

ESTUDIO PREDIMED

EFFECTOS DE LA DIETA MEDITERRÁNEA SOBRE LA PREVENCIÓN PRIMARIA DE LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

Protocolo de Investigación

Abril 2009

INDICE

A. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	4
1. Objetivos principales	5
2. Otros objetivos	5
B. ANTECEDENTES	5
1. La dieta Mediterránea	5
2. Dieta Mediterránea y prevención cardiovascular: Evidencias	6
3. Limitaciones de los estudios sobre la Diet Med en la prevención cardiovascular.....	7
4. Aceite de oliva y prevención cardiovascular	8
5. Frutos secos y prevención cardiovascular	9
6. Dietas altas en MUFA en sujetos diabéticos, obesos y de alto riesgo vascular.....	10
7. Importancia de los estudios aleatorizados en prevención primaria.....	11
C. ESTUDIOS PRELIMINARES.....	11
1. Ensayos preliminares con aceite de oliva y frutos secos.....	11
1. El contenido fenólico del AOV disminuye la oxidación de las LDL <i>in vivo</i>	11
2. Las nueces mejoran la función endotelial en sujetos hipercolesterolémicos.....	12
2. Estudio caso-control de Diet Med y riesgo de infarto de miocardio.....	12
3. Estudio piloto del ensayo PREDIMED	12
D. DISEÑO Y MÉTODOS	14
1. Resumen	14
2. Diseño	15
3. Variables	15
4. Tamaño de la muestra	16
5. Cronograma y financiación	16
6. Población a estudiar / selección de candidatos	17
7. Reclutamiento	18
8. Visitas	18
9. Intervención	20
1. Intervención de los 3 grupos	20
2. Visitas de seguimiento	22
10. Descripción de las dietas (intervención).....	22
1. Menús	22
2. Administración y distribución	23
3. Promoción de la adherencia	23
4. Valoración del cumplimiento	24
11. Medidas y Determinaciones	24
1. Cuestionarios	25
2. Presión arterial y otros	25
3. Electrocardiogramas	25
4. Muestras biológicas	25
5. Valoración de los Eventos	26
12. Análisis estadístico	27

13. Monitorización	27
1. Calidad de los datos	28
2. Análisis de los datos	28
14. Estructura Organizativa	28
15. Bases de datos	29
16. Limitaciones del estudio	30
17. Plan de diseminación de los resultados.....		30
E. Bibliografía	32

A. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El estudio **PREDIMED (Prevención con Dieta Mediterránea)** es un ensayo clínico aleatorizado de intervención dietética que pretende averiguar si la Dieta Mediterránea (Diet Med) suplementada con aceite de oliva virgen (AOV) o frutos secos evita la aparición de complicaciones cardiovasculares mayores (muerte de origen cardiovascular, infarto de miocardio y/o accidente vascular cerebral) en sujetos de alto riesgo vascular, comparado con una dieta baja en grasa. Como variables secundarias, se pretenden valorar también los efectos de la Diet Med sobre la mortalidad global e incidencia de insuficiencia cardíaca, diabetes, cáncer, deterioro cognitivo y otras enfermedades neuro-degenerativas.

Los hábitos alimentarios tienen un papel crucial en el mantenimiento de la salud, tanto a nivel individual como poblacional (**Hu, 2002**). Actualmente, la Diet Med se considera el modelo de alimentación más saludable. Los resultados de dos amplios estudios europeos, el seguimiento de la cohorte EPIC de Grecia (**Trichopoulou, 2003**) y el estudio HALE en población anciana (**Knoops, 2004**), así como los observados en dos estudios realizados en los Estados Unidos, el *NIH-AARP Diet and Health study* (**Mitrou, 2007**) y el *Nurses Health study* (**Fung, 2009**), sugieren que una elevada adherencia a la Diet Med tradicional se asocia tanto a una menor mortalidad global, como a una menor mortalidad por cardiopatía coronaria. En un ensayo clínico aleatorizado con un modelo modificado de Diet Med (enriquecida con ácido alfa-linolénico y poco aceite de oliva) versus una dieta control, el *Lyon Diet Heart Study* (**De Lorgeril, 1999**), se concluyó que la Diet Med se asocia a una marcada reducción de la mortalidad cardiovascular y de la incidencia de complicaciones cardiovasculares en pacientes que ya han sufrido un infarto de miocardio. Sin embargo, no se ha realizado ningún ensayo clínico aleatorizado que haya valorado si los efectos de la Diet Med son superiores a los de una dieta baja en todo tipo de grasa, que es la que actualmente se recomienda en la prevención primaria de la cardiopatía coronaria.

El posible efecto preventivo de la Diet Med sobre el aumento de la carga de enfermedad de la cardiopatía coronaria (**Reddy, 2004; WHO, 2003a**) hace que la respuesta a la pregunta formulada se considere del máximo interés público. No obstante existen otros motivos para realizar un amplio estudio sobre los efectos cardioprotectores de la Diet Med, como los siguientes: a) Los países del Sur de Europa han seguido esta dieta desde hace muchos años sin que se hayan observado efectos perjudiciales y, además, su esperanza de vida es la más elevada del mundo (**Willett, 1995**), b) Estos países presentan una baja incidencia de enfermedad coronaria (**Tunstall-Pedoe, 1999**) a pesar de tener una incidencia igual o incluso superior de factores clásicos de riesgo vascular comparado con la población de los Estados Unidos (**Gabriel, 2008**); c) la diversidad de observaciones mecanísticas y epidemiológicas de los efectos beneficiosos sobre la salud del consumo de los distintos componentes la Diet Med, como ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) del aceite de oliva (**Pérez-Jiménez, 2005**) o frutos secos (**Kris-Etherton, 2001**); y d) la gran palatabilidad, aceptación y cumplimiento de la Diet Med comparado con la dieta baja en grasa (**McManus, 2001**).

En la era de la medicina basada en la evidencia, las recomendaciones nutricionales al público deberían basarse en los resultados de grandes ensayos clínicos que analicen variables finales “potentes”. No obstante, todavía no se dispone de este nivel de evidencia ni respecto a la Diet Med, ni a sus principales componentes (p.e., aceite de oliva). En

Octubre del 2003, se inició el reclutamiento de participantes para un ensayo clínico de prevención primaria, el **estudio PREDIMED**. Se trata de un estudio aleatorizado, multicéntrico, de grupos paralelos, financiado por el Instituto de Investigación Carlos III (ISCIII), y dirigido a estudiar los efectos sobre el riesgo de complicaciones cardiovasculares mayores de dos intervenciones dietéticas suplementadas con aceite de oliva virgen (AOV) o frutos secos, comparado con el efecto de una dieta baja en todo tipo de grasa.

A.1 Objetivos principales

- 1. Valorar los efectos de la Diet Med sobre un agregado de complicaciones cardiovasculares mayores (mortalidad de origen cardiovascular, infarto de miocardio y accidente vascular cerebral), comparado con los efectos de una dieta baja en grasa.
- 2. Dentro de la Diet Med, valorar si el enriquecimiento de la dieta con AOV tiene un efecto diferente al enriquecimiento con una mezcla de frutos secos (nueces, avellanas y almendras) sobre un agregado de complicaciones cardiovasculares mayores (mortalidad de origen cardiovascular, infarto de miocardio y accidente vascular cerebral), comparado con los efectos de una dieta baja en grasa.

A.2 Otros objetivos

También se valorarán los efectos sobre variables secundarias como: mortalidad por cualquier causa e incidencia de insuficiencia cardiaca, diabetes mellitus, cáncer y demencia; y sobre variables intermedias, como presión arterial (PA), glucemia, perfil lipídico, marcadores de inflamación y otros marcadores intermedios de riesgo cardiovascular para entender mejor cómo los cambios dietéticos modifican el riesgo de sufrir complicaciones cardiovasculares.

B. ANTECEDENTES Y SIGNIFICADO

Las enfermedades cardiovasculares son la causa más frecuente de muerte en el mundo en el siglo XXI. Los países occidentales, incluidos los Estados Unidos de América, continúan teniendo un tasa absoluta de morbilidad y mortalidad cardiovascular inaceptablemente alta. Además, estas enfermedades están adquiriendo las características de una epidemia encubierta en los países en vías de desarrollo (**Reddy, 2004; WHO, 2003a, WHO, 2003b**). En cambio, la incidencia de la enfermedad coronaria es sorprendentemente baja en algunos países desarrollados como Francia, España, Grecia, Italia y Portugal, lo que conlleva que tengan una esperanza de vida mucho mayor que los países del Norte de Europa e incluso que los Estados Unidos (**WHO, 1993; Tunstall-Pedoe, 1999**). Estas diferencias se explican sobre todo por el patrón de alimentación propio de los países mediterráneos, que se conoce como Dieta Mediterránea.

B.1 La Dieta Mediterránea (Diet Med)

Se considera como Diet Med al patrón tradicional de alimentación de los países en los que típicamente crecen los olivos como Creta, Grecia y Sur de Italia de finales de la década de los años 50 y principios de los 60. Las principales características de esta dieta son: a) un alto consumo de cereales, legumbres, frutos secos, frutas y verduras; b) un consumo relativamente alto de grasa (hasta un 40% del total de ingesta energética), principalmente en forma de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA), que deben suponer un 20 por ciento o más de la ingesta energética total; c) uso de aceite de oliva para uso

culinario y para aliñar las ensaladas y las verduras, como fuente principal de grasa visible; d) consumo moderado – alto de pescado; e) consumo en cantidades moderadas o bajas de pollo y derivados lácteos (generalmente en forma de yogurt o queso fresco); f) bajo consumo de carnes rojas y productos derivados de la carne; g) consumo moderado de alcohol, principalmente en forma de vino tinto consumido con las comidas (**Trichopoulou, 1995; Martinez-Gonzalez, 2004a**).

El hecho de que se tratara de un patrón de alimentación basado en una tradición verdaderamente antigua y sin efectos perjudiciales evidentes despertó el interés de muchos investigadores que pasaron a considerarla como una herramienta muy prometedora desde el punto de vista de la salud pública. De hecho, amplios sectores de la comunidad científica y de los propios consumidores creen en el efecto cardioprotector de la Diet Med. Esta hipótesis encaja bien con el paradigma actual de estudio de patrones dietéticos, en lugar de alimentos concretos o de nutrientes en la epidemiología nutricional (**Hu, 2002**). La base racional de esta hipótesis es que tanto los alimentos como los nutrientes pueden tener efectos sinérgicos o antagónicos cuando se consumen de forma combinada. Además, los patrones globales representan mejor la alimentación de las personas de la comunidad, por lo que proporcionan información epidemiológica más real (**Jacques, 2001; Jacobs, 2003**). Por otra parte, los patrones dietéticos tiene un mayor potencial de aceptación, palatabilidad y futuro cumplimiento cuando se recomiendan a la población. Por ello, a pesar de su relativamente alto contenido en grasa, las ventajas teóricas de la Diet Med son múltiples. Para aumentar el consumo de verduras debe tenerse en cuenta que los aliños sin grasa o con poca grasa suelen ser menos aceptados que los que utilizan aceite de oliva u otras fuentes de grasa. El saltear o freír las verduras con cantidades variables de aceite de oliva, en lugar utilizar aliños bajos en grasa o cocinarlas al vapor aumenta el gusto y, con ello, se consigue un mantenimiento a largo plazo de dietas ricas en verduras y hortalizas. Estas técnicas de preparación y cocinado de los alimentos son típicas de los países Mediterráneos, donde se cocina con aceite de oliva para aumentar su sabor. Por todo ello, cuando se considera la educación nutricional como promoción de la salud, debe esperarse un mejor cumplimiento con la Diet Med que con otras dietas bajas en grasa. De hecho, en un ensayo clínico dirigido a perder peso con dietas hipocalóricas (**McManus, 2001**), la adherencia a la Diet Med fue muy superior a la de una dieta baja en grasa. Los participantes manifestaron que la Diet Med era mucho más sabrosa que los regímenes con baja grasa y, por ello el cumplimiento a largo plazo fue mucho mayor. Sin embargo, actualmente se está observando un indeseable alejamiento de la Diet Med tradicional en la población del Sur de Europa, especialmente entre los más jóvenes (**Sanchez-Villegas, 2003; Costacou, 2003**), con un aumento del consumo de carnes rojas y otros productos cárnicos, junto a alimentos y bebidas ricas en azúcares. Además, también se observa que el aceite de oliva virgen está siendo sustituido por otros aceites vegetales de calidad inferior.

B.2 La Diet Med y prevención cardiovascular: Evidencias científicas

La Diet Med se ha asociado a una menor mortalidad por cualquier causa en numerosos estudios de cohorte de personas mayores (**Trichopoulou, 1995; Kouris-Blazos, 1999; Lasheras, 2000**). Así, los resultados del estudio de la cohorte EPIC de Grecia, que incluyó a más de 22.000 participantes, sugieren que una mayor adherencia a la Diet Med tradicional se asocia a una menor mortalidad global y, más

específicamente, a una menor mortalidad por enfermedad coronaria (**Trichopoulou, 2003**). En el seguimiento del estudio HALE con personas sanas de edades entre 70 y 90 años, se observaron resultados similares (**Knoops, 2004**), al igual que en el *NIH-AARP Diet and Health study* (**Mitrou, 2007**) y en el *Nurses Health study* (**Fung, 2009**). En dos estudios caso-control también observó una relación inversa entre adherencia a la Diet Med e incidencia de infarto de miocardio no fatal (**Martinez-Gonzalez, 2002; Panagiotakos, 2002**). Asimismo, en un estudio de prevención secundaria se observó una marcada reducción en la tasa de re-infarto o de muerte cuando en el grupo de pacientes coronarios que fueron asignados a la dieta mediterránea experimental y en la que los derivados lácteos se reemplazaron por una margarina especial rica en ácido alpha-linolénico (ALA) (**De Lorgeril, 1999**). A raíz de la publicación de los resultados de este estudio, la *American Heart Association* llamó la atención de que la Diet Med podría ser una herramienta potencialmente útil en la prevención de la enfermedad coronaria, pero advirtió que era preciso realizar más estudios antes de recomendar de forma concluyente a la población. Estos futuros estudios deberían averiguar si la dieta juega por sí misma un papel fundamental en la protección frente a la enfermedad coronaria, y este efecto es independiente de otros factores como una mayor actividad física o unos mejores sistemas de ayudas sociales, propios de los países mediterráneos (**Kris-Etherton, 2001a**). En un reciente meta-análisis se ha destacado que los efectos beneficiosos de una mayor adherencia a una Diet Med tradicional sobre la mortalidad global y la mortalidad de origen cardiovascular (**Sofi, 2008**).

También hay muchas evidencias epidemiológicas que sugieren que el consumo de aceite de oliva y de frutos secos, componentes importantes de la Diet Med, tienen efectos protectores sobre el sistema cardiovascular. En ensayos clínicos a corto plazo (**Fuentes, 2001**), y también en un ensayo clínico a dos años con 180 pacientes con síndrome metabólico (**Esposito, 2004**), se ha observado que la ingesta frecuente de ambos alimentos se asocia a una reducción de varios biomarcadores de riesgo cardiovascular. No obstante, tampoco en este caso, se dispone de ensayos clínicos aleatorizados que hayan valorado los efectos del aceite de oliva o de los frutos secos en la prevención cardiovascular.

