

RASSEGNA

IL RUOLO DEL SEVEN COUNTRIES STUDY OF CARDIOVASCULAR DISEASES NELL'IDENTIFICAZIONE DELLA DIETA MEDITERRANEA

The role of the seven countries study of cardiovascular diseases in the identification of the mediterranean diet

ALESSANDRO MENOTTI¹, PAOLO EMILIO PUDDU²

¹Associazione per la Ricerca Cardiologica, Roma;

²Dipartimento di Scienze Cardiovascolari, Respiratorie, Nefrologiche, Anestesiologiche e Geriatriche, Sapienza Università di Roma, Roma

SUMMARY

The Seven Countries Study of Cardiovascular Diseases started at the end of the 1950's and it is still running after more than 50 years, after having enrolled, at entry, 16 population cohorts in 8 nations of seven countries for a total of 12,763 middle aged men. It represents the prototype of epidemiological studies involving different populations at international level. The study has shown that different populations may suffer different levels in incidence and mortality from coronary heart disease, other cardiovascular diseases and overall mortality, with higher rates in North America and Northern Europe, and definitely lower rates in Southern Europe - especially the Mediterranean side - and Japan. These differences were partly explained by different levels in saturated fat consumption, in average serum cholesterol and other risk factors. The various cohorts were different also in terms of dietary pattern as defined by the ratio of calories derived from vegetable food and fish on one side, and calories derived from animal foods and sugar on the other. These findings allowed to identify the so-called Mediterranean Diet that is characterized by large values of that ratio. These eating habits were associated with lower rates in incidence and mortality from coronary heart disease and partly also with long term all-cause mortality and indirectly with survival. More recent studies have refined these concepts and documented on a larger scale the virtues of these eating habits.

Keywords: *Mediterranean diet, Cardiovascular diseases, Survival.*

Introduzione

La definizione delle caratteristiche della Dieta Mediterranea ed il concetto stesso di Dieta Mediterranea rappresentano una fondamentale scoperta in campo biologico, fisiologico e medico-sanitario dell'ultimo secolo.

Indirizzo per la corrispondenza

Prof Paolo Emilio Puddu
Dipartimento di Scienze Cardiovascolari
Respiratorie, Nefrologiche,
Anestesiologiche e Geriatriche
Sapienza Università di Roma
Viale del Policlinico, 155
00161 Roma
E-mail: paoloemilio.puddu@uniroma1.it

Pur essendo stata riconosciuta come patrimonio dell'umanità da parte nell'UNESCO questa scoperta non è stata premiata con un Nobel che notoriamente predilige la ricerca di base rispetto ad altre tipologie di ricerca.

Il concetto di Dieta Mediterranea è entrato ormai nel parlare comune e non è più solo appannaggio di medici, nutrizionisti ed esperti del settore.

Si tratta di una dieta che caratterizzava le popolazioni di alcune aree costiere del Mediterraneo alcuni decenni orsono e che aveva alla base un elevato consumo di alimenti vegetali rispetto a quelli animali, con particolare abbondanza di cereali (possibilmente non raffinati), verdura, frutta, legumi, pesce, olio di oliva e moderate quantità di vino, con limitati consumi di carne, di derivati del latte, uova e zucchero. La letteratura scientifica e quella divulgativa continuano a fornire risultati di studi da un lato ed informazioni, dall'altro, su questo particolare approccio alimentare che ha il pregio di essere associato ad una ridotta incidenza, prevalenza e mortalità per cardiopatia coronarica nonché di altre malattie cardiovascolari ed una ridotta mortalità per tutte le cause.

Fino all'inizio del 1900 non esistevano idee molto chiare sulla possibilità che le abitudini alimentari potessero avere un ruolo nel mantenimento della salute e nella comparsa di malattie. Le uniche ipotesi erano legate alla possibilità che una dieta molto povera potesse favorire la comparsa di alcune malattie infettive come la tubercolosi. Attività di ricerca sistematiche iniziarono solo dopo la seconda guerra mondiale.

