

Ácidos grasos omega-3 y enfermedad cardiovascular

Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease

Dra. Valeria Zago

CONICET; Laboratorio de Lípidos y Aterosclerosis, Cátedra de Bioquímica Clínica I, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica; Instituto de Fisiopatología y Bioquímica Clínica (INFIBIOC), Universidad de Buenos Aires, Ciudad de Buenos Aires, Argentina

El interés en los posibles beneficios cardiovasculares de los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 (AG n-3) no es nuevo, comenzó en la década de 1940^{1,2} y se amplificó con un ensayo histórico posterior que mostró una reducción del riesgo de enfermedad cardiovascular (ECV) después de un infarto agudo de miocardio.³ Sin embargo, desde entonces ha circulado mucha controversia debido a resultados discordantes entre varios estudios, e incluso metanálisis, lo que hace que se sigan estudiando para tratar de entender mejor los mecanismos por los cuales podrían tener o no esos efectos sobre la ECV.

¿CUÁLES SON LOS TIPOS Y FUENTES DE AG N-3?

Los AG n-3 son ácidos grasos esenciales, por lo cual deben obtenerse a través de la dieta, ya que los seres humanos carecen de las enzimas necesarias para sintetizarlos.⁴ Los AG n-3 más relevantes son tres: alfa-linolénico (ALA), eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA).

Los AG n-3 existen en varias fuentes: productos vegetales como nueces, aceites vegetales, semillas de chía, nueces y semillas de lino son fuentes dietéticas de ALA.⁵ Los seres humanos convierten un pequeño porcentaje de ALA en DHA mediante pasos enzimáticos, que incluyen el EPA como intermediario.

El EPA y el DHA también pueden existir en fuentes dietéticas de origen marino, como el pescado, los mariscos y las microalgas.⁶ Los AG n-3 a menudo se consumen en forma de suplementos de aceite de

pescado. Aunque estos suplementos han ganado popularidad, su impacto en la mitigación del riesgo cardiovascular (CV) es limitado debido a la falta de regulación en el procesamiento y a una calidad poco clara en cuanto al contenido de EPA o DHA.⁷ Finalmente, los AG n-3 existen en formulaciones purificadas altamente concentradas, disponibles con prescripción médica, tanto de mezclas EPA/DHA como de icosapenteno de etilo (IPE, éster etílico estable purificado de EPA), y es este último estudiado en importantes ensayos clínicos recientes.

¿CUÁL ES EL ROL DE LOS AG N-3 EN LA ECV?

A pesar del control eficaz de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) con intervenciones orales y no orales, el riesgo CV persiste, probablemente debido, en parte, a los niveles elevados de lipoproteínas ricas en triglicéridos (LRT), un tipo de dislipidemia particularmente prevalente en pacientes con diabetes y enfermedades metabólicas.⁸⁻¹⁰

Los triglicéridos (TG) elevados se pueden utilizar como marcador de niveles altos de estas lipoproteínas, y la creciente evidencia clínica ha asociado la hipertrigliceridemia con el riesgo residual de ECV aterosclerótica.¹¹⁻¹³ Los datos que respaldan la relación causal entre los TG y la ECV han llevado a centrarse en abordar la hipertrigliceridemia para disminuir progresivamente el riesgo de futuros eventos CV.

Sin embargo, dichos estudios no pueden determinar la independencia de los TG como factor de riesgo, ya que las variantes a menudo tienen efectos

pleiotrópicos que pueden influir en la etiología de la enfermedad.¹⁴ De hecho, las LRT incitan a la inflamación en un grado mucho mayor que las partículas de LDL y, por lo tanto, el aumento de estas lipoproteínas puede contribuir al componente inflamatorio del riesgo residual.¹⁵

Además, las terapias hipolipemiantes para la hipertrigliceridemia, como los fibratos y la niacina, no han demostrado beneficios para mitigar el riesgo CV cuando se usan junto con estatinas. Dado que los AG n-3 también pueden reducir eficazmente los niveles de TG, ocuparon un lugar central cuando varios ensayos mostraron resultados incongruentes en la reducción de los eventos CV. Se ha planteado la hipótesis de que el beneficio potencial de los AG n-3 para disminuir los eventos CV puede ir más allá de sus efectos reductores de TG y que estaría dado por efectos pleiotrópicos que conducen a una reducción de la aterosclerosis.