B.3 Limitaciones de los estudios publicados sobre Diet Med y prevención cardiovascular

El único estudio publicado utilizando una "Diet Med", el *Lyon Diet Heart Study* (**De Lorgeril, 1999**), incluyó pacientes que ya habían sufrido un infarto de miocardio, por lo que debe considerarse como estudio de prevención secundaria y por lo tanto sus resultados no pueden extrapolarse como prevención primaria de la enfermedad cardiovascular. Además, los resultados de este ensayo clínico, con una reducción del 50-70% en la tasa de re-infartos y mortalidad por enfermedad coronaria en el grupo que recibió la intervención con Diet Med suplementada con ácido alfa-linolénico, son "demasiado espectaculares" para ser verdad, y se han criticado muchos aspectos del diseño y métodos de estudio. Además, no prestó especial atención al consumo de aceite de oliva por parte de los participantes, que es la principal fuente de grasa dietética en los países Mediterráneos (**Martinez-Gonzalez, 2004b**). Por otro lado, en un estudio de la cohorte EPIC de Grecia tampoco se halló un efecto protector claro atribuible al aceite de oliva (**Trichopoulou, 2003**), lo que cuestionó si el elevado consumo de grasa proveniente

del aceite de oliva protege realmente frente a la cardiopatía coronaria (Hu, 2003). En el *Lyon Diet Heart Study*, solo se realizaron valoraciones dietéticas al inicio y al final del estudio en una pequeña proporción de los participantes (30% del grupo control y 50% del grupo experimental). Además, no se realizaron análisis de los marcadores bioquímicos de adherencia a la intervención. Por todo ello, debe considerarse que se desconoce realmente la dieta seguida por la mayoría de los participantes (Kris-Etherton, 2001a; Robertson, 2001). Otro posible limitación de este estudio es que sólo el 13% de la ingesta energética provenía de los MUFA en el grupo asignado a la denominada "Diet Med". Este porcentaje es realmente muy inferior al $\geq 20\%$ del contenido en MUFA propio de la Diet Med tradicional (Perez-Jimenez, 2002). Otras limitaciones del *Lyon Diet Heart Study* son el bajo número de variables finales detectadas (44/14, in los grupos control y de intervención, respectivamente), la improbable gran reducción en el riesgo relativo de eventos cardiovasculares mayores (a pesar de la ausencia de cambios en la mayoría de factores clásicos de riesgo vascular) y el hecho de que se detuviera precozmente el ensayo clínico (tras sólo 27 meses de seguimiento). Por todo ello, debe considerarse que hasta la fecha ningún estudio ha valorado realmente los efectos de una Diet Med verdadera, rica en aceite de oliva en la prevención de la enfermedad cardiovascular. El estudio PREDIMED es el primer gran ensayo clínico, que aleatoriza pacientes de alto riesgo vascular a una intervención con una Diet Med tradicional o a un grupo control a los que se les aconseja seguir una dieta baja en todo tipo de grasa, para valorar sus efectos sobre la prevención primaria de la enfermedad coronaria y, de este modo, evitar las limitaciones de otros estudios previos y conseguir el máximo grado de evidencia científica.

B.4. Aceite de oliva y prevención cardiovascular

Una de las principales características de la Diet Med tradicional es el elevado consumo de aceite de oliva como fuente principal de grasa añadida. Gran parte de las presumibles propiedades antiaterogénicas del aceite de oliva se atribuyen a su alto contenido en ácido oleico. Sin embargo, en los últimos años se han referido posibles efectos protectores adicionales de los polifenoles presentes en el aceite de oliva virgen, pero no en el aceite de oliva refinado (AOR) (Pérez-Jiménez, 2005). La concentración de estos y otros fitoquímicos en los aceites depende en gran medida en los procesos de extracción a que sean sometidos. El AOV se obtiene a partir de la primera prensada de las aceitunas y tiene un elevado contenido en antioxidantes (tocoferoles, polifenoles y flavonoides) y fitosteroles. El AOR tiene menor capacidad antioxidante porque en los procesos de refinado pierde su contenido en polifenoles, aunque su composición en ácidos grasos sea similar al del AOV (Ramirez-Tortosa, 1999; Lercker, 2000). Los fenoles del AOV (principalmente hidroxitirosol y tirosol) han demostrado una gran actividad antioxidante y antiinflamatoria *in vitro* (De la Puerta, 1999, 2001; Manna, 2002; Visioli, 2002). En estudios cruzados que han comparado AOV y AOR a dosis similares a la normalmente utilizadas en la Diet Med, se ha comprobado que el AOV aumenta la capacidad antioxidante total del plasma (Visioli, 2004) y la resistencia a la oxidación de las partículas de LDL-colesterol (Marrugat, 2004). En un gran estudio aleatorizado y cruzado, realizado en Europa, se observó que los marcadores *in vivo* de oxidación lipídica y de las partículas LDL disminuían de forma dosis dependiente en función del contenido fenólico del aceite administrado (Covas, 2006).

Sin embargo, existen ciertas discrepancias sobre los posibles efectos del AOV sobre la oxidación de las LDL (Vissers, 2004). El AOV también ha demostrado ejercer

una mayor protección sobre la peroxidación lipídica que el alfa-tocoferol de la dieta (**Mataix, 1998**) y poseer mayores propiedades antiinflamatorias (**Puerta-Vazquez, 2004**). En consecuencia, se cree que el AOV tiene mayores propiedades beneficiosas sobre el sistema cardiovascular que el AOR, y que es importante diferenciar entre el tipo de aceite cuando se analicen los posibles efectos del aceite de oliva sobre el riesgo vascular. En un estudio de intervención con varones hipercolesterolémicos, una Diet Med suplementada con AOV mejoró más la función endotelial que una dieta baja en grasa (**Fuentes, 2001**). En otro estudio con pacientes hipertensos, el AOV disminuyó de forma significativa los requerimientos de medicación antihipertensiva de estos sujetos (**Ferrara, 2000**).

El cambio isocalórico de grasa saturada por MUFA procedente de aceite de oliva reduce la concentración plasmática de colesterol total y LDL-colesterol comparable al observado tras el consume de dietas bajas en grasa, pero con mantenimiento de la concentración de HDL-colesterol, con lo que se obtiene un mejor perfil lipídico (**Perez-Jimenez, 2002; Willett, 2000**). Además, las partículas de LDL enriquecidas con ácido oleico son más resistentes a la oxidación. El consumo elevado de aceite de oliva, característico de la Diet Med (**Hu, 2003**), podría ser parcialmente responsable de estos efectos. También se han sugerido otros mecanismos adicionales para explicar los efectos beneficiosos de la Diet Med rica en MUFA (**Perez-Jimenez, 2002**). Entre ellos (véase más abajo), se ha referido que la adición de ácido oleico a cultivos de células endoteliales disminuye la expresión de las moléculas de adhesión endoteliales, con reducción de la expresión de la molécula-1 de adhesión celular vascular (VCAM-1) e inhibición de la activación del factor nuclear kappa-B (**Carluccio, 1999**). La activación postprandial del factor VII también se atenúa tras la ingesta de una dieta rica en MUFA. El aceite de oliva también se asocia a una reducción de síntesis de DNA en células musculares lisas obtenidas de arterias coronarias humanas (**Mata, 1997**). A la luz de estas propiedades cardiosaludables del aceite de oliva, la *Food and Drug Administration* de los Estados Unidos ha aprobado recientemente una alegación de salud a favor del aceite de oliva y ha pasado a considerarlo como un posible alimento cardioprotector. Sin embargo, no se han realizado estudios sobre eventos cardiovasculares con el aceite de oliva.

B.5. Frutos secos y prevención cardiovascular

Existen numerosas evidencias epidemiológicas que sugieren que el consumo de frutos secos tiene un efecto protector sobre el sistema cardiovascular. En una amplia cohorte de California, el *Adventist Health Study* observó que la frecuencia de consumo de frutos secos se asociaba inversamente con el riesgo cardiovascular (**Fraser, 1992**). Más recientemente, los resultados de otros tres estudios de cohortes, el *Iowa Women's Health Study*, el *Nurses' Health Study*, y el *Physician's Health Study*, han confirmado que la ingesta frecuente de frutos secos se asocia a un menor riesgo de enfermedad cardiovascular (**Ellsworth, 2001; Hu, 1998; Albert, 2002**). Sin embargo, en el estudio de la cohorte de Iowa la relación entre consumo de frutos secos y riesgo vascular no alcanzó la significación estadística y en el *Physician's Health Study* sólo se halló protección frente a la muerte súbita cardiaca, pero sí frente a la muerte no súbita de origen coronario o el infarto de miocardio no fatal.

Numerosos estudios aleatorizados (<50 sujetos) han señalado que la ingesta de dietas enriquecidas con frutos secos reducen de forma consistente el colesterol total y el LDL-colesterol, pero la mayoría de estudios han investigado sólo los efectos de las nueces o almendras (**Kris-Etherton, 2001b**). Este efecto hipocolesterolémico se obtiene con la

ingesta de dos a tres raciones de frutos secos al día. Los efectos sobre el HDL-colesterol han sido inconsistentes, aunque la relación entre colesterol total y HDL-colesterol suele disminuir (**Feldman EB, 2002**). Se ha referido que una dieta rica en nueces mejora la vasodilatación dependiente del endotelio y reduce la concentración sérica de VCAM-1 (**Ros, 2004**). Se trata de posibles mecanismos a través de los cuales el consumo de frutos secos podría reducir el riesgo cardiovascular.

Las nueces, almendras, avellanas y otros frutos secos, como los piñones, son ingredientes comunes de la Diet Med tradicional, ya que se producen en la mayoría de países mediterráneos. Los frutos secos son muy ricos en grasa (48-63 g/100 g por porción comestible). La mayoría de ellos son ricos en MUFA (principalmente, ácido oleico), mientras que las nueces lo son en PUFAs (ácidos linoleico y alfa-linolénico). El contenido en fibra de los frutos secos también es alto y varía entre el 5 y 9% de su peso. Los frutos secos son, además, fuente importante de arginina, potasio, vitamina E, y otros compuestos bioactivos. Por ello, esta composición tan especial de los frutos secos podría explicar parte de los efectos beneficiosos observados en los estudios prospectivos de cohorte y también de intervención a corto plazo. Hasta el momento, tampoco se han realizado estudios de intervención con frutos secos que hayan valorado eventos clínicos. El estudio PREDIMED es el primer ensayo a gran escala que aleatoriza pacientes con alto riesgo vascular para determinar con el mayor grado de evidencia científica posible los efectos cardioprotectores de los frutos secos.

B. 6 Dietas altas en MUFA en sujetos diabéticos, con sobrepeso/obesos y de alto riesgo vascular

Tradicionalmente, los consejos dietéticos dirigidos a diabéticos, obesos o con alto riesgo vascular resaltan la necesidad de evitar la grasa de origen animal y sustituir todo tipo de grasa de la dieta preferentemente por carbohidratos (CHO). La base racional es que las grasas proporcionan un exceso de energía y con ello promueven la obesidad. Sin embargo, las evidencias científicas acumuladas en las últimas dos décadas indican que las dietas ricas en MUFA podrían tener un efecto beneficioso en los sujetos diabéticos, obesos y con alto riesgo vascular. Estos efectos beneficiosos de los MUFA proceden principalmente de la Diet Med, y, más específicamente, del aceite de oliva (**Ros, 2003; Bondia-Pons, 2007**) y la mayoría de frutos secos (**Ros, 2003; Sabaté, 2003; Garcia-Lorda, 2003**). De hecho, la ingesta frecuente de CHO simples presentes en una gran cantidad de productos pobres en grasa se asocia con un aumento en el peso corporal. No obstante, a pesar de ello, todavía persiste una cierta resistencia a recomendar dietas altas en MUFA a sujetos con obesidad o diabetes, como alternativa a las tradicionales dietas bajas en todo tipo de grasas (y menos sabrosas). Por diseño del ensayo, en el estudio PREDIMED ha entrado una elevada proporción de sujetos con sobrepeso/obesidad y/o diabetes tipo 2. Es, pues, importante averiguar que el consejo de incrementar el contenido de grasa tipo MUFA en la dieta no supone un incremento en el peso corporal. Existen, no obstante, datos de que el consumo de dietas ricas en MUFA no engorda en el contexto de dietas controladas (**Ros, 2003**), en programas de reducción de peso (**McManus, 2001; Shai, 2008**), e incluso con dietas *ad libitum* (**Sabaté, 2003**). Además, en los resultados de nuestro estudio piloto (véase más abajo) no se observaron aumentos de peso en ninguno de los tres grupos de intervención.

B. 7. Importancia de los ensayos aleatorizados de prevención primaria

Como determinadas conclusiones basadas en resultados de estudios observacionales han sido posteriormente refutadas por la evidencia obtenida en ensayos clínicos aleatorizados (p.e. el presunto efecto cardioprotector de la terapia sustitutiva estrogénica o la suplementación con vitamina E), actualmente se considera necesario disponer del mayor grado de evidencia científica antes de aprobar cualquier estrategia de salud pública que promueva la Diet Med como modelo de alimentación saludable. Este grado de evidencia sólo se consigue tras la realización de ensayos clínicos a gran escala en los que la principal variable a analizar sea la presencia de eventos cardiovasculares demostrados. Las guías dietéticas adquirieron mayor relevancia cuando existe concordancia entre los resultados de los estudios observacionales y los experimentales.

No obstante, dadas las dificultades para practicar ensayos clínicos aleatorizados que valoren los efectos a largo plazo de las intervenciones dietéticas sobre variables finales clínicas, la comunidad científica suele basarse al redactar recomendaciones dietéticas en la combinación de los resultados de investigaciones epidemiológicas y estudios a corto plazo sobre variables intermedias. Sin embargo, se ha realizado un ensayo clínico de prevención secundaria que ha comparado dos patrones de alimentación en más de 600 participantes (**De Lorgeril, 1999**). Creemos que la realización de este estudio es posible porque tras el análisis al año de seguimiento de los primeros 1.700 participantes incluidos en el estudio PREDIMED se observó que la intervención conductual más el suplemento de alimentos específicos conseguía modificar los hábitos alimentarios de los participantes evaluados, así como el perfil de riesgo vascular que se modificaba en la dirección adecuada (**Zazpe, 2008**). Las intervenciones del estudio PREDIMED se dirigen a modificar la dieta de los participantes, no otros hábitos de vida, y por ello, los resultados deberían responder a la pregunta de si la Diet Med es realmente cardioprotectora.

C. ESTUDIOS PRELIMINARES

C. 1. Ensayos preliminares con aceite de oliva y frutos secos

Entre varios ensayos clínicos publicados, se destacan dos recientemente publicados por miembros del equipo investigador del estudio PREDIMED.

C. 1.1. El contenido fenólico del AOV disminuye la oxidación in vivo de las LDL

Se realizó un ensayo clínico de intervención, aleatorizado, cruzado y a doble ciego con tres aceites similares, pero distinta concentración de polifenoles (de 2.7 mg/kg a 366 mg/kg), en 200 voluntarios sanos Europeos. Los aceites se administraron durante periodos de tres semanas, precedidos por un periodo de lavado de dos semanas. Los tres tipos de aceite de oliva elevaron el HDL-colesterol y la relación entre glutatión reducido y oxidado, y, en cambio, redujeron la concentración plasmática de triglicéridos y el grado de oxidación del DNA. Los aceites con un contenido medio y alto de fenoles disminuyeron la oxidación *in vivo* de los lípidos y del LDL-colesterol. Tanto el aumento del HDL-colesterol como la reducción de la oxidación in vivo de las partículas de LDL se correlacionaron de forma dosis dependiente con el contenido polifenólico del aceite administrado (**Covas, 2006; Machowetz, 2007**).

C. 1.2 Una dieta con nueces mejora la función endotelial en sujetos hipercolesterolémicos

En un estudio cruzado, se administró de forma aleatoria una Diet Med baja en colesterol y una dieta control, con un contenido energético y graso similar, pero en la que se sustituyó un 32% de la energía procedente de MUFA por nueces en 21 sujetos hipercolesterolémicos de ambos sexos (Ros, 2004). Todos los participantes siguieron cada una de estas dietas durante cuatro semanas. La dieta con nueces mejoró la vasodilatación dependiente del endotelio y disminuyó la concentración de VCAM-1 ($P < 0.05$; ambos). La dieta con nueces también disminuyó de forma significativa el colesterol total y el colesterol LDL ($P < 0.05$; ambos). En un estudio complementario, se añadieron nueces a una comida experimental rica en ácidos grasos saturados y se observó una reducción de la disfunción endotelial postprandial tanto en sujetos sanos como en pacientes hipercolesterolémicos (Cortés, 2006). Estos efectos cardioprotectores de los frutos secos fueron más allá de la reducción del colesterol en los dos estudios reseñados, lo que sugiere que la Diet Med enriquecida con nueces proporciona mayor protección frente a las alteraciones del sistema cardiovascular.