Tuttavia, nella prima metà del 1900, vennero compiute una serie di osservazioni di "patologia geografica" eseguite da alcuni pionieri, spesso viaggiatori o soltanto individui curiosi, che svilupparono

l'interesse e posero le basi per affrontare questo problema. Potremmo ricordare Cornelis De Langen (1), un medico olandese trasferito dalla madre Patria per insegnare medicina in Indonesia all'inizio del 1900. Misurando a tutti la colesterolemia si accorse che quella degli Indonesiani era molto più bassa di quella dei suoi connazionali. Notò poi che "*l'angina pectoris*" era una condizione quasi inesistente tra i primi, mentre era un fenomeno relativamente frequente tra i secondi. Attribui la bassa colesterolemia dei locali alle loro abitudini alimentari, che erano quasi completamente vegetariane.

Isidore Snapper, un altro olandese allievo di De Langen, andò ad insegnare medicina all'Università di Pechino negli anni 1930 e, disponendo dell'elettrocardiografo, notò che le alterazioni da infarto miocardico erano eccezionali tra i Cinesi, mentre erano molto più frequenti tra gli Europei che vivevano in Cina. Attribui le differenze alla dieta sostanzialmente vegetariana dei Cinesi (2).

Più tardi Haqvin Malmros documentò che durante la seconda guerra mondiale la mortalità per malattie cardiovascolari in Svezia era notevolmente diminuita ed attribuì il fenomeno alle ristrettezze alimentari che si erano verificate anche in quel Paese, pur restato neutrale (3).

Anche la carriera epidemiologica del primo autore di questo articolo è stata influenzata da osservazioni sporadiche, all'inizio degli anni 1960, sulla rarità dell'infarto miocardico nelle corsie di un ospedale in Libia e dalla documentazione di un rapporto FAO sulle caratteristiche praticamente vegetariane delle diete locali (4).

Ansel Keys, fisiologo dell'University of Minnesota, ebbe l'idea che le abitudini alimentari potessero avere un'influenza sulla salute e sulle malattie, particolarmente la

cardiopatia coronarica. Assieme a Paul D White, il cardiologo del Presidente Eisenhower, viaggiò in molti Paesi all'inizio degli anni 1950 e si accorse che dove la colesterolemia era bassa i medici ospedalieri locali riferivano una notevole rarità dell'infarto miocardico. Una tappa critica nelle premesse al lancio di uno studio sistematico fu l'incontro, nel 1952, con il Prof Bergami, allora fisiologo dell'Università di Napoli, che lo invitò a verificare i livelli della colesterolemia in diverse classi sociali di Napoli e ad incontrare i clinici che riferivano sulla rarità ospedaliera dell'infarto miocardico (5).

Esplorazioni analoghe vennero eseguite in Grecia, in Finlandia, in Giappone, in Spagna, in Sud Africa ed in altre zone Italiane (6). Gli studi metabolici da lui eseguiti associando il livello di colesterolemia con la quantità e la qualità dei grassi alimentari contribuirono alla creazione dell'ipotesi dieta - cuore.

Sulla base di queste e altre osservazioni il Prof Ancel Keys, alla fine degli anni 1950, lanciò lo studio epidemiologico conosciuto come Seven Countries Study of Cardiovascular Diseases che è ancora in corso dopo 50 anni, dopo aver coinvolto tre generazioni di ricercatori.

Il Seven Countries Study of Cardiovascular Diseases oltre a rappresentare lo studio prototipale di epidemiologia cardiovascolare nel confrontare popolazioni, Paesi e culture diverse, fu quello che per primo identificò la cosiddetta Dieta Mediterranea e ne documentò i benefici nei riguardi delle malattie cardiovascolari e della speranza di vita.

Questa revisione dello studio riguarda quasi esclusivamente i dati dietetici-nutrizionali da un lato e l'incidenza cardiovascolare e la mortalità dall'altro. Risultati riguardanti altri aspetti sono reperibili altrove (7-11).

