



PROYECTO CARMA

Evaluación del riesgo cardiovascular, y de sus determinantes, en pacientes con artritis reumatoide, espondilitis anquilosante y artritis psoriásica



Protocolo de Investigación

10 de marzo de 2010. Versión 6

Investigador principal: Miguel A. González-Gay
Colaboradores: Carlos González Juanatey, José Luis Fernández Sueiro

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 3 |
| INTRODUCCIÓN..... | 4 |
| La predicción del riesgo cardiovascular | 4 |
| La relación artritis reumatoide-inflamación vascular | 4 |
| Inflamación vascular en otras enfermedades inflamatorias reumáticas | 5 |
| Determinantes genéticos e inflamatorios del riesgo cardiovascular | 6 |
| Justificación del estudio | 8 |
| HIPÓTESIS | 9 |
| OBJETIVOS | 9 |
| Objetivo principal | 9 |
| Objetivos secundarios | 9 |
| MÉTODOS..... | 10 |
| Diseño | 10 |
| Pacientes | 10 |
| Población diana | 10 |
| Población accesible | 10 |
| Muestreo..... | 10 |
| Criterios de selección de los sujetos | 11 |
| Reclutamiento..... | 12 |
| Pérdidas de seguimiento | 12 |
| Mediciones y variables | 13 |
| Variables principales: Puntuación SCORE y eventos cardiovasculares | 13 |
| Variables secundarias | 17 |
| Recogida de datos..... | 22 |
| Codificación | 22 |
| CONTROL DE CALIDAD | 23 |
| CONSIDERACIONES ESTADÍSTICAS | 23 |
| Tamaño muestral..... | 23 |
| Análisis estadístico..... | 24 |
| Visita basal..... | 24 |
| Visitas de seguimiento | 24 |
| Cálculo de la función de riesgo | 25 |
| Análisis de la influencia alélica o genotípica | 25 |
| Aspectos éticos | 25 |
| Evaluación beneficio-riesgo para los sujetos de investigación..... | 26 |
| Información y consentimiento | 26 |
| Confidencialidad de los datos..... | 26 |
| Interferencia con los hábitos de prescripción del médico | 26 |
| LIMITACIONES | 27 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 28 |

RESUMEN

El abordaje del riesgo cardiovascular (CV) en los pacientes con enfermedades reumáticas inflamatorias crónicas se ha convertido en un punto clave de la práctica clínica habitual desde que se ha revelado la conexión entre inflamación articular y sistémica y el riesgo de evento CV. No obstante, no está claro hasta qué punto las herramientas de evaluación del riesgo CV, que se utilizan además como umbral terapéutico, son aplicables al seguimiento de los pacientes con enfermedades reumáticas crónicas inflamatorias.

Objetivos. El propósito de este estudio es describir el perfil de riesgo CV en tres enfermedades reumáticas inflamatorias crónicas y comprobar si la puntuación de riesgo CV clásico (SCORE) debe aplicarse con o sin modificaciones para guiar las decisiones terapéuticas en estos pacientes. Así mismo es objetivo de este estudio confirmar la existencia de determinantes de dicho riesgo CV, incluidos determinantes genéticos.

Diseño. Se propone un estudio longitudinal prospectivo multicéntrico a 10 años en pacientes con artritis reumatoide (AR), artritis psoriásica (APs) y espondilitis anquilosante (EA) más un grupo control sin patología de tipo inflamatorio (artrosis). El estudio constará de una visita basal, o de prevalencia, y tres visitas de seguimiento a los 2, 5 y 10 años.

Sujetos. Pacientes con AR, EA, APs y controles sin enfermedad inflamatoria seleccionados de forma consecutiva en las consultas de reumatología de centros españoles previamente seleccionados de forma aleatoria.

Mediciones y variables. Se redactarán definiciones operativas de todas las variables a recoger en el estudio. En la visita basal se calculará la prevalencia de los factores de riesgo CV, clásicos y no clásicos, así como de síndrome metabólico y enfermedad CV establecida, en cada una de las tres enfermedades consideradas y en su conjunto, comparando los resultados con los del grupo control. En las visitas de seguimiento se estudiará la evolución clínica de la enfermedad y de los factores de riesgo, así como la aparición de nuevos eventos cardiovasculares. Por último, se calculará un SCORE de riesgo CV a 10 años para las tres enfermedades, tanto de forma individual como global.

Análisis estadístico. Se ha calculado un tamaño muestral total de 4.344 pacientes (1.086 por patología) para un seguimiento de 5 años. En la visita basal se realizarán los siguientes análisis: a) estudio descriptivo; b) cálculo de la prevalencia de factores de riesgo cardiovascular; y c) análisis de correlación entre marcadores de inflamación/actividad de la enfermedad y factores de riesgo cardiovascular. En las visitas de seguimiento a 2 y 5 años se estudiarán: a) pérdidas al seguimiento; b) asociación entre factores de riesgo y aparición de nuevos eventos cardiovasculares; c) cálculo de la incidencia de eventos cardiovasculares; y d) análisis de la función de riesgo cardiovascular mediante modelos de riesgos proporcionales de Weibull. En la visita a 10 años se validarán los modelos construidos en las visitas de seguimiento anteriores. En todos los análisis se controlará el efecto del diseño.

INTRODUCCIÓN

La predicción del riesgo cardiovascular

Las enfermedades cardiovasculares (CV) siguen siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en Europa y Norteamérica. Los factores de riesgo CV clásico son la edad, el sexo, la hipertensión, el tabaquismo, el colesterol y la diabetes. Factores como la obesidad, la hipertrofia ventricular izquierda, la historia familiar de cardiopatía coronaria prematura o la utilización de terapia hormonal sustitutiva también han sido considerados en la definición de riesgo CV. A partir de datos de estudios poblacionales se han creado tablas de predicción de la aparición de eventos CV a varios años. La estimación del riesgo CV en base a estas tablas tiene dos utilidades principales: identificar a los pacientes de alto riesgo en prevención primaria y ayudar en la toma de decisiones para la intervención farmacológica de la hipertensión arterial y la hipercolesterolemia.

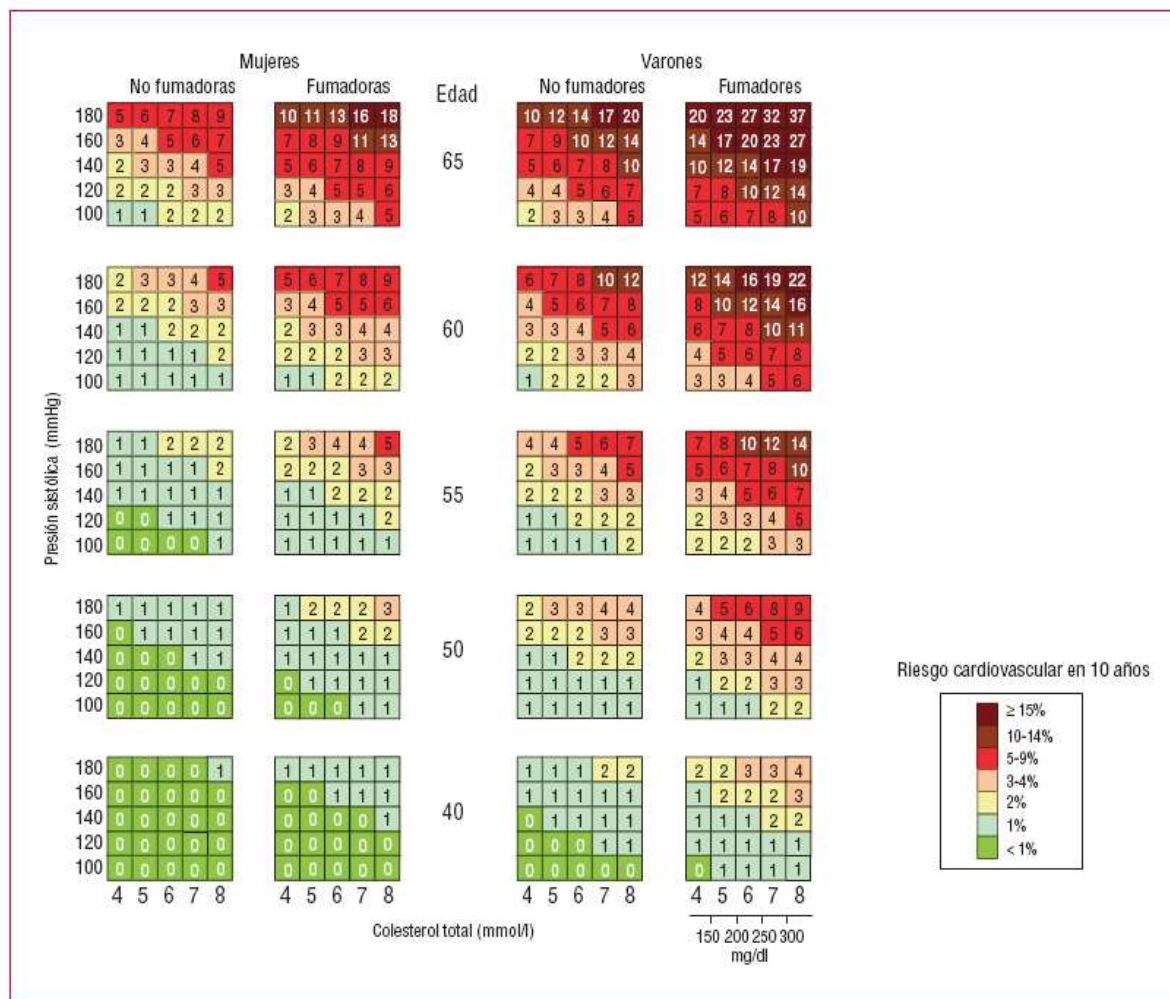
En España, como en el resto de Europa, el cálculo del riesgo de presentar una enfermedad coronaria se ha basado en la función de Framingham [1-3], aunque se ha constatado que esta función sobrestima el riesgo en algunas de las poblaciones estudiadas, especialmente en países del entorno mediterráneo [4, 5]. De ahí el interés por encontrar una función que se adapte a la prevalencia real de factores de riesgo e incidencia de enfermedades CV de los diferentes países. En este contexto han ido apareciendo diversos sistemas para calcular el riesgo CV en nuestro país, entre los que se encuentran las tablas de riesgo coronario de Framingham calibradas (REGICOR)[6] y adaptadas (DORICA)[7] para la población española. También recientemente se han publicado las tablas del SCORE (*Systematic Coronary Risk Evaluation*)[8], que estiman el riesgo de muerte CV y son las actualmente recomendadas por las Sociedades Europeas y por el Comité Español Interdisciplinario para la Prevención Cardiovascular (CEIPC). No siendo la adaptación española de la tabla de Framingham (REGICOR) ni el SCORE perfectos, Buitrago *et al* demostraron que la tabla del SCORE se aproxima más al riesgo real en una cohorte española y presenta mejores criterios de validez [9]. Finalmente se ha calibrado la tabla del SCORE para población española [10]. Como puede observarse en la Figura 1, esta tabla se basa en el sexo, la edad, la tensión arterial sistólica, el tabaquismo y el colesterol total para predecir el riesgo de muerte por causa CV a 10 años.