C. 2 Estudio caso-control preliminar sobre Diet Med y riesgo de infarto de miocardio

Se realizó un estudio caso-control con casos de infarto de miocardio y controles sanos para evaluar los efectos protectores de la Diet Med frente a la cardiopatía coronaria (Martínez-González, 2002). Seis alimentos resultaron protectores: 1) aceite de oliva, 2) fibra, 3) fruta, 4) verduras, 5) pescado y 6) alcohol. A cada individuo se le asignó una puntuación de 1 a 5 según el quintil de ingesta de cada uno de estos alimentos. A esta puntuación se les añadió en sentido contrario una puntuación de 5 a 1 según el consumo de otros dos alimentos considerados como perjudiciales: 7) carne y derivados cárnicos y 8) alimentos ricos en carbohidratos simples y, por ello, con una elevada carga glucémica (pan blanco y otros). A partir de estos ocho valores se estableció una puntuación de aproximación a una Diet Med tradicional. Cuanto mayor era esta puntuación, menor era la odds ratio (OR) de infarto de miocardio. Asimismo, se halló una correlación lineal significativa entre ambos parámetros tras ajustar por los principales factores de riesgo vascular. Por cada punto adicional en la puntuación de esta escala (límites observados: 9–38) la OR (Intervalo de confianza del 95%, IC) fue de 0.92 (0.86–0.98). Estos resultados apoyan la hipótesis que el aumento de adherencia a una Diet Med tradicional puede reducir realmente el riesgo de enfermedad coronaria.

C. 3. Estudio piloto del ensayo PREDIMED

En nuestro estudio piloto se incluyeron los primeros 772 participantes del ensayo PREDIMED (339 varones y 433 mujeres, edad media 67 ± 6 años) que completaron un periodo de intervención de 3 meses. Todos ellos se hallaban asintomáticos, la mitad eran diabéticos y el resto reunía tres o más factores de riesgo vascular. Estos sujetos se aleatorizaron a tres intervenciones distintas. En dos grupos se implementó una intervención conductual intensiva y educación nutricional dietética dirigida a mejorar sus hábitos dietéticos y aproximarse lo máximo posible a la Diet Med tradicional. Al tercer grupo, el grupo control, se le aconsejó que siguieran una dieta prudente, baja en todo tipo de grasa. A los participantes incluidos en el primer grupo de intervención (Diet Med + AOV), se les suministró AOV (1 litro/semana) y a los del segundo grupo de intervención (Diet Med + Frutos secos), se les regaló 30 g/día de frutos secos (15 g nueces, 7,5 g avellanas y 7,5 g almendras). A los tres grupos de intervención, se valoraron los cambios

en la dieta, presión arterial, glucemia, sensibilidad a la insulina (en los participantes no diabéticos), perfil lipídico y concentración sérica de los principales biomarcadores de inflamación. Los cambios en la ingesta de alimentos y nutrientes observados en los tres grupos de intervención siguieron la dirección esperada. Comparado con el grupo de dieta baja en grasa, en los dos grupos de Diet Med se observaron cambios favorables en la mayoría de variables analizadas, mientras que el peso se mantuvo estable, a pesar del aumento de grasa vegetal en los dos grupos de Diet Med (**Estruch, 2006**). En un subestudio de 372 participantes de los tres grupos, a los tres meses de intervención se observó una reducción de los marcadores de estrés oxidativo (LDL oxidada circulante) en los dos grupos de Diet Med comparado con el grupo bajo en grasa, el grupo control (**Fitó, 2007**). Se espera que estos efectos beneficiosos se incrementen a lo largo del estudio. Por otro lado, la ausencia de aumento de peso en los dos grupos que reciben suplementos de alimentos energéticos como el aceite de oliva y los frutos secos aleja el temor de que la promoción de una dieta alta en alimentos grasos como la Diet Med podría causar un aumento de la adiposidad.

En el estudio piloto (**Estruch, 2006**), se observó un incremento del 76.5% en la ingesta de ácido alfa-linolénico en el grupo de Med Diet+Frutos secos, hecho especialmente relevante dado que existen numerosas evidencias epidemiológicas del efecto cardioprotector de la ingesta de PUFA n-3 (**Dolecek, 1991; Ascherio, 1996; Guallar, 1999; Hu, 1999; Baylin, 2003; Djoussé, 2003; Brouwer, 2004**), aunque no todos los estudios han sido concordantes en este sentido (**Oomen, 2001**). El éxito del estudio de prevención secundaria con una Diet Med experimental (**De Lorgeril 1999**) también se atribuyó a la alta ingesta de ácido alfa-linolénico. No obstante, nuestro estudio tiene algunas ventajas, como a) nosotros utilizamos un alimento típicamente mediterráneo, los frutos secos, para aumentar el consumo de ácido alfa-linolénico; b) el tamaño de la muestra del estudio PREDIMED es mucho mayor; y c) se trata de un ensayo de prevención primaria.

Asimismo, se observaron reducciones estadísticamente significativas respecto al grupo control en la molécula soluble de adhesión intercelular-1 (ICAM-1), el VCAM-1, y la interleukina-6 en los dos grupos de Diet Med (**Estruch, 2006**). Existen numerosos estudios que señalan una relación causal entre la concentración plasmática de estas moléculas y el riesgo de aterosclerosis. Del mismo modo, los resultados de numerosos estudios epidemiológicos han comprobado que la concentración plasmática de ICAM-1 sería un predictor de futuros eventos cardiovasculares (**Hwang, 1997; Ridker, 2000a; Malik, 2001; Tanne, 2002; Haim, 2002; Becker, 2002; Luc, 2003**) y del desarrollo de una diabetes clínica (**Meigs, 2004**). Si se tienen en cuenta los cambios observados en ICAM-1, puede asumirse de forma conservadora que la variación en ICAM-1 en los dos grupos de Diet Med representa cambiar de 1 a 2 cuartiles, lo que se corresponde a una RR para enfermedad coronaria (**Ridker, 2000a**) de 0.77 (2:2.6) y 0.58 (1.5:2.6). Combinando estos efectos con los atribuibles a los cambios observados en la presión arterial y HDL-colesterol, podría esperarse un RR global de 0.53 a 0.71 para los grupos de Diet Med. Merece destacarse que la concentración de proteína C-reactiva sólo disminuyó en el grupo de Diet Med + AOV. La concentración de la PCR-ultrasensible también ha demostrado ser un parámetro útil para predecir futuras complicaciones cardiovasculares (**Ridker, 2000a; 2000b; Pradhan, 2002**). Nuestros hallazgos son similares a los obtenidos en estudios observacionales que han valorado los cambios en ICAM-1 y VCAM-1 de función de la ingesta de ácidos grasos n-3 (7-8% reducción, **Lopez-Garcia, 2004**), y también en

otros ensayos clínicos con ácidos grasos n-3 de cadena larga (ningún efecto, **Kew, 2004**), aceites de pescado (-12% para ICAM-1 y -20% para VCAM-1, pero sólo en sujetos ancianos, **Miles, 2001**), aceite de linaza (-18.7% en VCAM-1, pero no cambios en ICAM-1, **Rallidis, 2004**), o alfa-tocopherol (-11% in ICAM-1, **Desideri, 2002**). Nuestros resultados pueden resultar muy útiles para conocer los mecanismos por los cuales la Diet Med podría ejercer su efecto protector sobre la enfermedad cardiovascular. Además, coinciden con los obtenidos en estudios in-vitro que sugieren que tanto la ingesta de ácido oleico (**Carluccio, 1999**) como de los polifenoles contenidos en el AOV (**Carluccio, 2003**) se asocian a una disminución de la expresión de las molécula de adhesión relacionadas con la arteriosclerosis. Nuestros resultados también coinciden con los de un ensayo clínico previo que demostró que el aceite de oliva inducía una disminución en la proporción de células linfo-monocitarias periféricas que expresan ICAM-1 (**Yaqoob, 1998**) y otro que demostró que una dieta rica en nueces mejoraba la vasodilatación mediada por el endotelio y reducía la concentración de VCAM-1 (**Ros, 2004**).

D. DISEÑO Y MÉTODOS

D.1 Resumen

El objetivo de este ensayo clínico aleatorizado es valorar los posibles efectos de dos intervenciones conductuales intensivas y de educación nutricional sobre el riesgo de sufrir complicaciones cardiovasculares mayores, comparado con los efectos de un grupo control bajo en grasa durante una mediana de 6 años. A los dos primeros grupos se les recomienda seguir una Diet Med tradicional, pero a uno se les entrega AOV (1 litro/semana) y al otro 30 g/d de frutos secos (15 g de nueces, 7,5 g de avellanas, y 7,5 g de almendras). El tercer brazo de la aleatorización es el grupo control, en el que los participantes no reciben ningún tipo de educación sobre Diet Med, sino que se les aconseja seguir una dieta baja en todo tipo de grasa. Todos los participantes son varones (edad entre 55 y 80 años) y mujeres (edad: 60 a 80 años) con diabetes o tres o más factores de riesgo cardiovascular. Ninguno de los participantes presentaba ningún síntoma de enfermedad cardiovascular al inicio. Todos ellos fueron aleatorizados a uno de los tres grupos de intervención (2,350 cada uno de ellos) y seguidos durante una media de más de 5 años por sus médicos de cabecera para comprobar si sufrían alguna complicación cardiovascular. La principal variable final es un agregado que incluye muerte cardiovascular infarto de miocardio o accidente vascular cerebral.

D.2 Diseño

Se trata de un ensayo clínico, de grupos paralelos, multicéntrico, a simple ciego, y aleatorizado dirigido a valorar los posibles efectos de dos intervenciones conductuales intensivas y de educación nutricional sobre la incidencia de sufrir complicaciones cardiovasculares mayores, comparado con los efectos de un grupo control que sigue una dieta baja en todo tipo de grasa. El Comité de Investigación y Ética del Hospital Clínic (Barcelona, España) acreditado por el *Department of Health and Human Services* (DHHS) de los Estados Unidos y regulado por el *Federalwide Assurance for the Protection of Human Subjects for International (Non-US) Institutions* # 00000738 aprobó el protocolo de estudio el 16 de Julio del 2002. Este ensayo clínico ha sido registrado en el Current Controlled Trials de Londres con el número ISRCTN 35739639 (<http://www.controlled-trials.com/ISRCTN35739639>).

Los estudios controlados de alimentación son el mejor método para valorar el efecto biológico de determinados nutrientes sobre marcadores intermedios de riesgo cardiovascular. Sin embargo, la posibilidad de múltiples mecanismos protectores de los alimentos y nutrientes sobre la enfermedad coronaria, algunos de ellos recientemente identificados en los últimos años y otros que serán identificados próximamente, subraya la necesidad de realizar estudios clínicos en los que se valoren variables finales incuestionables. En los estudios de intervención nutricional en los que se pretenden valorar variables clínicas finales es imposible aplicar diseños de alimentación controlada. Desde una perspectiva de salud pública, es más realista realizar una intervención conductual ligada a un mayor acceso (gratuidad) a los alimentos saludables más representativos de una determinada dieta y, por este modo determinar su efectividad, para posteriormente aplicarlas en políticas oficiales o actividades de promoción de la salud.

El objetivo principal del estudio es comparar los efectos de dos patrones de alimentación, la Diet Med y una dieta control baja en grasa sobre la prevención primaria de la enfermedad cardiovascular. La base racional de utilizar dos intervenciones con Diet Med, una suplementada con AOV y la otra con frutos secos, se expone a continuación. Por un lado, el AOV utilizado en un brazo del estudio, además de ser una fuente rica en MUFA, es una buena fuente de compuestos fenólicos antioxidantes. La mitad de la dosis de frutos secos utilizado en otro brazo se debe a nueces, que contienen una cantidad apreciable de PUFA, especialmente ácido alfa-linolénico, un ácido graso omega-3 de origen vegetal. De este modo, una Diet Med ha sido enriquecida en MUFA y compuestos fenólicos antioxidantes y a la otra se añaden PUFA n-3 y n-6. Aunque ambos brazos tienen un mismo patrón de alimentación, la Diet Med, difieren en la ingesta de dos alimentos (AOV y frutos secos) y dos nutrientes (compuesto fenólicos y PUFA), que se consideran importantes en la prevención cardiovascular y que pueden tener efectos beneficiosos diferentes. Por todo ello, se decidió por un diseño en tres brazos, pero con el objetivo principal de comparar los efectos de dos patrones de alimentación, la Diet Med y una dieta baja en grasa, en la prevención sobre eventos cardiovasculares, y considerando que los alimentos añadidos a cada uno de los dos brazos de Diet Med pueden contribuir de manera diferente a los efectos totales del patrón de Diet Med. Se consideró que el regalo de algunos alimentos (aceite de oliva y frutos secos) ayudaría a aumentar el grado de cumplimiento de los participantes incluidos en los grupos de Diet Med. Sin embargo, dado el alto contenido en grasa del AOV y los frutos secos, se consideró inviable administrar ambos alimentos a la vez a un único grupo de participantes.

D.3 Variables finales

- Variables finales primarias: Un agregado de muerte cardiovascular, infarto de miocardio y accidente vascular cerebral no fatal.
- Variables finales secundarias: Muerte por cualquier causa e incidencia de angor que conlleve la práctica de una técnica de revascularización, insuficiencia cardíaca, diabetes mellitus, cáncer, demencia, y otras enfermedades degenerativas.
- Otras variables: Cambios en presión arterial, peso, medidas de adiposidad glucemia, perfil lipídico, marcadores de inflamación y otros marcadores intermedios de riesgo cardiovascular (véase también la sección D.11.5)

D.4 Tamaño muestral

Con una muestra de $n=6.999$ participantes con aleatorización en tres grupos de igual tamaño (dos grupos de intervención y un grupo control, de 2.333 participantes cada uno de ellos) se consigue un poder estadístico suficiente para evaluar los efectos de un patrón de Diet Med sobre las variables primarias (muerte cardiovascular, infarto de miocardio y accidente vascular cerebral). El tamaño muestral estimado se calculó para comparar dos proporciones de binomios que representen la tasa de eventos en uno de los grupos de tratamiento y en el grupo control. Se asumió un poder estadístico del 80% ($1-\beta = 0.8$) y ($1-\alpha/2 = 0.975$) para una P de dos colas de 0,05. Para estimar la incidencia acumulada de eventos en el grupo control, se utilizó el número de eventos observados en el primer año de seguimiento (tasa del 1,3%). Adaptando esta cifra a un seguimiento de 6 años y teniendo en cuenta la edad de la población estudiada, se puede asumir que un 11% de riesgo en el grupo control. La reducción relativa mínima de eventos en los grupos de intervención debería ser del 25%. Entonces, $p_1 = 0.11$ y $p_2 = (0.117) (0.75) = 0.0825$. Con estas asunciones, se requiere 1.877 participantes por grupo. No obstante, se ha planeado incluir 2.333 sujetos por grupo para poder asumir un 10% de pérdidas en el seguimiento y también una incidencia menor de eventos a la esperada.

D. 5 Cronograma y financiación.

El Ministerio español de Sanidad, a través del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), financió este proyecto durante el periodo 2003-2005 (RTIC G03/140). Gracias a esta ayuda pudo constituirse una Red Temática de investigación formada por 16 grupos de investigación de toda España. En el año 2006 el ISCIII estableció una nueva estructura de investigación, dotada de una considerable aportación económica, la CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CiberOBN), en la que entraron a formar parte la mitad de los grupos originales. La otra mitad de los grupos originales y cinco más adicionales formaron una nueva red de investigación (RTIC RD 06/0045). También se han conseguido ayudas oficiales de otras agencias oficiales del Gobierno de España para financiar subproyectos relacionados con variables intermedias (lipoproteínas, marcadores inflamatorios, estudios de genómica y proteómica, etc.). También se han conseguido fondos adicionales de otras fuentes para realizar el proyecto global, como las donaciones de Empresas de Alimentación tanto en dinero como en otras aportaciones como, por ejemplo, impresión del material utilizado en la intervención (recetas de cocina y otros). Asimismo la donación del AOV por la Fundación-Patrimonio Comunal Olivarero o los frutos secos por Empresas de Alimentación ha supuesto una ayuda sustancial al proyecto.