Il Seven Countries Study: struttura e metodologia

Il Seven Countries Study è iniziato tra la fine degli anni 1950 e l'inizio degli anni 1960 e fu condotto in 16 coorti di uomini di età 40-59 anni in 8 nazioni di sette Paesi.

Una coorte venne arruolata negli Stati Uniti, due in Finlandia, una in Olanda, tre in Italia, due in Croazia-ex-Yugoslavia, tre in Serbia-ex-Yugoslavia, due in Grecia e due in Giappone per un totale di 12.763 individui. Le varie coorti rappresentavano culture molto diverse di Paesi molto differenti (7-11).

Le principali ipotesi alla base dello studio erano tre, e cioè stabilire se:

- 1) popolazioni diverse presentassero reali differenze di prevalenza, incidenza e mortalità per cardiopatia coronarica ed altre malattie cardiovascolari;
- 2) tali differenze, qualora fossero realmente esistite, potessero essere in parte spiegate da diversi stili di vita, abitudini alimentari ed altre caratteristiche delle popolazioni in studio;
- 3) all'interno delle singole popolazioni, alcune caratteristiche individuali (fattori di rischio) fossero in grado di predire la comparsa di futuri eventi coronarici e cardiovascolari.

La struttura dello studio fu quella di un classico studio epidemiologico longitudinale, che peraltro fu il primo condotto in forma multicentrica a livello internazionale e tale da poter considerare sia i confronti tra gruppi che i confronti tra individui.

Dopo l'esame iniziale, che comportò una partecipazione media superiore al 90% (con punte vicine o pari al 100%), vennero eseguiti riesami ogni 5 anni, per i successivi 10 anni in tutte le coorti, e fino a 40

anni in alcune coorti. Dati sull'incidenza delle malattie cardiovascolari furono raccolti sistematicamente per 10 anni in tutte le coorti, dati sulla mortalità per 25 anni in tutte le coorti e ancora dati sulla mortalità per 40 anni in 13 delle 16 coorti, mentre è in corso il completamento del follow-up per la mortalità a 50 anni per le stesse 13 coorti.

I dati sulle abitudini alimentari furono raccolti all'esame iniziale in sotto-campioni rappresentativi di ogni coorte, pesando tutti gli alimenti consumati in 7 giorni (*weighted record method*).

Tali informazioni furono convertite in gruppi di alimenti e nutrienti utilizzando "food tables" locali che vennero poi validate con analisi chimiche di porzioni di alimenti prelevate in loco e analizzate centralmente (8-11).

Tale procedura veniva eseguita in stazioni diverse ed i risultati venivano mediati. Solo nelle coorti dei Ferrovieri USA e dei Ferrovieri di Roma venne usata la tecnica del diario alimentare della durata di 7 giorni.

Successivamente, i consumi alimentari originali vennero ricodificati in modo sistematico e classificati in 18 gruppi, mentre gli alimenti rappresentativi della linea base vennero acquistati localmente ed i componenti alimentari analizzati centralmente in termini chimici (12, 13).

Nella coorte di Zutphen, in Olanda, venne anche applicata la tecnica delle storia dietetica raccolta in tutti i soggetti.

La stessa procedura venne poi utilizzata nella stessa coorte e nelle coorti Finlandesi e in quelle rurali Italiane, nei successivi riesami quinquennali a partire dall'anno 5 di follow-up.

Ciò permise di ricostruire le abitudini alimentari degli ultimi 6-12 mesi ed eseguire analisi sui singoli individui a partire dall'anno 5 del follow-up (11).