La relación artritis reumatoide-inflamación vascular

Estudios recientes ponen de manifiesto una mayor incidencia de eventos CV, y de mortalidad de causa CV, en pacientes con artritis reumatoide (AR) frente a población de la misma edad y sexo [11-13]. Este aumento del riesgo de enfermedad CV es, con una gran probabilidad, consecuencia de un proceso de aterosclerosis acelerada [14-16].

La aterosclerosis que acompaña a la AR ha sido demostrada en diferentes estadios evolutivos de la enfermedad [17-19]. La mayor incidencia de eventos CV sólo es parcialmente explicable por la presencia de factores clásicos de aterogénesis [13, 20, 21], jugando la inflamación un papel primordial en el desarrollo de este proceso. En este sentido, se ha demostrado una estrecha correlación entre los marcadores de inflamación y la presencia de aterosclerosis subclínica, valorada ésta por ultrasonografía de carótida [22, 23], y el desarrollo de eventos CV en el seguimiento de pacientes con AR de larga evolución [24].

Figura 1. Tablas de riesgo SCORE calibradas para la población española [10]



Inflamación vascular en otras enfermedades inflamatorias reumáticas

De manera similar a lo descrito para pacientes con AR, datos recientes indican que los pacientes con espondiloartropatías, en concreto con artritis psoriásica (APs) y espondilitis anquilosante (EA), también pudieran presentar un aumento de riesgo CV [25]. Como en la AR, el aumento del riesgo CV en pacientes con espondiloartritis no puede ser totalmente explicado por la presencia de factores de riesgo clásicos de aterosclerosis [26]. Los resultados de un estudio publicado este año han mostrado que la población escandinava con espondiloartritis requiere cirugía coronaria a una edad más temprana que las personas sin esta enfermedad reumática [27]. Además, el riesgo de cirugía coronaria en pacientes con espondiloartritis es independiente de la presencia de factores de riesgo clásicos de aterosclerosis [27].

La APs es una enfermedad reumática inflamatoria crónica asociada a psoriasis, generalmente seronegativa para el factor reumatoide, y que se clasifica generalmente dentro del grupo de las espondiloartropatías. La psoriasis es una enfermedad inflamatoria crónica de la piel que habitualmente presenta una elevada prevalencia de factores clásicos de aterogénesis, especialmente en los casos con afectación cutánea grave [28]. De hecho, se ha comprobado que los pacientes con psoriasis cutánea aislada presentan un riesgo significativamente elevado de mortalidad CV en

comparación con la población control [29-31]. Por otro lado, se ha observado que los pacientes con APs presentan un aumento de la aterosclerosis subclínica esperada que es independiente de la presencia de factores de riesgo CV clásicos [32, 33]. En este sentido, se ha descrito recientemente la existencia de diferentes estadios de enfermedad CV subclínica –disfunción endotelial y aterosclerosis carotídea subclínica– en población española con APs [32, 33].

La EA es una patología inflamatoria crónica que afecta a las articulaciones sacroilíacas y a las de la columna vertebral principalmente y que se observa en hasta el 1% de la población [34]. Los pacientes con EA tienen una mortalidad aproximadamente el doble de la encontrada en la población general, debido probablemente al elevado riesgo de desarrollo de eventos CV [26, 35, 36]. Aunque en la EA existen alteraciones cardíacas específicas como daño valvular aórtico o alteraciones en la conducción cardíaca [37, 38], la responsable del incremento de riesgo CV, al igual que en la AR o en la APs, pudiera ser una aterosclerosis acelerada [39, 40]. Esto es porque, como se ha descrito en la AR o en la APs, la aterosclerosis acelerada en pacientes con EA sólo puede ser explicada parcialmente por factores clásicos de aterogénesis como la dislipemia o la hipertensión arterial [39, 40]. Por otra parte, la presencia de una situación de inflamación crónica, característica de la EA, puede hacer a estos pacientes más propensos al desarrollo de aterosclerosis y eventos CV.

Parece lógico pensar que la AR, la APs y la EA por sí mismas también pueden ser un factor de riesgo CV independiente de los factores clásicos de aterosclerosis.

Determinantes genéticos e inflamatorios del riesgo cardiovascular

La AR es una enfermedad autoinmune donde los factores genéticos desempeñan un papel fundamental. Estudios de familias apoyan esta influencia genética, habiéndose descrito una mayor concordancia para el desarrollo de AR en gemelos univitelinos que en el resto de hermanos. En la AR se ha observado que varios genes dentro del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) influyen en la susceptibilidad para el desarrollo de AR en diferentes poblaciones. Una serie de alelos HLA-DRB1, dentro de la región de clase II del MHC, codifican una secuencia común de aminoácidos correspondientes a los residuos 67-74 de la cadena DRBeta1. Estos alelos, denominados “epítipo compartido”, se han asociado a una mayor susceptibilidad a desarrollar AR y también a una mayor gravedad en la expresión clínica de la AR, con más erosiones y manifestaciones extra-articulares.

Se ha observado una asociación entre el desarrollo de disfunción endotelial, considerada una fase precoz en el desarrollo de aterosclerosis, y la positividad de los alelos HLA-DRB1*04 “epítipo compartido” [17, 21]. Los pacientes con AR homocigóticos para el epítipo compartido tienen mayor riesgo de desarrollar una disfunción endotelial grave y los portadores del alelo HLA-DRB1*0404 tienen con mayor frecuencia disfunción del endotelio vascular que el resto de los pacientes con AR [21].

Y no sólo se asocia a disfunción endotelial, sino que también se observa una incidencia aumentada de eventos CV en pacientes HLA-DRB1*04 positivos para el epítipo compartido, más clara si cabe en asociación al alelo DRB1*0404 [21]. En el Reino Unido se ha descrito además un aumento de la mortalidad de causa CV por cardiopatía isquémica en AR portadoras del epítipo compartido, en particular en relación con los genotipos HLA-DRB1*0101/*0401 o 0404/*0404 [41, 42].

Aunque los resultados descritos arriba enfatizan la importancia de la región HLA en el desarrollo de aterogénesis acelerada en los pacientes con AR, es importante tener en cuenta que la AR es una enfermedad poligénica y que la contribución de genes dentro del MHC para la susceptibilidad y desarrollo de AR sólo es de alrededor de 1/3 a 1/4 de la contribución genética total [43]. Debido a ello, para un mayor conocimiento de las bases genéticas implicadas en el proceso aterogénico de la

AR es importante que se determinen otros genes potencialmente candidatos que puedan influir en el proceso aterogénico en estos pacientes.

Numerosos estudios han señalado al gen PTPN22 como un factor genético de susceptibilidad a diferentes enfermedades autoinmunes, incluida la AR. De hecho, el gen PTPN22 es la asociación genética con AR mejor establecida y replicada, aparte de los genes HLA [43]. De forma muy interesante un trabajo reciente ha reportado que el gen PTPN22, además de predisponer a autoinmunidad, potencia el desarrollo de aterosclerosis [44] y de esta forma une estos dos fenómenos, por lo que sería de gran interés estudiar el gen PTPN22, junto con los genes HLA-DR, en los procesos CV de la AR.

En esta línea se ha sugerido que los procesos inmunológicos e inflamatorios podrían ser importantes en el desarrollo o desestabilización de la placa de aterogénesis [45]. Uno de estos mecanismos que ha despertado gran interés es la señalización vía receptores tipo *toll* (*toll like receptors* - TLR) y su influencia en el desarrollo de aterogénesis [45]. Los TLRs son una familia de receptores (se han identificado hasta 12 receptores en mamíferos) conocidos como “receptores de reconocimiento de patrón” y cuya función principal es el inicio de una respuesta inmune innata eficaz ante patógenos y otros estímulos. Este tipo de receptores, en concreto TLR4, TLR1, y TLR2 se expresan en modelos de ratón de aterosclerosis así como en placas aterogénicas de humanos [45]. Datos muy recientes destacan la implicación del TLR4 en la iniciación y progresión de aterosclerosis [46]. El TLR4 se expresa en distintos tipos celulares de la pared de vasos sanguíneos ateroscleróticos como células endoteliales, macrófagos, fibroblastos y células dendríticas [47]. El TLR4 presenta dos polimorfismos que afectan a su dominio extracelular y que generan un cambio aminoacídico: Asp299Gly y Thr399Ile. Ambos polimorfismos se han relacionado con una menor respuesta ante estímulos bacterianos [48] y por lo tanto con una menor inflamación a nivel sistémico, lo cual podría constituir un efecto protector para el riesgo CV. De hecho, se ha observado que el polimorfismo Asp299Gly se asocia con un menor riesgo de padecer aterosclerosis de la carótida así como con un menor grosor de la capa íntima-media de esta arteria [49].

Además se sabe que durante la formación y progresión de la placa de aterogénesis intervienen mecanismos proinflamatorios. La exposición de la superficie endotelial a distintos factores de riesgo, como infecciones o inflamación crónica, resulta en daño y en inflamación local del tejido endotelial. Se produce una interacción entre células T y macrófagos con secreción de citoquinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alpha (TNF α) o la interleukina 1 (IL-1), resultando en la transformación del endotelio hacia un estado protrombótico, caracterizado por un aumento en la expresión de moléculas de adhesión y de quimioquinas. Muchas de estas moléculas se consideran biomarcadores indicativos de una enfermedad aterosclerótica activa, es el caso de la proteína C reactiva (CRP), la cual estimula la secreción de moléculas de adhesión y quimioquinas, o de la IL-6, ICAM-1, TNF α , y VCAM-1 [50]. En un estudio reciente se han observado niveles elevados de estos biomarcadores en pacientes con AR en comparación con población sana y una asociación entre los niveles de VCAM-1 y el espesor de la íntima media carotídea [50]. Algunos polimorfismos en genes pueden afectar los niveles de expresión de estas moléculas y se han asociado a enfermedades CV, como es el caso de polimorfismos CRP 1059 G/C, IL-6- 174G/C, MIF- 173G/C, ICAM-1- 469E/K, y E-sel Ser128Arg, que se han asociado con un mayor riesgo de padecer aterosclerosis o angina [51, 52]. Recientemente se ha informado de la existencia de variantes polimórficas del gen CRP que alteran la actividad transcripcional del mismo y que se encuentran relacionados con los niveles basales en suero de la proteína C reactiva [53, 54].

