

Editorial

Ventajas y limitaciones de los grandes estudios epidemiológicos de seguimiento en nutrición

MAIRA BES-RASTROLLO Y MIGUEL ÁNGEL MARTÍNEZ-GONZÁLEZ

Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Clínica Universitaria-Facultad de Medicina. Universidad de Navarra. Pamplona. España.

LA EPIDEMIOLOGÍA NUTRICIONAL Y LOS GRANDES ESTUDIOS DE SEGUIMIENTO

La sabiduría popular considera que la dieta tiene un efecto importante en la salud y el concepto ha pasado de generación en generación durante milenios¹. Observar las relaciones entre alimentación y salud se ha venido haciendo desde tiempos inmemoriales, pero la epidemiología nutricional, entendida como la ciencia que estudia sistemáticamente estas relaciones, es una de las disciplinas más jóvenes en el campo de la salud pública. Esto es debido en parte a las dificultades que presenta la medición de la dieta en comparación con otras exposiciones².

El objetivo fundamental de la epidemiología nutricional es identificar los elementos de la dieta que se asocian a un mayor o menor riesgo de enfermedad³. Actualmente existe un interés creciente por el estudio de la influencia de la nutrición en la prevención de enfermedades crónicas y en el tratamiento de diferentes afecciones. Diversas evidencias científicas apoyan la asociación de numerosos factores alimentarios y nutricionales con diversas enfermedades, tales como las cardiovasculares, la hipertensión, diferentes tipos de cáncer, la diabetes, la obesidad o la osteoporosis⁴.

La dieta es uno de los principales factores de riesgo modificables de las principales causas de muerte y enfermedad en España, por lo tanto desempeña un papel prioritario en las acciones de salud pública y de promoción de la salud.

Los métodos epidemiológicos distinguen dos tipos de categorías: los estudios experimentales y los estudios no experimentales u observacionales^{5,6}.

Los estudios experimentales son aquellos en los que el investigador asigna a cada sujeto un tratamiento (exposición) determinado de forma aleatoria con el objetivo de obtener la máxima comparabilidad entre el

grupo tratado y el no tratado. En general, este tipo de estudios proporciona la mayor evidencia científica para demostrar verdadera causalidad de una determinada exposición en la ocurrencia de una enfermedad. Pero, por problemas éticos, no siempre sería aceptable experimentar asignando aleatoriamente a individuos a seguir una u otra dieta si a la luz de la evidencia científica disponible se pudiera pensar con fundamento que alguna de las dos dietas comparadas podría tener efectos perjudiciales en la salud. Adicionalmente, incluso cuando resulte ético comparar dos dietas con un diseño experimental, un ensayo aleatorizado representa habitualmente unos problemas logísticos de tal envergadura que con bastante frecuencia no resulta factible.

Como alternativa exenta de estos problemas éticos y de factibilidad disponemos de los estudios observacionales en los que el investigador no tiene el control sobre la exposición de cada individuo, ya que los participantes son quienes eligen libremente su exposición. Se clasifican en estudios ecológicos, estudios transversales, estudios de casos y controles y estudios de cohortes⁶.

Los estudios de seguimiento (llamados de cohortes) son la mejor estrategia no experimental de recogida de datos para establecer relaciones causales entre un alimento o patrón dietético y el riesgo de presentar una enfermedad. Un estudio de cohortes consiste en recoger la información sobre las posibles causas (exposiciones) de un grupo de personas, seguirlas en el tiempo y observar la aparición de enfermedad; por ello son estudios longitudinales (prospectivos) y analíticos (pretenden establecer relaciones causa-efecto). Están también las cohortes retrospectivas (cohortes históricas), en las que la exposición de los individuos se obtiene de antiguos registros recogidos en el pasado con otra finalidad y que se aprovechan para reconstruir históricamente la secuencia exposición-enfermedad, una vez que ya han ocurrido los casos de enfermedad, que suele ser el momento en que se realiza el estudio. La viabilidad de este tipo de estudios se basa en la calidad de la información preexistente recogida por otros motivos. No obstante, normalmente suelen pre-

Correspondencia: Dr. M.A. Martínez-González.
Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública.
Universidad de Navarra.
Irunlarrea, 1. 31080 Pamplona. España.
Correo electrónico: mamartinez@unav.es

sentar mayores sesgos que los estudios de cohortes prospectivos, que sí son diseñados con el propósito de valorar la relación exposición-efecto y no representan un mero aprovechamiento secundario de datos preexistentes.