D. 5.1 Planificación

Al inicio del estudio, se realizó un curso de formación al personal adscrito (un mínimo de una dietista y una enfermera por cada uno de los 11 centros de campo - CC) para asegurar una uniformidad en la intervención dietética administrada en los distintos CC, así como en las técnicas de extracción y almacenamiento de la sangre y otras muestras biológicas. Entre los meses de Marzo y Septiembre del año 2003, se desarrolló la logística, protocolos y manual de operaciones, se compró del material inventariable necesario, se imprimieron los formularios y se implementaron los sistemas de entrada y manejo de datos. Cada CC contactó con aproximadamente 20 Centros de Atención Primaria (CAP) para reclutar a los participantes. Finalmente, durante este periodo se

confeccionaron los menús y listas de la compra de productos mediterráneos que deberán darse a los participantes.

D. 5.2. Estudio piloto

El reclutamiento de la fase piloto se inició entre los meses de Octubre y Diciembre del 2003. A los 3 meses de intervención, se revaloraron los 772 participantes incluidos para comprobar el grado de cumplimiento de las intervenciones administradas y los cambios en los marcadores intermedios de riesgo cardiovascular (véase la sección C.3).

D. 5.3. Implementación

Una vez comprobados que los cambios en la dieta de los participantes y en los factores de riesgo discurrían en la dirección adecuada, se continuó el reclutamiento hasta finalizar el 31 de Marzo del 2009 con un total de 7,350 participantes. Cada CC ha reclutado entre 350 y 1000 participantes, referidos por aproximadamente 10 médicos de atención primaria de cada CAP.

D. 5.4 Seguimiento

Los participantes reclutados en el año 2003 serán seguidos más de 8 años y serán los que tendrán el mayor periodo de seguimiento. Los participantes que han entrado a finales del 2008 serán seguidos sólo 3 años, y serán los que tengan el menor periodo de seguimiento. En consecuencia, la media de seguimiento de los participantes en el estudio será de 6 años.

D. 5.5 Análisis/finalización

El ensayo clínico finalizará el 31 de Diciembre del 2011. A principios del 2012, se valorarán las variables finales y determinaciones de laboratorio realizadas, se entrarán y revisarán los datos a la base y se realizarán los análisis estadísticos pertinentes. Se calcula que hasta el segundo semestre del 2012 no se dispondrá de los manuscritos para remitir a las revistas científicas.

D. 6 Población a estudiar / Criterios de selección

La población a estudiar es de más de 7,000 personas con alto riesgo vascular (≈ 700 por cada CC): Los varones deben tener entre 55 y 80 años y las mujeres, entre 60 y 80 años. Ninguno de ellos puede manifestar síntomas de ninguna enfermedad cardiovascular y cumplir al menos uno de los siguientes criterios:

D. 6.1 Criterios de inclusión: Deben cumplir uno de los siguientes dos criterios (**a** o **b**):

- a) Diabetes tipo 2.** Diagnóstico de diabetes en base a uno de los siguientes criterios: i) Tratamiento actual con insulina o hipoglucemiantes orales; ii) Glucosa en ayunas > 126 mg/dl en dos determinaciones (ayunas se define como la ausencia de ingesta calórica durante al menos 8 horas); iii) Glucemia casual > 200 mg/dl con poliuria, polidipsia o pérdida no explicada de peso; iv) Glucemia > 200 mg/dl a las 2 horas en el test de tolerancia oral a la glucosa. **O**
- b) Tres o más** de los siguientes **factores de riesgo:** i) Tabaquismo (>1 cig/día en el último mes); ii) Hipertensión (PA sistólica ≥ 140 mm Hg o diastólica ≥ 90 mm Hg, repetidamente durante el último mes, o medicación antihipertensiva); iii) LDL-colesterol ≥ 160 mg/dl; iv) HDL-colesterol ≤ 40 mg/dl en varones o ≤ 50 mg/dl en mujeres, o seguir tratamiento hipolipemiente; v) Índice de masa corporal ≥ 25 kg/m²; vi) Historia familiar de Enfermedad Coronaria precoz (infarto de miocardio documentado o muerte súbita antes de 55 años en familiares varones de primer grado o antes de 65 años en familiares mujeres de primer grado).

D. 6.2 Criterios de exclusión. Los principales criterios de exclusión son: i) Historia documentada de enfermedad cardiovascular, como enfermedad coronaria (angina, infarto de miocardio, técnicas de angioplastia coronaria o existencia de Q anormales en el electrocardiograma (ECG)), accidente vascular cerebral (tanto isquémica como hemorrágico, incluidos los accidentes vasculares transitorios), y arteriopatía periférica sintomática diagnosticada mediante técnicas de imagen; ii) Enfermedad médica grave que impida al paciente participar en un estudio de intervención nutricional; iii) Cualquier condición médica que limite la supervivencia del paciente a menos de 1 año; iv) Inmunodeficiencia o infección por el VIH; v) Abuso de tóxicos o alcoholismo crónico o ingesta total diaria de alcohol >50 g/d; vi) Índice de masa corporal (IMC) > 40 kg/m²; vii) Dificultad o no voluntad para cambiar los hábitos dietéticos; viii) Imposibilidad para seguir una Diet Med por motivos religiosos o por trastornos en la masticación o deglución; ix) Baja probabilidad de cambio de hábitos dietéticos según los estadios de disposición al cambio según el modelo de Prochaska y DiClemente (**Nigg, 1999**); x) Historia de alergia alimentaria con hipersensibilidad a cualquiera de los componentes del aceite de oliva o los frutos secos; xi) Participación en ensayos clínicos farmacológicos o toma de cualquier fármaco en investigación en el último año; xii) Pacientes ingresados en instituciones por alguna enfermedad crónica, sin autonomía, incapaces de andar, sin dirección postal fija o con imposibilidad de acudir a las reuniones trimestrales; xiii) Analfabetismo; y xiv) Los pacientes con una infección o inflamación aguda (i.e., neumonía) pueden participar en el estudio transcurridos tres meses de la resolución del proceso.

D. 7 Reclutamiento

La mayoría de CAP tiene experiencia en reclutamiento y seguimiento de pacientes incluidos tanto en estudios epidemiológicos como en ensayos clínicos. La participación de médicos de atención primaria asegura una alta tasa de reclutamiento. Como estos mismos médicos son los responsables de la atención médica de los participantes, y son conscientes de sus factores de riesgo, no existen problemas éticos en cuanto a confidencialidad de los datos de los participantes en el estudio. En el proceso de selección de candidatos, el primer paso es identificar los posibles participantes en base su historial clínico en los CAPs. La mayoría de CAPs (más del 70 %) participantes en el estudio están informatizados, por lo que la selección de posibles candidatos es relativamente simple. Después se revisa individualmente las historias clínicas, para excluir aquéllos no cumplan los criterios de inclusión o presenten algún criterio de exclusión. Seguidamente se contacta con los candidatos por teléfono y se les invita a que acudan a una visita al CAP, donde se les explicará los objetivos y características del estudio, y se les solicita que firmen el consentimiento informado (véase más adelante). En esta primera visita se les explica brevemente el estudio y se les expone la posibilidad de que reciban algún alimento (aceite o frutos secos) de forma gratuita. Más del 70% de los candidatos aceptan participar en el estudio.

D. 8 Visitas de los participantes

Los participantes en estudio se seleccionan tras revisión de su historia clínica y después de dos entrevistas formales de cribaje. En estas entrevistas se realiza una historia clínica, se rellenan los cuestionarios, se toman las medidas antropométricas, se mide la PA y se extrae sangre en ayunas para análisis. Parte de la información recogida

en estas visitas de cribaje se utiliza como información basal para los subsiguientes análisis de los efectos de las intervenciones sobre los marcadores intermedios y factores de riesgo vascular.

- **Evaluación inicial:** Tras revisión de su historia clínica, se contacta telefónicamente con los candidatos elegibles para determinar si son capaces y quieren participar en el estudio. Aquellos que responden afirmativamente son citados a una primera visita de cribaje. La proporción de participación (relación reclutados / elegibles) en los distintos CC varió entre 0,75 y 0,90.

- **Visita de cribaje:** Esta visita, realizada en el CAP, sirve para identificar / confirmar de forma más precisa los criterios de inclusión y exclusión de cada participante. Esta entrevista personal de 15-30 minutos incluye: a) Administración de un cuestionario de 26 preguntas sobre los antecedentes médicos y factores de riesgo relacionados con su selección para el estudio, incluido su disposición al cambio de dieta (modelo de Prochaska). b) Revisión del último ECG disponible en la historia clínica. Si no se le ha realizado ninguno en el último año, se realiza uno durante la visita. c) Si el sujeto cumple con todos los requisitos (incluidos los datos del ECG), se le solicita que firme el consentimiento informado una vez se le han detallado todas las características del estudio y todas las pruebas e intervenciones que se le van a realizar (véase <http://www.predimed.org>). El consentimiento informado consta de dos partes, una sobre participación y análisis bioquímicos y otro para recolección del AND para análisis genéticos. **d)** Se le entrega también los siguientes cuestionarios para que el sujeto los rellene en su domicilio (véase <http://www.predimed.org>):

- Una explicación detallada por escrito del estudio.
- Cuestionario de frecuencia de consumo (FFQ) con 137 preguntas, más algunas preguntas sobre suplementos minerales y vitamínicos, y consumo de alcohol (adaptado del cuestionario de Willett y validado en España, véase **Martin-Moreno, 1993**)
- Cuestionario de actividad física de Minnesota (validada la versión española, **Elosua, 1994 & 2000**).

e) Al participante se le dan instrucciones de como recoger muestras de las uñas de los pies y traerlas en la siguiente visita.

f) Se programa la visita basal y se le explica al participantes que debe acudir en ayunas para que le puedan practicar el análisis de sangre.

Tras la visita de cribaje, se aleatoriza al participante a uno de los tres grupos de intervención.

- **Aleatorización:** La enfermera del estudio asigna cada participante a un grupo de intervención, de acuerdo con una tabla de aleatorización previamente confeccionada según el orden de inclusión en el estudio en cada nodo. Esta tabla fue confeccionada por la Unidad Coordinadora e incluye una de aleatorización estratificada para cada CC. Los cuatro estratos de aleatorización fueron confeccionados según la edad (punto de corte ≥ 70 años) y género. Las enfermeras de estudio actúan de forma totalmente independiente a las enfermeras del CAP. Por lo tanto, ellas no están realizando ninguna actividad relacionada con la atención clínica a los participantes y sus tareas se limitan a recoger datos para el estudio PREDIMED.

- **Visita basal:** Se trata de una visita de una hora de duración que incluye las siguientes tareas: **a)** Contestar un cuestionario de 14 puntos para valorar el grado de adhesión a la Diet Med (véase <http://www.predimed.org> y **Martínez-González, 2004c**). **b)** Una entrevista

en la que la dietista explica de nuevo el objetivo y desarrollo del estudio. **c)** La dietista revisa (y completa con el participante si es preciso) los cuestionarios de FFQ y actividad física. Alternativamente, puede ayudar al participante que ha tenido problemas para rellenar el cuestionario en casa a hacerlo durante la visita. **d)** La enfermera medirá el peso, altura, circunferencia de la cintura y la presión arterial, además de medir el índice de presión pierna-brazo. **e)** La enfermera practica una venopunción para extraer sangre y posteriormente preparar las alícuotas de suero, plasma y *buffy-coat*. **f)** También se recoge orina y fragmentos de las uñas de los pies. **g)** Rellenar un cuestionario general de 47 puntos en el que se recoge información sobre la medicación actual y los factores de riesgo. La información para rellenar este cuestionario también se comprueba en la historia clínica del paciente.

- **Visitas de seguimiento:** A parte de la intervención, las visitas de seguimiento se limitan a un control anual, que incluye las mismas exploraciones realizadas en la visita basal, con excepción del cuestionario general que se sustituye por el cuestionario de seguimiento y se añade un cuestionario de tolerancia / efectos adversos (véase <http://www.predimed.org>). Se recogen muestras de sangre y orina al inicio y a los 1, 3, 5 y 7 (y/o visita final). En todas las visitas de seguimiento se valora la incidencia de eventos primarios o secundarios.

D.9 Intervención

Las dietistas del estudio PREDIMED son las responsables directas de todas las intervenciones dietéticas. Se trata de dietistas registradas, formadas y que han obtenido la certificación para poder administrar el protocolo de intervención del PREDIMED. Antes de iniciar la implementación del protocolo, se realizó un curso de formación de aproximadamente 24 horas en las que se repasaron los conceptos teóricos del protocolo y se realizaron sesiones prácticas con expertos en nutrición para revisar y mejorar el protocolo de la intervención dietética. Los contactos continúan telefónicamente cada dos meses a lo largo de todo el estudio. En estas llamadas cada dietista comenta las sesiones prácticas, así como las incidencias, problemas y posibles soluciones que surgen al implementar el protocolo. También se establece una estrecha relación entre las dietistas y el centro coordinador y el *Data Manager*, especialmente tras analizar los datos de los FFQ y las determinaciones bioquímicas realizadas en una muestra aleatoria del 10% de los participantes para determinar el grado de cumplimiento de la intervención.

D. 9. 1. Administración de la intervención a los tres grupos

D. 9.1.1 Entrevista de motivación individual con al dietista del PREDIMED. Tras la visita inicial, los participantes aleatorizados a uno de los tres grupos de intervención tienen una entrevista personal con la dietista. En el curso de esta entrevista se realizan las siguientes actividades:

- a)** Administración del cuestionario de 14 puntos de adherencia a la Diet Med.
- b)** Recomendaciones personales sobre los cambios que deben introducir en su dieta para alcanzar las metas propuestas. Dependiendo del grupo de tratamiento, la dietista explica las principales razones para adoptar una Diet Med o una dieta baja en grasa, resaltando principalmente las ventajas de cada dieta en particular, y menos los riesgos de no hacerlo, para así transmitir un mensaje positivo sobre los beneficios de la dieta para un mejor control de la diabetes y los factores de riesgo vascular. En base a la cantidad total de grasa de la dieta, las recomendaciones que se dan a los participantes incluidos en el

grupo de dieta baja en grasa son opuestas a las que se administran a los participantes de los dos grupos de Diet Med. Nuestra experiencia previa con pacientes diabéticos en los que se ha administrado una intervención conductual para dejar de fumar en atención primaria ha sido muy satisfactoria (**Canga, 2000**). También tenemos experiencia en utilizar el modelo basados en los estadios de disposición al cambio en intervenciones (**Lopez-Azpiazu, 2000**). La dietista personaliza el mensaje y lo adapta a las enfermedades médicas, preferencias y creencias de cada participante. Durante la formación de la dietista se resaltó que realizaran una aproximación holística a los cambios de estilo de vida de los participantes, para adaptar la intervención a las necesidades nutricionales de cada uno de ellos y, con ello, favorecer la adherencia a la dieta prescrita. Se utiliza una técnica de compromiso (contrato) y se negocian los cambios en la dieta estableciendo una meta a conseguir, de modo que ésta sea considerada como posible por parte del participante. Los cambios pueden enfocarse tanto hacia un cambio en el tamaño de las raciones, como a un cambio de la frecuencia de la ingesta o a cambios en el método de cocinado de los alimentos. Variaciones respecto al trimestre anterior, aunque sean menores, se consideran un éxito y se utilizarán para reforzar la necesidad de mayores cambios y aumentar la autoestima. La utilidad y efectividad de este método han sido demostradas en grandes ensayos aleatorizados realizados en los Estados Unidos dirigidos a reducir la grasa de la dieta como el *Women's Health Initiative Study* (**Mossavar-Rahmani, 2004; Patterson, 2003**). Se dedicara especial atención a evitar que los participantes con diabetes, sobrepeso/obesidad, y/o hiperlipidemia no reciban consejos dietéticos contradictorios por otros profesionales de la salud ajenos al estudio PREDIMED. Como todavía algunos profesionales de salud e incluso expertos en nutrición consideran que la grasa insaturada, como la contenida en el aceite de oliva o en los frutos secos, puede engordar, es importante que los participantes incluidos en dos grupos de Diet Med no tengan miedo a un eventual aumento de peso. Ello puede hacerse explicando las últimas evidencias científicas disponibles (**McManus, 2001; Ros, 2003; Sabaté, 2003; Garcia-Lorda, 2003**) y también que en el estudio piloto no se apreció aumento de peso a los tres meses de intervención de los dos grupos de Diet Med.

c) Dependiendo del grupo asignado, se les entrega un folleto e información escrita sobre los principales componentes y método de cocinado de los alimentos de la Diet Med y de la Dieta baja en grasa, junto con recomendaciones sobre la frecuencia de ingesta de cada uno de los alimentos. Los participantes asignados al grupo de Diet Med+AOV reciben información adicional sobre los beneficios, utilización y conservación del aceite de oliva, mientras que los incluidos en el grupo de frutos secos reciben información similar sobre las propiedades de estos alimentos, con especial énfasis en los tres tipos de frutos secos que se utilizan en el estudio PREDIMED (véase: <http://www.predimed.org>).

d) A todos los participantes se les cita para que acudan a una sesión de grupo en las siguientes 1-2 semanas. La visita acaba con el compromiso del participante de que acudirá a estas sesiones.