El óxido nítrico (ON) es un importante mediador en la aparición de la disfunción endotelial previa al daño vascular. En los vasos, el ON es producido por la expresión constitutiva de la enzima óxido

nítrico sintasa endotelial (eNOS) o bien tras la activación por diversos estímulos de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS o NOS2). El ON tiene multitud de funciones en el organismo, pero su capacidad de ejercer cambios funcionales y morfológicos sobre la pared de los vasos sanguíneos, como la vasodilatación dependiente de endotelio (VED), es esencial en el mantenimiento de la homeostasis vascular y en la prevención de procesos de aterogénesis. La producción de ON por la eNOS permite un flujo sanguíneo adecuado inhibiendo la contracción de la musculatura lisa de los vasos sanguíneos y así también inhibe la generación de la placa de ateroma. En los vasos aterogénicos la vasodilatación dependiente de endotelio está alterada y esto se cree es debido a una inhibición de la actividad de la eNOS [55]. El papel de la iNOS en la aterogénesis no está claramente definido, pero se ha observado un aumento de los niveles de ARN mensajero de esta enzima en macrófagos y células del músculo liso de los vasos sanguíneos aterogénicos. Se especula que el exceso en la producción de NO que mediaría la iNOS podría aumentar el daño celular y así contribuir a la muerte celular y necrosis de tejidos que aparece en las lesiones ateroscleróticas avanzadas [55]. Los niveles de producción de estas enzimas se pueden ver afectados por polimorfismos genéticos en sus regiones reguladoras. En el exón 7 del gen de la eNOS se ha descrito un polimorfismo que genera un cambio aminoacídico de ácido glutámico por ácido aspártico (-786T/C ó Glu298Asp) que se ha asociado con predisposición a distintas enfermedades cardiovasculares y que se cree que afecta a la actividad de la enzima [56, 57]. En la región promotora del gen de la iNOS se han descrito numerosos polimorfismos, entre ellos destaca un microsatélite bialélico TAAA que afecta a la actividad del promotor de la iNOS y que además se ha asociado con enfermedades cardiovasculares [58].

Podemos concluir que el estudio a nivel genético y molecular pone de manifiesto una estrecha relación entre moléculas inflamatorias relacionadas etiopatogénicamente con las enfermedades reumáticas y con las enfermedades CV.

Justificación del estudio

Un estudio que permita establecer el riesgo de muerte por causa CV en población con enfermedades reumáticas inflamatorias y que permita adaptar o calibrar las tablas de riesgo en uso sería de gran utilidad, puesto que habitualmente se toman decisiones de iniciar un tratamiento hipolipemiante o antihipertensivo en pacientes con enfermedades reumáticas inflamatorias basándonos en riesgo de población sin el riesgo de la inflamación crónica. ¿Es necesario bajar los niveles de colesterol, o de tensión arterial o la edad a la que se debería empezar a tratar? ¿Hay otros factores que se deban añadir a las tablas de riesgo y que mejoren la utilidad predictiva en nuestros pacientes? ¿Es igual el riesgo en todas las artritis? ¿Hasta qué punto los factores genéticos que se proponen están presentes en población con o sin enfermedades inflamatorias articulares o sistémicas entendiendo por sistémicas a la inflamación vascular?

HIPÓTESIS

El riesgo de padecer un evento CV, mortal o no, parece ser mayor en pacientes con AR, APs o EA que en población de igual edad y sexo sin enfermedad inflamatoria reumática.

Las tablas de riesgo CV deberían adaptarse a la enfermedad reumática de base, pudiéndose beneficiar, desde el punto de vista de la utilidad predictiva, de la estratificación por factores de riesgo CV no clásicos o de tipo inflamatorio.

Algunos parámetros inflamatorios de detección habitual en clínica y genes candidatos, por su relevancia funcional e implicación en los procesos que conducen a aterogénesis, riesgo vascular, inflamación o respuesta inmune, podrían estar asociados con la predisposición genética de los pacientes con enfermedades reumáticas a padecer afecciones de tipo vascular.

OBJETIVOS

Objetivo principal

El objetivo principal del estudio CARMA es evaluar el papel de la inflamación crónica y de los factores de riesgo CV clásicos sobre la aparición de eventos CV y de mortalidad de causa CV en pacientes con AR, APs y EA en nuestro medio. Si se demuestra que el riesgo es distinto a una población control, se calibrarán o modificarán las tablas de riesgo SCORE para poder utilizarlas en pacientes con AR, APs o EA.

Objetivos secundarios

Se plantean los siguientes objetivos secundarios:

1. Describir la situación CV de la patología reumática inflamatoria (AR, APs, EA), tanto en cuanto a factores de riesgo como a enfermedad establecida.
2. Calcular el SCORE de riesgo CV a 10 años para las enfermedades estudiadas, tanto de forma individual como en su conjunto.
3. Analizar la prevalencia de riesgo elevado (SCORE $\geq 5\%$) en las poblaciones de pacientes y en un grupo control.
4. Estudiar la evolución clínica de la enfermedad y de los factores de riesgo, así como la aparición de nuevos eventos CV.
5. Realizar estudios genéticos para evaluar la asociación entre distintos marcadores genéticos y la predisposición a presentar eventos CV en las enfermedades estudiadas (AR, EA y APS). En concreto se pretende:
 - a. caracterizar a la muestra desde el punto de vista del tipaje HLA-DR;
 - b. analizar la influencia del gen PTPN22, variante 1858;

- c. determinar la influencia los polimorfismos Asp299Gly y Thr399Ile del gen TLR4;
- d. investigar la relación entre polimorfismos de las citoquinas proinflamatorias IL-6, IL-1A, IL-1B, IL-1RN, TNFA y MIF, así como de las moléculas de adhesión ICAM-1 y ELAM y definir posibles haplotipos en interacciones gen-gen;
- e. determinar la influencia los polimorfismos de la región promotora del gen CRP;
- f. estudiar los polimorfismos de la eNOS e iNOS y su influencia en el desarrollo de evento CV durante el seguimiento.

MÉTODOS

Diseño

Estudio observacional longitudinal prospectivo de una cohorte clínica de pacientes con AR, EA y APs para describir el perfil de riesgo cardiovascular y calcular un SCORE de riesgo a 10 años. La duración total del estudio será de 11 años.

Se realizará un corte transversal en el año basal para el estudio de la prevalencia de factores de riesgo y de enfermedad CV establecida así como para el análisis de marcadores e interacciones genéticas relacionadas con la gravedad del proceso.

Se llevarán a cabo tres visitas de seguimiento a los 2, 5 y 10 años de la visita basal o inicial.

Pacientes

Población diana

Los resultados de este estudio deben ser extrapolables a todos los pacientes con AR, EA o APs. Los hallazgos en la muestra de control deberían ser extrapolables a pacientes sin patología inflamatoria (artrosis, osteoporosis y otras).

Población accesible

Pacientes con los diagnósticos anteriores que estén siendo atendidos en consultas de Reumatología de centros de atención terciaria o secundaria españoles. Los pacientes atendidos en consultas de reumatología en nuestro país son, en general, representativos de todos los pacientes con dichos diagnósticos. El Sistema Nacional de Salud español es de acceso universal y las consultas de reumatología extra-hospitalarias sin conexión con un servicio de reumatología hospitalario muy escasas. Aunque es esperable que los pacientes con estas enfermedades que acudan a visitas médicas por reumatólogos sean pacientes con algo más de gravedad que los no atendidos en hospitales, o sólo en consultas privadas, hay una alta probabilidad de que sean representativos del paciente medio, como ya hemos demostrado en estudios previos con similares muestras [59-61].

Muestreo

Se realizará un muestreo probabilístico por conglomerados en dos fases.

En primer lugar se seleccionarán de forma aleatoria centros españoles con atención especializada en Reumatología a partir de la base de datos de la Sociedad Española de Reumatología. Se seleccionarán

tantos centros como sean necesarios para cubrir el tamaño muestral previsto, más un 20% de centros que quedarán en reserva para sustituir a los centros que no deseen participar.

En cada uno de los centros participantes se seleccionará un mismo número de pacientes consecutivos por patología (AR, EA y APS) y un grupo control (pacientes con patología no inflamatoria) hasta completar la cantidad necesaria para el tamaño muestral calculado.

Criterios de selección de los sujetos

Se seleccionarán pacientes consecutivos de las tres patologías y del grupo control siempre que cumplan, o hayan cumplido, las siguientes condiciones:

1. En el caso de AR, que haya cumplido, de forma demostrable a lo largo de la evolución, al menos 4 criterios del ACR 1987 [62]:
 - a. Rigidez matutina de al menos 1 hora de duración
 - b. Artritis de 3 ó más grupos articulares
 - c. Artritis de articulaciones de las manos
 - d. Artritis simétrica
 - e. Nódulos reumatoides
 - f. Factor reumatoide presente, determinado por cualquier método
 - g. Alteraciones radiológicas compatibles con AR
2. En el caso de EA, que haya cumplido, de forma demostrable a lo largo de la evolución, los criterios de Nueva York modificados para EA definida [63]. Se incluirían, por tanto, pacientes con el criterio radiológico presente y al menos uno de los criterios clínicos.
 - a. *Criterios clínicos:*
 - i. Dolor en la zona lumbar o dorso-lumbar de más de tres meses que mejora con el ejercicio pero no con otras medidas;
 - ii. Limitación de la movilidad de la espina lumbar en los planos sagital y frontal;
 - iii. Limitación de la expansión respiratoria
 - b. *Criterio radiológico:* sacroileítis.
3. En el caso de APs, que haya cumplido, de forma demostrable a lo largo de la evolución, todos los criterios de Moll y Wright [64]:
 - a. artritis inflamatoria (periférica o sacroilitis o espondilitis)
 - b. presencia de psoriasis
 - c. ausencia de factor reumatoide
4. Como controles se seleccionarán pacientes que no cumplan ningún criterio de enfermedad inflamatoria crónica, indicando el diagnóstico por el que se está siguiendo en reumatología. Se aceptarán diagnósticos de artrosis, de cualquier localización, osteoporosis u otros procesos no

encuadrables dentro de artritis o conectivopatías tales como lumbalgia mecánica bien caracterizada y reumatismos de partes blandas (tendinitis). Se excluirán como controles los pacientes con artrosis erosiva de manos o gota.

La duración de la enfermedad no se considerará un criterio de exclusión ni para los casos ni para los controles.

Reclutamiento

Se reclutarán aleatoriamente centros españoles con unidad de Reumatología, a partir de la base de datos de la Sociedad Española de Reumatología, la cual cubre adecuadamente (más del 90%) de los centros con reumatología del país.

En cada uno de los centros, los pacientes serán reclutados en función de su orden de llegada al servicio, no teniendo en cuenta su gravedad ni la duración de su enfermedad.

Existirán pósters disponibles para la sala de espera en los que se informará a los pacientes de la existencia del estudio.

A los pacientes y controles se les entregará una hoja informativa del estudio, previa comprobación de que cumplen los criterios de selección y que no se ha alcanzado ya el tamaño muestral para el centro.

Si el paciente accede a participar, se obtendrá su consentimiento informado y se le citará para una visita específica del mismo. De esta manera se evitará interferir con la dinámica de las consultas.

De los pacientes que no deseen participar se recogerá un mínimo de información mediante una breve entrevista que puede ser administrada en ese mismo momento. Estos datos serán analizados posteriormente para valorar las diferencias con la muestra elegida.