VENTAJAS DE LOS ESTUDIOS DE SEGUIMIENTO FRENTE A LOS DE CASOS Y CONTROLES

No se debe confundir los estudios de cohortes retrospectivos o históricas con los estudios de casos y controles. Los estudios de casos y controles parten de 2 grupos de sujetos, quienes ya han desarrollado la enfermedad y una muestra de sujetos sin la enfermedad (controles). Se encuesta a unos y a otros (o se les toma muestras) con una metodología similar y se averigua así si hay alguna exposición nutricional que les diferencia. Los estudios de casos y controles también son más débiles metodológicamente que los de cohortes prospectivos o estudios de seguimiento.

La característica principal de un estudio de cohortes prospectivo es que la exposición (supuesta causa protectora o perjudicial) es evaluada y medida *antes* de que ocurra el desenlace o enfermedad (supuesto efecto). De este hecho se derivan sus principales ventajas frente a un estudio de casos y controles. Por ejemplo, si se quiere evaluar si una dieta rica en fibra protege frente a la obesidad, un estudio de casos y controles compararía el consumo de fibra entre las personas obesas (casos) y las personas en normopeso (controles), mientras que un estudio de cohortes empezaría con un conjunto de individuos libres de obesidad que se clasificarían en distintos grupos en función de la cantidad de fibra consumida al inicio del seguimiento, se les seguiría después durante varios años y posteriormente se compararía la ocurrencia de nuevos casos de obesidad entre los que más fibra consumieron y los que menos consumieron.

Los estudios de cohortes, especialmente si son prospectivos, evitan muchas causas de sesgos potenciales que amenazan los estudios de casos y controles. Se previene así el sesgo de recuerdo (*recall bias*)⁷. En un estudio de casos y controles, los casos, por su propio interés, al presentar la enfermedad tienen un incentivo para plantearse si hay algo en la dieta que la produjo, recordarán con más facilidad aquello a lo que estuvieron expuestos y le darán más importancia. Esto crea diferencias sistemáticas con los controles, que no tienen tal incentivo, y distorsiona los resultados. Asimismo, a partir de un estudio de cohortes se elude el importante sesgo de la causalidad inversa, ya que el estudio de cohortes prospectivas evoluciona de acuerdo con la historia natural de la enfermedad, con lo que queda clara la secuencia temporal (primero la exposición y posteriormente el efecto). Por ejemplo, mediante un estudio de casos y controles podríamos hallar

que la fibra se asocia con obesidad, ya que los obesos, por el hecho de estar obesos, pueden decidir consumir más fibra para intentar perder peso y, por tanto, podría observarse que las personas obesas consumen más fibra que las personas en normopeso. Este hecho no ocurriría en un estudio de cohortes porque primero se analiza la exposición en un grupo de personas libres de evento y posteriormente se observa, pasado el tiempo, la incidencia de obesidad.

Un estudio de cohortes también evita el sesgo de supervivencia que puede afectar a los estudios de casos y controles cuando sólo incluyen los casos supervivientes, ya que los casos con un peor pronóstico mueren muy pronto tras la aparición de enfermedad⁶. Otra ventaja de los estudios de cohortes es la posibilidad de calcular incidencias y riesgos absolutos. Además, al realizar mediciones repetidas de la dieta durante el seguimiento, se facilita una mejor clasificación de los participantes según sus hábitos alimentarios y se reducen los sesgos por mala clasificación, uno de los principales caballos de batalla en la epidemiología nutricional⁸. Finalmente, los estudios de cohortes permiten examinar muchos efectos de una misma exposición, son las llamadas cohortes multipropósito. De este modo, se puede optimizar los beneficios de la puesta en marcha de una cohorte, cuya principal desventaja es su elevado coste con un desembolso económico mantenido durante el seguimiento.