Le coorti italiane del Seven Countries Study

L'arruolamento delle coorti Italiane avvenne con lo scopo di identificare tre aree rurali, localizzate nel nord, nel centro e nel sud del Paese che avessero, verosimilmente, diversi stili di vita e differenti abitudini alimentari, con una dieta più ricca al nord, più povera al sud ed intermedia al centro. Crevalcore (Bologna), Montegiorgio (Ascoli Piceno) e Nicotera (Catanzaro) furono le aree prescelte sulla base di trattative locali e di convenienza. Inoltre venne identificato un campione di ferrovieri, nella zona di Roma e dintorni, per rappresentare la controparte europea di un analogo campione arruolato nel Mid- e North-West degli Stati Uniti (7). Le quattro aree Italiane sono state studiate con procedure leggermente diverse che risulteranno chiare nei capitoli successivi. In generale le aree di Crevalcore, Montegiorgio e dei Ferrovieri di Roma furono utilizzate per tutte le analisi ecologiche su nutrienti ed alimenti, assieme a tutte le altre aree del Seven Countries Study. Le coorti di Crevalcore e Montegiorgio furono utilizzate anche per analisi a livello individuale su nutrienti ed alimenti, mentre la coorte di Nicotera fu esaminata solo alla linea base nel 1957 e non fu possibile eseguire un follow-up per eventi cardiovascolari e per la mortalità. Il ruolo della coorte di Nicotera è stato principalmente quello di rappresentare la situazione di riferimento per la definizione di Dieta Mediterranea ma non venne compresa nell'elenco delle 16 coorti studiate longitudinalmente.

Risultati generali di analisi eseguite a livello internazionale

Le stime derivanti dall'indagine dietetica dell'esame iniziale in sotto-campioni delle varie aree indicarono elevati consu-

mi di grassi saturi nelle coorti del Nord-America e del Nord-Europa, che erano invece molto più bassi nel sud Europea e particolarmente nelle aree Mediterranee ed in Giappone (8-11). In termini di alimenti furono osservati pattern abbastanza diversi (12). In Finlandia gli alimenti prevalenti erano latte, patate, grassi animali e dolci e sia pure con livelli leggermente inferiori lo stesso *pattern* fu osservato in Olanda; negli Stati Uniti erano elevati i consumi di carne, frutta e dolci; in Italia dominavano i consumi di cereali (pane, pasta) e di vino; nell'ex Jugoslavia erano alti i consumi di pane, eccetto che a Belgrado, con molti vegetali e pesce in Dalmazia; in Grecia erano elevati i consumi di olio di oliva e frutta; mentre in Giappone erano elevati quelli di pesce, riso e prodotti derivati dalla soia.

A distanza la 5 e 10 anni dall'esame iniziale, fu possibile esaminare le relazioni tra consumi medi (per coorte) di alcuni nutrienti ed incidenza e mortalità per cardiopatia coronarica. Le correlazioni tra consumo di grassi saturi (quale proporzione dell'energia totale) ed incidenza e mortalità per cardiopatia coronarica erano elevate e significative; elevate e significative erano poi le relazioni inverse tra rapporto P/S (grassi poli-insaturi/saturi) e rapporto M/S (grassi mono-insaturi/saturi) da un lato ed incidenza e mortalità per cardiopatia coronarica dall'altro (9, 10, 14, 15). Gli elevati rapporti M/S riflettevano in genere un abbondante uso di olio di oliva, tipico delle aree Mediterranee. Tali reperti furono confermati sui dati della mortalità coronarica a 15, 20 e 25 anni di follow-up (11, 13, 15, 16). Inoltre anche il consumo di flavonoidi, che rappresentano un'importante categoria di anti-ossidanti, risultò inversamente correlato con la mortalità coronarica e quella per tumori (17).

Un'analisi sistematica, eseguita succes-

sivamente, mise a confronto gli alimenti, classificati in 18 gruppi con la mortalità coronarica a 25 anni nelle 16 coorti dello studio (18). In generale i gruppi di alimenti di origine animale e lo zucchero erano direttamente correlati con la mortalità coronarica, mentre quelli di origine vegetale, il pesce ed il consumo di alcool lo erano in forma inversa. Nonostante il piccolo numero di unità statistiche (le 16 coorti) la correlazione è risultata statisticamente significativa per alcuni gruppi di alimenti (per esempio diretta con burro, carne, latte, zucchero e dolci ed inversa con olio, legumi ed alcool). Alcuni esempi di tali correlazioni sono riportati nella *Tabella 1*. Partendo dall'ipotesi che le associazioni tra alimenti e mortalità fossero causali e indipendenti tra loro, furono eseguite delle simulazioni per stimare i potenziali benefici di modifiche sistematiche nelle abitudini alimentari. Per esempio, una riduzione nel consumo di alimenti di origine animale del 25% ed un aumento contemporaneo di alimenti di origine vegetale del 25% si assocerebbe ad una riduzione della mortalità coronarica del 32% in 25 anni.