D. 9.2.2. Sesiones de grupo. La dietista del PREDIMED es la responsable de las sesiones. El número máximo de participantes por cada sesión es de 20. Las sesiones grupales se organizan separadamente por cada grupo de intervención (Diet Med+AVO, Diet Med+frutos secos, Dieta baja en grasa). Cada una de estas sesiones incluye:

a) Una charla introductoria en la que la dietista recuerda a los participantes la escala de 14 puntos en los participantes incluidos en los grupos de Diet Med y la de 9 puntos de alimentos bajos en grasa en los del grupo baja en grasa (véase: <http://www.predimed.org>).

b) Clarificación de posibles dudas sobre los consejos dados o la información escrita que se les entrega.

c) A cada participante se les entrega la siguiente información escrita (véase también: <http://www.predimed.org>):

- Descripción de 4-5 alimentos típicos de la Diet Med o de una Dieta Baja en grasa, adaptados a la estación del año.
- Una lista de la compra de una semana, adaptada también a la estación del año.
- Plan semanal de comidas y cenas (con menús detallados) adaptado a la lista de la compra.
- Recetas de cocina de acuerdo con los menús sugeridos.

d) Entrega de la cantidad necesaria de aceite (15 litros = 1 litro/semana x 15 semanas) para los participantes del grupo de Diet Med + AOV, bolsas de nueces, avellanas y almendras (1.350 g de nueces = 15 g/d; 675 g de avellanas = 7.5 g/d, y 675 g de almendras = 7.5 g/d, lotes para 90 días) para los participantes del grupo de Diet Med + frutos secos, o regalo de alimentos bajos en grasa, libros, dosificadores, etc, para los participantes del grupo bajo en grasa.

e) La sesión acaba con el compromiso por parte del participante de acudir a la siguiente sesión de grupo (a los tres meses).

A los participantes del grupo de Diet Med + frutos secos se les entrega tres tipos de frutos secos: nueces, avellanas y almendras, en lugar de un solo tipo, porque hemos recibido financiación por parte de la industria para administrar estos tres tipos. No obstante, como existen numerosas evidencias de que el ácido alfa-linolénico contenido en las nueces ofrece ventajas adicionales en la prevención cardiovascular, se decidió administrar una mayor cantidad de nueces al grupo.

D. 9.2. Repetición de las sesiones individuales y de grupo

Las sesiones de grupo se repiten cada tres meses y siguen el esquema referido anteriormente. Las listas de la compra y las recetas se actualizan en cada sesión, de acuerdo con la estación del año. Cada sesión incluye tres pasos: valoración, intervención y futuras directrices (metas).

D. 10 Descripción de las dietas de intervención

El principal objetivo es cambiar el **patrón de dieta** en lugar de focalizarse en cambios en alimentos o macronutrientes específicos. La cantidad total de grasa en los dos grupos de Diet Med es *ad libitum* (se permite un alto consumo de grasa, siempre que ésta sea procedente del pescado y de origen vegetal, principalmente aceite de oliva y frutos secos), mientras que en el grupo bajo en grasa se limita el consumo de todo tipo de grasa. Tampoco hay ninguna restricción energética. La ingesta energética total se adapta al peso, edad y necesidades de cada participante, por lo que el consejo de la dietista es individual para cada uno de ellos.

Las directrices de las dietistas a cada uno de los participantes en los grupos de Diet Med se basan en los resultados de las encuestas de 14 puntos, mientras que las del grupo bajo en grasa se basan en los de la encuesta de 9 puntos.

D. 10.1 Confección de los menús

La mayoría de estudios que han analizado los efectos de la Diet Med han sido realizados bajo condiciones relativamente controladas, en las que la mayoría de alimentos y platos eran administrados a un reducido número de participantes por el equipo investigador. El estudio PREDIMED representa un paso más para obtener información

realmente útil para la sanidad pública, porque la intervención nutricional se da a personas que viven libremente y que reciben toda la información, motivación, soporte y ayuda para que puedan modificar sus hábitos alimentarios en su vida real, es decir, que continúan comprando sus alimentos y cocinando sus comidas. Este tipo de intervención se da, pues, en un escenario real, por lo que la información obtenida puede ser fácilmente transferida y utilizada en políticas de salud pública. Sin embargo, como la palatabilidad de las comidas es extremadamente importante para asegurar el cumplimiento de la dieta, se han desarrollado menús y recetas con estas características para los dos grupos de intervención con Diet Med. Los menús se han diseñado para que contengan los principales nutrientes. Se entregan a los participantes y son ellos los que deben aprender como preparar los platos utilizando las recetas y la información que les dan las dietitas.

D. 10.2. Administración y distribución de los alimentos

Cada tres meses, se regalan a los participantes incluidos en el grupo de Diet Med + AOV 15 litros de aceite oliva virgen rico en polifenoles (Patrimonio Comunal Olivarero, España). De forma similar, cada tres meses se dan 1.350 g de nueces (California Walnut Commission, Sacramento, CA), 675 g de almendras (Borges SA, Reus, España), y 675 g de avellanas (La Morella Nuts, Reus, España) a los participantes incluidos en el grupo de Diet Med + frutos secos. Los participantes de estos grupos recogen el aceite y los frutos secos, respectivamente, cuando acuden a las sesiones trimestrales de grupo. Ocasionalmente, estos alimentos se entregan individualmente cuando los participantes no pueden acudir a las sesiones o que deben cambiar el día de la sesión. Se decidió regalar estos alimentos para mejorar el grado de cumplimiento de los participantes incluidos en los dos grupos de Diet Med. La cantidad de aceite entregado (1 litro/semana) debería cubrir las necesidades de toda la familia. Por otra parte, a cada participante se entregan paquetes adicionales de 1000 g de frutos secos cada tres meses. Las tres industrias se han comprometido a suministrar los frutos secos hasta la finalización del estudio. Ninguno de los investigadores tiene ningún conflicto de interés con estas empresas.

D. 10.3. Promoción de la adherencia

Se realizan grandes esfuerzos para promocionar la adherencia al estudio, incluso antes de que el participante entre oficialmente en el mismo. Durante los procesos de cribaje y orientación, se da repetidamente información a los participantes sobre los puntos clave del estudio y sobre los conceptos de Diet Med y de dieta baja en grasa. Durante la primera visita de cribaje, en el cuestionario de elegibilidad se valoran las actitudes de los participantes sobre un posible cambio en la dieta. Los individuos deben querer cambiar sus hábitos dietéticos, y, en caso contrario, son excluidos del estudio. Las dietistas también realizan una intervención educacional y motivacional en las sesiones individuales y grupales que se realizan cada tres meses, es decir, en un total de 32 sesiones de intervención a lo largo de todo el estudio. También se entrega a los participantes información adicional por escrito sobre el estudio. Además, la entrega y distribución gratuita de alimentos clave asegura una gran adherencia a las dietas aconsejadas en cada grupo de intervención. La aceptación al protocolo de intervención es alta porque no se impone ninguna restricción calórica específica y los participantes en los dos grupos de Diet Med pueden comer grasa de origen vegetal y marina *ad libitum*. Finalmente, a lo largo de todo el estudio no se escatiman esfuerzos para potenciar la adherencia. Así, en muchos casos se trata de satisfacer las necesidades de cada participante y, por ejemplo, se entregan los alimentos en su domicilio o en su lugar de trabajo. Se trata de técnicas

realmente efectivas como se ha comprobado por los altos índices de adherencia y seguimiento en el estudio piloto.

D. 10.4. Valoración del cumplimiento

La administración anual del cuestionario de FFQ nos proporciona información sobre el grado de adhesión y cumplimiento de la dieta recomendada por los participantes. Aunque el FFQ que se utiliza en el estudio ha sido validado previamente en España (**Martin-Moreno, 1993**), se ha realizado un sub-estudio con 150 participantes que han rellenado dos FFQ, uno al inicio y otro al final del primer año, junto a un recordatorio alimentario de 3 días, cada 3 meses para validar y calibrarlo de nuevo. Respecto a los índices de validez del FFQ en relación con el recordatorio de 3 días por grupos de alimentos, e ingesta de energía y nutrientes los coeficientes de correlación intra-clase han variado entre 0,40 y 0,84. En cuanto a los grupos de alimentos, entre el 68 y 83% de los individuos se hallaban en el mismo cuartil o en un cuartil adyacente utilizando ambos métodos. Los datos obtenidos mediante cuestionarios de FFQ tienen, pues, una Buena reproducibilidad y un nivel de validez similar a otros FFQs utilizados en otros estudios prospectivos. La validación del FFQ asegura una mayor calidad en la medida de las dietas reales y permite poder efectuar correcciones de posibles errores de medida.

De todos modos, la información obtenida en el FFQ solo nos proporciona una valoración subjetiva del grado de cumplimiento de la dieta. Para obtener una evaluación objetiva, pueden medirse marcadores biológicos del grado de cumplimiento en una muestra aleatoria de participantes de los tres grupos de intervención. En una muestra aleatoria del 10% de los participantes, se analizaran a ciegas los siguientes marcadores de cumplimiento: a) composición de los ácidos grasos plasmáticos (especialmente los ácidos oleico y alfa-linolénico, que son indicadores fiables de la ingesta de MUFA y nueces, respectivamente); b) determinación de la concentración urinaria de tirosol e hidroxitirosol (AOV); c) concentración urinaria de resveratrol y etanol (vino y bebidas alcohólicas en general). Para poder relacionar estas determinaciones con el tiempo de la ingesta, se solicita a los participantes información sobre cuando tiempo pasó entre la última ingesta de cada uno de estos alimentos y el momento en que se extrajo la sangre o se recogió la orina.

D. 11 Determinaciones

La Tabla 1 muestra las principales pruebas y determinaciones realizadas en cada visita.

Table 1. Cuestionarios y pruebas que se realizan en el estudio PREDIMED.

	BASAL	AÑO-1	AÑO -2	AÑO -3	AÑO -4	AÑO -5
1. CUESTIONARIO DE INCLUSIÓN	X					
2. CUESTIONARIO GENERAL	X					
3. CUESTIONARIO DE FREC. CONSUMO	X	X	X	X	X	X
4. CUESTIONARIO ACT. FÍSICA	X	X	X	X	X	X
5. CUESTIONARIO DE SEGUIMIENTO*		X	X	X	X	X
6. CUESTIONARIO DE TOLERANCIA		X	X	X	X	X
7. CUESTIONARIO DE ABANDONO**		X	X	X	X	X
8. ECG	X	X	X	X	X	X
9. ANÁLISIS DE SANGRE	X	X		X		X
10. ANÁLISIS DE ORINA	X	X		X		X
11. RECOGIDA DE UÑAS	X					

*Incluye medida del peso, altura, circunferencia de la cintura, presión arterial e índice tobillo brazo de la presión arterial.

**Sólo si es necesario.

D. 11. 1 Cuestionarios

En la página web <http://www.predimed.org> se muestran los siete cuestionarios referidos en la Tabla 1 (#1 a 7). Las dietistas son responsables de la exactitud de los datos cumplimentados por los participantes. El cuestionario de seguimiento (#5 de la Tabla 1) recoge información sobre los siguientes puntos:

- Variables socio-demográficas (cambios respecto al inicial): 7 items.
- Cambios en el hábito de fumar: 3 items.
- Nuevos diagnósticos de diabetes, hiperlipidemia o hipertensión: 3 items.
- Diagnósticos de complicaciones cardiovasculares: 10 items.
- Complicaciones no cardiovasculares de la diabetes: 3 items.
- Otros problemas médicos: 3 items.
- Medicación actual (incluidas dosis): 20 items.
- Tiempo desde la última toma de AVO.
- Tiempo desde la última ingesta de vino u otras bebidas alcohólicas.

D. 11. 2 Presión arterial y medidas antropométricas

Las enfermeras del estudio PREDIMED, que han sido formadas y certificadas para realizar estas mediciones, miden la presión arterial, peso corporal, y altura. Se han establecido varios controles de calidad para asegurar la exactitud de estas medidas. Para la determinación de la presión arterial, los participantes desde permanecer en reposo durante cinco minutos en posición de sentado. Para su medición se utiliza un esfigmomanómetro semi-automático validado (Omron HEM-705CP) con un manguito de tamaño apropiado al diámetro del brazo de cada participante y se mide la presión de obliteración del pulso. En cada visita se realizan tres determinaciones, separadas por dos minutos. Se anota la media de la segunda y tercera determinación. Si entre ambas determinaciones se detecta una diferencia de más de 5 mm Hg, se repite todo el proceso y se anotan la media de las lecturas adicionales. También se determina la presión sistólica (por prueba de Doppler) en las arterial braquial, tibial posterior tibial, y *dorsalis pedis* para calcular el índice de presión tobillo-brazo. El peso corporal se mide en una balanza debidamente calibrada con el sujeto descalzo y en ropa ligera. La enfermera mide la altura con un estadiómetro calibrado montado en la pared. La circunferencia de la cintura se mide utilizando una cinta métrica, y colocándola en un plano horizontal situado en el punto medio entre la última costilla y la cresta iliaca.

D. 11. 3 Electrocardiograma (ECG)

Cada año, las enfermeras obtiene de la historia clínica de los pacientes el último ECG y se realizan dos copias, que se archivan con el resto de información recogida de cada participante. Si no se ha realizado ninguno, se solicita al CAP que le realicen uno.

D. 11. 4 Extracción, proceso y almacenaje de las muestras biológicas

Las enfermeras del estudio PREDIMED son las responsables directas de la obtención, proceso y almacenamiento de las muestras biológicas. Todas las enfermeras PREDIMED son enfermeras formadas, registradas y certificadas para poder cumplir con el

protocolo del estudio. Antes de empezar el estudio, todas ellas siguieron un curso teórico de 4 horas, acompañado de otras 4 horas de formación práctica. Se recogen muestras biológicas al inicio y a los años 1, 3, 5 y 7 (y/o visita final) de seguimiento de acuerdo con el protocolo (Tabla 2).

Tabla 2. Muestras de sangre obtenidas a los intervalos establecidos.

	Número de tubos	Volumen (ml)	
Tubo de vidrio K3E EDTA	4	4.5	Plasma EDTA + <i>buffy coat</i>
Tubo de plástico K3E EDTA (frío)	1	3	Plasma EDTA frío (tubo pre-refrigerado)
Tubo de vidrio 9NC Citrato	1	4.5	Plasma citrato + <i>buffy coat</i>
Tubo con gel SST	2	4	Suero (uno protegido de la luz para Hcy)
Tubo de vidrio K3E EDTA*	1	5	
TOTAL	9	38.5	

*Sólo en una muestra aleatoria (10%) para análisis de biomarcadores de cumplimiento: el resto se almacenará para futuros análisis.