LIMITACIONES DE LOS ESTUDIOS DE SEGUIMIENTO

Las cohortes prospectivas tienen limitaciones. Por la naturaleza del estudio, las cohortes no suelen ser eficientes para evaluar enfermedades raras, ya que se necesitaría un número elevadísimo de participantes para poder observar unos pocos casos. De todos modos, cualquier estudio prospectivo de seguimiento en epidemiología nutricional requiere muchos miles de participantes. Es una empresa de gran envergadura.

Tampoco son adecuadas para evaluar enfermedades con un tiempo de latencia muy grande en las que el seguimiento de la cohorte debería ser, como mínimo, el necesario para que se produjera la enfermedad⁶. Esta idea enlaza con la opinión de algunos autores que creen que los cuestionarios estándar de frecuencia de consumo de alimentos no son adecuados para avanzar en el conocimiento de las relaciones entre la dieta y el desarrollo de estas enfermedades⁹. Sin embargo, hay otros autores que afirman que la ausencia de asociaciones halladas entre dieta y cáncer se deben precisamente a que el cáncer es una enfermedad de gran latencia para el desarrollo de tumores, por lo que posiblemente sería necesario tener información de la dieta en las etapas tempranas de la vida² o de largos períodos para poder observar asociaciones entre dieta y cáncer, ya que, como hemos citado en la introduc-

ción, este tipo de cuestionarios sí ha podido hallar asociaciones significativas entre dieta y enfermedad cardiovascular.

Uno de los puntos principales que afecta a la calidad de una cohorte y representa la mayor amenaza para su validez interna son las pérdidas de participantes que ocurren durante el seguimiento, por lo que es preciso que las pérdidas que ocurran durante el seguimiento sean mínimas y además que no sean “informativas”, es decir que el hecho que se haya perdido un participante no debe guardar relación con la exposición ni con el desenlace de interés.

LA HABITUAL FALTA DE “REPRESENTATIVIDAD” DE LOS ESTUDIOS DE SEGUIMIENTO

Una manera de reducir las pérdidas durante el seguimiento es seleccionar a un grupo de participantes con alto grado de motivación y compromiso para permanecer en la cohorte. Por ejemplo, hay cohortes restringidas sólo a graduados universitarios o sólo a enfermeras¹⁰. Además, este hecho incrementa la claridad y la validez de la información y disminuye la oportunidad de confusión por clase social o nivel educativo. Como consecuencia, se pierde la posibilidad de generalizar los resultados de la cohorte a la población general. Pero en cambio, para la investigación causal no resulta imprescindible este requisito, ya que los mecanismos biológicos serán los mismos entre los graduados universitarios y el resto de la población¹¹. Es difícil pensar que el corazón de una enfermera norteamericana sea diferente del del resto de la población y que una dieta rica en grasas saturadas tenga efectos diferentes en la población general.

LOS ERRORES DE MEDICIÓN AL VALORAR LA DIETA EN ESTUDIOS DE SEGUIMIENTO

Uno de los temas de desarrollo y debate más activos en la epidemiología moderna es el relativo a los procedimientos para la evaluación de la dieta^{9,11,12}. En los estudios de cohortes, generalmente se utilizan cuestionarios de frecuencia de consumo (CFC; en inglés, FFQ: Food Frequency Questionnaire)¹³. Constan de una lista de alimentos (en torno a 100 ítems) y un apartado para señalar la frecuencia con que se consume cada alimento. Son clasificados como semicuantitativos cuando se indica además cuál es el tamaño de la porción o ración típica (en gramos o en medidas caseras)¹³. Es el método más utilizado actualmente por la epidemiología nutricional cuando se persiguen objetivos analíticos. Tiene la ventaja de ser un método rápido, de bajo coste y que se puede administrar por correo. Estos cuestionarios deben valorarse frente a un patrón de referencia más fiable y detallado que habi-