¿CUÁLES SON LOS MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS AG N-3?

Reducción de TG. Los AG n-3 reducen los TG mediante varios mecanismos que continúan investigándose activamente. En particular, los AG n-3 aumentan la tasa de oxidación de los ácidos grasos e inhiben la acil-CoA:1,2-diacilglicerolaciltransferasa (DGAT) que, a su vez, reduce la lipogénesis y la posterior producción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) en el hígado.^{16,17}

Además, el EPA inhibe la lipólisis inducida por citoquinas y la expresión genética relacionada en el tejido adiposo.^{18,19} Si bien no se comprende completamente la contribución a la reducción de TG, el EPA es un potente agonista de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR), en comparación con otros ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, por su sigla en inglés).²⁰ Se sabe que los agonistas de PPAR reducen los TG, incluidas las tiazolidindionas (agonistas de PPAR- γ) y los fibratos (agonistas de PPAR- α).

Finalmente, también se ha demostrado que el tratamiento con IPE disminuye los niveles de apolipoproteína C3 (apoC3) en pacientes con TG elevados, lo que causa mayor actividad de la lipoproteína lipasa y endocitosis de partículas

de lipoproteína mediada por receptores.²¹ Más recientemente, Grevengoed y col. identificaron un mecanismo potencialmente nuevo para reducir los TG al caracterizar abundantes N-acil taurinas (NAT) derivadas de AG n-3 en la bilis y el plasma.²² Ciertos miembros de estas NAT tuvieron efectos potentes al inhibir la hidrólisis de triacilglicerol y absorción de lípidos por parte de los enterocitos intestinales, lo que resulta en niveles más bajos de TG en el plasma humano y en el hígado de animales alimentados con una dieta rica en grasas. Por lo tanto, los mecanismos precisos de reducción de TG para los AG-n3 continúan evolucionando, pero es probable que sea un proceso multifactorial relacionado con la lipogénesis, la beta oxidación, la actividad de la lipoproteína lipasa y la expresión de genes vinculados con el metabolismo adiposo de lípidos y lipoproteínas.

Mecanismos más allá de la reducción de los triglicéridos

Las hipótesis actuales incluyen efectos pleiotrópicos mediados por EPA y efectos antiinflamatorios y antitrombóticos posteriores. Los ensayos MARINE y ANCHOR con IPE sugieren efectos antiinflamatorios, con reducción de LDL oxidadas, lipoproteínas remanentes, fosfolipasa A2 asociada con lipoproteínas (Lp-PLA2) y proteína C-reactiva de alta sensibilidad (PCRhs),²³ al tiempo que aumentan la secreción de la citoquina interleuquina (IL)-10, en comparación con los controles con placebo.²⁴ También existen diferencias entre EPA y DHA en sus efectos sobre la oxidación de lípidos y la función endotelial,²⁵ que probablemente estén mediados por variaciones en la forma en que se integran en la membrana celular.²⁶ El EPA estabiliza la bicapa de fosfolípidos al permitir que el colesterol permanezca distribuido de manera más uniforme, mientras que el DHA afecta la fluidez de la membrana al promover la formación de dominios desordenados, lo que posteriormente altera la membrana celular.²⁷ La reducción de los dominios ricos en colesterol mediados por el EPA puede aliviar la inflamación y mejorar la disfunción endotelial. Dado que la aterosclerosis es producto de la disfunción e inflamación endotelial y se asocia con cambios en la estructura lipídica de la membrana con aumento de la permeabilidad, oxidación de los lípidos y generación de especies

reactivas de oxígeno, la capacidad de modular estas vías con EPA es prometedora.

¿DISMINUYEN LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES?

