Valppu L, Quinn MT, Lambeth JD, Vega JD, Taylor WR, Griendling KK. Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis. *Circulation* 2002;105:1429–1435.

Soriguer F, Morcillo S, Cardona F, Rojo-Martínez G, de la Cruz Almaráz M, Ruiz de Adana Mde L, Oliveira G, Tinahones F, Esteve I. Pro12Ala polymorphism of the PPARG2 gene is associated with type 2 diabetes mellitus and peripheral insulin sensitivity in a population with a high intake of oleic acid. *J. Nutr.* 2006;136:2325–2330.

Sorlí JV, Corella D, Francés F, Ramírez JB, González JI, Guillén M, Portolés O. The effect of the APOE polymorphism on HDL-C concentrations depends on the cholesterol ester transfer protein gene variation in a Southern European population. *Clin Chim Acta.* 2006;366:196-203.

Sorlí JV, Velert R, Guillén M, Portolés O, Ramírez JB, Iborra J, Corella D. Efecto del polimorfismo de la apolipoproteína E en el perfil lipoproteico y riesgo cardiovascular en una población mediterránea. *Med Clin (Barc)* 2002;118:569-574

Souverein OW, Jukema JW, Boekholdt SM, Zwinderman AH, Tanck MW. Polymorphisms in APOA1 and LPL genes are statistically independently associated with fasting TG in men with CAD. *Eur J Hum Genet.* 2005;13:445-51.

Sowers JR. Diabetes mellitus and cardiovascular disease in women. *Arch Intern Med* 1998;158:617-21.

Spencer-Jones NJ, Ge D, Snieder H, Perks U, Swaminathan R, Spector TD, Carter ND, O'Dell SD. AMP-kinase alpha2 subunit gene PRKAA2 variants are associated with total cholesterol, low-density lipoprotein-cholesterol and high-density lipoprotein-cholesterol in normal women. *J Med Genet* 2006;43:936-942.

Spencer-Jones NJ, Ge D, Snieder H, Perks U, Swaminathan R, Spector TD, Carter ND, O'Dell SD. AMP-kinase alpha2 subunit gene PRKAA2 variants are associated with total cholesterol, low-density lipoprotein-cholesterol and high-density lipoprotein-cholesterol in normal women. *J Med Genet.* 2006;43:936-42.

Spieker LE, Sudano I, Hürlimann D, Lerch PG, Lang MG, Binggeli C, Corti R, Ruschitzka F, Lüscher TF, Noll G. High-density lipoprotein restores endothelial function in hypercholesterolemic men. *Circulation* 2002;105,1399-1402.

Spirin V, Schmidt S, Pertsemlidis A, Cooper RS, Cohen JC, Sunyaev SR. Common Single-Nucleotide Polymorphisms Act in Concert to Affect Plasma Levels of High-Density Lipoprotein Cholesterol. *Am J. Hum Genet* 2007;19: 81-6.

Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature.* 1990;346:425-34.

Srinivasan SR, Li S, Chen W, Boerwinkle E, Berenson GS. R219K polymorphism of the ABCA1 gene and its modulation of the variations in serum high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides related to age and adiposity in white versus black young adults. The Bogalusa heart study. *Metabolism.* 2003;52:930-4.

Srivastava N, Achyut BR, Prakash J, Agarwal CG, Pant DC, Mittal B. Association of cholesteryl ester transfer protein (TaqIB) and apolipoprotein E (HhaI) gene variants with obesity. *Mol Cell Biochem* 2008;314:171-177

Stamler J, Daviglius ML, Garside DB, Dyer AR, Greenland P, Neaton JD. Relationship of baseline serum cholesterol levels in 3 large cohorts of younger men to long-term coronary, cardiovascular, and all-cause mortality and to longevity. *JAMA.* 2000;284:311-8

Stamler J, Stamler R, Neaton JD. Blood pressure, systolic and diastolic, and cardiovascular risks: US population data. *Arch Intern Med* 1993;153:598-615.

Stamler J, Wentworth D, Neaton JD, for the MRFIT Research Group. Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356222 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *JAMA.* 1986;256:2823-8.

Stanger O, Renner W, Khoschsorur G, Rigler B, Wascher TC. NADH/NADPH oxidase p22 phox C242T polymorphism and lipid peroxidation in coronary artery disease. *Clin Physiol.* 2001;21:718-22.

Stapleton D, Woollatt E, Mitchelhill KI, Nicholl JK, Fernandez CS, Michell BJ, Witters LA, Power DA, Sutherland GR, Kemp BE. AMP-activated protein kinase isoenzyme family: subunit structure and chromosomal location. *FEBS Letters* 1997;409:452-6.

Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1995;92:1355-74.

Stefan N, Schäfer S, Machicao F, Machann J, Schick F, Claussen CD, Stumvoll M, Häring HU, Fritsche A. Liver fat and insulin resistance are independently associated with the -514C>T polymorphism of the hepatic lipase gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:4238-4243

Steffen LM, Kroenke CH, Yu X, Pereira MA, Slattery ML, Van Horn L, Gross MD, Jacobs DR Jr. Associations of plant food, dairy product, and meat intakes with 15-y incidence of elevated blood pressure in young black and white adults: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Study. *Am J Clin Nutr*. 2005;82:1169-77.

Steinberg D, Lewis A. Conner memorial lecture. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation* 1997; 95:1062-1071

Steinberg D, Witztum JL. Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? *Circulation*. 2002;105:2107-2111.

Steinberg, D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem* 1997;272:20963-20966.

Stemme S, Faber B, Holm J, Wiklund O, Witztum JL, Hansson GK. T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:3893-7.

Stephens JW, Humphries S. The molecular genetics of CAD: clinical implications. *J Intern Med*. 2003;253:120-7.

Stocker R, Keaney JF. Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis *Physiol Rev* 2004;84:1381-1478.

Stolerman ES, Manning AK, McAteer JB, Fox CS, Dupuis J, Meigs JB, Florez JC. TCF7L2 variants are associated with increased proinsulin/insulin ratios but not obesity traits in the Framingham Heart Study. *Diabetologia*. 2009;52:614-20.

St-Pierre J, Miller-Felix I, Paradis ME, Bergeron J, Lamarche B, Després JP, Gaudet D, Vohl MC. Visceral obesity attenuates the effect of the hepatic lipase -514C>T polymorphism on plasma HDL-cholesterol levels in French Canadian men. *Mol Genet Metab* 2003;78:31- 6.

Stumvoll M, Glodstein BJ, vanHaefen TW. Type 2 diabetes principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 2005, 365:1333-1346.

Stumvoll M, Haring H. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 Pro12Ala polymorphism. *Diabetes* 2002;51:2341-7.

Suárez C, del Arco C, Sáez T, Blanco F, Ruiz JM, Alonso M, Gabriel R. al. Monitorización ambulatoria de la presión arterial en ancianos. Estudio EPICARDIAN. *Rev Esp Cardiol.* 1998;51:965-71.

Subar AF, Thompson FE, Kipnis V, Midthune D, Hurwitz P, McNutt S, McIntosh A, Rosenfeld S. Comparative validation of the Block, Willett, and National Cancer Institute food frequency questionnaires – The Eating at America’s Table Study. *Am J Epidemiol* 2001;154:1089–1099.

Subbiah MT. Nutrigenetics and nutraceuticals: the next wave riding on personalized medicine. *Transl Res.* 2007;149:55-61.

Suchankova G, Tekle M, Saha AK, Ruderman NB, Clarke SD, Gettys TW. Dietary polyunsaturated fatty acids enhance hepatic AMP-activated protein kinase activity in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 2005;326: 851–858.

Suchankova G, Tekle M, Saha AK, Ruderman NB, Clarke SD, Gettys TW. Dietary polyunsaturated fatty acids enhance hepatic AMP-activated protein kinase activity in rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;326:851-8.

Suehiro T, Nakauchi Y, Yamamoto M, Arii K, Itoh H, Hamashige N, Hashimoto K. Paraoxonase gene polymorphism in Japanese subjects with coronary heart disease. *Int J Cardiol.* 1996;57:69-73.

Sugawara A, Takeuchi K, Uruno A, Ikeda Y, Arima S, Kudo M, Sato K, Taniyama Y, Ito S. Transcriptional suppression of type 1 angiotensin II receptor gene expression by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology* 2001;142:3125–3134.

Sukhova GK, Schönbeck U, Rabkin E, Schoen FJ, Poole AR, Billingham RC, Libby P. Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques. *Circulation* 1999;99:2503-9

Sullivan BL, Brown J, Williams PG, Meyer BJ. Dietary validation of a new Australian food-frequency questionnaire that estimates long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids. *Br J Nutr* 2008;99:660–666.

Sun MW, Lee JY, de Bakker PI, Burt NP, Almgren P, Råstam L, Tuomi T, Gaudet D, Daly MJ, Hirschhorn JN, Altshuler D, Groop L, Florez JC. Haplotype structures and large-scale association testing of the 5' AMP-activated protein kinase genes PRKAA2, PRKAB1, and PRKAB2 with type 2 diabetes. *Diabetes* 2006;55:849–855

Supreme Scientific Heath Council, Ministry of Health and Welfare of Greece. Dietary guidelines for adults in Greece. *Archives of Hellenic Medicine* 1999;16:516-24.

SU-VI-MAX. Portions alimentaires: Manuel photos pour l’estimation des quantités. Editorial Polytechnica. Paris.2002;978:7178-4562-4. ISBN: 978-2-7178-4562-4

Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Egido J. Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35:881–900.

Swarbrick M, Chapman ML, McQuillan B, Hung J, Thompson P, Beilby J. A Pro12Ala polymorphism in the human peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 is associated with combined hyperlipidaemia in obesity. *Eur J Endocrinol* 2001;144:277–282.

Tahvanainen E, Syvanne M, Frick MH, Murto-maki-Repo S, Antikainen M, Kesaniemi YA, Kauma H, Pasternak A, Taskinen MR, Ehnholm C. Association of variation in hepatic lipase activity with promoter variation in the hepatic lipase gene. The LOCAT Study Investigators. *J Clin Invest* 1998;101:956-960

Tai ES, Corella D, Deurenberg-Yap M, Cutter J, Chew SK, Tan CE, Ordovas JM; Singapore National Health Survey. Dietary fat interacts with the -514C>T polymorphism in the hepatic lipase gene promoter on plasma lipid profiles in a multiethnic Asian population. *J Nutr*. 2003;133:3399-408.(a)

Tai ES, Ordovas JM, Corella D, Deurenberg-Yap M, Chan E, Adiconis X, Chew SK, Loh LM, Tan CE. The TaqIB and -629C>A polymorphisms at the cholesteryl ester transfer protein locus: associations with lipid levels in a multiethnic population. The 1998 Singapore National Health Survey. *Clin Genet* 2003;63:19-30(b)

Takeda K, Ichiki T, Tokunou T, Funakoshi Y, Iino N, Hirano K, Kanaide H, Takeshita A. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators downregulate angiotensin II type 1 receptors in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 2000;102:1834-1839.