Los tubos de plástico K3E EDTA (frío) y el de vidrio con gel separador SST (para homocisteína) se mantendrán en frío (hielo) antes de la extracción de la sangre; una vez extraída y rellenados los tubos, éstos se continuarán manteniendo en frío. Las muestras de suero, plasma citrato y plasma EDTA se distribuirán en alícuotas de 200 y 500 microlitros, que se almacenarán a -80°C hasta su análisis en el laboratorio central. Las determinaciones bioquímicas se realizarán a ciegas y se colocarán en la misma remesa las muestras consecutivas de cada participante. Cada CC dispone de congeladores con suficiente capacidad para almacenar estas muestras. Se obtendrá una muestra de orina que se repartirá en 16 alícuotas (650 microlitros) que también se almacenarán a -80°C. Dependiendo de los fondos disponibles, puede omitirse la obtención de muestras los años 2, 4 y 6. Todas las muestras biológicas se procesarán en cada CC con una demora inferior a 2 horas después de su obtención. Durante el transporte del CAP al laboratorio del CC, las muestras se trasladarán en un container refrigerado (-4°C). Las muestras de uñas de cada participante se almacenarán a temperatura ambiente.

Además, en cada CC se procederá a realizar una analítica que incluya: hemograma completo y determinaciones bioquímicas básicas como glucemia, ácido úrico ALT, AST, gamma-glutamil transpeptidasa, fosfatasa alcalina, bilirrubina, creatinina, BUN; colesterol total, HDL-, y LDL-colesterol; triglicéridos, proteínas totales, y albúmina, junto a examen rutinario de orina, incluida la relación albúmina / creatinina en orina reciente. Se aislará DNA genómico de los leucocitos de todos los participantes y se realizarán análisis de polimorfismos de genes candidatos que puedan modular la respuesta cardiovascular a la dieta (LIPC, LPL, PPARG, APOE, PON1, MTHFR, y otros) mediante PCR y posterior discriminación alélica. Algunos miembros del equipo han tenido un papel muy relevante en la identificación de interacciones gen-ambiente, que pueden resultar de gran interés para nuestro proyecto (Ordovas, 2001; Corella, 2002).

D. 11.5 Valoración de las variables finales

Los eventos que se diagnostiquen serán revisados y certificados por el **Subcomité de Eventos**. Este comité revisará los casos sin saber a que grupo de intervención pertenecen. Las variables primarias se detallan en la sección D3. El Subcomité de eventos

comprobará y certificará los eventos en base a la historia clínica y certificados de defunción aplicando el código de la Clasificación Internacional de Enfermedades correspondiente a muerte de causa cardiovascular (enfermedad coronaria o accidente vascular cerebral). Un infarto de miocardio no fatal definitivo se refiere a un infarto de miocardio diagnosticado en un centro hospitalario que reúne los criterios explicados en el Manual de Operaciones. El infarto de miocardio se define por la presencia de síntomas sugestivos de isquemia o infarto, con datos electrocardiográficos (onda Q nueva en dos o más derivaciones) u otra evidencia de infarto de acuerdo con las directrices del *American College of Cardiology (Cannon, 2001)*. El diagnóstico de accidente vascular cerebral se basa en la aparición aguda de un déficit neurológico que persiste más de 24 horas y que se confirma mediante una prueba de imagen (TAC o RM cerebral). También se realizará un análisis de las variables secundarias.

D. 12. Análisis estadístico

Los análisis se van a realizar según la intención de tratamiento. Con el tamaño de muestra actual, se asume que se dispondrá de suficiente poder estadístico para evaluar los efectos de la Diet Med (las dos Diet Med consideradas como un único grupo) comparado con la dieta baja en grasa en la prevención primaria de la enfermedad cardiovascular. También se deben poder observar diferencias en las variables primarias en los dos grupos de Diet Med para determinar si los suplementos de AOV o los frutos secos tienen algún efecto cardioprotector diferente. La principal variable a analizar será el tiempo desde la aleatorización hasta el evento. Para una determinada variable final, el tiempo hasta el evento se define como el número de días desde que el paciente es aleatorizado hasta el primer diagnóstico de la variable final. En caso de infarto de miocardio silente, se aplicará la fecha del ECG practicado. En los participantes que no han sufrido ningún evento, el tiempo de seguimiento se considerará hasta el último contacto. El test estadístico de análisis de este tipo de datos será el de *log rank*. Este método tiene la ventaja de no necesitar ningún requerimiento especial, excepto el grupo aleatorio de intervención. Este análisis será la primera medida del éxito o fracaso del ensayo. Sin embargo, si se observan diferencias bases en los principales factores de riesgo vascular entre los tres grupos, se utilizará el análisis proporcional de Cox ajustado por CC, edad, género y principales factores de riesgo. En las comparaciones entre las variables primarias se utilizará las *hazard ratios*, ajustadas por otras variables relevantes como índice de masa corporal, actividad física, nivel de educación, y estado familiar.

D. 13 Monitorización

El Centro de *Data and Knowledge Management Center (DKMC)* será el responsable de preparar los informes para que el *Steering Committee* y el *Data and Safety Monitoring Board (DSMB)* puedan comprobar los progresos del estudio. Estos informes incluirán: a) reclutamiento y seguimiento por personas-año, y comparación con las metas preestablecidas. b) adherencia de los participantes (marcadores bioquímicos y datos del FFQ data sobre grado de cumplimiento y comparación con los objetivos previstos de consumo de alimentos y nutrientes; c) control de calidad (preferencias por determinados dígitos, variabilidad, valores fuera de rango); d) variables intermedias y finales, primarias y secundarias de cada CC y comparaciones entre grupos respecto a las variables primarias, mortalidad total y otras variables secundarias. En estas secciones, los datos se proporcionarán de forma global y en caso necesario, distribuidos por CC. Los informes

serán enviados a los miembros del DSMB dos semanas antes de la reunión o de la fecha de la revisión de los datos. Se tomarán las medidas apropiadas para asegurar la seguridad y confidencialidad de los datos, incluida su envío por correo certificado y compromiso de retorno o destrucción de todos los informes. Las comparaciones entre grupos respecto a eventos finales primarios se actualizará dos días antes de la reunión, de modo que el DSMB disponga de la información más actualizada posible.

D.13.1. Calidad de los Datos

Para valorar la veracidad de los datos de los cuestionarios y de la propia base de datos, un equipo de personal externo al cada CC revisará la historia clínica de un número aleatorio de participantes. Se ha propuesto revisar aproximadamente los datos del 25% de los participantes incluidos en cada CC. Posteriormente, los miembros de *Data and Knowledge Management Center (DKMC)* confirmarán y certificarán la validez de datos (Véase más abajo).

D.13.2. Análisis de los datos

Los datos del ensayo PREDIMED se analizarán a 5 intervalos (4 análisis interinos y el análisis final). Los 4 análisis interinos que decidirán la continuación del ensayo se realizarán a los 2, 3, 4 y 5 años de seguimiento medio. Los valores de la p de dos colas necesarios para detener el ensayo en cada análisis interino (1° a 4°) son respectivamente $5 \cdot 10^{-6}$, 0.001, 0.009 y 0.02 para beneficio, y $9 \cdot 10^{-5}$, 0.005, 0.02 y 0.05 para efectos adversos, de acuerdo con las bondades asimétricas de O'Brien-Fleming (**O'Brien, 1979**). Las recomendaciones de detener o continuar el estudio las realizará el DSMB. Existen tres posibles razones para finalizar el estudio antes de tiempo: a) eficacia demostrada de la Diet Med; b) observación de efectos adversos graves debidos a la intervención; c) no existe esperanza de una evaluación favorable de la hipótesis propuesta (i.e., si existen tan pocas diferencias entre las intervenciones, que el poder del estudio este seriamente comprometido). Sólo debería plantearse la finalización del estudio si el efecto de la intervención es realmente manifiesto.

D. 14 Estructura organizativa

En la página web <http://www.predimed.org> se expone un resumen de la estructura organizativa de este estudio. La principal fuente de financiación es el ISCIII (Gobierno de España). Un **Data and Safety Monitoring Board (DSMB)** supervisará el estudio. El líder del proyecto, el Dr. Ramón Estruch (Hospital Clinic, Universidad de Barcelona) cuenta con el asesoramiento del **Steering Committee** para realizar cambios estratégicos a lo largo del tiempo del estudio. Las actividades de coordinación y supervisión interna del proyecto se han dividido en tres categorías: unidades de coordinación, unidades operativas y de investigación, y subcomités. La Tabla 3 muestra los datos básicos de cada unidad. En resumen, el equipo de investigación incluye: 11 **Centros de Campo (C)**, tres **Management and Statistical Units (DMSU)**; un **Data and Knowledge Management Center (DKMC)**; y 9 **Unidades de Laboratorio Especializado (ULE)**. El **Steering Committee** está dirigido por el Dr. Estruch, e incluye los coordinadores de los 11 CC, el investigador responsable de cada ULE y *Data Manager*. También se han creado las siguientes estructuras organizativas: un **Subcomité de Dieta**, co-dirigido por los Dres. Martínez-Gonzalez (Navarra) y Ros (Barcelona), un **Subcomité de Determinaciones**, dirigido por la Dra. Covas (IMIM-Barcelona), un **Subcomité de Reclutamiento** (dirigido por el Dr. Salas), un **Subcomité de Eventos**, dirigido por el Dr. Arós (Cardiólogo, Hospital Txagorritxu, Vitoria) y que incluirá un clínico de cada CC. El DSMB incluye los siguientes

asesores externos: Dr. F. Xavier Pi-Sunyer, Columbia University College of Physicians and Surgeons, New York; Dr. Frank Hu, Harvard School of Public Health, Boston; Dr. Joan Sabaté, Loma Linda University, CA; y Dr. Carlos González, Investigador Principal de la Rama Española del Estudio EPIC, Barcelona. Este Comité se encargará de la implementación del protocolo, y monitorizar el progreso del ensayo anualmente. Además, como ya se ha señalado, se remitirá un informe periódico a este Comité con los pertinentes análisis para poder valorar la continuación o no del estudio PREDIMED. La mayoría de Comités estarán en contacto mediante teléfono y correo electrónico durante el estudio, pero mantendrán reuniones periódicas (dos veces al año los años 1-4, una vez el año 5), aunque la frecuencia de los contactos puede variar a lo largo del estudio.

D. 15 Manejo y tratamiento de los datos

El DKMC estará co-dirigido por el Data Manager, la Dra. Covas, y el Dr. Martinez-Gonzalez. Con el soporte del DMSU (IMIM, Universidad de Navarra & Hospital Clínic-Barcelona), desarrollará y mantendrá la base de datos; realizará los análisis estadísticos y controlará el ensayo en general. Los datos recogidos en las visitas de cribaje, intervención y seguimiento serán recogidos en cada CC y enviados al Data Manager cada mes, que los revisará y enviará informes sobre los datos que falten o que resulten incongruentes cada mes hasta sean clarificados. El Data Manager también informará mensualmente al Dr. Estruch sobre la calidad de los datos, organizados según el tipo de visita (cribaje, basal, seguimiento al año, etc.) y por formulario /cuestionario. Al final de cada visita anual, el Data Manager verificará y certificará los datos de cada cuestionario.

Tabla 3. Descripción de la Unidades Orgánicas del Proyecto.

Categ.	Nombre de la Unidad	Responsabilidades
Coordinación	Administración	Dirección General, administración de los programas de tareas encomendadas
	Soporte Técnico	Asistencia técnica y tecnológica, instalación y mantenimiento de infraestructuras.
	Data and Knowledge Management Center (DKMC)	Análisis estadístico, manejo de los datos, elaboración de informes, manejo de las bases de datos, desarrollo de herramientas informáticas, seguridad de la información y de los sistemas informáticos.
	Soporte Médico	Asistencia médica en tareas clínicas
Investigación y Operaciones	Universidad de Barcelona (Hospital Clínic)	CENTRO DE CAMPO (CC)-1: Reclutamiento de pacientes, intervención dietética. Unidad de Laboratorio Especializado (ULE)-1
	Barcelona, IMIM*/ ICS (Centros de Atención Primaria)	CC -2: Reclutamiento de pacientes, intervención dietética Data Management and Statistical Unit (DMSU)-1, ULE -2
	Universidad Navarra	CC -3 Reclutamiento de pacientes, intervención dietética, DMSU-2 , proceso de FFQ
	Universidad Valencia	CC -4 Reclutamiento de pacientes, intervención dietética, análisis genéticos, ULE -3
	Universidad Malaga	CC -5: Reclutamiento de pacientes, intervención dietética, trabajo de laboratorio
	Sevilla Centro de Atención Primaria	CC -6: Reclutamiento de pacientes, intervención dietética
	Sevilla-CSIC*	ULE -4
	Mallorca I. Universidad Baleares	CC -7: Reclutamiento de pacientes, intervención dietética
	Tarragona, Rovira Virgili Univ.	CC -8: Reclutamiento de pacientes, intervención dietética, trabajo de laboratorio
	Vitoria, Hospital Txagorritxu	CC -9: Reclutamiento de pacientes, intervención dietética
	Las Palmas, Univ. Gran Canaria	CC -10: Reclutamiento de pacientes, intervención dietética
	Hospital Bellvitge, Barcelona	CC -11: Reclutamiento de pacientes, intervención dietética
	Universidad de las Islas Baleares	ULE -5
	Universidad Barcelona – Facultad de Farmacia	ULE -6
Universidad del País Vasco – Facultad de Farmacia	ULE -7	
Universidad de Barcelona – Facultad de Ciencias	ULE -9	

*CSIC: Centro Superior de Investigaciones Científicas. IMIM: Instituto Municipal de Investigación Biomédica.

Se ha creado un sistema de acceso a los datos del estudio a través de una web privada (<http://www.predimed.org>), de donde los investigadores autorizados pueden descargarse todos los formularios, bases de datos y artículos publicados. Por seguridad y privacidad, se requiere un ID y una contraseña para poder acceder a los datos y a los formularios. Este sistema basado en la web es el utilizado para enviar los datos al Data Manager. Como control de calidad se revisarán los principales datos del estudio, como p.e. preferencia por determinadas cifras y variabilidad de los datos. Para reducir los gastos de entrada y la velocidad del proceso de datos, los formularios y cuestionarios son escaneados. Todos los formularios son entrados por duplicado y posteriormente se realiza una revisión exhaustiva en busca de datos que faltan. También se revisa la existencia de incongruencias. También se realizan auditorías periódicas para detectar problemas no resueltos. La emisión de informes estandarizados que resumen las incongruencias, datos que faltan u otros problemas de la base de datos es otro método adicional para asegurar la calidad de los datos. Para minimizar los errores potenciales, se ha escrito un Manual de Operaciones. Asimismo, se realizará una reunión anual de formación para el personal de staff. El DKMC controlará los posibles problemas en cada CC y recomendará la aplicación de nuevas medidas o corrección de anteriores en caso de detectar deficiencias. Hasta el final del ensayo, el personal de los CC no dispondrá de toda la información del ensayo, a excepción de los estadísticos, el Data Manager y el DSMB externo. Dada la naturaleza de la intervención, es imposible que las dietistas y enfermeras de los respectivos CC no sepan a que grupo de intervención están asignados los participantes. No obstante, el SubComité de Eventos si que no sabrá la intervención seguida por los casos que le envíen para evaluar.

D.16 Limitaciones del estudio

El consumo de grasa es relativamente alto en los países mediterráneos. Debido a ello, a muchos participantes les cuesta seguir una dieta baja en grasa durante un periodo prolongado de tiempo. Somos conscientes de que se trata de una limitación porque los participantes incluidos en el grupo bajo en grasa (grupo control) pertenecen a la cultura mediterránea y sus hábitos alimentarios derivan de una Diet Med tradicional rica en grasa (**Serra-Majem, 2007**). Pensamos que no sería ético recomendar a los controles apartarse mucho de este patrón dietético más sano, por lo que los máximos esfuerzos se dirigen a que los participantes de ambos grupos experimentales se aproximen lo máximo posible a la Diet Med tradicional y de este modo maximizar las diferencias.