Se reclutarán tantos pacientes como sea necesario por centro para llegar al tamaño muestral total. Se incluirán más centros si el número de pacientes a reclutar por centro se considerara poco factible.

Los pacientes con dificultades para la participación en el estudio (rechazo, problemas para acudir a la visitas basal o a las de seguimiento) serán reemplazados por los siguientes que cumplan los criterios de selección hasta completar el número previsto en cada centro (ver apartado de Tamaño muestral más adelante).

Para el reclutamiento de los controles, se comprobará que tienen la edad (\pm 5 años) y sexo de un paciente incluido.

Se han diseñado materiales para facilitar el reclutamiento de los tres tipos de pacientes y controles por los médicos participantes.

Pérdidas de seguimiento

Con el fin de disminuir al máximo las pérdidas al seguimiento se realizará un seguimiento activo de los pacientes incluidos en la cohorte. Para cumplir este objetivo en la visita basal se recogerá información completa sobre datos de contacto propios y de al menos dos personas de contacto con quien poder comunicarse en caso de no localizar al paciente en su domicilio habitual. Además, se establecerán mecanismos para fomentar la participación de los centros y pacientes y mantener su motivación, incluido acceso a la información sobre el estudio, cartas de agradecimiento y tarjetas recordatorio.

En las visitas de seguimiento se recogerá información sobre las causas de las pérdidas (rechazo a seguir participando o defunción). En el caso de cambio de domicilio se facilitará la visita al estudio a pesar de estar en otro centro, incluso cubriendo el desplazamiento si es necesario. En el caso de pérdida por fallecimiento se recogerá la fecha de la defunción así como su causa. La fuente de esta información será triple: registro hospitalario, familia y registro oficial de la comunidad de origen. Si el paciente no puede acudir a la visita en la fecha fijada, se intentará que acuda en un plazo menor a 4 meses de la fecha fijada. En cualquier caso, es preferible que se retrase la visita a que no se produzca una visita. En el caso de pérdidas por otras causas, y siempre que el paciente se encuentre accesible, se intentará recoger la información necesaria mediante entrevista telefónica y a partir de registros hospitalarios.

Se diseñarán estrategias para mantener el contacto con los pacientes y los centros durante los periodos entre visitas para evitar el abandono de los primeros y las pérdidas de los segundos. Por ejemplo mediante el empleo de cartas de agradecimiento dirigidas a los pacientes y de informes periódicos para los centros.

Mediciones y variables

Variables principales: Puntuación SCORE y eventos cardiovasculares

La *variable principal* del estudio es el SCORE de riesgo cardiovascular que se calculará en todas las visitas. El SCORE se basa en:

- Sexo
- Edad
- Fumador¹
- Tensión arterial sistólica, en mmHg y medida por esfigmomanómetro habitual
- Colesterol total, en mmol/L (puede recogerse en mg/dl, dato disponible con mayor frecuencia en nuestro país)

Para el cálculo del SCORE se utiliza la siguiente ecuación:

En primer lugar se calcula la probabilidad de supervivencia base para enfermedad coronaria (EC) y no coronaria (ENC) para la edad actual del paciente y a los 10 años, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$S_0(Edad) = \exp\{-\exp(a) \cdot (Edad - 20)^p\}$$

$$S_0(Edad + 10) = \exp\{-\exp(a) \cdot (Edad - 10)^p\}$$

Los coeficientes a y p se obtienen de la siguiente tabla (para poblaciones con riesgo bajo):

| | EC | | ENC | |
|--------|-------|------|-------|------|
| | a | p | a | p |
| Hombre | -22.1 | 4.71 | -26.7 | 5.64 |

1. Los pacientes exfumadores cuentan como no fumadores tras un año de abandono de su hábito

Mujer -29.8 6.36 -31.0 6.62

Se calcula el valor de la siguiente ecuación para enfermedad coronaria y no coronaria:

$$w = b_C(\text{Colesterol} - 6) + b_T(\text{TAS} - 120) + b_F$$

donde los coeficientes se obtienen de la siguiente tabla:

| | EC | ENC |
|---------------------------|-------|-------|
| b_C Colesterol [mmol/l] | 0.24 | 0.02 |
| b_T TAS [mmHg] | 0.018 | 0.022 |
| b_F Fumador = SI | 0.71 | 0.63 |

El colesterol viene dado en mmol/l. Para convertir el valor de mg/dl a mmol/l basta con multiplicar por **0.02586**.

El siguiente paso consiste en calcular la probabilidad de supervivencia con esos factores de riesgo a esa edad y a 10 años:

$$S(\text{Edad}) = S_0(\text{Edad})^{\exp(w)}$$

$$S(\text{Edad} + 10) = S_0(\text{Edad} + 10)^{\exp(w)}$$

Ahora para cada tipo de enfermedad calculamos la probabilidad de supervivencia a los 10 años condicionada a la supervivencia a la edad actual:

$$S_{10}(\text{Edad}) = S(\text{Edad} + 10) / S(\text{Edad})$$

Siendo entonces el riesgo a 10 años:

$$\text{Riesgo}_{10} = 1 - S_{10}(\text{Edad})$$

Así obtenemos dos valores de riesgo REC₁₀ para Enfermedad Coronaria, RENC₁₀ para Enfermedad No Coronaria. El riesgo total corresponderá a la suma de ambos.

Posteriormente la variable se utilizará para obtener una variable dicotómica de riesgo, “**Riesgo alto**” y “**Riesgo bajo**”, según las Terceras Recomendaciones Europeas de Prevención Cardiovascular [65]. Según estas recomendaciones, se definen las siguientes prioridades (cualquiera de ellas) para la prevención de enfermedades CV (Riesgo alto) en la práctica clínica:

1. Pacientes con enfermedad coronaria establecida, enfermedad arterial periférica o enfermedad cerebrovascular aterosclerótica
2. Individuos asintomáticos que se encuentran en alto riesgo de desarrollar enfermedades CV ateroscleróticas a causa de:
 - a. varios factores de riesgo resultantes en un SCORE (riesgo de muerte a 10 años) \geq 5%
 - b. aumento excesivo de los niveles de factores de riesgo individuales:
 - colesterol \geq 8 mmol/l (320 mg/dl)
 - colesterol LDL \geq 6 mmol/l (240 mg/dl)
 - presión arterial \geq 180/110 mmHg
 - c. diabetes tipo 2 o diabetes tipo 1 con microalbuminuria
 - d. familiares de primer grado con:
 - enfermedad CV aterosclerótica de inicio temprano
 - alto riesgo aún siendo asintomáticos (esto no podrá comprobarse, así que no se incluirá en la creación de la variable)

Si el paciente recibe tratamiento hipolipemiante o antihipertensivo el riesgo está relacionado con el control de sus factores de riesgo.

En cada visita se recogerá la incidencia de eventos CV nuevos durante el período de observación previo junto con la fecha en que ocurrió el evento o de diagnóstico.

Definiciones operativas de eventos CV y mortalidad de causa CV

Se recogerán tanto del pasado (antecedentes de eventos cardiovasculares) como de forma prospectiva (eventos incidentes).

Cardiopatía isquémica. Documentación o aportación de datos suficientes para el diagnóstico de un infarto de miocardio o de angina no silente. En el caso de cardiopatía isquémica silente, se recogerá el dato, pero no computará como evento.

Accidente cerebrovascular. Cualquier proceso documentado, transitorio o establecido, de carácter hemorrágico o isquémico, que esté documentado.

Insuficiencia renal de causa arteriosclerótica: Si existen datos de insuficiencia renal crónica (creatinina sérica mayor o igual a 1,3 mg/dl con disminución del filtrado glomerular a lo largo del estudio) habiéndose descartado una causa no aterosclerótica de la insuficiencia renal (ejemplos de causas no ateroscleróticas: nefropatía IgA, glomerulonefritis rápidamente progresiva, nefropatía intersticial por fármacos).

Insuficiencia cardíaca. Se considerarán aquellos casos de insuficiencia cardíaca demostrada, no disnea no filiada, según criterios de Framingham. Para establecer el diagnóstico de insuficiencia cardíaca congestiva se necesitan, como mínimo, un criterio mayor y 2 menores [66]:

| CRITERIOS DE FRAMINGHAM | | |
|---------------------------|------------------------------|---|
| Mayores | Menores | Mayores o menores |
| DPN | Edema en MMII | Adelgazamiento \geq 4.5 kg dp de 5 días de tto |
| Distensión venosa yugular | Tos nocturna | |
| Crepitantes | Disnea de esfuerzo | |
| Cardiomegalia | Hepatomegalia | |
| Edema agudo de pulmón | Derrame pleural | |
| Galope por S3 | CV disminuída en 1/3 | |
| PVY > 16 cm H2O | Taquicardia (\geq 120lpm) | |
| Reflujo hepatoyugular + | | |

Arteriopatía periférica. Enfermedad arterial aterosclerótica en las extremidades que cursa con dolor espontáneo o con claudicación con el ejercicio físico y que se confirma por hallazgos de imagen consistentes con alteración vascular arterial mediante eco Doppler o arteriografía/angio resonancia.

Mortalidad de causa CV. Se considerará que la muerte ha sido de causa CV según la definición de del proyecto europeo SCORE [8]. Esta incluye los siguientes códigos del CIE-9:

401 a 414

- 401: HTA esencial
- 402: Cardiopatía hipertensiva
- 403: Enfermedad renal hipertensiva
- 404: Enfermedad cardíaca y renal hipertensiva
- 405: HTA secundaria
- 410: Cardiopatía isquémica
- 411: Formas agudas y subagudas de cardiopatía isquémica
- 412: Infarto de miocardio antiguo
- 413: Angina de pecho
- 414: Otras formas de cardiopatía isquémica crónica

426 a 443,

- 426: Trastornos de conducción
- 427: Disritmias cardíacas
- 428: Insuficiencia cardíaca
- 429: Descripciones y complicaciones de enfermedad cardíaca mal definidas
- 430: Hemorragia subaracnoidea
- 431: Hemorragia intracerebral
- 432: Otra hemorragia intracraneal y hemorragia intracraneal no especificada
- 433: Oclusión y estenosis de las arterias precerebrales
- 434: Oclusión de arterias cerebrales
- 435: Isquemia cerebral transitoria
- 436: Enfermedad cerebro vascular aguda mal definida
- 437: Otra enfermedad cerebrovascular y enfermedad cerebrovascular mal definida
- 438: Efectos tardíos de enfermedad cerebrovascular
- 440: Aterosclerosis
- 441: Aneurisma aórtico y disecante
- 442: Otros aneurismas
- 443: Otra enfermedad vascular periférica

Dentro de este grupo **se excluyen** las siguientes causas de muerte no arteriosclerótica:

- 426.7: Excitación auriculoventricular anómala
- 429.0: Miocarditis no especificada
- 430.0: Hemorragia subaracnoidea (hemorragia meníngea, ruptura de aneurisma cerebral congénito o aneurisma cerebral saculado)
- 432.1: Hemorragia subdural
- 437.3: Aneurisma cerebral, no roto
- 437.4: Arteritis cerebral
- 437.5: Enfermedad Moyamoya

También **se incluyen** los dos códigos siguientes:

- 798.1: Muerte instantánea
- 798.2: Muerte que tiene lugar en menos de 24 horas desde el inicio de los síntomas, sin explicación de otro tipo

Variables secundarias

Las *variables secundarias* son los factores de riesgo, clásicos (HTA, Diabetes, Hipercolesterolemia, Obesidad, Tabaquismo e Insuficiencia renal) y no clásicos (Inflamación), las *variables descriptivas* (características de los pacientes, parámetros de laboratorio) y los posibles *factores de confusión* (actividad, duración y tratamiento).