Talmud PJ, Hawe E, Robertson K, Miller GJ, Miller NE, Humphries SE. Genetic and environmental determinants of plasma high density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein AI concentrations in healthy middle-aged men. *Ann Hum Genet*. 2002;66:111-24.

Talmud PJ, Humphries SE. Genetic polymorphisms, lipoproteins and CAD. *Curr Opin Lipidol* 2001;12:405-409.

Talmud PJ, Stephens JW, Hawe E, Demissie S, Cupples LA, Hurel SJ, Humphries SE, Ordovas JM. The significant increase in cardiovascular disease risk in APOEepsilon4 carriers is evident only in men who smoke: potential relationship between reduced antioxidant status and ApoE4. *Ann Hum Genet* 2005;69:613-22.

Talmud PJ, Ye S, Humphries SE. Polymorphism in the promoter region of the apolipoprotein AI gene associated with differences in apolipoprotein AI levels: the European Atherosclerosis Research Study. *Genet Epidemiol*. 1994;11:265-80.

Talmud PJ. Gene-environment interaction and its impact on coronary heart disease risk *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* 2007;17:148-152

Talmud PJ. How to identify gene-environment interactions in a multifactorial disease: CHD as an example *Proceedings of the Nutrition Society* 2004;63:5-10.

Tan CE, Tai ES, Tan CS, Chia KS, Lee J, Chew SK, Ordovas JM. APOE polymorphism and lipid profile in three ethnic groups in the Singapore population. *Atherosclerosis* 2003;170:253-260

Tanasescu M, Leitzmann MF, Rimm EB, Willett WC, Stampfer MJ, Hu FB. Exercise type and intensity in relation to coronary heart disease in men. *J. Am. Med. Assoc.* 2002;288:1994-2000.

Tavakkoly Bazzaz J, Shojapoor M, Nazem H, Amiri P, Fakhrzadeh H, Heshmat R, Parvizi M, Hasani Ranjbar S, Amoli MM. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism in diabetes and obesity. *Mol Biol Rep.* 2010;37:105-9.

Teo KK, Ounpuu S, Hawken S, Pandey MR, Valentin V, Hunt D, Diaz R, Rashed W, Freeman R, Jiang L, Zhang X, Yusuf S; INTERHEART Study Investigators. Tobacco use and risk of myocardial infarction in 52 countries in the INTERHEART study: a case-control study. *Lancet*. 2006;368:647-58.

Teran-Garcia M, Santoro N, Rankinen T, Bergeron J, Rice T, Leon AS, Rao DC, Skinner JS, Bergman RN, Després JP, Bouchard C. HERITAGE Family Study. Hepatic lipase gene variant -514C>T is associated with lipoprotein and insulin sensitivity response to regular exercise: the HERITAGE Family Study. *Diabetes*. 2005;54:2251-5.

Thanos D, Maniatis T. NF- κ B: a lesson in family values. *Cell* 1995; 80: 529-532.

The Fifth Report Of The Joint National Committee On Detection, Evaluation, And Treatment Of High Blood Pressure (Jnc V) *Arch Intern Med*. 1993 Jan 25;153:154-83.

The Pooling Project Research Group. Relationship of blood pressure, serum cholesterol, smoking habit, relative weight and ECG abnormalities to the incidence of major coronary events: final report of the pooling Project. *J Chronic Dis*. 1978;31:201-306.

Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) Final report. *Circulation*. 2002;106:3143.

Thomas JE, Foody JM. The pathophysiology of cardiovascular disease in diabetes mellitus and the future of therapy. *J Cardiometab Syndr*. 2007;2:108-13.

Thompson A, Di Angelantonio E, Sarwar N, et al. Association of cholesteryl ester transfer protein genotypes with CETP mass and activity, lipid levels, and coronary risk. *JAMA*. 2008;299:2777-88.

Thompson JF, Durham LK, Lira ME, Shear C, Milos PM. CETP polymorphisms associated with HDL cholesterol may differ from those associated with cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 2005;181:45-53

Thompson JF, Wood LS, Pickering EH, Dechairo B, Hyde CL. High density genotyping and functional SNP localization in the CETP gene. *J Lipid Res* 2007; 48:434-43.

Thompson PD, Buchner D, Pina IL, Balady GJ, Williams MA, Marcus BH, Berra K, Blair SN, Costa F, Franklin B, Fletcher GF, Gordon NF, Pate RR, Rodriguez BL, Yancey AK, Wenger NK; American Heart Association Council on Clinical Cardiology Subcommittee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention; American Heart Association Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism Subcommittee on Physical Activity. Exercise and physical activity in the prevention and treatment of atherosclerotic cardiovascular disease: a statement from the Council on Clinical Cardiology (Subcommittee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention) and the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism (Subcommittee on Physical Activity). *Circulation* 2003;107:3109-3116

Thompson PD, Crouse SF, Goodpaster B, Kelley D, Moyna N, Pescatello L. The acute versus the chronic response to exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 2001;33:S438-S445.

Thompson S, Kienast J, Pyke S, Haverkate F, Van de Loo JC. Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. *N Engl J Med* 1995;332:635-41.

- Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol.* 2006;6:772-83.
- Tiret L, de Knijff P, Menzel H-J, Ehnholm C, Nicaud V, Havekes LM. ApoE polymorphism and predisposition to coronary heart disease in youths of different European populations: The EARS Study. *European Atherosclerosis Research Study. Arterioscler Thromb* 1994;14:1617-1624
- Tiret L. Gene-Environment Interaccion: A Central Concept in Multifactorial Diseases. *Proc. Nutr.Soc.*2002;61:457-63
- Tomas M, Latorre G, Senti M, Marrugat J. The antioxidant function of high density lipoproteins: a new paradigm in atherosclerosis. *Rev Esp Cardiol.* 2004;57:557-69.
- Tomás M, Senti M, Elosua R, Vila J, Sala J, Masià R, Marrugat J. Interaction between the Gln-Arg 192 variants of PON and oleic acid intake as a determinant of high-density lipoprotein cholesterol and paraoxonase activity. *Eur J Pharmacol.* 2001;432:121-128.
- Tong Y, Lin Y, Zhang Y, Yang J, Zhang Y, Liu H, B. Association between TCF7L2 gene polymorphisms and susceptibility to type 2 diabetes mellitus: a large Human Genome Epidemiology (HuGE) review and meta-analysis. *BMC Med Genet.* 2009;19:10-15.
- Torzewski M, Rist C, Mortensen RF, Zwaka TP, Bienek M, Waltenberger J, Koenig W, Schmitz G, Hombach V, Torzewski J. C-reactive protein in the arterial intima: role of C-reactive protein receptor-dependent monocyte recruitment in atherogenesis. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 2000;20:2094-9.
- Tou JC, Wade CE. Determinants affecting physical activity levels in animal models. *Exp Biol Med (Maywood)* 2002;227:587-600
- Trichopoulou A, Bamia C, Trichopoulos D. Mediterranean diet and survival among patients with coronary heart disease in Greece. *Arch Intern Med.* 2005; 25;165:929-35.(b)
- Trichopoulou A, Costacou T, Bamia C, Trichopoulos D. Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *N Engl J Med.* 2003;348:2599-608.
- Trichopoulou A, Kouris-Blazos A, Wahlqvist ML, Gnardellis C, Lagiou P, Polychronopoulos E, Vassilakou T, Lipworth L, Trichopoulos D. Diet and overall survival in elderly people. *BMJ.* 1995;311:1457-60.
- Trichopoulou A, Naska A, Orfanos P, Trichopoulos D. Mediterranean diet in relation to body mass index and waist-to-hip ratio: the Greek European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Study. *Am J Clin Nutr* 2005;82:935-40.(a)
- Tsimikas S, Philis-Tsimikas A, Alexopoulos S, Sigari F, Lee C, Reaven PD. LDL isolated from Greek subjects on a typical diet or from American subjects on an oleate-supplemented diet induce less monocyte chemotaxis and adhesion when exposed to oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:122-130
- Tsubono Y, Nishino Y, Fukao A, Hisamichi S, Tsugane S. Temporal change in the reproducibility of a self administered food frequency questionnaire. *Am J Epidemiol* 1995;142:1231-1235.

Tummala PE, Chen XL, Sundell CL, Laursen JB, Hammes CP, Alexander RW, Harrison DG, Medford RM. Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature: a potential link between the renin-angiotensin system and atherosclerosis. *Circulation* 1999;100:1223-9.

Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Mähönen M, Tolonen H, Ruokokoski E, Amouyel P. Contribution of trends in survival and coronary-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10 years results from 37 WHO MONICA project populations. Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease. *Lancet* 1999; 353: 1547 – 1557.

Tuomilehto J, Lindström J, Eriksson JG, Valle TT, Hämäläinen H, Ilanne-Parikka P, Keinänen-Kiukaanniemi S, Laakso M, Louheranta A, Rastas M, Salminen V, Uusitupa M; Finnish Diabetes Prevention Study Group. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med*. 2001;344:1343-50.

Turban S, Fuentes F, Ferlic L, Brugada R, Gotto AM, Ballantyne CM, Marian AJ. A prospective study of paraoxonase gene Q/R192 polymorphism and severity, progression and regression of coronary atherosclerosis, plasma lipid levels, clinical events and response to fluvastatin. *Atherosclerosis*. 2001;154:633-40.

Turley SD, Dietschy JM. Sterol absorption by the small intestine. *Curr Opin Lipidol*. 2003;14:233-40.

Turner PR, Cortese C, Wootton R, Marenah C, Miller NE, Lewis B. Plasma apolipoprotein B metabolism in familial type III dysbetalipoproteinaemia. *Eur J Clin Invest* 1985;15:100-12.

Tuteja N, Ahmad P, Panda BB, Tuteja R. Genotoxic stress in plants: shedding light on DNA damage, repair and DNA repair helicases. *Mut Res Rev* 2009;681:134-49

Tuteja N, Singh MB, Misra MK, Bhalla PL, Tuteja R. Molecular mechanisms of DNA damage and repair: progress in plants. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2001;36:337-97 (a)

Tuteja N, Tuteja R. Unravelling DNA repair in human: molecular mechanisms and consequences of repair defect. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2001;36:261-90 (b)

Tuteja R, Tuteja N, Melo C, Casari G, Baralle FE. Transcription efficiency of human apolipoprotein A-I promoter varies with naturally occurring A to G transition. *FEBS Lett* 1992;304:98-101.

Tzima N, Pitsavos C, Panagiotakos DB, Skoumas J, Zampelas A, Chrysohoou C, Stefanadis C. Mediterranean diet and insulin sensitivity, lipid profile and blood pressure levels, in overweight and obese people; the ATTICA study. *Lipids Health Dis*. 2007;6:22.

Tzonou A, Kalandidi A, Trichopoulou A, Hsieh CC, Toupadaki N, Willett W, Trichopoulos D. Diet and coronary heart disease: a case-control study in Athens, Greece. *Epidemiology*. 1993;4:511-6

Tzoulaki I, Murray GD, Lee AJ, Rumley A, Lowe GD, Fowkes GR. Artery Study of Progressive Peripheral Atherosclerosis in the General Population: Edinburgh. *Circulation* 2005;112:976-983.