tualmente es un registro dietético repetido varias veces al año. En España uno de los cuestionarios de frecuencia de consumo más utilizados es el que desarrollaron y validaron Martín-Moreno et al¹⁴, que representa una versión adaptada del cuestionario usado en las cohortes norteamericanas de la Harvard School of Public Health.

Uno de los mayores retos de la epidemiología nutricional es desarrollar y mejorar las herramientas utilizadas para la compleja tarea de evaluar la dieta de la población. Poco a poco los cuestionarios de frecuencia de consumo de alimentos se podrán mejorar con la ayuda de aplicaciones informáticas específicas⁹. Pero podríamos pensar que son un método muy pobre, ya que si con frecuencia alguien no es capaz de acordarse de lo que comió ayer, ¿cómo se va a acordar de lo que comió por término medio en un año? No hay duda de que hay un error considerable en la medición de las exposiciones alimentarias en cohortes de epidemiología nutricional⁸. De todos modos, tampoco esto supone una falta absoluta de validez, ya que el participante que se clasifica en los niveles más elevados de consumo de un determinado alimento (quintil superior), es muy improbable que realmente se encuentre en los niveles inferiores (primer quintil) y viceversa. Esto permite comparaciones relativas entre los extremos (quinto quintil frente al primero) que están razonablemente exentas de error de medida. En cambio, el error de medida suele estar concentrado en las categorías intermedias. Por ello, los resultados más sólidos suelen ser los obtenidos al comparar las categorías extremas. Además, se realiza el ajuste por energía a través de los residuales, lo que supone fijar la atención en la densidad relativa de ingesta de un determinado nutriente más que en la ingesta absoluta. Hay personas que consumen mucho de todos los alimentos, por lo que se caracterizará mejor la ingesta al relativizarla en función de la energía total ingerida^{15,16}. Otro proceso que contribuye a minimizar el error de medida es excluir a los participantes con ingestas energéticas extremas¹⁶. Ya que todos los métodos para estimar la ingesta dietética poseen errores, la mejor opción es desarrollar métodos para valorar el error y procedimientos estadísticos que tengan en cuenta el error en la medición¹⁷. Actualmente, se está empezando a usar métodos de corrección del error de medida en grandes estudios de cohortes de epidemiología nutricional y también en estudios de casos y controles¹⁷⁻¹⁹. Estos métodos suelen tener la ventaja de que mejoran la estimación puntual porque disminuyen el sesgo de mala clasificación no diferencial pero tienen habitualmente la desventaja de que aumentan la amplitud de los intervalos de confianza, y se necesitan tamaños de muestra gigantescos para conseguir que un estudio sea verdaderamente informativo.

Por ello, es conveniente hallar soluciones que mejoren lo que puede aportar el habitual y relativamente

simple método del cuestionario de frecuencia de consumo en la valoración de la dieta. Kristal et al⁹ proponen las siguientes alternativas: a) cuestionarios administrados por internet o mediante agendas electrónicas u otras aplicaciones recientes de *software* con pantalla táctil a los participantes. Estas aplicaciones podrían facilitar que los participantes pudiesen consultar fotos de los tamaños de las distintas raciones para ayudarles a estimar las cantidades consumidas; b) evaluar no sólo los nutrientes, sino también realizar preguntas para conocer los hábitos de comportamiento dietético. Por ejemplo: ¿Procuras tomar mucha fibra o fruta o verdura o pescado? ¿Sueles comer entre comidas (picotear)? ¿Con qué frecuencia haces comidas fuera de casa?; c) sustituir el listado que debe hacer el participante para elaborar sus registros o diarios dietéticos por fotos que el participante tome con su teléfono móvil, agenda electrónica u ordenador de bolsillo de cada una de las comidas que realice, y d) usar métodos de calibración de los cuestionarios semicuantitativos de frecuencia de consumo de alimentos mediante la realización de recuerdos de 24 h o registros dietéticos de 3 días en una submuestra aleatoria de la cohorte. Este proceso se ha llevado a cabo en la cohorte European Prospective Investigation into Cancer and nutrition (EPIC)¹⁷.