Definiciones operativas de factores de riesgo cardiovascular

Hipertensión arterial (HTA). Se definirá por la existencia de cifras de presión arterial sistólica de 140 mmHg o superior, presión arterial diastólica de 90 mmHg o superior, o la necesidad de tomar un antihipertensivo. La aplicación de la definición se basará en el promedio de dos o más lecturas de TA tomadas en diferentes días [67]. El procedimiento para la definición de hipertensión será el siguiente:

- Revisión de la historia clínica en busca del diagnóstico de HTA, tratada o no, por documentación o por cifras tensionales elevadas en repetidas ocasiones.
- Interrogatorio sobre tratamientos antihipertensivos.
- Determinación de la tensión arterial con el manguito disponible en consultas². En el caso de que se encuentre elevada en la exploración, se indicará al paciente que acuda bien a su farmacéutico, bien a su médico de cabecera, para su medición y comunique por teléfono la presión arterial de tres días distintos.

Hipercolesterolemia. La hipercolesterolemia se definirá por:

- Aparición en la historia clínica de cifras de colesterol plasmático en ayunas superiores a 240 mg/dl (6,5 mmol/L) al menos en dos ocasiones.
- Diagnóstico previo de hipercolesterolemia y tratamiento actual con hipolipemiantes o dieta.
- Casos sin determinaciones previas y cifras de colesterol plasmático en ayunas actual superior a 240 mg/dl, repetida en dos ocasiones.

² Se recogerán las determinaciones de presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD), en mmHg.

Diabetes mellitus (DM). Se utilizarán los criterios establecidos por el Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus en 2003 [68]. Según estos criterios, en los estudios epidemiológicos las estimaciones de la prevalencia e incidencia de diabetes debe basarse únicamente en una concentración plasmática de glucosa, tras ayuno nocturno, igual o superior a 7,0 mmol/L (126 mg/dl). Esta recomendación tiene por objetivo estandarizar y facilitar el trabajo de campo, especialmente teniendo en cuenta las dificultades de las pruebas de sobrecarga oral de glucosa. Es evidente que esta aproximación al diagnóstico producirá una infraestimación de la prevalencia que podría obtenerse con el uso combinado de la glucosa en ayunas y las pruebas de sobrecarga.

Para considerar a un paciente como diabético, se revisará la historia en busca de un diagnóstico documentado y se recogerá información sobre el uso de hipoglucemiantes orales o insulina. La documentación histórica o el tratamiento con hipoglucemiantes es definitorio. En caso negativo, y siempre que no se tenga acceso a analítica de los últimos 6 meses, se utilizará la determinación basal de glucosa en ayunas, estableciéndose el diagnóstico de diabetes si el valor es superior a 126 mg/dl.

Esta variable se recogerá además en varios niveles: 1) DM no insulino-dependiente, 2) DM insulino-dependiente sin repercusión orgánica demostrada (retinopatía, cardiopatía o nefropatía), 3) DM insulino-dependiente con repercusión orgánica demostrada.

Obesidad. El diagnóstico de obesidad se basará en el índice de masa corporal (kg/m^2) utilizándose los criterios OMS para su clasificación:

- Peso bajo: $\text{IMC} < 18,5$
- Peso normal: $\text{IMC } 18,5\text{-}24,9$
- Sobrepeso: $\text{IMC } 25\text{-}29,9$
- Obesidad: $\text{IMC } \geq 30$

El peso, en Kg, y la talla, en metros con dos decimales, se obtendrán directamente de su medición por balanza y tallímetro durante la visita del estudio.

Antecedentes familiares de enfermedad cardiovascular. Se definirán por la existencia de familiares de primer grado con cardiopatía isquémica (mortal o no) antes de los 50 años en el caso de los varones y antes de los 60 en el de las mujeres.

Síndrome metabólico. Para la definición de síndrome metabólico se utilizarán los criterios del *Adult Treatment Panel III* actualizados en 2005 [69], basados en la presencia de al menos tres de los siguientes factores:

- Obesidad central: Perímetro de cintura^[70] >102 cm en varones ó >88 cm en mujeres
- Hipertrigliceridemia: Concentración de triglicéridos en suero⁴ $>1,7$ mmol/l (150 mg/dl) o tratamiento farmacológico para los triglicéridos

³ La determinación del perímetro abdominal se llevará a cabo según las recomendaciones de la Sociedad Española para el estudio de la Obesidad (SEEDO) esto es con una cinta métrica flexible y milimetrada estando el sujeto en bipedestación, sin ropa y relajado. Se localizará el borde superior de las crestas iliacas y se rodeará la cintura con la cinta métrica por encima de este punto y de forma paralela al suelo, asegurando que la cinta esté ajustada pero sin comprimir la piel. La lectura se realiza después de una espiración normal.

⁴ Extracción en ayunas.

- Disminución del c-HDL: <1,0 mmol/l (40 mg/dl) en varones ó <1,3 mmol/l en mujeres (50 mg/dl)⁵ o tratamiento farmacológico
- HTA (ver arriba definiciones operativas de factores de riesgo clásicos)
- Glucemia en ayunas ≥6,1 mmol/l (110 mg/dl)

Hábitos de vida. Para la recogida de esta información se utilizarán las definiciones y codificación de la última Encuesta Nacional de Salud del año 2006 [71].

- Tabaquismo. Se recogerá en tres categorías: 1) Fumador actual y magnitud del hábito (<10; 10-20; >20 cigarrillos/día), 2) Ex fumador (tiempo sin fumar >1 año) y 3) Nunca fumador
- Actividad física: 1) En el trabajo, 2) En el tiempo libre

Hiperuricemia. No se trata de un factor de riesgo clásico. Se recogerá el dato del ácido úrico en sangre en una extracción en ayunas.

Características de los pacientes

Para la descripción de los pacientes y para poder realizar análisis de subgrupos o de factores modificadores o confusores, se incluirán los siguientes datos sociodemográficos:

- **Sexo.**
- **Edad.** Tanto en el momento de iniciar el seguimiento, como en el momento de ocurrir el evento o en el momento de censurar el archivo de datos (edad a la visita) o al diagnóstico. Todos los datos de edad se obtendrán de las respectivas fechas menos la fecha de nacimiento.
- **Nivel de estudios.** Se recogerá en 7 categorías: 1) Menos de primarios, 2) Primarios, 3) Formación profesional, 4) EGB / ESO, 5) BUP / COU / Bachillerato, 6) Estudios de Grado Medio y 7) Estudios Universitarios.

Datos de la enfermedad reumática inflamatoria

- **Duración de la enfermedad** en años. Se recogerá la fecha del inicio de los síntomas y la fecha del diagnóstico. Siempre que sea posible se utilizará la duración desde el inicio de los síntomas; en los casos en los que no se disponga de esta información se empleará la duración desde el diagnóstico.
- **Parámetros de inflamación-actividad en AR:**
 - ✓ Proteína C reactiva (PCR) ultrasensible
 - ✓ Velocidad de sedimentación eritrocitaria
 - ✓ Factor reumatoide (FR) positivo en alguna ocasión y valor actual (Nefelometría, ELISA o el método disponible)
 - ✓ Anticuerpos anti péptidos cítricos citrulinados (anti-CCP) en alguna ocasión y valor actual (ELISA o el método disponible)
 - ✓ DAS-28 (4 variables)
 - ✓ HAQ

⁵ Extracción sanguínea para la determinación del colesterol en ayunas. Se recogerán: Lipoproteínas de alta densidad (HDL); lipoproteínas de baja densidad (LDL), Apolipoproteínas A y B y lipoproteína a (Lp(a)).

- **Parámetros de inflamación-actividad en EA:**
 - ✓ Proteína C reactiva (PCR) ultrasensible
 - ✓ Velocidad de sedimentación eritrocitaria
 - ✓ BASDAI
 - ✓ BASFI
 - ✓ Antígeno HLA-B27, aunque no se considere un parámetro de inflamación
 - ✓ Recuento de articulaciones tumefactas (sobre 44 articulaciones)
 - ✓ Recuento de entesis dolorosas (sobre 13 entesis)
- **Parámetros de inflamación-actividad en APs:**
 - ✓ Onicopatía (si/no)
 - ✓ Afectación cutánea: Índice de gravedad cuantificada por área PASI
 - ✓ Proteína C reactiva (PCR) ultrasensible
 - ✓ Velocidad de sedimentación eritrocitaria
 - ✓ DAS adaptado a APs, con recuento de 78 articulaciones dolorosas y 76 tumefactas
 - ✓ Recuento de entesis dolorosas (sobre 13 entesis)
 - ✓ HAQ

Los parámetros de inflamación-actividad sólo se recogerán en la visita basal.

- **Tratamiento actual para la enfermedad reumática.** Se recogerá la utilización actual y desde la última visita, sin dosis, pero si con tiempo de exposición total.
 - ✓ Metotrexato
 - ✓ Ácido fólico/folínico
 - ✓ Ciclosporina
 - ✓ Salazopirina
 - ✓ Antipalúdicos (sólo en AR)
 - ✓ Sales de oro (sólo en AR)
 - ✓ Biológicos: Infliximab, Etanercept, Adalimumab, Rituximab, Anakinra
 - ✓ AINEs: Naproxeno, Diclofenaco, Aceclofenaco, Ibuprofeno, Indometacina, Inhibidores de la COX-2
 - ✓ Esteroides en tratamiento continuado (>3 meses)
 - ✓ Otros

En el caso de los controles únicamente se recogerá tratamiento con AINEs, esteroides y otros fármacos.

Comorbilidad

Se recogerá la presencia o no de comorbilidad distinta a la cardiovascular mediante lista de comprobación. Se recogerá una bioquímica de rutina⁶. Además se recogerá el tratamiento de la comorbilidad y de los factores de riesgo:

- ✓ Hipoglucemiantes orales
- ✓ Insulina
- ✓ Estatinas

⁶ Esta se realizará a partir de sangre extraída en ayunas e incluirá: glucemia, urea, creatinina, ácido úrico, proteínas totales, función hepática, iones, y determinación de microalbúmina en orina, además de las determinaciones necesarias para la evaluación de la actividad de la enfermedad inflamatoria y el perfil lipídico.