Questi reperti erano paralleli a relazioni dirette e significative tra la colesterolemia media delle singole coorti e l'incidenza e la mortalità coronarica da un lato, ed ancora a relazioni dirette e significative tra consumo di grassi saturi e colesterolemia media (9-11, 13, 16). Tutti questi risultati indicavano, in linea di massima, che i più elevati consumi di grassi saturi, i più elevati livelli di colesterolemia ed i più elevati quozienti di incidenza e mortalità coronarica si osservavano nelle coorti Nord-Americane e Nord-Europee, mentre i corrispondenti livelli erano decisamente più bassi nel Sud Europa ed in Giappone e particolarmente nelle coorti più strettamente Mediterranee, situate in Grecia, in Dalmazia ed a Montegiorgio in Italia.

Tabella I - Coefficienti di correlazione lineare tra consumi di alcuni nutrienti ed alimenti da un lato ed incidenza o mortalità per cardiopatia coronarica dall'altro. Analisi ecologica nelle 16 coorti del Seven Countries Study (confronti tra gruppi). Dati derivati da voci bibliografiche 9-II, 13-18.

Nutrienti o alimenti	Manifestazione clinica	Anni di follow-up	Coefficiente di correlazione lineare
Grassi totali	Eventi coronarici maggiori	5	0,40
Grassi saturi	Eventi coronarici maggiori	5	0,81 (*)
Grassi saturi	Tutti gli eventi coronarici	5	0,84 (*)
Grassi totali	Mortalità coronarica	10	0,50 (*)
Grassi saturi	Mortalità coronarica	10	0,84 (*)
Grassi saturi	Eventi coronarici maggiori	10	0,73 (*)
Rapporto P/S(°)	Mortalità coronarica	10	-0,82 (*)
Rapporto P/S (°)	Mortalità per tutte le cause	10	-0,47
Rapporto M/S (15 coorti) (°°)	Mortalità per tutte le cause	15	-0,63 (*)
Rapporto M/S (15 coorti) (°°)	Mortalità coronarica	15	-0,82 (*)
Rapporto M/S (15 coorti) (°°)	Mortalità per tumori	15	-0,57 (*)
Grassi saturi (12 coorti)	Mortalità coronarica	20	0,90 (*)
Grassi saturi	Mortalità coronarica	25	0,88 (*)
Flavonoidi	Mortalità coronarica	25	-0,50 (*)
Olio	Mortalità coronarica	25	-0,57 (*)
Legumi	Mortalità coronarica	25	-0,57 (*)
Latte	Mortalità coronarica	25	0,60 (*)
Burro	Mortalità coronarica	25	0,89 (*)
Carne	Mortalità coronarica	25	0,65 (*)
Zucchero	Mortalità coronarica	25	0,60 (*)
Dolci	Mortalità coronarica	25	0,75 (*)
Alcool	Mortalità coronarica	25	0,61 (*)
Complesso alimenti vegetali	Mortalità coronarica	25	-0,52
Complesso alimenti animali	Mortalità coronarica	25	0,80 (*)

*P<0,05; °Rapporto P/S: rapporto poli-insaturi/saturi; (°°) Rapporto M/S: rapporto mono-insaturi/saturi.

Risultò anche evidente che i vari gruppi di alimenti erano fortemente correlati tra loro, in forma diretta o inversa a seconda dei casi. Per esempio è stata documentata una sostanziale correlazione inversa tra consumo di latte (alimento tipico delle aree Nord Europee e Nord Americane) e consumo di frutta, verdura, pesce, olio di oliva, cereali e legumi (18). Pertanto, un'analisi multivariata, utilizzando questi dati, non poteva essere molto produttiva perché i gradi di libertà erano molto ridotti e le correlazioni tra i vari gruppi di alimen-

ti troppo forti. Per affrontare il problema in modo diverso fu necessario orientarsi verso analisi che considerassero i *pattern* alimentari.