El principal punto diferencial de nuestro diseño es que evaluamos dos Diet Med con un contenido en grasa más alto que el utilizado en otros estudios previos, pero en ambos grupos la principal fuente de grasa con ácidos grasos insaturados. Además, también se valoran los efectos de dos dietas ricas en polifenoles y fitosteroles. La rigurosa metodología que se aplica en el estudio PREDIMED debería permitir contestar de forma convincente la pregunta que ha generado más controversia en referencia a dieta y enfermedad cardiovascular, es decir, si deben reemplazarse la grasa saturada por MUFA o por carbohidratos.

D. 17. Diseminación de los resultados

D.17.1 Estrategias generales: La explotación de los resultados científicos del estudio PREDIMED se realizará siguiendo un Plan de Diseminación, que incluye: i) Utilización de

definiciones y datos elementales comunes, para utilización de un lenguaje científicos y popular común en las comunicaciones entre científicos y sociedad en general; y ii) Implementación de una estrategia, definida como un proceso a través del cual la población pueda asimilar, aceptar, adoptar y utilizar la información diseminada. El Plan de Diseminación debería ser más que la mera distribución de la información. También debe tenerse en cuenta como se consume la comida sana en base a una relación coste / beneficio de los componentes de los alimentos para proteger los intereses de la población con menos recursos.

El Plan de Diseminación debe tener en cuenta el tipo de audiencia, las estrategias utilizadas para una mayor asimilación y adopción de la información, y la implicación de varios medios de comunicación. Las audiencias potenciales pueden dividirse en seis categorías: I) consumidores; ii) nutricionistas y profesionales de la sanidad; iii) industria alimentaria; iv) políticos; v) investigadores; y vi) periodistas. Las estrategias de comunicación se dividirán en dos categorías principales: i) nutricionistas, profesionales de la sanidad e investigadores, a través de conferencias, talleres, cursos de educación nutricional continua, *web sites* institucionales, revistas y periódicos técnicos; ii) consumidores en general, a través la prensa escrita, radio y TV, y con la ayuda de la industria alimentaria y organizaciones de consumidores (p.e. la *American Consumers Organization*),.

D. 17.2. Estrategias específicas:

- Se dispone de dos páginas Web del estudio:
 - o [http: www.predimed.org](http://www.predimed.org)
 - o [http: www.unav.es/departamento/preventiva/predimed](http://www.unav.es/departamento/preventiva/predimed)
 en las que se puede revisar los detalles del estudio, incluidas las herramientas utilizadas en la intervención. Toda la información está abierta al público, excepto algunas secciones específicas, como las bases de datos, que no se abrirán hasta la finalización del estudio.
- Los resultados sobre variables finales (primarias y secundarias) y los análisis de variables intermedias a diferentes intervalos se publicarán en las mejores revistas médicas.
- Al final del estudio se realizará un Simposium Internacional en el que se presentarán los resultados finales. Incluirá conferencias sobre los principales aspectos sobre nutrición y enfermedad cardiovascular.
- También se editará una monografía y un CD-rom sobre los principales aspectos del estudio, que se enviará a todos los participantes, a todas las sociedades científicas relacionadas con Medicina Interna, Cardiología, Oncología, Epidemiología Cardiovascular y Nutrición, así como a las autoridades políticas relacionadas con la salud pública, nutrición y agricultura.

E. BIBLIOGRAFIA

- Albert CM, Gaziano JM, Willett WC, Manson JE. Nut consumption and decreased risk of sudden cardiac death in the Physicians' Health Study. *Arch Intern Med.* 2002;162:1382-7.
- Ascherio A, Rimm EB, Giovannucci EL, Spiegelman D, Stampfer M, Willett WC. Dietary fat and risk of coronary heart disease in men: cohort follow up study in the United States. *BMJ.* 1996;313:84-90.
- Baylin A, Kabagambe EK, Ascherio A, Spiegelman D, Campos H. Adipose tissue alpha-linolenic acid and nonfatal acute myocardial infarction in Costa Rica. *Circulation.* 2003;107:1586-91.
- Becker A, van Hinsbergh VW, Jager A, Kostense PJ, Dekker JM, Nijpels G, Heine RJ, Bouter LM, Stehouwer CD. Why is soluble intercellular adhesion molecule-1 related to cardiovascular mortality? *Eur J Clin Invest.* 2002;32:1-8.
- Bondia-Pons I, Serra-Majem L, Castellote AI, López-Sabater MC. Identification of foods contributing to the dietary lipid profile of a Mediterranean population. *Br J Nutr.* 2007;98:583-92.
- Bray GA, Popkin BM. Dietary fat intake does affect obesity! *Am J Clin Nutr.* 1998;68:1157-73.
- Brouwer IA, Katan MB, Zock PL. Dietary alpha-linolenic acid is associated with reduced risk of fatal coronary heart disease, but increased prostate cancer risk: a meta-analysis. *J Nutr.* 2004;134:919-22.
- Canga N, De Irala J, Vara E, Duaso MJ, Ferrer A, Martínez-González MA. Intervention study for smoking cessation in diabetic patients: a randomized controlled trial in both clinical and primary care settings. *Diabetes Care.* 2000;23:1455-60.
- Cannon CP, Battler A, Brindis RG, Cox JL, Ellis SG, Every NR, Flaherty JT, Harrington RA, Krumholz HM, Simoons ML, Van De Werf FJ, Weintraub WS, Mitchell KR, Morrisson SL, Brindis RG, Anderson HV, Cannon DS, Chitwood WR, Cigarroa JE, Collins-Nakai RL, Ellis SG, Gibbons RJ, Grover FL, Heidenreich PA, Khandheria BK, Knoebel SB, Krumholz HL, Malenka DJ, Mark DB, McKay CR, Passamani ER, Radford MJ, Riner RN, Schwartz JB, Shaw RE, Shemin RJ, Van Fossen DB, Verrier ED, Watkins MW, Phoubandith DR, Furnelli T. American College of Cardiology key data elements and definitions for measuring the clinical management and outcomes of patients with acute coronary syndromes. A report of the American College of Cardiology Task Force on Clinical Data Standards (Acute Coronary Syndromes Writing Committee). *J Am Coll Cardiol.* 2001;38:2114-30.
- Carluccio MA, Massaro M, Bonfrate C, Siculella L, Maffia M, Nicolardi G, Distante A, Storelli C, De Caterina R. Oleic acid inhibits endothelial activation: A direct vascular antiatherogenic mechanism of a nutritional component in the Mediterranean diet. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:220-8.
- Carluccio MA, Siculella L, Ancora MA, Massaro M, Scoditti E, Storelli C, Visioli F, Distante A, De Caterina R. Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit

- endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:622-9.
- Connor WE, Connor SL. Should a low-fat, high-carbohydrate diet be recommended for everyone? The case for a low-fat, high-carbohydrate diet. *N Engl J Med.* 1997;337:562-3.
- Corella D, Guillen M, Saiz C, Portoles O, Sabater A, Folch J, Ordovas JM. Associations of LPL and APOC3 gene polymorphisms on plasma lipids in a Mediterranean population: interaction with tobacco smoking and the APOE locus. *J Lipid Res.* 2002;43:416-27.
- Cortés B, Núñez I, Cofán M, Gilabert R, Pérez-Heras A, Casals E, Deulofeu R, Ros E. Acute effects of high-fat meals enriched with walnuts or olive oil on postprandial endothelial function in healthy subjects and patients with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48:1666-71.
- Costacou T, Bamia C, Ferrari P, Riboli E, Trichopoulos D, Trichopoulou A. Tracing the Mediterranean diet through principal components and cluster analyses in the Greek population. *Eur J Clin Nutr.* 2003;57:1378-85.
- Covas MI, Nyyssönen K, Poulsen HE, Kaikkonen J, Zunft HJ, Kiesewetter H, Gaddi A, de la Torre R, Mursu J, Bäumlér H, Nascetti S, Salonen JT, Fitó M, Virtanen J, Marrugat J, EUROLIVE Study Group. The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial. *Ann Intern Med.* 2006;145:333-41.
- de la Puerta R, Ruiz Gutierrez V, Houtl JR. Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. *Biochem Pharmacol.* 1999;57:445-9.
- de la Puerta R, Martinez Dominguez ME, Ruiz-Gutierrez V, Flavill JA, Houtl JR. Effects of virgin olive oil phenolics on scavenging of reactive nitrogen species and upon nitrenergic neurotransmission. *Life Sci.* 2001;69:1213-22.
- de Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Delaye J, Mamelle N. Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation.* 1999;99:779-85.
- Desideri G, Croce G, Marinucci MC, Masci PG, Stati M, Valeri L, Santucci A, Ferri C. Prolonged, low dose alpha-tocopherol therapy counteracts intercellular cell adhesion molecule-1 activation. *Clin Chim Acta.* 2002;320:5-9.
- Djousse L, Folsom AR, Province MA, Hunt SC, Ellison RC; National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study. Dietary linolenic acid and carotid atherosclerosis: the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study. *Am J Clin Nutr.* 2003;77:819-25.
- Ellsworth JL, Kushi LH, Folsom AR. Frequent nut intake and risk of death from coronary heart disease and all causes in postmenopausal women: the Iowa Women's Health Study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2001;11:372-7.
- Elosua R, Garcia M, Aguilar A, Molina L, Covas MI, Marrugat J. Validation of the Minnesota Leisure Time Physical Activity Questionnaire In Spanish Women. Investigators of the MARATDON Group. *Med Sci Sports Exerc.* 2000;32:1431-7.

- Elosua R, Marrugat J, Molina L, Pons S, Pujol E. Validation of the Minnesota Leisure Time Physical Activity Questionnaire in Spanish men. The MARATHOM Investigators. *Am J Epidemiol.* 1994;139:1197-209.
- Estruch R, Martínez-González MA, Corella D, Salas-Salvadó J, Ruiz-Gutiérrez V, Covas MI, Fiol M, Gómez-Gracia E, López-Sabater MC, Vinyoles E, Arós F, Conde M, Lahoz C, Lapetra J, Sáez G, Ros E on behalf of the PREDIMED Study Investigators. Effects of a Mediterranean-style diet on cardiovascular risk factors. A randomized trial. *Ann Intern Med* 2006;145:1-11.
- Espósito K, Marfella R, Ciotola M, Di Palo C, Giugliano F, Guigliano G, D'Armiento M, D'Andrea F, Guigliano D. Effect of a Mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomised trial. *JAMA* 2004; 292: 1440 – 6.
- Feldman EB. The scientific evidence for a beneficial health relationship between walnuts and coronary heart disease. *J Nutr.* 2002;132:1062S-1101S.
- Ferrara LA, Raimondi AS, d'Episcopo L, Guida L, Dello Russo A, Marotta T. Olive oil and reduced need for antihypertensive medications. *Arch Intern Med.* 2000 27;160:837-42.
- Ferro-Luzzi A, James WP, Kafatos A. The high-fat Greek diet: a recipe for all? *Eur J Clin Nutr.* 2002;56:796-809.
- Fitó M, Guxens M, Corella D, Sáez G, Estruch R, de la Torre R, Francés F, Cabezas C, López-Sabater MC, Marrugat J, García-Arellano A, Arós F, Ruiz-Gutierrez V, Ros E, Salas-Salvadó J, Fiol M, Solá R, Covas MI, on behalf of the PREDIMED Study Investigators. Effect of a traditional Mediterranean diet on lipoprotein oxidation. A randomized, controlled trial. *Arch Intern Med* 2007;167:1195-1203.
- Fraser GE, Sabate J, Beeson WL, Strahan TM. A possible protective effect of nut consumption on risk of coronary heart disease. The Adventist Health Study. *Arch Intern Med.* 1992;152:1416-24.
- Fuentes F, Lopez-Miranda J, Sanchez E, Sanchez F, Paez J, Paz-Rojas E, Marin C, Gomez P, Jimenez-Pereperez J, Ordovas JM, Perez-Jimenez F. Mediterranean and low-fat diets improve endothelial function in hypercholesterolemic men. *Ann Intern Med.* 2001;134:1115-9.
- Fung TT, Rexrode KM, Mantzoros CS, Manson JE, Willett WC, Hu FB. Mediterranean diet and incidence of and mortality from coronary heart disease and stroke in women. *Circulation.* 2009;119:1093-100.
- Gabriel R, Alonso M, Segura A, et al on behalf of the ERICE Cooperative Group. Prevalence, geographic distribution, and geographic variability of major cardiovascular risk factors in Spain. Pooled analysis of data from population-based epidemiological studies: the ERICE Study. *Rev Esp Cardiol* 2008;61:1030-40.
- Garcia-Lorda P, Megias Rangil I, Salas-Salvado J. Nut consumption, body weight and insulin resistance. *Eur J Clin Nutr.* 2003;57 Suppl 1:S8-11.

- Guallar E, Aro A, Jimenez FJ, Martin-Moreno JM, Salminen I, van't Veer P, Kardinaal AF, Gomez-Aracena J, Martin BC, Kohlmeier L, Kark JD, Mazaev VP, Ringstad J, Guillen J, Riemersma RA, Huttunen JK, Thamm M, Kok FJ. Omega-3 fatty acids in adipose tissue and risk of myocardial infarction: the EURAMIC study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:1111-8.
- Haim M, Tanne D, Boyko V, Reshef T, Goldbourt U, Leor J, Mekori YA, Behar S. Soluble intercellular adhesion molecule-1 and long-term risk of acute coronary events in patients with chronic coronary heart disease. Data from the Bezafibrate Infarction Prevention (BIP) Study. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39:1133-8.
- Hu FB, Stampfer MJ, Manson JE, Rimm EB, Colditz GA, Rosner BA, Speizer FE, Hennekens CH, Willett WC. Frequent nut consumption and risk of coronary heart disease in women: prospective cohort study. *BMJ.* 1998;317:1341-5.
- Hu FB, Stampfer MJ, Manson JE, Rimm EB, Wolk A, Colditz GA, Hennekens CH, Willett WC. Dietary intake of alpha-linolenic acid and risk of fatal ischemic heart disease among women. *Am J Clin Nutr.* 1999;69:890-7.
- Hu FB. Dietary pattern analysis: a new direction in nutritional epidemiology. *Curr Opin Lipidol* 2002;13:3-9.
- Hu FB. The Mediterranean diet and mortality--olive oil and beyond. *N Engl J Med.* 2003;348:2595-6.
- Hwang SJ, Ballantyne CM, Sharrett AR, Smith LC, Davis CE, Gotto AM Jr, Boerwinkle E. Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Circulation.* 1997;96:4219-25.
- Jacobs DR Jr, Steffen LM. Nutrients, foods, and dietary patterns as exposures in research: a framework for food synergy. *Am J Clin Nutr.* 2003;78(3 Suppl):508S-513S.
- Jacques PF, Tucker KL. Are dietary patterns useful for understanding the role of diet in chronic disease? *Am J Clin Nutr.* 2001;73:1-2.
- Jequier E, Bray GA. Low-fat diets are preferred. *Am J Med.* 2002;113 Suppl 9B:41S-46S.
- Joint WHO/FAO Expert Consultation on Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases (2002: Geneva, Switzerland). WHO technical report series; 916. Geneva: WHO, 2003.
- Kew S, Mesa MD, Tricon S, Buckley R, Minihane AM, Yaqoob P. Effects of oils rich in eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on immune cell composition and function in healthy humans. *Am J Clin Nutr.* 2004;79:674-81.
- Kouris-Blazos A, Gnardellis C, Wahlqvist ML, Trichopoulos D, Lukito W, Trichopoulou A. Are the advantages of the Mediterranean diet transferable to other populations? A cohort study in Melbourne, Australia. *Br J Nutr.* 1999;82:57-61.
- Kris-Etherton P, Eckel RH, Howard BV, St Jeor S, Bazzarre TL; Nutrition Committee Population Science Committee and Clinical Science Committee of the American