- ✓ Diuréticos
- ✓ IECA
- ✓ Inhibidores directos de la renina
- ✓ ARA-II
- ✓ Bloqueantes de los canales del calcio
- ✓ Antiagregantes plaquetarios
- ✓ Anticoagulantes
- ✓ Nitratos
- ✓ Beta-bloqueantes
- ✓ Estrógenos
- ✓ Raloxifeno

Determinantes genéticos

En la visita basal se obtendrá una muestra de saliva para la extracción centralizada de DNA y el análisis genético subsiguiente.

Métodos de identificación de polimorfismos -SNPs- conocidos. Técnica de PCR a tiempo real:

La reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (Real Time PCR) es un método cuantitativo preciso para determinar niveles de DNA y RNA en los tejidos. Sus aplicaciones son muy diversas permitiendo la detección de SNPs, determinación de niveles de expresión genética, detección de DNA viral en tejidos y tipaje de SNPs. Se basa en la detección y cuantificación de un marcador fluorescente, cuya señal irá aumentando proporcionalmente a medida que aumenta la cantidad de producto de PCR. En la reacción de PCR se incluye una sonda oligonucleotídica unida a un marcador fluorescente en un extremo y un “quencher” en el opuesto (sonda TaqMan). La proximidad del quencher reduce la señal fluorescente emitida por el fluoróforo. Esta sonda híbrida específicamente con la secuencia diana entre los oligonucleótidos utilizados, durante las fases de alineamiento y extensión. Durante la reacción, la actividad 5' nucleasa de la Taq polimerasa va liberando la sonda que previamente se había unido al DNA y al aumentar la separación entre el quencher y el fluoróforo se produce un aumento de la fluorescencia.

Para la discriminación alélica de SNPs, se diseña una sonda específica para cada alelo que se diferencian en el fluoróforo que la marca (fluorescent dye 6-carboxyfluorescein (FAM), tetracloro-6-carboxifluoresceína (TET). Un cambio entre la sonda y la secuencia diana reduce la eficiencia de la hibridación de la sonda y su posterior liberación, así un incremento significativo en la señal de uno de los fluoróforos indicará que alelo se encuentra presente en la muestra que se está analizando. La instrumentación empleada son real-time PCR ABI PRISM 7500Fast o 7900.

Evaluación de la gravedad

Se evaluará la gravedad de cada una de las patologías en estudio mediante la presencia en la historia clínica de los siguientes criterios:

- a) Artritis Reumatoide: Presencia de artritis erosiva (sí/no)
- b) Espondilitis anquilosante:
 - Actividad persistente (VSG o PCR persistentemente elevadas)
 - Existencia de artritis periférica

- Afectación precoz de la cadera definida como aquella que aparece en los primeros 10 años desde el inicio de la enfermedad con afectación clínica (dolor y limitación de movimiento) y afectación en pruebas de imagen (radiología o resonancia)
- Cambios radiológicos en columna vertebral en el momento del diagnóstico
- Falta de respuesta a AINEs

c) Artritis psoriásica:

- Inicio de enfermedad como poliartritis
- Nº de articulaciones inflamadas acumuladas (al menos más de 5)
- Nº de FAMEs utilizados (al menos más de 2)
- Presencia de dactilitis
- Presencia de erosiones

A partir de estos parámetros se construirá un índice de gravedad para cada enfermedad.

Recogida de datos

Cada centro designará un responsable que se encargará de mantener el proyecto activo y de asegurar que la recogida de la información se realiza de forma estandarizada.

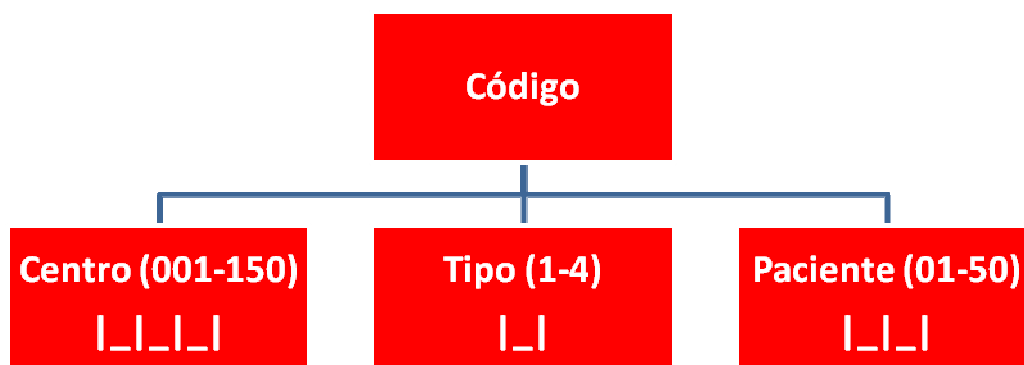
Una vez seleccionados los centros participantes, y antes del inicio del estudio, se establecerán consensos sobre los métodos de análisis de datos de laboratorio, límites de detección de los parámetros, puntos de corte de las escalas incluidas y definiciones operativas a utilizar.

Se han diseñado cuadernos de recogida de datos (CRD), uno por tipo de paciente y control, más otro mínimo para aquellos pacientes que no deseen participar tras haber sido seleccionados. Estos CRDs estarán disponibles en formato electrónico pdf con filtros y podrán imprimirse y ser enviados a la central logística.

Codificación

Las bases de datos del proyecto se diseñarán para que los pacientes incluidos no puedan identificarse. Se llevará a cabo un enmascaramiento reversible. Cada reumatólogo participante dispondrá de un listado de pacientes con sus códigos al que sólo él tendrá acceso.

El código del paciente incluirá tres dígitos de la codificación del centro, uno de la codificación del tipo de paciente (1=AR, 2=EA, 3=APs, 4=control) y dos dígitos por el orden de inclusión, según la figura:



CONTROL DE CALIDAD

Se realizará un estudio piloto para evaluar las dificultades y problemas del CRD. Los resultados del estudio piloto permitirán modificar los apartados necesarios hasta conseguir la comprensión adecuada del CRD y una mayor sencillez en su cumplimentación. Una vez realizadas las correcciones oportunas se llevará a cabo un entrenamiento sobre estandarización de la recogida de la información necesaria.

Se redactará un manual del investigador para describir y estandarizar el proceso así como para resolver las posibles dudas que puedan surgir durante la cumplimentación del CRD. Este manual también contendrá información sobre el control de las pérdidas durante el seguimiento y los procesos de verificación y control de calidad de los datos.

Los filtros del CRD evitarán la inclusión de valores fuera de rango y de valores perdidos.

Se llevará a cabo una monitorización *in situ* de centros seleccionados al azar por monitores acreditados. Estos validarán los datos en los CRDs enviados con los disponibles en las historias clínicas.

CONSIDERACIONES ESTADÍSTICAS

Tamaño muestral

Para el cálculo del tamaño muestral nos basamos en los siguientes supuestos:

1. En la población general la prevalencia de riesgo elevado (>5%) es del 10% [10].
2. Asumimos que es necesario modificar las tablas de riesgo si este supera en un 40% al que predicen las tablas. Esto significa que queremos detectar un 40% de más riesgo (14%) en enfermedades inflamatorias crónicas si realmente existe.
3. Aceptamos un error alfa=0,05 y un error beta=0,20

Para detectar una diferencia de proporciones de 4 puntos (10% frente a 14%) necesitamos una muestra de 1.085 para cada uno de los grupos.

Redondeamos a 1.100 por grupo para asumir pérdidas en el seguimiento, corregir el efecto de diseño en el cálculo de prevalencias y para permitir el análisis de modelos de regresión múltiple.

La muestra prevista total es de 4.400 pacientes (AR, EA y APS más controles de enfermedades no inflamatorias). Dependiendo del número total de centros participantes, el número final de pacientes por centro será de:

| Centros participantes | N a reclutar por grupo en cada centro | N total por centro | N total |
|-----------------------|---------------------------------------|--------------------|---------|
| 100 | 11 | 44 | 4400 |
| 75 | 15 | 60 | 4500 |
| 70 | 15 | 60 | 4200 |

| | | | |
|----|----|-----|------|
| 50 | 22 | 88 | 4400 |
| 44 | 25 | 100 | 4400 |

No consideramos que más de 100 pacientes por centro sea un reclutamiento factible.

Análisis estadístico

Una vez finalizada la recogida de datos se realizará un proceso de depuración de la base de datos y una descripción de los centros participantes y los pacientes seleccionados. Se estudiará la distribución de las variables y se realizarán pruebas de normalidad para definir los métodos estadísticos a utilizar.

Todos los análisis se ajustarán por la duración de la enfermedad, bien mediante estratificación o añadiendo la variable duración de la enfermedad en los modelos. El análisis se llevará a cabo con el paquete estadístico Stata/IC 10.1 (StataCorp LP, College Station, TX 77845 USA).

Se tendrá en cuenta el efecto del diseño por conglomerados, ajustando los análisis por una variable que defina a cada centro y utilizando las herramientas de encuestas poblacionales de este paquete estadístico.

En cada una de las visitas se realizarán diferentes tipos de análisis.

Visita basal

- Estudio descriptivo de todas las variables de interés mediante medidas de tendencia central y de dispersión (media, mediana, desviación estándar, rango intercuartílico) en el caso de variables cuantitativas y distribución de porcentajes en el caso de las cualitativas, comparando los resultados entre los diferentes grupos de pacientes y entre éstos y el grupo control.
- Estimación (intervalo de confianza del 95%; IC95%) de la prevalencia de factores de riesgo CV, tanto clásicos como no clásicos, tanto para cada una de las patologías como de forma global.
- Estimación del SCORE medio (IC95%) global y por sexos y de la prevalencia de Riesgo Alto según la definición operativa. Los pacientes con eventos CV previos se excluirán del cálculo del score puesto que son pacientes de alto riesgo ya definido.
- Análisis del efecto de confusión del IMC y de la inflamación en las posibles diferencias entre pacientes y controles en los factores de riesgo CV, mediante el empleo de modelos de regresión ajustados.
- Estudio de correlación entre los marcadores de inflamación o actividad de las tres patologías seleccionadas y los factores de riesgo CV.

Visitas de seguimiento

Se realizarán tres visitas de seguimiento, a los 2,5; 5; y 10 años. En cada una de ellas se llevarán a cabo los siguientes análisis:

- Estudio de las pérdidas: se contabilizarán las pérdidas y se definirán sus posibles causas. Además, se analizará la magnitud y dirección del posible sesgo mediante la comparación de las características basales entre las pérdidas al seguimiento y los sujetos que permanecen en el estudio.

- Estimación de la incidencia (IC95%) de eventos CV, según definiciones operativas. Se excluirán del cálculo de incidencia a aquellos pacientes con eventos cardiovasculares previos a la basal debido a que ya tenían alto riesgo antes de entrar en el estudio.
- Estimación de la tasa estandarizada de mortalidad por causa CV (IC95%).
- Asociación entre diversos factores de riesgo y aparición de nuevos eventos CV mediante análisis bivariantes.