Se han realizado varios ensayos clínicos aleatorizados de AG n-3 para reducir eventos CV. El estudio histórico inicial fue el GISSI-Prevenzione, que evaluó la eficacia de los AG n-3 (1 g de EPA y DHA) en 11 323 sobrevivientes de un infarto agudo de miocardio (IAM) reciente. Mostró una reducción del 10% de los eventos CV graves en los pacientes tratados con suplementos, en comparación con los controles no tratados. Sin embargo, solo el 5% de los pacientes tomaban estatinas al inicio del estudio, lo que hace que sea menos generalizable a la práctica clínica actual.³ Sin embargo, ensayos clínicos posteriores a gran escala y en diferentes poblaciones, no lograron demostrar el beneficio de los AG n-3: el estudio ORIGIN (1 g de EPA + DHA) investigó una población de pacientes con alto riesgo de sufrir eventos CV que tenían intolerancia a la glucosa o diabetes; el estudio ASCEND (1 g de EPA + DHA), también analizó a pacientes con diabetes, pero sin enfermedad CV establecida; el STRENGTH (4 g/día de EPA + DHA), hizo foco en pacientes con alto riesgo CV con hipertrigliceridemia y niveles bajos de colesterol asociado con lipoproteínas de alta densidad (HDLc), mientras que el OMEMI (1.9 g de EPA + DHA) investigó a pacientes de entre 70 y 82 años con IAM reciente.

Si bien los ensayos discutidos anteriormente incluyeron formulaciones combinadas de EPA y DHA, el estudio JELIS, en 2007, investigó de manera específica 1.8 g de IPE vs. tratamiento con estatinas en pacientes sin antecedentes de ECV. Hubo una reducción del riesgo relativo del 19% en eventos de ECV ateroesclerótica, durante una mediana de seguimiento de 4.6 años. Sorprendentemente, la disminución de los eventos coronarios observados con el EPA fue independiente de la reducción del LDLc, lo que indica que otros factores influyen en estos efectos beneficiosos. Además, el EPA fue más eficaz en el grupo de pacientes con niveles altos de TG (≥ 150 mg/dl) y niveles bajos de HDL (< 40 mg/dl), en los que hubo una reducción del 52% en los eventos de ECV.²⁸ En 2019 se publicó el REDUCE-IT, un estudio aleatorizado y a doble ciego que

evaluó el aporte suplementario con 4 g/día de IPE vs. placebo en 8179 pacientes en prevención secundaria, tratados con dosis moderada y alta de estatinas, y que fueron seguidos durante 4.9 años.²⁹ Este estudio incluyó pacientes con ECV o diabetes más otro factor de riesgo CV, con valores de TG entre 135 y 499 mg/dl. Durante el seguimiento se observó una reducción del 25% en la mortalidad CV, el IAM y el accidente cerebrovascular (ACV) no fatal, la revascularización coronaria o la angina inestable. Los criterios secundarios de valoración se redujeron un 26%. Cabe resaltar que la dosis total utilizada de 4 g diarios fue una dosis más alta que la de ensayos anteriores, y la formulación de un éster etílico de EPA altamente purificado también difería de estudios anteriores que no habían logrado mostrar beneficios con los AG n-3. En comparación, el JELIS había utilizado una dosis más baja de IPE: 1.8 g. En el REDUCE-IT se informaron más eventos adversos relacionados con sangrado y hospitalización por fibrilación/aleteo auricular. Por otro lado, la dosis de 4 g se asoció con niveles séricos de EPA similares a los hallados en el JELIS, pero en una población japonesa con alto consumo de pescado. Los niveles de EPA plasmáticos, entonces, no parecen justificar estos efectos adversos.

El ensayo RESPECT-EPA examinó específicamente la utilidad del IPE en una población en prevención secundaria; 2506 pacientes japoneses con enfermedad coronaria estable y una relación EPA/ácido araquidónico inferior a 0.4 fueron asignados al azar a 1.8 g de IPE más estatina o a estatina sola. Se observó una tendencia hacia el beneficio del IPE en el criterio de valoración primario (muerte CV, IAM no mortal, infarto cerebral no mortal, angina inestable y revascularización coronaria) y reducción significativa en el criterio de valoración secundario (muerte cardíaca súbita, IAM, angina inestable o revascularización coronaria), resultados que se suman a la evidencia existente del beneficio del EPA en la disminución de los eventos coronarios, independientemente del grupo placebo, a pesar de no ser tan robusto.