U.S. Department of Health and Human Services and U.S. Department of Agriculture. Dietary Guidelines for Americans, 2005. Washington, DC: U.S. Department of Health and Human Services and U.S. Department of Agriculture. 2005.

U.S. Department of Health and Human Services. Data2010: the Healthy People 2010 database. Available at <http://wonder.cdc.gov/data2010>.

U.S. Department of Health and Human Services. Physical activity and health: A report of the Surgeon General. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion; 1996.

U.S. Preventive Services Task Force. Screening for obesity in adults: recommendations and rationale. *Ann Intern Med*. 2003;139:930-2.

Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Andersson A, Allen RH. Total homocysteine in plasma and serum: methods and clinical applications. *Clin Biochem* 1993;93:1764-1779

UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). *Lancet*. 1998;352:854-65.

Ukkola O, Garenc C, Pérusse L, Bergeron J, Després JP, Rao DC, Bouchard C. Genetic variation at the lipoprotein lipase locus and plasma lipoprotein and insulin levels in the Québec Family Study. *Atherosclerosis* 2001;158:199-206

Ukkola O, Tremblay A, Bouchard C. LPL polymorphisms and response to long-term overfeeding. *J Intern Med*. 2002;251:429-36.

Ulevitch RJ, Johnston AR, Weinstein DB. New function for high density lipoproteins. Their participation in intravascular reactions of bacterial lipopolysaccharides. *J Clin Invest* 1979;64:1516-1524.

Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui T, Ishizaka N, Griendling KK. p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1996;271:23317-23321.

Utermann G, Pruin N, Steinmetz A. Polymorphism of apolipoprotein E 111. Effect of a single polymorphic gene locus on plasma lipid levels in man. *Clin Genet* 1979;15:63-72.

Utermann G. Apolipoprotein E polymorphism in health and disease. *Am Heart J* 1987;113:433-440

van Acker BA, Botma GJ, Zwinderman AH, Kuivenhoven JA, Dallinga-Thie GM, Sijbrands EJ, Boer JM, Seidell JC, Jukema JW, Kastelein JJ, Jansen H, Verhoeven AJ; REGRESS Study Group. High HDL cholesterol does not protect against coronary artery disease when associated with combined cholesteryl ester transfer protein and hepatic lipase gene variants. *Atherosclerosis*. 2008;200:161-7.

van Dam RM, Willett WC, Rimm EB, Stampfer MJ, Hu FB. Dietary fat and meat intake in relation to risk of type 2 diabetes in men. *Diabetes Care*. 2002;25:417-24.

Van den Hoogen PCW, Feskens EJM, Magelkerke NJD, Menotti A, Nissinen A, Kromhout D. The relation between blood pressure and mortality due to coronary heart disease among men in different parts of the World. *N Engl J Med* 2000;342:1-8.

van Leeuwen MA, van Rijswijk MH. Acute phase proteins in the monitoring of inflammatory disorders. *Baillieres Clin Rheumatol* 1994;8:531-52.

Vane JR, Mitchell JA, Appleton I, Tomlinson A, Bishop-Bailey D, Croxtall J, Willoughby DA. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase in inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:2046–2050.

Vanhoutte PM, Boulanger CM. Endothelium-dependent responses in hypertension. *Hypertens Res* 1995;18:87-98.

Vardulaki KA, Walker NM, Day NE, Duffy SW, Ashton HA, Scott RA. Quantifying the risks of hypertension, age, sex and smoking in patients with abdominal aortic aneurysm. *Br J Surg*. 2000;87:195-200.

Vaxillaire M, Veslot J, Dina C, Proença C, Cauchi S, Charpentier G, Tichet J, Fumeron F, Marre M, Meyre D, Balkau B, Froguel P; DESIR Study Group. Impact of common type 2 diabetes risk polymorphisms in the DESIR prospective study. *Diabetes*. 2008;57:244-54.

Vega GL, Clark LT, Tang A, Marcovina S, Grundy SM, Cohen JC. Hepatic lipase activity is lower in African American men than in white American men: effects of 5' flanking polymorphism in the hepatic lipase gene (LIPC). *J Lipid Res* 1998;39:228–232

Vepa S, Scribner WM, Parinandi NL, English D, Garcia JG, Natarajan V. Hydrogen peroxide stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase in vascular endothelial cells. *Am J Physiol*. 1999;277:L150-L158

Verma S, Badiwala MV, Weisel RD, Li SH, Wang CH, Fedak PW, Li RK, Mickle DA. C-reactive protein activates the nuclear factor-kappaB signal transduction pathway in saphenous vein endothelial cells: implications for atherosclerosis and restenosis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;126:1886-91

Verma S, Li SH, Badiwala MV, Weisel RD, Fedak PW, Li RK, Dhillon B, Mickle DA. Endothelin antagonism and interleukin-6 inhibition attenuate the proatherogenic effects of C-reactive protein. *Circulation* 2002;105:1890-6.(a)

Verma S, Wang CH, Li SH, Dumont AS, Fedak PW, Badiwala MV, Dhillon B, Weisel RD, Li RK, Mickle DA, Stewart DJ. A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. *Circulation* 2002;106:913-9.(b)

Vickers MA, Green FR, Terry C, Mayosi BM, Julier C, Lathrop M, Ratcliffe PJ, Watkins HC, Keavney B. Genotype at a promoter polymorphism of the interleukin-6 gene is associated with baseline levels of plasma C-reactive protein. *Cardiovasc Res*. 2002;53:1029–34.

Vijayagopal P, Glancy L. Macrophages stimulate cholesteryl ester accumulation in cocultured smooth muscle cells incubated with lipoprotein-proteoglycan complex. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:1112-1121.

Viles-González JF, Fuster V, Badimon JJ. Atherothrombosis: a widespread disease with unpredictable and life-threatening consequences. *Eur Heart J*. 2004;25:1197-207.

Villar-Álvarez F, Banegas JR, Mata J, Rodríguez-Artalejo F. Las enfermedades cardiovasculares y sus factores de riesgo en España: hechos y cifras. Majadahonda: Ergón; 2003.

Villarreal-Molina MT, Aguilar-Salinas CA, Rodríguez-Cruz M, Riaño D, Villalobos-Comparan M, Coral-Vazquez R, Menjivar M, Yescas-Gomez P, Königsoerg-Fainstein M, Romero-Hidalgo S, Tusie-Luna MT, Canizales-Quinteros S; Metabolic Study Group. The ATP-binding cassette transporter A1 R230C variant affects HDL cholesterol levels and BMI in the Mexican population: association with obesity and obesity-related comorbidities. *Diabetes*. 2007;56:1881-7.

Vimalaswaran KS, Luan J, Andersen G, Muller YL, Wheeler E, Brito EC, O'Rahilly S, Pedersen O, Baier LJ, Knowler WC, Barroso I, Wareham NJ, Loos RJ, Franks PW. The Gly482Ser genotype at the PPARGC1A gene and elevated blood pressure: a meta-analysis involving 13,949 individuals. *J Appl Physiol*. 2008;105:1352-8.

Vincent-Baudry S, Defoort C, Gerber M, Bernard MC, Verger P, Helal O, Portugal H, Planells R, Grolhier P, Amiot-Carlin MJ, Vague P, Lairon D. The MediRIVAGE study: reduction of cardiovascular disease risk factors after a 3-mo intervention with aMediterranean-type diet or a low-fat diet. *Am J Clin Nutr*. 2005;82:964-971.

Visioli F, Galli C. Antiatherogenic components of olive oil. *Curr Atheroscler Rep*. 2001;3:64-7.

Vlassara H, Fuh H, Donnelly T, Cybulsky. Advanced glycation endproducts promote adhesion molecule (VCAM-1, ICAM-1) expression and atheroma formation in normal rabbits. *Mol Med* 1995;1:447-456.

Vohl MC, Houde A, Lebel S, Hould FS, Marceau P. Effects of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma co-activator-1 G482S variant on features of the metabolic syndrome. *Mol Genet Metab*. 2005;86:300-6.

Volcik K, Ballantyne CM, Pownall HJ, Sharrett AR, Boerwinkle E. Interaction effects of high-density lipoprotein metabolism gene variation and alcohol consumption on coronary heart disease risk: the atherosclerosis risk in communities study. *Journal of Studies on Alcohol and Drugs*. 2007;68:485-92.

Volcik KA, Barkley RA, Hutchinson RG, Mosley TH, Heiss G, Sharrett AR, Ballantyne CM, Boerwinkle E. Apolipoprotein E polymorphisms predict LDL cholesterol levels and carotid artery wall thickness but not incident coronary heart disease in 12,491 ARIC study participants. *Am J Epidemiol* 2006;164: 342-348.

Von Eckardstein A, Nofer JR, Assmann G. High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:13-27.

Vojarova B, Weyer C, Hanson K, Tatarani Pa, Bogardus C, Pratley RE. Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin actino, and insulin secretion. *Obes Res* 2001;9:414-7.

Wallace AJ, Sutherland WH, Mann JI, Williams SM. The effect of meals rich in thermally stressed olive and safflower oils on postprandial serum paraoxonase activity in patients with diabetes. *Eur J Clin Nutr*. 2001;55:951-958

Wang CH, Li SH, Weisel RD, Fedak PW, Dumont AS, Szmítko P, Li RK, Mickle DA, Verma S. C-reactive protein upregulates angiotensin type 1 receptors in vascular smooth muscle. *Circulation* 2003;107:1783-1790.

Wang H, Eckel RH. Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;297:E271-88.

Wang J, Kuusisto J, Vääntinen M, Kuulasmaa T, Lindström J, Tuomilehto J, Uusitupa M, Laakso M. Variants of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene predict conversion to type 2 diabetes in the Finnish Diabetes prevention study and are associated with impaired glucose regulation and impaired insulin secretion. *Diabetologia* 2007; 50:1192–200.

Wang XL, Wang J. Smoking-gene interaction and disease development: relevance to pancreatic cancer and atherosclerosis. *World J Surg.* 2005;29:344-53.

Wang YB, Yu YC, Li Z, Wang C, Wang JY, Wu GT. Study on the relationship between polymorphisms of peroxisome proliferators-activated receptor-gamma coactivator-1alpha gene and type 2 diabetes in Shanghai Hans in China. *Chin J Med Genetics (Chin)* 2005;22:453-456.

Wannamethee G, Shaper AG, Macfarlane PW, Walker M. Risk factors for sudden cardiac death in middle-aged British men. *Circulation.* 1995;91:1749-56.

Wannamethee G, Whincup PH, Shaper AG, Walker M, MacFarlane PW. Factors determining case fatality in myocardial infarction “who dies in a heart attack?” *Brit Heart J* 1995;74:324-31.

Wannamethee SG, Shaper AG, Walker M. Physical activity and mortality in older men with diagnosed coronary heart disease. *Circulation.* 2000;102:1358-63.

Wareham NJ, Jakes RW, Rennie KL, Schuit J, Mitchell J, Hennings S, Day NE. Validity and repeatability of a simple index derived from the short physical activity questionnaire used in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Public Health Nutr.* 2003;6:407-13.