Cálculo de la función de riesgo

El riesgo de enfermedad cardiovascular mortal en 10 años se calculará mediante un modelo de riesgos proporcionales de Weibull. En este modelo la función de riesgo se basa en la edad del individuo en lugar de en su tiempo de observación. El empleo de la edad como variable de tiempo permite hacer estimaciones para todo el rango de edad observado en el estudio. Por otra parte, este modelo permite hacer estimaciones para seguimientos superiores a la duración del periodo de seguimiento del estudio; el cálculo del riesgo a 10 años se basará en la probabilidad condicionada de mortalidad cardiovascular para los siguientes 10 años, suponiendo que el individuo ha sobrevivido a la edad índice. En los modelos se introducirán los factores de riesgo, clásicos y no clásicos, que en el análisis bivalente así como los posibles factores de confusión. Se efectuarán dos estimaciones de riesgo independientes (modelo para enfermedad coronaria y para enfermedad no coronaria) y con dos métodos de evaluación (colesterol y relación colesterol/HDL). El riesgo cardiovascular total será la suma de los riesgos de enfermedad coronaria y no coronaria. Los modelos construidos para el seguimiento a los 2,5 y 5 años se validarán con los datos del último corte a 10 años.

Por último, se diseñarán tablas de riesgo y se calculará la prevalencia de riesgo elevado (Score $\geq 5\%$) en las poblaciones de pacientes (independientes y global) y en el grupo control.

Análisis de la influencia alélica o genotípica

El equilibrio de Hardy-Weinberg se investigará empleando una prueba de bondad de ajuste que analiza las frecuencias génicas de los individuos control [Arlequín 5.1]. Este test analiza si los genotipos observados corresponden a la distribución teórica esperada. Las diferencias en las frecuencias observadas de los distintos genotipos, haplotipos o alelos, entre el grupo de los pacientes y el grupo control, se evaluarán mediante el método de la Chi-cuadrado (Mantel-Haenszel) a partir de tablas de contingencia 3 x 2 ó 2 x 2; la prueba exacta de Fisher se aplicará cuando alguno de los valores esperados sea inferior a 5. Se calculará la *odds ratio* (IC95%) según el método de Woolf con la modificación de Haldane.

También se evaluará, en los casos necesarios, el posible desequilibrio de unión entre dos loci mediante el valor r^2 [Haploview v2.03].

Aspectos éticos

El presente estudio será desarrollado de acuerdo con la Declaración de Helsinki y sus revisiones posteriores. Todos los participantes invitados a participar en el estudio recibirán información sobre los objetivos del mismo y sobre el carácter confidencial de sus datos, tras lo que se les pedirá que firmen un consentimiento. Se recabará un consentimiento separado para el análisis genético.

Los centros participantes asignarán un código de identificación a cada uno de sus pacientes y mantendrán la confidencialidad de los datos de acuerdo a la normativa vigente de la Agencia Oficial de Protección de Datos.

Evaluación beneficio-riesgo para los sujetos de investigación

El riesgo para los pacientes participantes en el estudio será el mismo que si no participaran en el mismo, puesto que no se realizan pruebas invasivas ni se modificarán tratamientos como consecuencia del proyecto.

El beneficio esperado para los pacientes participantes en el estudio tampoco se verá afectado. No obstante, un mayor conocimiento sobre el riesgo CV de este tipo de pacientes podrá ser beneficioso para dichos pacientes en el futuro.

Información y consentimiento

Cada paciente recibirá un texto de información en el que se ofrecerá una explicación completa en términos coloquiales de la finalidad del estudio, así como información sobre los datos que se van a recoger (datos clínicos y obtención de muestras de sangre u orina). Los médicos participantes son responsables de explicar a todos los pacientes, antes de su inclusión en el estudio, la naturaleza, finalidad, procedimientos y duración esperada del estudio, así como los datos que se recogerán durante la participación en el mismo. Se le concederá a cada paciente el tiempo necesario para tomar una decisión y realizar las preguntas oportunas. El paciente debe ser informado acerca de su derecho a abandonar el estudio en cualquier momento sin que ello le suponga perjuicio alguno.

El consentimiento informado será siempre por escrito. Dicho documento permanecerá bajo la custodia del investigador, pudiendo ser requerido por monitores del estudio para ser auditado. El consentimiento informado en ningún caso deberá salir del centro ni ser archivado en ningún otro lugar.

Confidencialidad de los datos

Se guardarán las normas de seguridad y confidencialidad propias de este tipo de estudios.

El tratamiento de los datos de carácter personal requeridos en este estudio se rige por la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre. El anonimato del paciente se mantendrá en todo momento, al utilizarse exclusivamente un código numérico de identificación. Las anotaciones recogidas en la historia clínica de los pacientes podrán ser revisadas por las autoridades sanitarias. Los detalles permanecerán siempre confidenciales y no se revelará el nombre del paciente en ningún caso.

Interferencia con los hábitos de prescripción del médico

En ningún caso se interferirá ni se incentivará la utilización de ningún tratamiento específico ni para la enfermedad inflamatoria reumática ni para la CV si la hubiera. La naturaleza del estudio es únicamente observacional. Los médicos participantes seguirán su práctica médica habitual y las recomendaciones vigentes.

LIMITACIONES

Una limitación importante es el reclutamiento de un elevado número de pacientes. En especial preocupa el elevado número de pacientes con APs a reclutar por centro. Hemos considerado que el máximo número por centro sería de 25 pacientes de este tipo. Si no se lograra el tamaño muestral de algún grupo específico se podrían utilizar las siguientes estrategias: aumentar el número de centros participantes, solicitar a centros grandes que recluten a más pacientes con la patología en cuestión, calcular el poder estadístico en el primer año con la muestra reclutada y decidir si es factible continuar sin apurar la muestra.

Otra limitación importante es la necesidad de realizar un seguimiento prolongado (10 años) a una cohorte de más de 4.000 pacientes. Para obtener estimaciones fiables y no sesgadas es preciso conseguir un seguimiento lo más completo posible. Para ello se diseñarán e implementarán estrategias que fomenten la participación y el seguimiento de los centros, médicos y pacientes participantes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Prevention of coronary heart disease in clinical practice. Recommendations of the Second Joint Task Force of European and other Societies on coronary prevention. *Eur Heart J.* 1998 Oct; 19(10):1434-1503.
2. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation.* 1998 May 12; 97(18):1837-1847.
3. D'Agostino RB, Russell MW, Huse DM, Ellison RC, Silbershatz H, Wilson PW, et al. Primary and subsequent coronary risk appraisal: new results from the Framingham study. *Am Heart J.* 2000 Feb; 139(2 Pt 1):272-281.
4. Marrugat J, Solanas P, D'Agostino R, Sullivan L, Ordovas J, Cordon F, et al. [Coronary risk estimation in Spain using a calibrated Framingham function]. *Rev Esp Cardiol.* 2003 Mar; 56(3):253-261.
5. Menotti A, Lanti M, Puddu PE, Kromhout D. Coronary heart disease incidence in northern and southern European populations: a reanalysis of the seven countries study for a European coronary risk chart. *Heart.* 2000 Sep; 84(3):238-244.
6. Marrugat J, Subirana I, Comin E, Cabezas C, Vila J, Elosua R, et al. Validity of an adaptation of the Framingham cardiovascular risk function: the VERIFICA Study. *J Epidemiol Community Health.* 2007 Jan; 61(1):40-47.
7. Aranceta J, Perez Rodrigo C, Foz Sala M, Mantilla T, Serra Majem L, Moreno B, et al. [Tables of coronary risk evaluation adapted to the Spanish population: the DORICA study]. *Med Clin (Barc).* 2004 Nov 20; 123(18):686-691.
8. Conroy RM, Pyorala K, Fitzgerald AP, Sans S, Menotti A, De Backer G, et al. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *Eur Heart J.* 2003 Jun; 24(11):987-1003.
9. Buitrago Ramirez F, Canon Barroso L, Diaz Herrera N, Cruces Muro E, Bravo Simon B, Perez Sanchez I. [Comparison of the SCORE function chart and the Framingham-REGICOR equation to estimate the cardiovascular risk in an urban population after 10 years of follow-up]. *Med Clin (Barc).* 2006 Sep 16; 127(10):368-373.
10. Sans S, Fitzgerald AP, Royo D, Conroy R, Graham I. [Calibrating the SCORE cardiovascular risk chart for use in Spain]. *Rev Esp Cardiol.* 2007 May; 60(5):476-485.
11. Goodson N, Marks J, Lunt M, Symmons D. Cardiovascular admissions and mortality in an inception cohort of patients with rheumatoid arthritis with onset in the 1980s and 1990s. *Ann Rheum Dis.* 2005 Nov; 64(11):1595-1601.
12. Solomon DH, Karlson EW, Rimm EB, Cannuscio CC, Mandl LA, Manson JE, et al. Cardiovascular morbidity and mortality in women diagnosed with rheumatoid arthritis. *Circulation.* 2003 Mar 11; 107(9):1303-1307.
13. del Rincon ID, Williams K, Stern MP, Freeman GL, Escalante A. High incidence of cardiovascular events in a rheumatoid arthritis cohort not explained by traditional cardiac risk factors. *Arthritis Rheum.* 2001 Dec; 44(12):2737-2745.
14. del Rincon I, Escalante A. Atherosclerotic cardiovascular disease in rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Rep.* 2003 Aug; 5(4):278-286.
15. Shoenfeld Y, Gerli R, Doria A, Matsuura E, Cerinic MM, Ronda N, et al. Accelerated atherosclerosis in autoimmune rheumatic diseases. *Circulation.* 2005 Nov 22; 112(21):3337-3347.
16. Gonzalez-Gay MA, Gonzalez-Juanatey C, Martin J. Rheumatoid arthritis: a disease associated with accelerated atherogenesis. *Semin Arthritis Rheum.* 2005 Aug; 35(1):8-17.
17. Gonzalez-Juanatey C, Testa A, Garcia-Castelo A, Garcia-Porrúa C, Llorca J, Vidan J, et al. HLA-DRB1 status affects endothelial function in treated patients with rheumatoid arthritis. *Am J Med.* 2003 Jun 1; 114(8):647-652.