Por lo tanto, si bien los ensayos con AG n-3 mixtos no han logrado reducir los eventos CV, el REDUCE-IT demostró rigurosamente la eficacia de dosis altas de IPE en pacientes con

hipertrigliceridemia que toman estatinas con máxima tolerancia, y con ECV o diabetes y factores de riesgo de ECV. Sumado a esto, varios estudios de imágenes han confirmado el beneficio de las formulaciones de EPA con respecto a la aterosclerosis. El ensayo CHERRY, que utilizó IPE en combinación con pitavastatina, mostró una reducción significativa en el volumen del ateroma (evaluado mediante ecografía intravascular), en comparación con pitavastatina sola. Además, en estudio EVAPORATE, 4 g/día de IPE redujeron las tasas de progresión de la placa y afectaron el volumen y la composición de esta en un ensayo de 80 pacientes.³⁰

¿CUÁLES SON LAS RECOMENDACIONES ACTUALES?

Si bien la dieta saludable es un pilar de la prevención CV y hoy en día se aconseja la dieta mediterránea o similar (clase I, nivel A), con un aporte de AG n-3 a través del pescado, a partir de los resultados del REDUCE-IT y sus diversos subestudios, las directrices para el tratamiento de las dislipidemias en el adulto han incorporado al IPE en sus recomendaciones.

Actualmente, se recomienda al IPE como complemento del tratamiento con estatinas en máxima dosis tolerada, para reducir el riesgo de IAM, ACV, revascularización coronaria y angina inestable que requiera hospitalización, en pacientes adultos con TG en ayunas o sin ayuno > 150 mg/dl y ECV o diabetes establecida y más de dos factores de riesgo de ECV. No existen criterios particulares para los niveles de LDLc, ya que el IPE proporciona beneficio CV, independientemente de los valores iniciales de LDLc. Además, como complemento de la dieta para reducir los niveles de TG en pacientes adultos con hipertrigliceridemia grave (≥ 500 mg/dl). Sin embargo, la prescripción de AG n-3 en dosis altas en pacientes con fibrilación auricular o aleteo mal controlado debería evitarse, dado los resultados observados tanto en el REDUCE-IT como en el STRENGTH de mayor riesgo para estos.

Las directrices de la Asociación Estadounidense de Diabetes de 2020 establecen que para los pacientes que toman estatinas, con valores de LDLc bien controlados y de TG entre 135 y 499 mg/dl,

se puede considerar la adición de IPE para reducir el riesgo CV (recomendación de nivel A). Las guías de la Sociedad Europea de Cardiología (ESC)/Sociedad Europea de Aterosclerosis (EAS) de 2019, recomiendan IPE 2 g dos veces al día en combinación con una estatina en pacientes con niveles de TG de 135 a 499 mg/dl (clase IIa, nivel B). Además, las Guías de Prevención de la ESC de 2021 recomiendan IPE en pacientes de alto riesgo si los niveles de TG aún están elevados (> 135 mg/dl), a pesar de estar tomando estatinas y adoptar medidas de estilo de vida (clase IIb). De manera similar, las directrices de la Asociación Nacional de Lípidos (NLA) también recomiendan IPE en pacientes mayores de 45 años con ECV aterosclerótica clínica, o en mayores de 50 años con diabetes y más de un factor de riesgo, con TG entre 135 y 499 mg/dl con estatinas máximamente toleradas (clase I, nivel B).

¿QUÉ ES Y QUÉ UTILIDAD TIENE EL ÍNDICE OMEGA-3?

Dado que la concentración de AG n-3 varía entre los diferentes alimentos y, además, varios factores pueden afectar sus niveles en suero luego de una ingesta rica en AG n-3, medir la cantidad de AG n-3 no es un indicador fiable del nivel de estos AG en el organismo. Como los AG n-3 al absorberse pasan a formar parte de las membranas celulares, en 2004 William S. Harris y Clemens Von Schacky³¹ propusieron utilizar el índice omega-3, calculándolo como el porcentaje de la membrana total de los glóbulos rojos formado por EPA y DHA, para evaluar mejor la cantidad de AG n-3 como indicador de riesgo CV.