VENTAJAS E INCONVENIENTES: SALDO FAVORABLE PARA LOS ESTUDIOS DE SEGUIMIENTO

Ningún estudio puede ser considerado como definitivo para entender la relación entre dieta y enfermedad. No obstante, los hallazgos epidemiológicos de múltiples estudios de seguimiento, tomados conjuntamente, pueden contribuir a entender de forma significativa la relación entre dieta y enfermedad si todos ellos apuntan en la misma dirección, tienen plausibilidad biológica y no parecen ser debidos a confusión por un estilo de vida general, sino propiamente por la dieta.

En este contexto, el papel que han desempeñado los grandes estudios de seguimiento (cohortes prospectivas), desarrollados durante las décadas de los ochenta y noventa del siglo pasado, es algo que no tiene precio. Gracias a estos estudios prospectivos se dispone actualmente de una fuente de información de alta calidad para valorar la relación entre la dieta y la salud²⁰.

En este contexto, especialmente destacables, consistentes y sólidos son los conocimientos actualmente disponibles acerca de los factores nutricionales que determinan el riesgo de enfermedad coronaria. Lo peor es la ingesta de grasas insaturadas de tipo trans (hidrogenadas artificialmente) que se utiliza, sobre todo, en bollería industrial y patatas fritas comerciales. En cambio, es clara la protección coronaria que se puede obtener con el consumo de frutas, verduras, cereales integrales y frutos secos²⁰.

Sin embargo, tanto las mejores cohortes²¹⁻²⁴ como un enorme ensayo aleatorizado reciente²⁵ no encuentran que la ingesta de grasas en total sea el factor principal que eleve el riesgo de enfermedad cardiovascular. Estos resultados hacen especialmente valiosos los resultados previos de grandes estudios de seguimiento, a pesar de sus limitaciones, ya que se adelantaron en muchos años a lo que ahora puede resultar sorprendente a muchos tras ver la paradójica ineffectividad de la dieta baja en grasas en un ensayo aleatorizado. El hecho es que las recomendaciones que se habían realizado tradicionalmente para prevenir la enfermedad cardiovascular (reducir las grasas, sobre todo las grasas saturadas) además de ser difíciles de cumplir, sólo tienen, en el mejor de los casos, un impacto mínimo en la mejora del riesgo cardiovascular. En cambio, seleccionar el tipo de grasa evitando las artificialmente hidrogenadas que son de tipo trans y prefiriendo las monoinsaturadas (aceite de oliva, frutos secos) o poliinsaturadas (grasas de pescado) sí que produce un gran beneficio.

Por otra parte, no debe olvidarse uno de los hallazgos más importantes realizados por la epidemiología nutricional y que puede considerarse prácticamente como definitivo: la asociación entre una ingesta escasa de ácido fólico durante el embarazo y un mayor riesgo de nacimiento de niños con defectos del tubo neural. Este conocimiento, que se obtuvo a partir de la epidemiología nutricional, ha tenido un verdadero impacto en salud pública²⁶. Analizando el consumo de nutrientes globalmente en forma de patrones dietéticos, se ha observado que el concepto de dieta mediterránea tradicional, caracterizada por el uso de aceite de oliva como principal fuente de grasa, con un alto cociente entre grasas monoinsaturadas/saturadas, un consumo abundante de frutas variadas y frescas, cereales, verduras, legumbres y frutos secos, un moderado pero habitual consumo de vino tinto en las comidas, un consumo reducido de carne (preferentemente aves de corral) y un consumo relativamente bajo de productos lácteos, principalmente en forma de queso y yogur, se ha asociado a una reducción de la mortalidad por todas las causas²⁷ y a una mayor longevidad²⁸. Sin embargo, mientras en países septentrionales se está mirando hacia la dieta mediterránea como el prototipo de alimentación sana, en España, especialmente entre los más jóvenes²⁹, este patrón tradicional de consumo se está abandonando, con importantes consecuencias para la salud derivadas en gran medida en el aumento de las cifras de sobrepeso y obesidad, resultado en parte por la adquisición de patrones dietéticos más occidentalizados, como el frecuente consumo de refrescos azucarados³⁰ y comidas rápidas (*fast-foods*)³¹.