18. Vaudo G, Marchesi S, Gerli R, Allegrucci R, Giordano A, Siepi D, et al. Endothelial dysfunction in young patients with rheumatoid arthritis and low disease activity. *Ann Rheum Dis.* 2004 Jan; 63(1):31-35.
19. Gonzalez-Juanatey C, Llorca J, Testa A, Revuelta J, Garcia-Porrúa C, Gonzalez-Gay MA. Increased prevalence of severe subclinical atherosclerotic findings in long-term treated rheumatoid arthritis patients without clinically evident atherosclerotic disease. *Medicine (Baltimore).* 2003 Nov; 82(6):407-413.
20. Dessein PH, Joffe BI, Veller MG, Stevens BA, Tobias M, Reddi K, et al. Traditional and nontraditional cardiovascular risk factors are associated with atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2005 Mar; 32(3):435-442.
21. Gonzalez-Gay MA, Gonzalez-Juanatey C, Lopez-Diaz MJ, Pineiro A, Garcia-Porrúa C, Miranda-Filloy JA, et al. HLA-DRB1 and persistent chronic inflammation contribute to cardiovascular events and cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2007 Feb 15; 57(1):125-132.
22. Del Rincon I, Williams K, Stern MP, Freeman GL, O'Leary DH, Escalante A. Association between carotid atherosclerosis and markers of inflammation in rheumatoid arthritis patients and healthy subjects. *Arthritis Rheum.* 2003 Jul; 48(7):1833-1840.
23. Gonzalez-Gay MA, Gonzalez-Juanatey C, Pineiro A, Garcia-Porrúa C, Testa A, Llorca J. High-grade C-reactive protein elevation correlates with accelerated atherogenesis in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2005 Jul; 32(7):1219-1223.
24. Gonzalez-Juanatey C, Llorca J, Martin J, Gonzalez-Gay MA. Carotid Intima-Media Thickness Predicts the Development of Cardiovascular Events in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Semin Arthritis Rheum.* 2008 Mar 11.
25. Peters MJ, van der Horst-Bruinsma IE, Dijkmans BA, Nurmohamed MT. Cardiovascular risk profile of patients with spondylarthropathies, particularly ankylosing spondylitis and psoriatic arthritis. *Semin Arthritis Rheum.* 2004 Dec; 34(3):585-592.
26. Heeneman S, Daemen MJ. Cardiovascular risks in spondyloarthritides. *Curr Opin Rheumatol.* 2007 Jul; 19(4):358-362.
27. Hollan I, Saatvedt K, Almdahl SM, Mikkelsen K, Moer R, Halvorsen P, et al. Spondyloarthritis: a strong predictor of early coronary artery bypass grafting. *Scand J Rheumatol.* 2008 Jan-Feb; 37(1):18-22.
28. Neimann AL, Shin DB, Wang X, Margolis DJ, Troxel AB, Gelfand JM. Prevalence of cardiovascular risk factors in patients with psoriasis. *J Am Acad Dermatol.* 2006 Nov; 55(5):829-835.
29. Mallbris L, Akre O, Granath F, Yin L, Lindelof B, Ekbom A, et al. Increased risk for cardiovascular mortality in psoriasis inpatients but not in outpatients. *Eur J Epidemiol.* 2004; 19(3):225-230.
30. Poikolainen K, Karvonen J, Pukkala E. Excess mortality related to alcohol and smoking among hospital-treated patients with psoriasis. *Arch Dermatol.* 1999 Dec; 135(12):1490-1493.
31. Lindegard B. Mortality and causes of death among psoriatics. *Dermatologica.* 1989; 179(2):91-92.
32. Gonzalez-Juanatey C, Llorca J, Miranda-Filloy JA, Amigo-Diaz E, Testa A, Garcia-Porrúa C, et al. Endothelial dysfunction in psoriatic arthritis patients without clinically evident cardiovascular disease or classic atherosclerosis risk factors. *Arthritis Rheum.* 2007 Mar 15; 57(2):287-293.
33. Gonzalez-Juanatey C, Llorca J, Amigo-Diaz E, Dierssen T, Martin J, Gonzalez-Gay MA. High prevalence of subclinical atherosclerosis in psoriatic arthritis patients without clinically evident cardiovascular disease or classic atherosclerosis risk factors. *Arthritis Rheum.* 2007 Aug 15; 57(6):1074-1080.
34. Braun J, Bollow M, Remlinger G, Eggens U, Rudwaleit M, Distler A, et al. Prevalence of spondylarthropathies in HLA-B27 positive and negative blood donors. *Arthritis Rheum.* 1998 Jan; 41(1):58-67.
35. Lehtinen K. Mortality and causes of death in 398 patients admitted to hospital with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.* 1993 Mar; 52(3):174-176.

36. Divecha H, Sattar N, Rumley A, Cherry L, Lowe GD, Sturrock R. Cardiovascular risk parameters in men with ankylosing spondylitis in comparison with non-inflammatory control subjects: relevance of systemic inflammation. *Clin Sci (Lond)*. 2005 Aug; 109(2):171-176.
37. Lautermann D, Braun J. Ankylosing spondylitis--cardiac manifestations. *Clin Exp Rheumatol*. 2002 Nov-Dec; 20(6 Suppl 28):S11-15.
38. Alves MG, Espirito-Santo J, Queiroz MV, Madeira H, Macieira-Coelho E. Cardiac alterations in ankylosing spondylitis. *Angiology*. 1988 Jul; 39(7 Pt 1):567-571.
39. van Halm VP, van Denderen JC, Peters MJ, Twisk JW, van der Paardt M, van der Horst-Bruinsma IE, et al. Increased disease activity is associated with a deteriorated lipid profile in patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis*. 2006 Nov; 65(11):1473-1477.
40. Abou-Raya A, Abou-Raya S. Inflammation: a pivotal link between autoimmune diseases and atherosclerosis. *Autoimmun Rev*. 2006 May; 5(5):331-337.
41. Matthey DL, Thomson W, Ollier WE, Batley M, Davies PG, Gough AK, et al. Association of DRB1 shared epitope genotypes with early mortality in rheumatoid arthritis: results of eighteen years of followup from the early rheumatoid arthritis study. *Arthritis Rheum*. 2007 May; 56(5):1408-1416.
42. Farragher TM, Goodson NJ, Naseem H, Silman AJ, Thomson W, Symmons D, et al. Association of the HLA-DRB1 gene with premature death, particularly from cardiovascular disease, in patients with rheumatoid arthritis and inflammatory polyarthritis. *Arthritis Rheum*. 2008 Feb; 58(2):359-369.
43. Orozco G, Rueda B, Martin J. Genetic basis of rheumatoid arthritis. *Biomed Pharmacother*. 2006 Dec; 60(10):656-662.
44. Pertovaara M, Heliovaara M, Raitala A, Oja SS, Knekt P, Hurme M. The activity of the immunoregulatory enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase is decreased in smokers. *Clin Exp Immunol*. 2006 Sep; 145(3):469-473.
45. Hansson GK, Robertson AK, Soderberg-Naucler C. Inflammation and atherosclerosis. *Annu Rev Pathol*. 2006; 1:297-329.
46. Michelsen KS, Doherty TM, Shah PK, Arditi M. TLR signaling: an emerging bridge from innate immunity to atherogenesis. *J Immunol*. 2004 Nov 15; 173(10):5901-5907.
47. Pasterkamp G, Van Keulen JK, De Kleijn DP. Role of Toll-like receptor 4 in the initiation and progression of atherosclerotic disease. *Eur J Clin Invest*. 2004 May; 34(5):328-334.
48. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, et al. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet*. 2000 Jun; 25(2):187-191.
49. Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, Wiedermann CJ, Oberhollenzer F, Bonora E, et al. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N Engl J Med*. 2002 Jul 18; 347(3):185-192.
50. DeGraba TJ. Immunogenetic susceptibility of atherosclerotic stroke: implications on current and future treatment of vascular inflammation. *Stroke*. 2004 Nov; 35(11 Suppl 1):2712-2719.
51. Dessein PH, Joffe BI, Singh S. Biomarkers of endothelial dysfunction, cardiovascular risk factors and atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2005; 7(3):R634-643.
52. Flex A, Gaetani E, Papaleo P, Straface G, Proia AS, Pecorini G, et al. Proinflammatory genetic profiles in subjects with history of ischemic stroke. *Stroke*. 2004 Oct; 35(10):2270-2275.
53. Szalai AJ, Wu J, Lange EM, McCrory MA, Langefeld CD, Williams A, et al. Single-nucleotide polymorphisms in the C-reactive protein (CRP) gene promoter that affect transcription factor binding, alter transcriptional activity, and associate with differences in baseline serum CRP level. *J Mol Med*. 2005 Jun; 83(6):440-447.
54. Carlson CS, Aldred SF, Lee PK, Tracy RP, Schwartz SM, Rieder M, et al. Polymorphisms within the C-reactive protein (CRP) promoter region are associated with plasma CRP levels. *Am J Hum Genet*. 2005 Jul; 77(1):64-77.
55. Wilcox JN, Subramanian RR, Sundell CL, Tracey WR, Pollock JS, Harrison DG, et al. Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997 Nov; 17(11):2479-2488.
56. Wang XL, Wang J. Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease. *Mol Genet Metab*. 2000 Aug; 70(4):241-251.

57. Yoshimura M, Yasue H, Nakayama M, Shimasaki Y, Ogawa H, Kugiyama K, et al. Genetic risk factors for coronary artery spasm: significance of endothelial nitric oxide synthase gene T-786-->C and missense Glu298Asp variants. *J Investig Med*. 2000 Sep; 48(5):367-374.
58. Morris BJ, Glenn CL, Wilcken DE, Wang XL. Influence of an inducible nitric oxide synthase promoter variant on clinical variables in patients with coronary artery disease. *Clin Sci (Lond)*. 2001 May; 100(5):551-556.
59. Carmona L, Gonzalez-Alvaro I, Balsa A, Angel Belmonte M, Tena X, Sanmarti R. Rheumatoid arthritis in Spain: occurrence of extra-articular manifestations and estimates of disease severity. *Ann Rheum Dis*. 2003 Sep; 62(9):897-900.
60. Gonzalez-Alvaro I, Hernandez-Garcia C, Villaverde Garcia V, Vargas E, Ortiz AM. [Variations in the drug treatment of rheumatoid arthritis in Spain]. *Med Clin (Barc)*. 2002 Jun 1; 118(20):771-776.
61. Carbonell J, Cobo T, Balsa A, Descalzo MA, Carmona L. The incidence of rheumatoid arthritis in Spain: results from a nationwide primary care registry. *Rheumatology (Oxford)*. 2008 Jul; 47(7):1088-1092.
62. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1988 Mar; 31(3):315-324.
63. van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria. *Arthritis Rheum*. 1984 Apr; 27(4):361-368.
64. Moll JM, Wright V. Psoriatic arthritis. *Semin Arthritis Rheum*. 1973; 3(1):55-78.
65. De Backer G, Ambrosioni E, Borch-Johnsen K, Brotons C, Cifkova R, Dallongeville J, et al. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. Third Joint Task Force of European and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice. *Eur Heart J*. 2003 Sep; 24(17):1601-1610.
66. Braunwald E. Insuficiencia cardiaca. En: Harrison: Principios de Medicina Interna. McGraw-Hill-Interamericana de España S.A., 14ª Edición 1998. Basado en: Ho KKL et al. *Circulation* 1993; 88(1):107-15.
67. The sixth report of the Joint National Committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure. *Arch Intern Med*. 1997 Nov 24; 157(21):2413-2446.
68. The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 2003; 26(Suppl 1):S5-S20.
69. 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 Dec 17; 106(25):3143-3421.
70. Consenso SEEDO 2007 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapéutica. [4 de septiembre de 2008]; Disponible en: http://www.seedo.es/portals/seedo/consenso/Consenso_SEEDO_2007.pdf
71. Encuesta Nacional de Salud 2006. [4 de septiembre de 2008]; Disponible en: <http://www.msc.es/estadEstudios/estadisticas/encuestaNacional/encuesta2006.htm>