Waters D, Lespérance J, Gladstone P, Boccuzzi SJ, Cook T, Hudgin R, Krip G, Higginson L. Effects of cigarette smoking on the angiographic evolution of coronary atherosclerosis. A Canadian Coronary Atherosclerosis Intervention Trial (CCAIT) Substudy. CCAIT Study Group. *Circulation.* 1996;94:614-21.

Weinstein AR, Sesso HD, Lee IM, Cook NR, Manson JE, Buring JE, Gaziano JM. Relationship of physical activity vs body mass index with type 2 diabetes in women. *JAMA.* 2004;292:1188-94.

Weisgraber KH, Rall SC Jr, Mahkey RW. Human E apoprotein heterogeneity. Cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo-E isoforms. *J Biol Chem.* 1981 Sep 10;256:9077-83.

Weisgraber KH. Apolipoprotein E distribution among human plasma lipoprotein: role of the Cysteine-arginine interchange at residuo 112. *J Lipid Res* 1990;31:1503-1511.

Weiss D, Sorescu D, Taylor WR. Angiotensin II and Atherosclerosis. *Am J Cardiol* 2001;87(S):25C-32C.

Weiss EP, Brandauer J, Kulaputana O, Ghiu IA, Wohn CR, Phares DA, Shuldiner AR, Hagberg JM. FABP2 Ala54Thr genotype is associated with gluoregulatory function and lipid oxidation after a highfat meal in sedentary nondiabetic men and women. *Am J Clin Nutr.* 2007;85:102-8.

Weiss KM, Clark AG. Linkage disequilibrium and the zapping of complex human traits. *Trends Genet* 2002;18:19-24

Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress and diabetes. *J clin Invest.* 2005;115:1111-9.

Wessel TR, Arant CB, Olson MB, Johnson BD, Reis SE, Sharaf BL, Shaw LJ, Handberg E, Sopko G, Kelsey SF, Pepine CJ, Merz NB. Relationship of physical fitness vs body mass index with coronary artery disease and cardiovascular events in women. *JAMA*. 2004;292:1179-87.

Weyrich P, Machicao F, Staiger H, Simon P, Thamer C, Machann J, Schick F, Guirguis A, Fritsche A, Stefan N, Häring HU. Role of AMP-activated protein kinase gamma 3 genetic variability in glucose and lipid metabolism in nondiabetic whites *Diabetologia* 2007;50:2097–2106

Wheeler JG, Keavney BD, Watkins H, Collins R, Danesh J. Four paraoxonase gene polymorphisms in 11212 cases of coronary heart disease and 12786 controls: meta-analysis of 43 studies. *Lancet*. 2004;363:689-95.

Whincup PH, Gilg JA, Emberson JR, Jarvis MJ, Feyerabend C, Bryant A, Walker M, Cook DG. Passive smoking and risk of coronary heart disease and stroke: prospective study with cotinine measurement. *BMJ*. 2004;329:200-5.

Whitehead AS, FitzGerald, GA. Twenty-first century phox: not yet ready for widespread screening. *Circulation* 2001;103:7–9.

Whiting BM, Anderson JL, Muhlestein JB, Horne BD, Bair TL, Pearson RR, Carlquist JF. Intermountain Heart Collaborative Study Group. Candidate gene susceptibility variants predict intermediate end points but not angiographic coronary artery disease. *Am Heart J*. 2005;150:243-250.

Wilcken B, Bamforth F, Li Z, Zhu H, Ritvanen A, Renlund M, Stoll C, Alembik Y, Dott B, Czeizel AE, Gelman-Kohan Z, Scarano G, Bianca S, Ettore G, Tenconi R, Bellato S, Scala I, Mutchinick OM, López MA, de Walle H, Hofstra R, Joutchenko L, Kavteladze L, Bermejo E, Martínez-Frías ML, Gallagher M, Erickson JD, Vollset SE, Mastroiacovo P, Andria G, Botto LD. Geographical and ethnic variation of the 677C>T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): findings from over 7000 newborns from 16 areas world wide. *J Med Genet*. 2003;40:619-25.

Wilcken De, Wang Xl, Sim As, Mccredie Rm. Distribution in Healthy and Coronary Populations of the Methylenetetrahydrofolate Reductase (Mthfr) C677t Mutation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16:878-82.

Willett WC, Green A, Stampfer MJ, Speizer FE, Colditz GA, Rosner B, Monson RR, Stason W, Hennekens CH. Relative and absolute excess risks of coronary heart disease among women who smoke cigarettes. *N Engl J Med*. 1987;317:1303-9

Willett WC, Sacks F, Trichopoulou A, Drescher G, Ferro-Luzzi A, Helsing E, Trichopoulos D. Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. *Am J Clin Nutr*. 1995;61:1402S-1406S.

Willett WC. *Nutritional Epidemiology*. New York: Oxford University Press.1998.

Willett WC. Related articles, links abstract balancing lifestyle and genomics research for disease prevention. *Science*. 2002;296:695-8.

Willson T, Brown P, Sternbach D, Henke B. The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *J Med Chem* 2000;43:527–550.

Wilson PW, Schaefer EJ, Larson MG, Ordovas JM. Apolipoprotein E alleles and risk of coronary disease. A meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16:1250-5.

Wilson PWF, Myers RH, Larson MG, Ordovas JM, Wolf PA, Schaefer EJ. Apolipoprotein E alleles, dyslipidemia, and coronary heart disease: The Framingham Offspring Study. *JAMA* 1994;272:1666-1671

Winder WW, Hardi DG. Inactivation of acetyl-CoA carboxylase and activation of AMP-activated protein Kinase in muscle during exercise. *Am J Physiol* 1996;270:E299-E304.

Winder WW, Hardie DG. AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes. *American Journal of Physiology* 1999;277: E1-10.

Wing RR, Hill JO. Successful weight loss maintenance. *Annu Rev Nutr.* 2001;21:323–341.

Winkelmann BR, Boehm BO, Nauck M, Kleist P, März W, Verho NK, Ranjith N, Kneissl G. Cigarette smoking is independently associated with markers of endothelial dysfunction and hyperinsulinaemia in nondiabetic individuals with coronary artery disease. *Curr Med Res Opin* 2001;17:132-41.

Winkler G, Kiss S, Keszthelyi L, Sápi Z, Ory I, Salamon F, Kovács M, Vargha P, Szekeres O, Speer G, Karádi I, Sikter M, Kaszás E, Dworak O, Gerö G, Cseh K. Expression of tumor necrosis factor (TNF)-alpha protein in the subcutaneous and visceral adipose tissue in correlation with adipocyte cell volume, serum TNF-alpha, soluble serum TNF-receptor-2 concentrations and C-peptide level. *Eur J Endocrinol* 2003;149:129–135.

Wittrup HH, Andersen RV, Tybjaerg-Hansen A, Jensen GB, Nordestgaard BG. Combined analysis of six lipoprotein lipase genetic variants on triglycerides, high-density lipoprotein, and ischemic heart disease: cross-sectional, prospective, and case-control studies from the Copenhagen City Heart Study. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:1438–45.

Wittrup HH, Nordestgaard BG, Steffensen R, Jensen G, Tybjaerg-Hansen A. Effect of gender on phenotypic expression of the S447X mutation in LPL: the Copenhagen City Heart Study. *Atherosclerosis.* 2002;165:119-26.

Wittrup HH, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Lipoprotein lipase mutations, plasma lipids and lipoproteins, and risk of ischemic heart disease. A meta-analysis. *Circulation* 1999;99:2901-7.

Wong SHY, Knight JA, Hopfer SM, Zaharia O, Leach CN Jr, Sunderman FW Jr. Lipidperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clin Chem* 1987;33:214–220.

Woo D, Sauerbeck LR, Kissela BM, Khoury JC, Szaflarski JP, Gebel J, Shukla R, Pancioli AM, Jauch EC, Menon AG, Deka R, Carrozzella JA, Moomaw CJ, Fontaine RN, Broderick JP. Genetic and environmental risk factors for intracerebral hemorrhage: preliminary results of a population-based study. *Stroke* 2002;33:1190–1196.

Woods A, Johnstone SR, Dickerson K, Leiper FC, Fryer LG, Neumann D, Schlattner U, Wallimann T, Carlson M, Carling D. LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr Biol.* 2003;13:2004-8.

Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, Spiegelman BM. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 1999; 98:115–124

Wung SF, Kulkarni MV, Pullinger CR, Malloy MJ, Kane JP, Aouizerat BE. The lipoprotein lipase gene in combined hyperlipidemia: evidence of a protective allele depletion. *Lipids Health Dis* 2006;5:19

Xu CF, Angelico F, Del Ben M, Humphries S. Role of genetic variation at the apo AI-CIII-AIV gene cluster in determining plasma apo AI levels in boys and girls. *Genet Epidemiol* 1993;10:113–22.

Xu M, Li X, Wang JG, Du P, Hong J, Gu W, Zhang Y, Ning G. Glucose and lipid metabolism in relation to novel polymorphisms in the 5'-AMP-activated protein kinase gamma2 gene in Chinese. *Mol Genet Metab* 2005;86:372–378

Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med* 2001;7:941–946.

Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Goto K, Masaki T. A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca²⁺ channels. *J Hypertens (Supl)*:1988;6:188-191

Yang W, Kelly T, He J. Genetic epidemiology of obesity. *Epidemiol Rev.* 2007;29:49-61.

Yi F, Brubaker PL, Jin T. TCF-4 mediates cell type-specific regulation of proglucagon gene expression by beta-catenin and glycogen synthase kinase-3 beta. *J Biol Chem* 2005;280:1457-1464

Yliharsilä H, Eriksson JG, Forsén T, Laakso M, Uusitupa M, Osmond C, Barker DJ. Interactions between peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 gene polymorphisms and size at birth on blood pressure and the use of antihypertensive medication. *J Hypertens.* 2004;22:1283-1287.

Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J, Adelmant G, Stafford J, Kahn CR, Granner DK, Newgard CB, Spiegelman BM. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature* 2001;413:131–138

Yu LF, Qiu BY, Nan FJ, Li J. AMPK activators as novel therapeutics for type 2 diabetes. *Curr Top Med Chem.* 2010;10:397-410.

Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, Coppack SW. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:972-978.

Yuhanna IS, Zhu Y, Cox BE, Hahner LD, Osborne-Lawrence S, Lu P, Marcel YL, Anderson RG, Mendelsohn ME, Hobbs HH, Shaul PW. High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med* 2001;7:853-857.

Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, McQueen M, Budaj A, Pais P, Varigos J, Lisheng L, INTERHEART Study Investigators. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet.* 2004;364:937-52.

Zaiou M, Kay A, Newhouse YM, Innerarity R, Segall M, Phillips C, Sissel LK. Apolipoprotein E low density lipoprotein receptor interaction: influences of basic residue and amphipathic alpha helix organization in the ligand. *J Lipid Res* 2000;41:1087-1095

Zambon A, Deeb SS, Brown BG, Hokanson JE, Brunzell JD. Common hepatic lipase gene promoter variant determines clinical response to intensive lipid-lowering treatment. *Circulation* 2001;103:792-798

Zambon A, Deeb SS, Hokanson JE, Brown BG, Brunzell JD. Common variants in the promoter of the hepatic lipase gene are associated with lower levels of hepatic lipase activity, buoyant LDL and higher HDL2 cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1723-1729.