- Heart Association. AHA Science Advisory: Lyon Diet Heart Study. Benefits of a Mediterranean-style, National Cholesterol Education Program/American Heart Association Step I Dietary Pattern on Cardiovascular Disease. *Circulation*. 2001;103:1823-5.
- Kris-Etherton PM, Zhao G, Binkoski AE, Coval SM, Etherton TD. The effects of nuts on coronary heart disease risk. *Nutr Rev*. 2001;59:103-11.
- Lasheras C, Fernandez S, Patterson AM. Mediterranean diet and age with respect to overall survival in institutionalized, nonsmoking elderly people. *Am J Clin Nutr*. 2000;71:987-92.
- Lercker G, Lercker G, Rodriguez-Estrada MT. Chromatographic analysis of unsaponifiable compounds of olive oils and fat-containing foods. *J Chromatogr A*. 2000;881:105-29.
- Lopez-Azpiazu I, Martinez-Gonzalez MA, Leon-Mateos A, Kearney J, Gibney M, Martinez JA. Stages of dietary change and nutrition attitudes in the Spanish population. *Public Health*. 2000;114:183-9.
- Lopez-Garcia E, Schulze MB, Manson JE, Meigs JB, Albert CM, Rifai N, Willett WC, Hu FB. Consumption of (n-3) fatty acids is related to plasma biomarkers of inflammation and endothelial activation in women. *J Nutr*. 2004;134:1806-11.
- Luc G, Arveiler D, Evans A, Amouyel P, Ferrieres J, Bard JM, Elkhilil L, Fruchart JC, Ducimetiere P; PRIME Study Group. Circulating soluble adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 and incident coronary heart disease: the PRIME Study. *Atherosclerosis*. 2003;170:169-76.
- Machowetz A, Poulsen HE, Gruendel S, Weimann A, Fitó M, Marrugat J, de la Torre R, Salonen JT, Nyssönen K, Mursu J, Nascetti S, Gaddi A, Kiesewetter H, Bäuml H, Selmi H, Kaikkonen J, Zunft HJ, Covas MI, Koenig C. Effect of olive oils on biomarkers of oxidative DNA stress in Northern and Southern Europeans. *FASEB J*. 2007;21:45-52.
- Malik I, Danesh J, Whincup P, Bhatia V, Papacosta O, Walker M, Lennon L, Thomson A, Haskard D. Soluble adhesion molecules and prediction of coronary heart disease: a prospective study and meta-analysis. *Lancet*. 2001;358:971-6.
- Manna C, D'Angelo S, Migliardi V, Loffredi E, Mazzone O, Morricca P, Galletti P, Zappia V. Protective effect of the phenolic fraction from virgin olive oils against oxidative stress in human cells. *J Agric Food Chem*. 2002;50:6521-6.
- Mangiapan EH, McAteer MA, Benson GM, White DA, Salter AM. Modulation of the regression of atherosclerosis in the hamster by dietary lipids: comparison of coconut oil and olive oil. *Br J Nutr*. 1999;82:401-9.
- Martinez-Gonzalez MA, Fernandez-Jarne E, Serrano-Martinez M, Marti A, Martinez JA, Martin-Moreno JM. Mediterranean diet and reduction in the risk of a first acute myocardial infarction: an operational healthy dietary score. *Eur J Nutr*. 2002;41:153-60.

- Martinez-Gonzalez MA, Estruch R. Mediterranean diet, antioxidants and cancer: the need for randomized trials. *Eur J Cancer Prev.* 2004;13:327-35.
- Martinez-Gonzalez MA, Sanchez-Villegas A. The emerging role of Mediterranean diets in cardiovascular epidemiology: monounsaturated fats, olive oil, red wine or the whole pattern? *Eur J Epidemiol.* 2004;19(1):9-13.
- Martinez-Gonzalez MA, Fernandez-Jarne E, Serrano-Martinez M, Wright M, Gomez-Gracia E. Development of a short dietary intake questionnaire for the quantitative estimation of adherence to a cardioprotective Mediterranean diet. *Eur J Clin Nutr.* 2004;58:1550-2.
- Martin-Moreno JM, Boyle P, Gorgojo L, Maisonneuve P, Fernandez-Rodriguez JC, Salvini S, Willett WC. Development and validation of a food frequency questionnaire in Spain. *Int J Epidemiol.* 1993;22:512-9.
- Marrugat J, Covas MI, Fito M, Schroder H, Miro-Casas E, Gimeno E, Lopez-Sabater MC, de la Torre R, Farre M; SOLOS Investigators. Effects of differing phenolic content in dietary olive oils on lipids and LDL oxidation--a randomized controlled trial. *Eur J Nutr.* 2004;43:140-7.
- Mata P, Varela O, Alonso R, Lahoz C, de Oya M, Badimon L. Monounsaturated and polyunsaturated n-6 fatty acid-enriched diets modify LDL oxidation and decrease human coronary smooth muscle cell DNA synthesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:2088-95.
- Mataix J, Quiles JL, Huertas JR, Battino M, Manas M. Tissue specific interactions of exercise, dietary fatty acids, and vitamin E in lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med.* 1998;24:511-21.
- McManus K, Antinoro L, Sacks F. A randomized controlled trial of a moderate-fat, low-energy diet compared with a low fat, low-energy diet for weight loss in overweight adults. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2001;25:1503-11.
- Meigs JB, Hu FB, Rifai N, Manson JE. Biomarkers of endothelial dysfunction and risk of type 2 diabetes mellitus. *JAMA.* 2004;291:1978-86.
- Miles EA, Thies F, Wallace FA, Powell JR, Hurst TL, Newsholme EA, Calder PC. Influence of age and dietary fish oil on plasma soluble adhesion molecule concentrations. *Clin Sci (Lond).* 2001;100:91-100.
- Mitrou PN, Kipnis V, Thiébaud AC, Reedy J, Subar AF, Wirfält E, Flood A, Mouw T, Hollenbeck AR, Leitzmann MF, Schatzkin A. Mediterranean dietary pattern and prediction of all-cause mortality in a US population: results from the NIH-AARP Diet and Health Study. *Arch Intern Med.* 2007;167:2461-8.
- Mossavar-Rahmani Y, Henry H, Rodabough R, Bragg C, Brewer A, Freed T, Kinzel L, Pedersen M, Soule CO, Vosburg S. Additional self-monitoring tools in the dietary modification component of The Women's Health Initiative. *J Am Diet Assoc.* 2004;104:76-85.

- Nigg CR, Burbank PM, Padula C, Dufresne R, Rossi JS, Velicer WF, Laforge RG, Prochaska JO. Stages of change across ten health risk behaviors for older adults. *Gerontologist*. 1999;39:473-82.
- O'Brien PC, Fleming TR. A multiple testing procedure for clinical trials. *Biometrics*. 1979;35:549-56.
- Oomen CM, Ocke MC, Feskens EJ, Kok FJ, Kromhout D. alpha-Linolenic acid intake is not beneficially associated with 10-y risk of coronary artery disease incidence: the Zutphen Elderly Study. *Am J Clin Nutr*. 2001;74:457-63.
- Ordovas JM, Corella D, Demissie S, Cupples LA, Couture P, Coltell O, Wilson PW, Schaefer EJ, Tucker KL. Dietary fat intake determines the effect of a common polymorphism in the hepatic lipase gene promoter on high-density lipoprotein metabolism: evidence of a strong dose effect in this gene-nutrient interaction in the Framingham Study. *Circulation*. 2002;106:2315-21.
- Panagiotakos DB, Pitsavos C, Chrysohoou C, Stefanadis C, Toutouzias P. Risk stratification of coronary heart disease in Greece: final results from the CARDIO2000 Epidemiological Study. *Prev Med*. 2002;35:548-56.
- Patterson RE, Kristal A, Rodabough R, Caan B, Lillington L, Mossavar-Rahmani Y, Simon MS, Snetselaar L, Van Horn L. Changes in food sources of dietary fat in response to an intensive low-fat dietary intervention: early results from the Women's Health Initiative. *J Am Diet Assoc*. 2003;103:454-60.
- Perez-Jimenez F, Lopez-Miranda J, Mata P. Protective effect of dietary monounsaturated fat on arteriosclerosis: beyond cholesterol. *Atherosclerosis*. 2002;163:385-98.
- Perez-Jimenez F, Alvarez de Cienfuegos G, Badimon L, Barja G, Battino M, Blanco A, Bonanome A, Colomer R, Corella-Piquer D, Covas I, Chamorro-Quiros J, Escrich E, Gaforio JJ, Garcia Luna PP, Hidalgo L, Kafatos A, Kris-Etherton PM, Lairon D, Lamuela-Raventos R, Lopez-Miranda J, Lopez-Segura F, Martinez-Gonzalez MA, Mata P, Mataix J, Ordovas J, Osada J, Pacheco-Reyes R, Perucho M, Pineda-Priego M, Quiles JL, Ramirez-Tortosa MC, Ruiz-Gutierrez V, Sanchez-Rovira P, Solfrizzi V, Soriguer-Escofet F, de la Torre-Fornell R, Trichopoulos A, Villalba-Montoro JM, Villar-Ortiz JR, Visioli F. International conference on the healthy effect of virgin olive oil. *Eur J Clin Invest* 2005;35:421-4.
- Pradhan AD, Manson JE, Rossouw JE, Siscovick DS, Mouton CP, Rifai N, Wallace RB, Jackson RD, Pettinger MB, Ridker PM. Inflammatory biomarkers, hormone replacement therapy, and incident coronary heart disease: prospective analysis from the Women's Health Initiative observational study. *JAMA*. 2002;288:980-7.
- Puerta Vazquez R, Martinez-Dominguez E, Sanchez Perona J, Ruiz-Gutierrez V. Effects of different dietary oils on inflammatory mediator generation and fatty acid composition in rat neutrophils. *Metabolism*. 2004;53:59-65.
- Rallidis LS, Paschos G, Papaioannou ML, Liakos GK, Panagiotakos DB, Anastasiadis G, Zampelas A. The effect of diet enriched with alpha-linolenic acid on soluble

- cellular adhesion molecules in dyslipidaemic patients. *Atherosclerosis*. 2004;174:127-32.
- Ramirez-Tortosa MC, Urbano G, Lopez-Jurado M, Nestares T, Gomez MC, Mir A, Ros E, Mataix J, Gil A. Extra-virgin olive oil increases the resistance of LDL to oxidation more than refined olive oil in free-living men with peripheral vascular disease. *J Nutr*. 1999;129:2177-83.
- Reddy KS. Cardiovascular disease in non-Western countries. *N Engl J Med*. 2004;350:2438-40.
- Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med*. 2000;342:836-43.
- Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation*. 2000;101:1767-72.
- Ros E. Dietary cis-monounsaturated fatty acids and metabolic control in type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr*. 2003;78(3 Suppl):617S-625S.
- Ros E, Nunez I, Perez-Heras A, Serra M, Gilabert R, Casals E, Deulofeu R. A walnut diet improves endothelial function in hypercholesterolemic subjects: a randomized crossover trial. *Circulation*. 2004;109:1609-14.
- Sabate J. Nut consumption and body weight. *Am J Clin Nutr*. 2003;78(3 Suppl):647S-650S.
- Sanchez-Villegas A, Delgado-Rodriguez M, Martinez-Gonzalez MA, De Irala-Estevez J; Seguimiento Universidad de Navarra group. Gender, age, socio-demographic and lifestyle factors associated with major dietary patterns in the Spanish Project SUN (Seguimiento Universidad de Navarra). *Eur J Clin Nutr*. 2003;57:285-92.
- Serra-Majem L, Ribas-Barba L, Salvador G, Jover L, Raidó B, Ngo J, Plasencia A. Trends in energy and nutrient intake and risk of inadequate intakes in Catalonia, Spain (1992-2003). *Public Health Nutr*. 2007;10(11A):1354-67.
- Shai I, Schwarzfuchs D, Henkin Y, Shadar DR, Witkow S, Greenberg I, Golan R, Fraser D, Bolotin A, Vardi H, Tangi-Rozental O, Zuk-Ramot R, Sarusi B, Brickner D, Schwartz Z, Sheiner E, Marko R, Katorza E, Thiery J, Fiedler GM, Blüher M, Stumvoll M, Stampfer MJ, Dietary Intervention Randomized Controlled Trial (DIRECT) Group. Weight loss with low-carbohydrate, Mediterranean and low-fat diet. *N Engl J Med*. 2008;359:229-41.
- Sofi F, Cesari F, Abbate R, Gensini GF, Casini A. Adherence to Mediterranean diet and health status: meta-analysis. 2008 Sep 11;337:a1344. doi: 10.1136/bmj.a1344
- Tanne D, Haim M, Boyko V, Goldbourt U, Reshef T, Matetzky S, Adler Y, Mekori YA, Behar S. Soluble intercellular adhesion molecule-1 and risk of future ischemic stroke: a nested case-control study from the Bezafibrate Infarction Prevention (BIP) study cohort. *Stroke*. 2002;33:2182-6.

- Trichopoulou A, Kouris-Blazos A, Wahlqvist ML, Gnardellis C, Lagiou P, Polychronopoulos E, Vassilakou T, Lipworth L, Trichopoulos D. Diet and overall survival in elderly people. *BMJ*. 1995;311:1457-60.
- Trichopoulou A, Costacou T, Bamia C, Trichopoulos D. Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *N Engl J Med*. 2003;348:2599-608.
- Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Mahonen M, Tolonen H, Ruokokoski E, Amouyel P. Contribution of trends in survival and coronary-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA project populations. Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease. *Lancet*. 1999 May 8;353(9164):1547-57.
- USDA (2000). Nutrition and Your Health: Dietary Guidelines for Americans. Washington: US Department of Agriculture. <http://www.health.gov/dietaryguidelines/dga2000/document/contents.htm>.
- Visioli F, Galli C. The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: new findings. *Nutr Rev*. 1998;56:142-7.
- Visioli F, Galli C. Biological properties of olive oil phytochemicals. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2002;42:209-21.
- Visioli F, Caruso D, Grande S, Bosisio R, Villa M, Galli G, Sirtori C, Galli C. Virgin Olive Oil Study (VOLOS): vasoprotective potential of extra virgin olive oil in mildly dyslipidemic patients. *Eur J Nutr*. 2004;1-7 [Epub ahead of print]
- Vissers MN, Zock PL, Katan MB. Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: a review. *Eur J Clin Nutr* 2004 ;58: 955–965.
- Willett WC, Sacks F, Trichopoulou A, Drescher G, Ferro-Luzzi A, Helsing E, Trichopoulos D. Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. *Am J Clin Nutr*. 1995;61(6 Suppl):1402S-1406S.
- Willett WC. Will high-carbohydrate/low-fat diets reduce the risk of coronary heart disease? *Proc Soc Exp Biol Med*. 2000;225:187-90.
- World Health Organization. Health for All: statistical database. Geneva: WHO, Regional Office for Europe, 1993.
- World Health Organization (2003a). Neglected Global Epidemics: three growing threats. In: WHO: The world health report 2003 - shaping the future. Geneva: WHO, 2003.
- World Health Organization (2003b). Joint WHO/FAO Expert Consultation on Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases. WHO technical report series; 916. Geneva: WHO, 2003.
- Yaqoob P, Knapper JA, Webb DH, Williams CM, Newsholme EA, Calder PC. Effect of olive oil on immune function in middle-aged men. *Am J Clin Nutr*. 1998;67:129-35.
- Zazpe I, Sanchez-Tainta A, Estruch R, Lamuela-Raventos RM, Schröder H, Salas-Salvado J, Corella D, Fiol M, Gomez-Gracia E, Aros F, Ros E, Ruiz-Gutierrez V, Iglesias P, Conde-Herrera M, Martinez-Gonzalez MA. A large randomized individual and group intervention conducted by dieticians increased the adherence to

Mediterranean-type diets: The PREDIMED study. *J Am Diet Assoc.* 2008;108:1134-44.