Se demostró que sus niveles tienen una correlación directa con el riesgo de muerte por enfermedad coronaria, donde un valor > 8% disminuyó el riesgo y un porcentaje inferior al 4% lo aumentó.³¹ Por lo tanto, hoy en día el índice omega-3 es una medición objetiva de los niveles endógenos de AG n-3, específicamente para EPA y DHA, y puede usarse para evaluar: el estado inicial de AG n-3, la respuesta a la terapia con AG n-3, como objetivo clínico para la salud CV y, si se utiliza de manera constante en ensayos clínicos, puede hacer que los estudios futuros sean más fácilmente interpretables y comparables.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sinclair, H.M. The Diet of Canadian Indians and Eskimos. *Proc Nutr Soc* 12:69-82, 1953.
2. Bang, H.O, Dyerberg, J. Plasma Lipids and Lipoproteins In Greenlandic West Coast Eskimos. *Acta Med Scand* 192: 85-94,1972.
3. Marchioli, R. Dietary supplementation with N-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: Results of the GISSI-Prevenzione trial. *Lancet* 354: 447-455,1999.
4. Bhatt DL, Budoff MJ, Mason RP. A revolution in Omega-3 fatty acid research. *J Am Coll Cardiol* 76:2098-101,2020.
5. Weinberg RL, Brook RD, Rubenfire M, Eagle KA. Cardiovascular impact of nutritional supplementation with Omega-3 fatty acids: jACC focus seminar. *J Am Coll Cardiol* 77:593-608, 2021.
6. Bergé JP, Barnathan G. Fatty acids from lipids of marine organisms: molecular biodiversity, roles as biomarkers, biologically active compounds, and economical aspects. In: Ulber R, Le Gal Y, editors. *Marine biotechnology I*. Berlin, Heidelberg:Springer Berlin Heidelberg. p. 49e125, 2005.
7. Sherratt SCR, Lero M, Mason RP. Are dietary fish oil supplements appropriate for dyslipidemia management? A review of the evidence. *Curr Opin Lipidol* 31:94-100, 2020.
8. Ganda OP, Bhatt DL, Mason RP, Miller M, Boden WE. Unmet need for adjunctive dyslipidemia therapy in hypertriglyceridemia management. *J Am Coll Cardiol* 72:330-43, 2018.
9. Libby P. Triglycerides on the rise: should we swap seats on the seesaw? *Eur Heart J* 36:774-6, 2015.
10. Tall AR, Thomas DG, Gonzalez-Cabodevilla AG, Goldberg IJ. Addressing dyslipidemic risk beyond LDL-cholesterol. *J Clin Invest* 132(1):e148559, 2022.
11. Sarwar N, Danesh J, Eiriksdottir G, Sigurdsson G, Wareham N, Bingham S, et al. Triglycerides and the risk of coronary heart disease: 10,158 incident cases among 262,525 participants in 29 western prospective studies. *Circulation* 115:450-458, 2007.
12. Varbo A, Benn M, Tybjaerg-Hansen A, Jørgensen AB, Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG. Remnant cholesterol as a causal risk factor for ischemic heart disease. *J Am Coll Cardiol* 61:427-436, 2013.
13. Nordestgaard BG, Benn M, Schnohr P, Tybjaerg-Hansen A. Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women. *JAMA* 298:299-308, 2007.
14. Burgess S, Freitag DF, Khan H, Gorman DN, Thompson SG. Using multivariable Mendelian randomization to disentangle the causal effects of lipid fractions. *PLoS ONE* 9:e108891, 2014.
15. Hansen SEJ, Madsen CM, Varbo A, Nordestgaard BG. Low-Grade Inflammation in the Association between Mild-to-Moderate Hypertriglyceridemia and Risk of Acute Pancreatitis: A Study of More Than 115000 Individuals from the General Population. *Clin Chem* 65:321-32, 2019.
16. Oscarsson J, Hurt-Camejo E. Omega-3 fatty acids eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid and their mechanisms of action on apolipoprotein B-containing lipoproteins in humans: a review. *Lipids Health Dis* 16:149, 2017.
17. Shearer GC, Savinova OV, Harris WS. Fish oil—how does it reduce plasma triglycerides? *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1821:843e51, 2012.
18. Lee M-S, Kwun I-S, Kim Y. Eicosapentaenoic acid increases lipolysis through up-regulation of the lipolytic gene expression and down-regulation of the adipogenic gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Genes Nutr* 2:327e30, 2008.
19. Lorente-Cebrian S, Bustos M, Marti A, Fernández-Galilea M, Martinez JA, Moreno-Aliaga MJ. Eicosapentaenoic acid inhibits tumour necrosis factor- α -induced lipolysis in murine cultured adipocytes. *J Nutr Biochem* 23:218e27, 2012.