Zambon A, Deeb SS, Pauletto P, Crepaldi G, Brunzell JD. Hepatic lipase: a marker for cardiovascular disease risk and response to therapy. *Curr Opin Lipidol* 2003;14:179-189.

Zambón D, Sabaté J, Muñoz S, Campero B, Casals E, Merlos M, Laguna JC, Ros E. Substituting walnuts for monounsaturated fat improves the serum lipid profile of hypercholesterolemic men and women. A randomized crossover trial. *Ann Intern Med* 2000;132:538-546.

Zambrano M, Fernández E, López M, Rangel A, de Romero P, Fernández V, Marina Morales L, Molero-Conejo E, Connell L, Raleigh X, Aranguren-Mendez J. Gly482Ser polymorphism of the coactivator-1alpha of the activated receptor of peroxisome gamma proliferation in individuals from Maracaibo, Venezuela] *Invest Clin*. 2009;50:285-94.

Zampelas A, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Das UN, Chrysohoou C, Skoumas Y, Stefanadis C. Fish consumption among healthy adults is associated with decreased levels of inflammatory markers related to cardiovascular disease: the ATTICA study. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46:120-4.

Zeggini E, Scott LJ, Saxena R, Voight BF, Marchini JL, Hu T, de Bakker PI, Abecasis GR, Almgren P, Andersen G, Ardlie K, Boström KB, Bergman RN, Bonnycastle LL, Borch-Johnsen K, Burt NP, Chen H, Chines PS, Daly MJ, Deodhar P, Ding CJ, Doney AS, Duren WL, Elliott KS, Erdos MR, Frayling TM, Freathy RM, Gianniny L, Grallert H, Grarup N, Groves CJ, Guiducci C, Hansen T, Herder C, Hitman GA, Hughes TE, Isomaa B, Jackson AU, Jørgensen T, Kong A, Kubalanza K, Kuruvilla FG, Kuusisto J, Langenberg C, Lango H, Lauritzen T, Li Y, Lindgren CM, Lyssenko V, Marville AF, Meisinger C, Midthjell K, Mohlke KL, Morken MA, Morris AD, Narisu N, Nilsson P, Owen KR, Palmer CN, Payne F, Perry JR, Pettersen E, Platou C, Prokopenko I, Qi L, Qin L, Rayner NW, Rees M, Roix JJ, Sandbaek A, Shields B, Sjögren M, Steinthorsdottir V, Stringham HM, Swift AJ, Thorleifsson G, Thorsteinsdottir U, Timpson NJ, Tuomi T, Tuomilehto J, Walker M, Watanabe RM, Weedon MN, Willer CJ; Wellcome Trust Case Control Consortium, Illig T, Hveem K, Hu FB, Laakso M, Stefansson K, Pedersen O, Wareham NJ, Barroso I, Hattersley AT, Collins FS, Groop L, McCarthy MI, Boehnke M, Altshuler D. Meta-analysis of genome-wide association data and large-scale replication identifies additional susceptibility loci for type 2 diabetes. *Nat Genet* 2008;40:638-645.

Zeggini E, Weedon MN, Lindgren CM, Frayling TM, Elliott KS, Lango H, Timpson NJ, Perry JR, Rayner NW, Freathy RM, Barrett JC, Shields B, Morris AP, Ellard S, Groves CJ, Harries LW, Marchini JL, Owen KR, Knight B, Cardon LR, Walker M, Hitman GA, Morris AD, Doney AS; Wellcome Trust Case Control Consortium (WTCCC), McCarthy MI, Hattersley AT. Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science* 2007;316:1336-1341.

Zeiber AM, Schachinger V, Minners J. Long-term cigarette smoking impairs endothelium-dependent coronary arterial vasodilator function. *Circulation* 1995;92:1094-100.

Zhang C, Qi L, Hunter DJ, Meigs JB, Manson JE, van Dam RM, Hu FB. Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene and the risk of type 2 diabetes in large cohorts of U.S. women and men. *Diabetes* 2006;55:2645-2648

Zhang SL, Lu WS, Yan L, Wu MC, Xu MT, Chen LH, Cheng H. Association between peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha gene polymorphisms and type 2 diabetes in southern Chinese population: role of altered interaction with myocyte enhancer factor 2C. *Chin Med J (Engl)*. 2007;120:1878-85.

Zhang Y, Zanotti I, Reilly MP, Glick JM, Rothblat, GH, Rader DJ. Overexpression of apolipoprotein A-I promotes reverse transport of cholesterol from macrophages to feces in vivo. *Circulation* 2003;108:661-663.

Zhao SP, Xiao ZJ, Li QZ, Nie S, Tan LM, Jiang B, Wu J. Relationship between ATP-binding cassette transporter 1 R219K genetic variation and blood lipids. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2004;84:1421-5.

Zhao YF, Feng DD, Chen C. Contribution of adipocyte-derived factors to betacell dysfunction in diabetes. *Int J Biochem Cell Biol* 2006;38:804-819.

Zhou Y, Yin R, Deng Y, Li Y, Wu J. Interactions between alcohol intake and the polymorphism of rs708272 on serum high-density lipoprotein cholesterol levels in the Guangxi Hei Yi Zhuang population. *Alcohol*. 2008;42:583-91.

Zondervan KT, Cardon LR. The complex interplay among factors that influence allelic association. *Mat Rev Genet* 2004;5:89-100.

Zwarts L, Savage GP, McNeil DL. Fatty acid content of new zealand-grown walnuts (*juglans regia* L.). *International Journal of Food Science Nutrition* 1999;50(3):189-194.

Figura 1.1 Porcentaje de muertes debidas a ECV y por sexo en España, Informe SEC 2009.....	20
Figura 1.2. Tasa de mortalidad por CI por provincia en hombres (arriba izquierda); en mujeres (abajo izquierda); en la población total (derecha) según el Informe SEC 2009.....	21
Figura 1.3. Tasa de mortalidad por enfermedad cerebrovascular por provincia en hombres (arriba izquierda); en mujeres (abajo izquierda); en la población total (derecha) según el Informe SEC 2009.....	21
Figura 1.4. Metabolismo del colesterol circulante (Mathews CK et al, 2000).....	25
Figura 1.5. Transporte reverso de colesterol (Sampietro T et al, 2006).....	29
Figura 1.6. Sección transversal de una arteria normal.....	30
Figura 1.7. Proceso de aterosclerosis. LDL: lipoproteínas de baja densidad, ROS: especies reactivas de oxígeno, ICAM: molécula de adhesión intercelular, VCAM: molécula de adhesión celular vascular, PECAM: molécula de adhesión plaquetar-1 MCP-1: proteína 1 quimiotáctica de monocitos, CML: células del músculo liso. (adaptada de Madamanchi NR et al, 2005)....	35
Figura 1.8. Efectos antiaterogénicos del c-HDL (Sampietro et al, 2006).....	40
Figura 1.9. Esquema de la patogenia de aterosclerosis en la obesidad. Los tres mecanismos principales son el aumento de AG libres, resistencia a la insulina y desequilibrio de citocinas. AGL: AG libres, DM2: diabetes mellitus tipo 2, IG: intolerancia a la glucosa. (Alegría Ezquerria E et al, 2008).....	43
Figura 1.10. Prevalencia de tabaquismo en España según las edades y el sexo. Datos de la Encuesta Nacional de Salud 2006.....	53
Figura 1.11. Pirámide nutricional del USDA1995 (izquierda) y Pirámide nutricional del USDA 2005 (derecha).....	57
Figura 1.12. Pirámide de Dieta Mediterránea Tradicional (Willet W et al, 1995).....	60
Figura 1.13. Pirámide de Dieta Mediterránea desarrollada para la población griega (Supreme Scientific Health Council, Ministry of Health and Welfare of Greece, 1999).	61
Figura 1.14. Pirámide de la Alimentación Saludable (SENC, 2004)	62

- Figura 1.15. Riesgo de mortalidad total (arriba) y mortalidad por ECV (abajo) asociado al incremento de 2 puntos en la adherencia a la Dieta Mediterránea. Los cuadrados representan el tamaño del efecto en cada estudio, las líneas muestran el intervalo de confianza al 95% y el rombo representa el tamaño total del efecto. (Sofi F et al, 2008).64
- Figura 1.16. Modelo de interacción gen*ambiente propuesto por Talmud PJ, 2004 (figura de Talmud PJ, 2007).85
- Figura 3.1. Identificador de los participantes incluido en cada cuestionario..... 103
- Figura 3.2. Cuestionario de adherencia a la DM utilizado en el estudio PREDIMED. 108
- Figura 3.3. Protocolo de fraccionamiento en alícuotas de las muestras biológicas obtenidas en el estudio PREDIMED. 113
- Figura 3.4. Cronograma de administración de los CFCA y registros dietéticos..... 120
- Figura 3.5. MagNA Pure Compact Instrument de Roche utilizado para extracción de ADN 130
- Figura 3.6. Funcionamiento de una sonda TaqMan. En esta figura se muestra como cada sonda, unida a un fluorocromo diferente, se une de manera específica a cada secuencia, y al ejercer la polimerasa su actividad 5' exonucleasa permite la liberación del fluorocromo y consecuentemente la emisión de fluorescencia (Livak KJ et al, 1995). 137
- Figura 3.7. Gráfico que facilita el software del sistema de detección Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR tras realizar el análisis de discriminación alélica que permite conocer el genotipo de cada individuo. Según la fluorescencia que detecta agrupa las muestras en homocigoto para alelo Y, heterocigoto (alelo X e Y) y homocigoto alelo X. Los controles y las muestras donde no hay ADN los clasifica como indeterminados. 140
- Figura 4.1. Variación en la concentración de tirosol e hidroxitirosol en orina tras 3 meses de intervención en el grupo de DM+AOEV del estudio piloto PREDIMED en el nodo de Valencia. 148
- Figura 4.2 Cambios en los niveles de marcadores de inflamación tras 3 meses de intervención en los 3 grupos del estudio piloto en el nodo de Valencia. A: Cambios en los niveles de proteína C reactiva (PCR), B: Cambios en los niveles de interleuquina 6 (IL-6), C: Cambios en los niveles molécula de adhesión intercelular (ICAM), D: Cambios en los niveles de: molécula de adhesión celular vascular (VCAM). Las barras de error representan el intervalo de confianza al 95%. * Indica que la diferencia entre las medias de la visita inicial y a los 3 meses es estadísticamente significativa, $P < 0,05$. 149
- Figura 4.3. Variables y gráfico de desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos TaqIB (rs708272) y rs183130 del gen de la CETP. P1: p-valor para comparar las frecuencias genotípicas de ambos polimorfismos mediante un test Chi-cuadrado; D': coeficiente de desequilibrio relativo al máximo; LOD: logaritmo (base 10) de probabilidad de ligamiento entre dos loci; r^2 :