Esto es sólo un botón de muestra de la valiosa información que han aportado y seguirán aportando para la nutrición estos grandes estudios de seguimiento.

Actualmente, en nuestro país hay dos grandes cohortes de este tipo en marcha, una de ellas forma parte

del gran proyecto multicéntrico EPIC³² y está diseñado para valorar la relación entre dieta y cáncer. Cuenta con más de 40.000 participantes en España. El otro estudio de seguimiento es más reciente, se llama SUN (Seguimiento Universidad de Navarra), tiene actualmente 17.000 participantes y está diseñado pensando en otras enfermedades crónicas, como las cardiovasculares, hipertensión u obesidad, entre otras³³.

BIBLIOGRAFÍA

- Hipócrates. Sobre la medicina antigua en tratados hipocráticos. Madrid: Gredos; 1983.
- Michels KB. Nutricional epidemiology-past, present, future. *Int J Epidemiol.* 2003;32:486-88.
- Byers T. The role of epidemiology in developing nutritional recommendations: past, present, and future. *Am J Clin Nutr.* 1999;69 Suppl:S1304-8.
- Grupo de expertos (World Health Organization/Food and Agriculture Organization). Diet, nutrition and the prevention of chronic disease. WHO Technical Report Series 916. Geneva: WHO; 2003.
- Martínez-González MA, De Irala J. Estudios de cohortes en nutrición. En: Serra-Majem L, Aranceta J, editores. *Nutrición y salud pública.* 2.ª ed. Barcelona: Masson; 2006.
- De Irala J, Martínez-González MA, Seguí-Gómez M. Diseños de investigación epidemiológica. En: De Irala J, Martínez-González MA, Seguí-Gómez M, editores. *Epidemiología aplicada.* Barcelona: Ariel; 2004. p. 167-256.
- Freudenheim JL. Study design and hypothesis testing: issues in the evaluation of evidence from research in nutritional epidemiology. *Am J Clin Nutr.* 1999;69 Suppl:S1315-21.
- Michels KB. A renaissance for measurement error. *Int J Epidemiol.* 2001;30:421-2.
- Kristal AR, Peteres U, Potter JD. Is it time to abandon the food frequency questionnaire? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14:2826-8.
- Michels KB, Giovannucci E, Chan AT, Singhanian R, Fuchs CS, Willett WC. Fruit and vegetable consumption and colorectal adenomas in the Nurses' Health Study. *Cancer Res.* 2006; 66:3942-53.
- Rothman KJ, Greenland S. Precision and validity in epidemiologic studies. En *Modern Epidemiology.* 2nd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1998. p. 115-34.
- Michels KB. The role of nutrition in cancer development and prevention. *Int J Cancer.* 2005;114:163-5.
- Gorgojo L, Martín-Moreno JM. Cuestionario de frecuencia de consumo alimentario. En: Serra-Majem L, Aranceta J, editores. *Nutrición y salud pública.* 2.ª ed. Barcelona: Masson; 2006.
- Martin-Moreno JM, Boyle P, Gorgojo L, Maisonneuve P, Fernandez-Rodriguez JC, Salvini S, et al. Development and validation of a food frequency questionnaire in Spain. *Int J Epidemiol.* 1993;22:512-9.
- Willett WC, Howe GR, Kushi LH. Adjustment for total energy intake in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr.* 1997;65 Suppl:S1220-8.
- Willett WC. *Nutritional Epidemiology.* 2nd ed. New York: Oxford University Press; 1998.
- Bingham SA, Day NE, Luben R, Ferrari P, Slimani N, Norat T, et al. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet.* 2003; 361:1496-501.