20. Xu HE, Lambert MH, Montana VG, Parks DJ, Blanchard SG, Brown PJ, et al. Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Mol Cell* 3:397e403, 1999.
21. Ballantyne CM, Braeckman RA, Philip S, Stirtan WG, Doyle RT, Soni PN, et al. Icosapent ethyl (icosapentaenoic acid ethyl ester): effects on plasma apolipoprotein C-III levels in patients from the MARINE and ANCHOR studies. *Journal of Clinical Lipidology* 10:635e45. e631, 2016.
22. Grevengoed TJ, Trammell SAJ, Svenningsen JS, Makarov MV, Svava Nielsen T, Brings Jacobsen JC, et al. An abundant biliary metabolite derived from dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids regulates triglycerides. *J Clin Investig* 131(6):e143861, 2021.
23. Bays HE, Ballantyne CM, Braeckman RA, Stirtan WG, Soni PN. Icosapent ethyl, a pure ethyl ester of eicosapentaenoic acid: effects on circulating markers of inflammation from the MARINE and ANCHOR studies. *Am J Cardiovasc Drugs* 13:37-46, 2013.
24. Satoh-Asahara N, Shimatsu A, Sasaki Y, Nakaoka H, Himeno A, Tochiya M, et al. Highly purified eicosapentaenoic acid increases interleukin-10 levels of peripheral blood monocytes in obese patients with dyslipidemia. *Diabetes Care* 35:2631e9, 2012.
25. Sherratt SCR, Dawoud H, Bhatt DL, Malinski T, Mason RP. Omega-3 and omega-6 fatty acids have distinct effects on endothelial fatty acid content and nitric oxide bioavailability. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 173:102337, 2021.
26. Sherratt SCR, Juliano RA, Mason RP. Eicosapentaenoic acid (EPA) has optimal chain length and degree of unsaturation to inhibit oxidation of small dense LDL and membrane cholesterol domains as compared to related fatty acids in vitro. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1862:183254, 2020.
27. Jacobs ML, Faizi HA, Peruzzi JA, Vlahovska PM, Kamat NP. EPA and DHA differentially modulate membrane elasticity in the presence of cholesterol. *Biophys J* 120: 2317-2329, 2021.
28. Yokoyama M, Origasa H, Matsuzaki M, Matsuzawa Y, Saito Y, Ishikawa Y, et al. Effects of eicosapentaenoic acid on major coronary events in hypercholesterolaemic patients (JELIS): a randomised open-label, blinded endpoint analysis. *Lancet* 369:1090-1098, 2007.
29. Bhatt DL, Steg PG, Brinton EA, Jacobson TA, Miller M, Tardif J-C, et al. Rationale and design of REDUCE-IT: reduction of cardiovascular events with icosapent ethyl-intervention trial. *Clin Cardiol* 40:138-148, 2017.
30. Budoff MJ, Bhatt DL, Kinninger A, Lakshmanan S, Muhlestein JB, Le VT, et al. Effect of icosapent ethyl on progression of coronary atherosclerosis in patients with elevated triglycerides on statin therapy: final results of the EVAPORATE trial. *Eur Heart J* 41:3925-3932, 2020.
31. Harris WS, Von Schacky C. The Omega-3 Index: a new risk factor for death from coronary heart disease? *Prev Med*, 39:212-220, 2004.