coeficiente de correlación entre los dos loci; Distancia: distancia medida en pares de base entre los loci.	163
Figura 4.4. Niveles de glucosa en individuos con genotipo RR y portadores del alelo K según el polimorfismo R219K de ABCA1 en la población del estudio PREDIMED en el nodo de Valencia.	170
Figura 4.5. Niveles de c-HDL en diabéticos y no diabéticos según el genotipo del polimorfismo Q192R. (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba ANOVA; P _{tend} : p-valor obtenido de una prueba de tendencia lineal entre genotipos).	177
Figura 4.6. Niveles de c-HDL en obesos y no obesos según el genotipo del polimorfismo Q192R. (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba ANOVA; P _{tend} : p-valor obtenido de una prueba de tendencia lineal entre genotipos).	177
Figura 4.7. Variables y gráfico de desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos rs1861868, rs3751812 y rs9939609 del gen de la FTO. P1: p-valor para comparar las frecuencias genotípicas de ambos polimorfismos mediante un test Chi-cuadrado; D': coeficiente de desequilibrio relativo al máximo; LOD: logaritmo (base 10) de probabilidad de ligamiento entre los loci; r ² : coeficiente de correlación entre los dos loci; Distancia: distancia medida en pares de bases entre los loci.	179
Figura 4.8. Niveles de presión arterial sistólica (PAS) y de presión arterial diastólica (PAD) según el polimorfismo Pro12Ala del gen de PPARG2 en hombres de la población PREDIMED en el nodo de Valencia.	184
Figura 4.9. Variables y gráfico de desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos rs7901695, rs7903146 y rs12255372 del gen de TCF7L2. P1: p-valor para comparar las frecuencias genotípicas de ambos polimorfismos mediante un test Chi-cuadrado; D': coeficiente de desequilibrio relativo al máximo; LOD: logaritmo (base 10) de probabilidad de ligamiento entre los loci; r ² : coeficiente de correlación entre los dos loci; Distancia: distancia medida en pares de bases entre los loci.	187
Figura 4.10. Riesgo de DMT2 (OR) asociado a los portadores del alelo minoritario de los polimorfismos rs7901695, rs7903146, rs12255372 del gen de TCF7L2 frente a los homocigotos salvajes, en la población PREDIMED del nodo de Valencia. Se representa la OR para DMT2 tras ajustar por edad y sexo mediante regresión logística. Las barras de error representan el intervalo de confianza al 95% y se incluye el p-valor obtenido al calcular la OR mediante regresión logística.	190
Figura 4.11. Concentración sérica de IL-6 en hombres y mujeres según el polimorfismo -174G/C del gen de IL-6, en la población PREDIMED del estudio piloto general. (Dentro de un género, cuando las medias no tienen la misma letra significa que son diferentes P < 0,05).	197

- Figura 4.12. Variables y gráfico de desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos rs2796495, rs4213, rs1036852, rs2293445, rs8961 y rs1467320 de los genes de las subunidades de AMPK.; D': coeficiente de desequilibrio relativo al máximo; LOD: logaritmo (base 10) de probabilidad de ligamiento entre los loci; r²: coeficiente de correlación entre los dos loci.204
- Figura 4.13. Media de peso en hombres y mujeres según el genotipo del polimorfismo rs4213 del gen PRKAB1. (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba ANOVA; Ptend: p-valor obtenido de una prueba de tendencia lineal entre genotipos).206
- Figura 4.14. Media de IMC en hombres y mujeres según el genotipo del polimorfismo rs4213 del gen PRKAB1. (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba ANOVA; Ptend: p-valor obtenido de una prueba de tendencia lineal entre genotipos).206
- Figura 4.15. Niveles de c-HDL en fumadores y no fumadores según el genotipo del polimorfismo Q192R en la población PREDIMED del nodo de Valencia. (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba ANOVA; Ptend: p-valor obtenido de una prueba de tendencia lineal entre genotipos)..214
- Figura 4.16. Niveles de c-HDL en individuos con alta y baja adherencia a la DM según el genotipo del polimorfismo Q192R. (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba ANOVA).217
- Figura 4.17. Niveles de c-LDL en individuos con alta y baja adherencia a la DM según el genotipo del polimorfismo -75G/A del gen APOA1 en la población PREDIMED del nodo de Valencia. (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba T-Student).....219
- Figura 4.18. Niveles de TG en individuos que consumen 2 o más veces o menos de 2 veces verduras/hortalizas al día (izquierda) y 3 o más veces o menos de 3 veces fruta al día (derecha) según el genotipo del polimorfismo -514C/T del gen LIPC, en la población PREDIMED del nodo de Valencia. (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba T-Student).222
- Figura 4.19. IMC (Kg/m²) en individuos que consumen 3 o más o menos de 3 veces a la semana FS según el polimorfismo rs7901695 del gen de TCF7L2 en la población del nodo de Valencia del estudio PREDIMED. (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba ANOVA; OR para obesidad: valor de odds ratio referido a los portadores del alelo C con respecto al genotipo homocigoto TT, ajustado por edad y sexo obtenida mediante regresión logística. Entre paréntesis se incluye el intervalo de confianza al 95%. También el p-valor obtenido al calcular la OR mediante regresión logística.224
- Figura 4.20. IMC (Kg/m²) en individuos que consumen 3 o más o menos de 3 veces a la semana FS según el polimorfismo rs7903146 del gen de TCF7L2 en la población del nodo de Valencia del estudio PREDIMED. (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba ANOVA; OR para obesidad:

valor de odds ratio referido a los portadores del alelo C con respecto al genotipo homocigoto TT, ajustado por edad y sexo obtenida mediante regresión logística. Entre paréntesis se incluye el intervalo de confianza al 95%. También el p-valor obtenido al calcular la OR mediante regresión logística.	224
Figura 4.21. IMC (Kg/m ²) en individuos que consumen 3 o más o menos de 3 veces a la semana FS según el polimorfismo rs12255372 del gen de TCF7L2 en la población del nodo de Valencia del estudio PREDIMED. (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba ANOVA; OR para obesidad: valor de odds ratio referido a los portadores del alelo C con respecto al genotipo homocigoto TT, ajustado por edad y sexo obtenida mediante regresión logística. Entre paréntesis se incluye el intervalo de confianza al 95%. También el p-valor obtenido al calcular la OR mediante regresión logística.	225
Figura 4.22. Perímetro de la cintura en individuos sedentarios y no sedentarios según el polimorfismo rs99396309 del gen de la FTO en la población PREDIMED del nodo de Valencia. (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba ANOVA).	235
Figura 4.23. Índice de masa corporal (IMC) en individuos sedentarios y no sedentarios según el polimorfismo rs99396309 del gen de la FTO, en la población PREDIMED del nodo de Valencia. (P: p-valor de comparación de medias mediante una prueba ANOVA).	235
Figura 4.24. Medias de c-HDL (mg/dL) según los polimorfismos TaqIB en el gen de CETP y E2/E3/E4 en el gen de ApoE en la población PREDIMED del nodo de Valencia.	245
Figura 4.25. Medias de c-HDL (mg/dL) según los polimorfismos TaqIB en el gen de CETP y -514C/T en el gen LIPC en la población PREDIMED del nodo de Valencia.	246
Figura 4.26. Medias de c-HDL (mg/dL) según los polimorfismos rs183130 en el gen de CETP y -514C/T en el gen LIPC en la población PREDIMED del nodo de Valencia.	247
Figura 5.1. Cambios en los niveles de marcadores de inflamación tras 3 meses de intervención en los 3 grupos del estudio piloto del proyecto PREDIMED general. A: Cambios en los niveles de proteína C reactiva (PCR), B: Cambios en los niveles de interleuquina 6 (IL-6), C: Cambios en los niveles molécula de adhesión intercelular (ICAM), D: Cambios en los niveles de: molécula de adhesión celular vascular (VCAM). Las barras de error presentan el intervalo de confianza al 95%. * Indica que la diferencia entre las medias de la visita inicial y a los 3 meses es estadísticamente significativa, P<0,05 (Estruch R et al, 2006).....	261

Tabla 1.1. Composición de las principales lipoproteínas del plasma humano (adaptada de Mathews CK et al, 2000).	24
Tabla 3.1. Centros de campo (CC) y unidades de laboratorio especializadas (ULE) participantes en el estudio PREDIMED.	99
Tabla 3.2 Número de participantes incluidos en el estudio piloto del proyecto PREDIMED en cada Centro de Atención Primaria que ha colaborado con en nodo de Valencia	102
Tabla 3.3 Número de participantes incluidos en el estudio PREDIMED en cada Centro de Atención Primaria que ha colaborado con en nodo de Valencia.....	104
Tabla 3.4. Cuestionarios que son administrados en la visita inicial y posteriores visitas de seguimiento a cada participante en el estudio PREDIMED.....	105
Tabla 3.5. Obtención de muestras biológicas según la visita en el estudio PREDIMED... ..	111
Tabla 3.6. Hábitos alimentarios característicos mediterráneos.	118
Tabla 3.7. Material de apoyo entregado en las reuniones grupales trimestrales para reforzar el cumplimiento de la intervención en el estudio PREDIMED.....	119
Tabla 3.8. Recomendaciones para el grupo Control en el estudio PREDIMED.	119
Tabla 3.9. Número de CFCAs y registros dietéticos contestados por nodo en el estudio VALFRECO.	121
Tabla 3.10. Absorción de grasa durante la cocción. Estudio VALFRECO.....	123
Tabla 3.11. Criterios de corrección para alimentos crudos y cocidos. Estudio VALFRECO.	124
Tabla 3.12. Oligonucleótidos empleados para el análisis genético	134
Tabla 3.13. Ciclos de amplificación, temperatura de anillamiento y tamaño esperado de los fragmentos de ADN estudiados en los genes de interés.....	135
Tabla 3.14. Enzimas utilizadas, secuencia de corte y fragmentos obtenidos tras la digestión del producto de amplificación para el cribado de las variantes en los genes de interés.....	136