La prima analisi che prese in considerazione i *patterns* alimentari riguardò le relazioni tra abitudini alimentari all'anno 10 di follow-up in cinque coorti Europee dello studio (due in Finlandia, una in Olanda e due in Italia) e mortalità coronarica e per tutte le cause durante i successivi 20 anni di follow-up (19). In questo caso fu creato uno score che identificava la maggiore o

minore aderenza alimentare di ogni singolo soggetto alle raccomandazioni dietetiche derivate da un rapporto dell'OMS (20). Tale punteggio riguardava i consumi di grassi saturi, grassi poli-insaturi, proteine, carboidrati complessi, fibre alimentari, frutta e vegetali, legumi, noci e simili, monosaccaridi e disaccaridi e colesterolo. Il punteggio risultava tanto più elevato quanto maggiore era l'aderenza alle raccomandazioni dietetiche dell'OMS. I punteggi individuali aggiustati per coorte, età, consumo di sigarette e di alcool, furono disposti in ordine crescente e suddivisi in tre classi equi-numeriche (terzili). Ponendo pari a 1 il rischio del terzile con valori più bassi (in teoria meno favorevoli), il rischio relativo del terzile 3 era di 0,87 per la mortalità per tutte le cause, 0,82 per la mortalità cardiovascolare e 0,85 per la mortalità per tumori, suggerendo che le raccomandazioni dietetiche dell'OMS potevano rappresentare un orientamento benefico nei comportamenti alimentari (Tabella 2).

Successivamente il problema venne affrontato con tecnica più sofisticata per definire i *pattern* alimentari che caratterizzavano in media le singole coorti dello studio alla linea base (18). Si tratta della "*factor analysis*"

che si basa sulle associazioni tra le variabili note. Con questa procedura viene identificato un fattore ignoto e non misurato (*extracted factor*) che deriva dalle associazioni tra i vari gruppi di alimenti. Il "*factor loading*" rappresenta una specie di coefficiente di correlazione tra le variabili originarie e ciò che è definito "*extracted factor*" ed indica il contributo del fattore nella stima delle variabili originarie. Il "*factor score*", invece, rappresenta, per un singolo caso (coorte in questo caso), la stima del fattore sottostante formato dalla combinazione lineare delle variabili osservate, utilizzando il peso dei coefficienti. Il *factor score* è assimilabile ad un punteggio che identifica un "*pattern*" (alimentare in questo caso). Il "*factor loading*", specifico per ogni gruppo di alimenti, risultò in generale di segno algebrico opposto confrontando gli alimenti vegetali da un lato con quelli di origine animale dall'altro. Il "*factor score*", specifico per ogni coorte, fu messo in relazione con la mortalità coronarica a 25 anni producendo un coefficiente di correlazione molto elevato ($r = 0,90$) e significativo, ma con un andamento curvilineo di natura esponenziale. Tenendo conto della relazione esponenziale tra

Tabella 2 - Sintesi di alcuni risultati derivati da analisi sui pattern alimentari. Dati derivati da voci bibliografiche 18, 19, 23.

Aree e Unità statistiche	Indicatore dietetico	End-point	Coefficiente di Correlazione	Rischio relativo ⁺
3045 individui in 5 coorti Europee	Raccomandazioni OMS	Mortalità per tutte le cause in 10 anni	----	0.87*
		Mortalità coronarica in 10 anni	----	0.82*
		Mortalità per tumori in 10 anni	----	0.85**
16 coorti	Factors score da gruppi di alimenti	Mortalità coronarica in 25 anni	0.90*	----
16 coorti	Indice MAI da gruppi di alimenti	Mortalità coronarica in 25 anni	-0.84*	----

⁺Rischio relativo tra terzile superiore e terzile inferiore della distribuzione dell'indicatore;

*P<0,05; **P=0,13

factor score e mortalità coronarica, il coefficiente diventava 0,94. La distribuzione, sul piano cartesiano, delle varie coorti ha permesso di identificare vari gruppi e cioè: un *cluster* di coorti Nord-Americane e Nord-Europee; un *cluster* di coorti Sud-Europee non strettamente Mediterranee; un cluster di coorti decisamente Mediterranee; ed un cluster di coorti Giapponesi, disposti in forma decrescente sia per il valore del “*factor score*” (dietetico) che della mortalità coronarica.