- Thurigen D, Spiegelman D, Blettner M, Heuer C, Brenner H. Measurement error correction using validation data: a review of methods and their applicability in case-control studies. *Stat Methods Med Res.* 2000;9:447-74.
- Spiegelman D, McDermott A, Rosner B. Regression calibration method for correcting measurement-error bias in nutritional epidemiology. *Am J Clin Nutr.* 1997;65 Suppl 4:S1179-86.
- Hu FB, Willett WC. Optimal diets for prevention of coronary heart disease. *JAMA.* 2002;288:2569-78.
- He K, Merchant A, Rimm EB, Rosner BA, Stampfer MJ, Willett WC, et al. Dietary fat intake and risk of stroke in male US healthcare professionals: 14 year prospective cohort study. *BMJ.* 2003;327:777-82.
- 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.
- Pietinen P, Ascherio A, Korhonen P, Hartman AM, Willett WC, Albanes D, et al. Intake of fatty acids and risk of coronary heart disease in a cohort of Finnish men. The Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study. *Am J Epidemiol.* 1997;145:876-87.
- Oh K, Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ, Willett WC. Dietary fat intake and risk of coronary heart disease in women: 20 years of follow-up of the Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol.* 2005;161:672-9.
- Howard BV, Van Horn L, Hsia J, Manson JE, Stefanick ML, Wassertheil-Smoller S, et al. Low-fat dietary pattern and risk of cardiovascular disease: the Women's Health Initiative Randomized Controlled Dietary Modification Trial. *JAMA.* 2006; 295:655-66.
- Bol KA, Collins JS, Kirby RS; National Birth Defects Prevention Network. Survival of infants with neural tube defects in the presence of folic acid fortification. *Pediatrics.* 2006;117: 803-13.
- Trichopoulou A, Orfanos P, Norat T, Bueno-de-Mesquita B, Ocké M, Peeters PH, et al. Modified Mediterranean diet and survival: EPIC-elderly prospective cohort study. *BMJ.* 2005; 330:991.
- Knoops KTB, De Groot LC, Kromhout D, Perrin AE, Moreiras-Varela O, Menotti A, et al. Mediterranean diet, lifestyle factors and 10-year mortality in elderly European men and women. The HALE Project. *JAMA.* 2004;292:1433-9.
- Sánchez-Villegas A, Delgado-Rodríguez M, Martínez-González MA, De Irala-Estévez J. 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.
- Schulze MB, Manson JE, Ludwig DS, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, et al. Sugar-sweetened beverages, weight gain, and incidence of type 2 diabetes in young and middle-aged women. *JAMA.* 2004;292:927-34.
- Pereira MA, Kartashov AI, Ebbeling CB, Van Horn L, Slaterry ML, Jacobs DR Jr, et al. Fast-food habits, weight gain, and insulin resistance (the CARDIA study): 15-year prospective analysis. *Lancet.* 2005;365:36-42.
- González CA, Navarro C, Martínez C, Quiros JR, Dorronsoro M, Barricarte A, et al. El Estudio Prospectivo Europeo Sobre Cáncer y Nutrición (EPIC). *Rev Esp Salud Pública.* 2004;78: 167-76.
- Bes-Rastrollo M, Sanchez-Villegas A, Gomez-Gracia E, Martinez JA, Pajares RM, Martinez-Gonzalez MA. Predictors of weight gain in a Mediterranean cohort: the Seguimiento Universidad de Navarra Study. *Am J Clin Nutr.* 2006;83: 362-70.