Tabla 3.15 Código de <i>SNP Genotyping Assay</i> de Applied Biosystems para cada polimorfismo.	138
Tabla 3.16. Composición de la mezcla de reacción para la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa.	139
Tabla 4.1. Características antropométricas y clínicas en el grupo de DM+AOVE, DM+FS y control de la población PREDIMED del estudio piloto en el nodo de Valencia.	147
Tabla 4.2. Cambios en la puntuación en el cuestionario de adherencia a la DM de 14 puntos, en el peso, concentración de lípidos y glucosa tras 3 meses de intervención dietética en el estudio piloto del proyecto PREDIMED del nodo de Valencia. ¹	148
Tabla 4.3. Características antropométricas y clínicas en el grupo de DM+AOVE, DM+FS y control de la población del estudio piloto del proyecto PREDIMED.....	150
Tabla 4.4. Cambios en la puntuación en el cuestionario de adherencia a la DM de 14 puntos, en el peso, concentración de lípidos y glucosa tras 3 meses de intervención dietética en el estudio piloto del proyecto PREDIMED. ¹	151
Tabla 4.5. Valores diarios medios de energía total, hidratos de carbono, proteínas, grasas, AGM, AGS, AGP, comparando CFCA 1, CFCA 2 y la media de los 4 registros dietéticos obtenidos en el estudio VALFRECO del nodo de Valencia.	153
Tabla 4.6. Valores diarios medios de energía total, hidratos de carbono, proteínas, grasas, AGM, AGS, AGP, colesterol, fibra, ácidos grasos omega-3 de origen marino y de origen no marino y ácido α -linoléico comparando CFCA 1, CFCA 2 y la media de los 4 registros dietéticos, en la población del estudio VALFRECO global.....	154
Tabla 4.7. Reproducibilidad del CFCA: correlación entre la ingesta de nutrientes en CFAC1 y CFCA2, en la población del estudio VALFRECO global.....	155
Tabla 4.8. Validez del CFCA: correlación entre la ingesta de nutrientes en el CFCA2 y los 4 registros dietéticos, en la población del estudio VALFRECO global.....	156
Tabla 4.9. Características antropométricas y bioquímicas de la población PREDIMED en el nodo de Valencia y comparación por sexo.....	157
Tabla 4.10. Características clínicas de la población PREDIMED del nodo de Valencia. ..	158
Tabla 4.11. Frecuencias genotípicas del polimorfismo E2/E3/E4 del gen APOE en la población PREDIMED del nodo de Valencia y comparando por sexo.	159
Tabla 4.12 Variables antropométricas (edad, peso, IMC, cintura), presión arterial (PAS, PAD), niveles plasmáticos de glucosa y de lípidos (CT, c-LDL, c-HDL, TG) según el genotipo del polimorfismo E2/E3/E4 del gen de APOE en la población PREDIMED del nodo de Valencia.	160

Tabla 4.13. Concentración plasmática de TG según el genotipo del polimorfismo E2/E3/E4 de APOE en hombres y mujeres en la población PREDIMED del nodo de Valencia.	161
Tabla 4.14. Estudio del riesgo de HTA asociado al polimorfismo E2/E3/E4 del gen de APOE.....	161
Tabla 4.15 Frecuencias genotípicas del polimorfismos TaqIB y rs183130 del gen CETP en la población PREDIMED del nodo de Valencia y comparando por sexo..	162
Tabla 4.16. Variables antropométricas (edad, peso, IMC, cintura), presión arterial (PAS, PAD), niveles plasmáticos de glucosa y de lípidos (CT, c-LDL, c-HDL, TG) según el genotipo del polimorfismo TaqIB del gen de CETP en la población PREDIMED del nodo de Valencia.	164
Tabla 4.17 Variables antropométricas (edad, peso, IMC, cintura), presión arterial (PAS, PAD), niveles plasmáticos de glucosa y de lípidos (CT, c-LDL, c-HDL, TG) según el genotipo del polimorfismo rs183130 del gen de CETP en la población PREDIMED del nodo de Valencia.	165
Tabla 4.18. Frecuencias genotípicas del polimorfismo Ser447X del gen LPL en la población PREDIMED del nodo de Valencia y comparando por sexo.	166
Tabla 4.19. Variables antropométricas (edad, peso, IMC, cintura), presión arterial (PAS, PAD), niveles plasmáticos de glucosa y de lípidos (CT, c-LDL, c-HDL, TG) según el genotipo del polimorfismo Ser447X del gen de LPL en la población PREDIMED del nodo de Valencia.	167
Tabla 4.20. Frecuencias genotípicas del polimorfismo R219K del gen ABCA1 en la población PREDIMED del nodo de Valencia y comparando por sexo.	168
Tabla 4.21. Variables antropométricas (edad, peso, IMC, cintura), presión arterial (PAS, PAD), niveles plasmáticos de glucosa y de lípidos (CT, c-LDL, c-HDL, TG) según el genotipo del polimorfismo R219K del gen de ABCA1 en la población PREDIMED del nodo de Valencia.	169
Tabla 4.22. Valores de concentración de glucosa, c-HDL, IMC y perímetro de cintura según el genotipo del polimorfismo R219K del gen de ABCA1 en hombres y mujeres en la población PREDIMED del nodo de Valencia.	171
Tabla 4.23. Frecuencias genotípicas del polimorfismo -514C/T del gen LIPC en la población PREDIMED del nodo de Valencia y comparando por sexo.	172
Tabla 4.24. Variables antropométricas (edad, peso, IMC, cintura), presión arterial (PAS, PAD), niveles plasmáticos de glucosa y de lípidos (CT, c-LDL, c-HDL, TG) según el genotipo del polimorfismo -514C/T del gen de LH en la población estudiada.	173
Tabla 4.25. Frecuencias genotípicas del polimorfismo -75G/A del gen APOA1 en la población PREDIMED del nodo de Valencia y comparando por sexo.	174
Tabla 4.26. Variables antropométricas (edad, peso, IMC, cintura), presión arterial (PAS, PAD), niveles plasmáticos de glucosa y de lípidos (CT, c-LDL, c-HDL,	

TG) según el genotipo del polimorfismo -75G/A de APOA1 en la población PREDIMED del nodo de Valencia.	174
Tabla 4.27. Frecuencias genotípicas del polimorfismo Q192R del gen PON1 en la población PREDIMED del nodo de Valencia y comparando por sexo.	175
Tabla 4.28. Variables antropométricas (edad, peso, IMC, cintura), presión arterial (PAS, PAD), niveles plasmáticos de glucosa y de lípidos (CT, c-LDL, c-HDL, TG) según el genotipo del polimorfismo Q192R del gen de PON1 en la población PREDIMED del nodo de Valencia.	176
Tabla 4.29. Diferencia en la concentración de c-HDL según el genotipo del polimorfismo Q192R del gen de PON1 al comparar diabéticos y no diabéticos y obesos y no obesos en la población del nodo de Valencia del estudio PREDIMED.	178
Tabla 4.30. Frecuencias genotípicas de los polimorfismos rs9939609, rs1861868 y rs3751812 del gen FTO en la población PREDIMED del nodo de Valencia y comparando por sexo.	179
Tabla 4.31. Variables antropométricas (edad, peso, IMC, cintura), niveles plasmáticos de glucosa y TG según el genotipo del polimorfismo rs9939609 del gen de FTO en la población PREDIMED del nodo de Valencia.	180
Tabla 4.32. Variables antropométricas (edad, peso, IMC, cintura), niveles plasmáticos de glucosa y TG según el genotipo del polimorfismo rs1861868 del gen de FTO en la población PREDIMED del nodo de Valencia.	180
Tabla 4.33 Variables antropométricas (edad, peso, IMC, cintura), niveles plasmáticos de glucosa y TG según el genotipo del polimorfismo rs3751812 del gen de FTO en la población PREDIMED del nodo de Valencia.	181
Tabla 4.34. Análisis del riesgo de obesidad según el genotipo de los diferentes polimorfismos del gen de FTO en la población PREDIMED del nodo de Valencia.	182
Tabla 4.35. Frecuencias genotípicas del polimorfismo Pro12Ala del gen PPARG2 en la población PREDIMED del nodo de Valencia y comparando por sexo.	182
Tabla 4.36 Variables antropométricas (edad, peso, IMC, cintura), niveles plasmáticos de glucosa y de lípidos (CT, c-LDL, c-HDL, TG) según el genotipo del polimorfismo Pro12Ala del gen PPARG2 en la población PREDIMED del nodo de Valencia.	183
Tabla 4.37. Frecuencias genotípicas del polimorfismo Gly482Ser del gen PPARGC1 en la población PREDIMED del nodo de Valencia y comparando por sexo.	185
Tabla 4.38. Variables antropométricas (edad, peso, IMC, cintura), niveles plasmáticos de glucosa y de lípidos (CT, c-LDL, c-HDL, TG) según el genotipo del polimorfismo Gly482Ser del gen PPARGC1 en la población PREDIMED del nodo de Valencia.	186

Tabla 4.39. Frecuencias genotípicas de los polimorfismos rs7901695, rs7903146 y rs12255372 del gen TCF7L2 en la población PREDIMED del nodo de Valencia y comparando por sexo.....	187
Tabla 4.40. Variables antropométricas (edad, peso, IMC, cintura), niveles plasmáticos de glucosa y TG según el genotipo del polimorfismo rs7901695 del gen de TCF7L2 en la población PREDIMED del nodo de Valencia.	188
Tabla 4.41. Variables antropométricas (edad, peso, IMC, cintura), niveles plasmáticos de glucosa y TG según el genotipo del polimorfismo rs7903146 del gen de TCF7L2 en la población PREDIMED del nodo de Valencia.	188
Tabla 4.42. Variables antropométricas (edad, peso, IMC, cintura), niveles plasmáticos de glucosa y TG según el genotipo del polimorfismo rs12255372 del gen de TCF7L2 en la población PREDIMED del nodo de Valencia.	189
Tabla 4.43. Frecuencias genotípicas de los polimorfismos rs7901695, rs7903146 y rs12255372 del gen TCF7L2 en diabéticos y no diabéticos, en la población PREDIMED del nodo de Valencia.	190
Tabla 4.44. Características antropométricas, bioquímicas y clínicas de la población del estudio piloto general del estudio PREDIMED.	192
Tabla 4.45. Frecuencias genotípicas del polimorfismo -765G/C del gen COX-2 en la población del estudio piloto general del estudio PREDIMED y comparando por sexo.	193
Tabla 4.46. Variables antropométricas (edad, IMC), niveles plasmáticos de glucosa y de lípidos (CT, c-LDL, c-HDL, TG) y marcadores de inflamación (PCR, IL-6, ICAM, VCAM) según el genotipo del polimorfismo -765G/C del gen de COX-2 en la población PREDIMED del estudio piloto general.	194
Tabla 4.47. Frecuencias genotípicas del polimorfismo -174G/C del gen IL-6 en la población PREDIMED del estudio piloto general y comparando por sexo....	195
Tabla 4.48. Variables antropométricas (edad, IMC), niveles plasmáticos de glucosa, lípidos (CT, c-LDL, c-HDL, TG) y marcadores de inflamación (PCR, IL-6, ICAM, VCAM) según el genotipo del polimorfismo -174G/C del gen de IL-6 en la población PREDIMED del estudio piloto general.	196
Tabla 4.49 Frecuencias genotípicas del polimorfismo C242T del gen CYBA en la población PREDIMED del nodo de Valencia y comparando por sexo.	197
Tabla 4.50. Niveles plasmáticos de marcadores de estrés oxidativo según el genotipo del polimorfismo C242T del gen CYBA en la población PREDIMED del nodo de Valencia.	198
Tabla 4.51 Variables antropométricas (edad, peso, IMC, cintura), presión arterial (PAS, PAD), niveles plasmáticos de glucosa y de lípidos (CT, c-LDL, c-HDL, TG) según el genotipo del polimorfismo C242T del gen CYBA en la población PREDIMED del nodo de Valencia.	199