Un approccio molto diverso, ma anch'esso basato sul principio del *pattern* alimentare, fu sviluppato successivamente dal Prof Fidanza, con una tecnica *a priori*, con la costruzione dell'indice MAI (Mediterranean Adequacy Index) (21, 22). In questo caso, fu adottato un *pattern* dietetico tipico mediterraneo quale riferimento e fu creato un punteggio di scostamento

da tale situazione ideale, che è tanto maggiore quanto maggiore è la differenza rispetto al modello di riferimento. Quale dieta di riferimento è stata adottata quella della coorte di Nicotera, che era caratterizzata da un elevato consumo di alimenti di origine vegetale (pane, pasta, verdure, frutta fresca e secca, olio di oliva, pesce) moderate quantità di vino e da modesti consumi di alimenti di origine animale (latte e derivati, uova, carne, grassi animali e dolci). La scelta della dieta del campione di Nicotera, che pur non disponeva di follow-up per eventi cardiovascolari e per la mortalità, dipese dalle somiglianze delle abitudini dietetiche con quelle dei campioni in Dalmazia ed in Grecia dove l'incidenza e la mortalità coronarica erano risultate molto basse nel corso dei primi 25 anni di follow-up. Dai dati dell'esame iniziale risultava comunque che a Nicote-

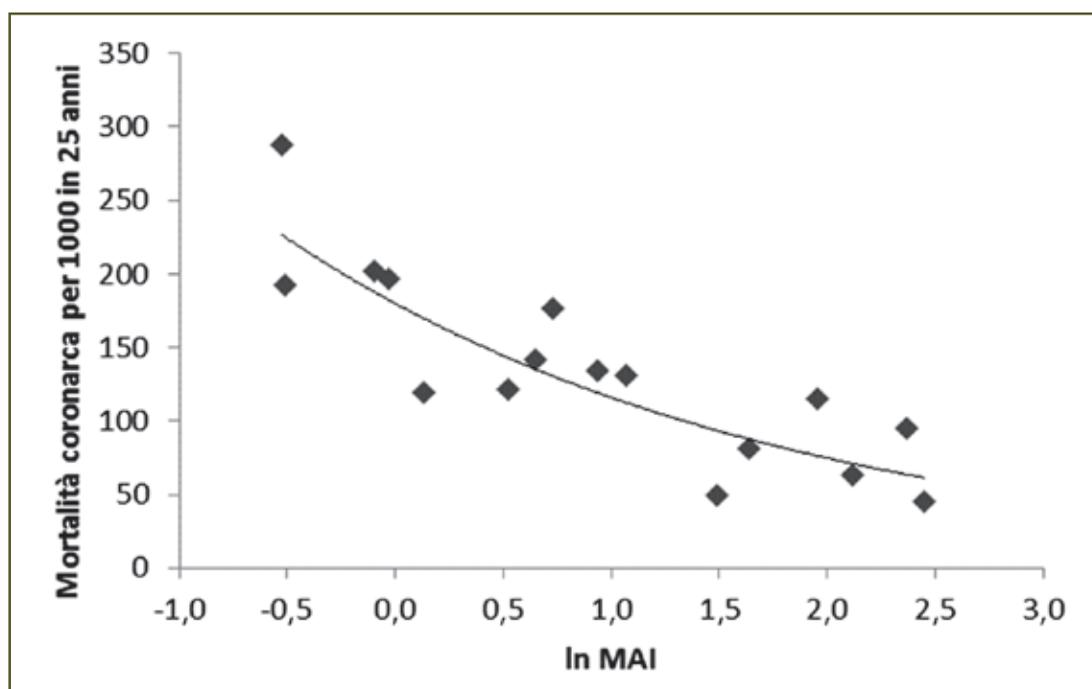


Figura 1 - Relazione tra logaritmo naturale dell'indice di adeguatezza della Dieta Mediterranea (MAI) e mortalità coronarica in 25 anni nelle 16 aree del Seven Countries Study. Ricostruito da dati tabulati nella voce bibliografica 23.