Tabla 4.52. Frecuencias genotípicas del polimorfismo C677T del gen MTHFR en la población PREDIMED del nodo de Valencia y comparando por sexo.	200
Tabla 4.53. Variables antropométricas (edad, peso, IMC, cintura), presión arterial (PAS, PAD), niveles plasmáticos de glucosa y de lípidos (CT, c-LDL, c-HDL, TG) según el genotipo del polimorfismo C677T del gen MTHFR en la población PREDIMED del nodo de Valencia.	201
Tabla 4.54. Análisis del riesgo de obesidad y DMT2 según el genotipo del polimorfismo C677T del gen de MTHFR, en la población PREDIMED del nodo de Valencia.	202
Tabla 4.55. Frecuencias genotípicas de los polimorfismos rs2796495, rs4213, rs1036852, rs 2293445, rs8961 y rs1467320 del gen AMPK en la población PREDIMED del nodo de Valencia y comparando por sexo.	203
Tabla 4.56. Variables antropométricas (edad, peso, IMC, cintura), niveles plasmáticos de glucosa y TG según el genotipo del polimorfismo rs2796495 del gen de PRKAA2 en la población PREDIMED del nodo de Valencia.	205
Tabla 4.57. Variables antropométricas (edad, peso, IMC, cintura), niveles plasmáticos de glucosa y TG según el genotipo del polimorfismo rs4213 del gen de PRKAB1 en la población PREDIMED del nodo de Valencia.	205
Tabla 4.58 Variables antropométricas (edad, peso, IMC, cintura), niveles plasmáticos de glucosa y TG según el genotipo del polimorfismo rs1036852 del gen de PRKAB2 en la población PREDIMED del nodo de Valencia.	207
Tabla 4.59. Variables antropométricas (edad, peso, IMC, cintura), niveles plasmáticos de glucosa y TG según el genotipo del polimorfismo rs2293445 del gen de PRKAG1 en la población PREDIMED del nodo de Valencia.	208
Tabla 4.60. Variables antropométricas (edad, peso, IMC, cintura), niveles plasmáticos de glucosa y TG según el genotipo del polimorfismo rs8961 del gen de PRKAG2 en la población en la población PREDIMED del nodo de Valencia.	208
Tabla 4.61. Variables antropométricas (edad, peso, IMC, cintura), niveles plasmáticos de glucosa y TG según el genotipo del polimorfismo rs1467320 del gen de PRKAG3 en la población PREDIMED del nodo de Valencia.	209
Tabla 4.62. Análisis del riesgo de obesidad y DMT2 según el genotipo de los diferentes polimorfismos de la subunidades de AMPK, en la población PREDIMED del nodo de Valencia.	210
Tabla 4.63. Diferencias en parámetros antropométricos, niveles plasmáticos de lípidos y tensión arterial entre fumadores y no fumadores en la población PREDIMED del nodo de Valencia.	212
Tabla 4.65. Diferencia en la concentración de c-HDL según el genotipo del polimorfismo Q192R del gen de PON1 al comparar fumadores y no fumadores en la población PREDIMED del nodo de Valencia.	214

Tabla 4.66. Interacción entre el polimorfismo C242T del gen de <i>p22phox</i> y consumo de tabaco sobre los niveles plasmáticos de GSH en la población PREDIMED del nodo de Valencia.	215
Tabla 4.67. Diferencias en parámetros antropométricos, niveles plasmáticos de lípidos y tensión arterial entre individuos que consumen una dieta con elevado o bajo grado de adherencia a la DM en la población PREDIMED del nodo de Valencia.	216
Tabla 4.68. Diferencia en la concentración de c-HDL según el genotipo del polimorfismo Q192R del gen de PON1 al comparar individuos con alta y baja adherencia a la DM, en la población PREDIMED del nodo de Valencia.	218
Tabla 4.69. Interacción entre el polimorfismo -75G/A del gen de ApoA1 y consumo de carnes rojas, hamburguesas, salchichas o embutidos sobre los niveles plasmáticos de c-LDL en la población PREDIMED del nodo de Valencia. ..	219
Tabla 4.70. Interacción entre el polimorfismo R219K del gen de ABCA1 y adherencia a la DM sobre los niveles plasmáticos de glucosa y DMT2 en la población PREDIMED del nodo de Valencia.	220
Tabla 4.71. Interacción entre el polimorfismo R219K del gen de ABCA1 y consumo de pescado o marisco sobre los niveles plasmáticos de glucosa y DMT2 en la población PREDIMED del nodo de Valencia.	221
Tabla 4.72. Interacción entre el polimorfismo R219K del gen de ABCA1 y consumo de repostería comercial sobre IMC y obesidad en la población PREDIMED del nodo de Valencia.	221
Tabla 4.73. Interacción entre el polimorfismo -514 C/T del gen LIPC y consumo frutos secos sobre los niveles plasmáticos de c-HDL en la población PREDIMED del nodo de Valencia.	223
Tabla 4.74. Interacción entre el polimorfismo C677T del gen de MTHFR y consumo de repostería comercial sobre el IMC y riesgo de obesidad en la población PREDIMED del nodo de Valencia.	226
Tabla 4.75. Interacción entre el polimorfismo C677T del gen de MTHFR y consumo preferente de pollo, pavo o conejo frente a carnes rojas o derivados cárnicos sobre el IMC y riesgo de obesidad en la población PREDIMED del nodo de Valencia.	227
Tabla 4.76. Interacción entre el polimorfismo rs1467320 del gen de PRKAG3 y adherencia a la DM sobre los niveles plasmáticos de glucosa y DMT2 en la población PREDIMED del nodo de Valencia.	228
Tabla 4.77. Interacción entre el polimorfismo rs1467320 del gen de PRKAG3 y consumo de carnes rojas, hamburguesas, salchichas o embutidos sobre los niveles plasmáticos de glucosa y DMT2 en la población PREDIMED del nodo de Valencia.	228

Tabla 4.78. Interacción entre el polimorfismo rs2796495 del gen de PRKAA2 y adherencia a la DM sobre IMC y perímetro de la cintura en la población del nodo de Valencia del estudio PREDIMED.....	229
Tabla 4.79. Riesgo de obesidad asociado al polimorfismo rs2796495 del gen de PRKAA2 en individuos con alta y baja adherencia a la DM en la población PREDIMED del nodo de Valencia.	230
Tabla 4.80. Interacción entre el polimorfismo rs2796495 del gen de PRKAA2 y el consumo de pescado sobre IMC y perímetro de la cintura en la población PREDIMED del nodo de Valencia.....	230
Tabla 4.81. Riesgo de obesidad asociado al polimorfismo rs2796495 del gen de PRKAA2 según en consumo de pescado en la población PREDIMED del nodo de Valencia.	231
Tabla. 4.82. Cambios en el consumo de alimentos (medidos mediante el CFCA), en la puntuación en el cuestionario de adherencia a la DM de 14 puntos, concentración de lípidos y marcadores de inflamación tras 3 meses de intervención dietética en la población PREDIMED del estudio piloto general. ¹	232
Tabla 4.83. Diferencias en parámetros antropométricos, niveles plasmáticos de lípidos y tensión arterial entre sedentarios y no sedentarios en la población PREDIMED del nodo de Valencia.	233
Tabla 4.84. Interacción entre el polimorfismo Pro12Ala del gen de PPARG2 y actividad física sobre los niveles plasmáticos de glucosa y DMT2 en la población del nodo de Valencia del estudio PREDIMED.....	236
Tabla 4.85. Efecto del genotipo homocigoto mutado frente al homocigoto salvaje y de la combinación de estos genotipos sobre los niveles plasmáticos de c-HDL, de los polimorfismos TaqIB y rs183130 de CETP en población PREDIMED en el nodo de Valencia.....	238
Tabla 4.86. Efecto del genotipo homocigoto salvaje frente portadores del alelo mutado y de la combinación de estos genotipos sobre los niveles plasmáticos de c-HDL, de los polimorfismos TaqIB y rs183130 de CETP en población PREDIMED en el nodo de Valencia.	238
Tabla 4.87. Efecto del genotipo más favorable frente genotipo menos favorable y de la combinación de estos genotipos sobre el los niveles plasmáticos de c-HDL, de los polimorfismos TaqIB y rs183130 del gen de CETP, Q192 del gen de PON1 y R219K del gen de ABCA1 en población PREDIMED en el nodo de Valencia.	239
Tabla 4.88. Efecto del genotipo más favorable frente genotipo menos favorable y de la combinación de estos genotipos sobre los niveles plasmáticos de c-LDL, de los polimorfismos E2/E3/E4 del gen de ApoE y -75 G/A del gen de ApoA1, en población PREDIMED en el nodo de Valencia.	240

Tabla 4.89. Efecto del genotipo más favorable frente genotipo menos favorable y de la combinación de estos genotipos sobre el IMC, de los polimorfismos rs7903146 del gen de TCF7L2, rs1036852 del gen de PRKAB2 y R219K del gen de ABCA1, en población PREDIMED en el nodo de Valencia.....	241
Tabla 4.90. Efecto del genotipo homocigoto mutado frente al homocigoto salvaje y de la combinación de estos genotipos sobre los niveles plasmáticos de glucosa, de los polimorfismos rs7903146 y rs12255372 del gen de TCF7L2 en población PREDIMED en el nodo de Valencia.....	242
Tabla 4.91. Efecto del genotipo homocigoto salvaje frente portadores del alelo mutado y de la combinación de estos genotipos sobre los niveles plasmáticos de glucosa, de los polimorfismos rs7903146 y rs12255372 del gen de TCF7L2 en población PREDIMED en el nodo de Valencia.	243
Tabla 4.92. Efecto del genotipo más favorable frente genotipo menos favorable y de la combinación de estos genotipos sobre el los niveles plasmáticos de glucosa, de los polimorfismos rs7903146 y rs12255372 del gen de TCF7L2, R219K del gen de ABCA1 y C677T del gen de MTHFR en población PREDIMED en el nodo de Valencia.....	244
Tabla 4.93. Características demográficas, antropométricas, clínicas, bioquímicas, en los casos y en los controles del estudio EPIC.....	248
Tabla 4.94. Características dietéticas y de estilo de vida en casos y controles del estudio EPIC.	249
Tabla 4.95. Asociación entre el polimorfismo TAqIB de la CETP y lípidos plasmáticos en casos incidentes de cardiopatía isquémica (CI) y controles a nivel basal en el estudio EPIC.	250
Tabla 4.96. Asociación entre el polimorfismo TaqIB y cardiopatía isquémica incidente. Análisis de regresión logística.	251
Tabla 4.97. Asociación entre el polimorfismo TaqIB y cardiopatía isquémica incidente según el consumo de alcohol (bebedores y no bebedores). Análisis de regresión logística.....	253
Tabla 4.98. Asociación entre el polimorfismo TaqIB y cardiopatía isquémica incidente en diabéticos y no diabéticos. Análisis de regresión logística.	254
Tabla 5.1 Frecuencias alélicas de los polimorfismos de las subunidades de AMPK para europeos (HapMap-CEU), chinos (HapMap-HCB), japoneses (HapMap-JPT) y africanos (HapMap-YRI) obtenidas en el proyecto HapMap y comparadas con las de la población PREDIMED del nodo de Valencia.....	315