ra la prevalenza di malattie cardiovascolari e di ipertensione arteriosa erano molto basse (7, 22). L'indice MAI venne costruito dividendo la somma della percentuale delle calorie totali derivanti da alimenti tipici Mediterranei (pane, cereali, legumi, patate, vegetali, frutta, pesce, vino e oli vegetali) per la somma della percentuale delle calorie totali derivanti da alimenti non tipici del Mediterraneo (latte, formaggio, carne, uova, grassi animali, margarina, dolci, zucchero, bevande dolci). Quanto maggiore è tale rapporto, tanto più la dieta si avvicina a quella Mediterranea e viceversa. Il valore del MAI a Nicotera era attorno a 7, indicando che il rapporto tra calorie derivanti da alimenti "mediterranei" su quelli non mediterranei era di circa 7 volte. Talora il calcolo del MAI può produrre valori estremi (e poco credibili) se il soggetto consuma enormi quantità di vino o altri alcoolici.

Calcolando l'indice MAI nelle 16 coorti del Seven Countries Study sulla base di 18 gruppi di alimenti è stata osservata una forte correlazione inversa ($r=-0,84$) tra il suo logaritmo naturale e la mortalità coronarica in 25 anni (23, 24). In generale, le aree del Nord Europea e del Nord America avevano valori di MAI inferiori a 1, mentre nelle aree del Sud-Europa e del Giappone i valori variavano da oltre 1 fino a 11. Tali valori elevati erano caratteristici anche delle aree giapponesi. Questo reperto confermava quanto osservato in base alla "factor analysis", pur partendo da una procedura completamente diversa. Successivamente il MAI è stato applicato in 23 campioni di popolazione di 6 diversi Paesi per documentare le differenze nei pattern alimentari (25).

Un'altra analisi sui pattern alimentari venne condotta combinando i dati di 5 coorti Europee con quelle dello studio SENECA e documentando che le abitudini

di dietetiche di tipo Mediterraneo erano protettive nei riguardi della mortalità per tutte le cause e per cardiopatia coronarica (26).

Analisi dedicate sono state eseguite anche nei riguardi della mortalità per tumori (27-31) e per broncopatia cronica ostruttiva (COPD) (32-35), la maggior parte con l'approccio ecologico, confrontando le 16 coorti dello studio. Sia pure talora con qualche incertezza legata ai piccoli numeri, è stata dimostrata una relazione inversa tra alcune vitamine (specie la vitamina C) e vari tipi di tumori; tra l'assunzione di fibra alimentare ed i tumori del colon-retto ed in generale un ruolo protettivo degli alimenti vegetali. Ciò valeva anche per la mortalità per COPD e per la funzione respiratoria espressa dal volume espiratorio forzato in 0,75 sec.

Analisi di interesse sono state eseguite localmente sulle coorti dei singoli Paesi. I maggiori contributi sono venuti dalla coorte Olandese di Zutphen poiché dati sulle abitudini alimentari furono raccolti in tutti i soggetti all'esame iniziale e poi vennero ripetute periodicamente (11). Il reperto più importante è probabilmente legato alla dimostrazione che il consumo di pesce è inversamente correlato con la mortalità coronarica in 20 anni (36).

Analisi riguardanti solo le aree italiane del Seven Countries Study

In generale, tutte le analisi ecologiche riportate precedentemente hanno indicato che le tre coorti Italiane si ponevano in posizioni abbastanza ben definite e costanti nelle relazioni tra nutrienti o alimenti da un lato ed eventi coronarici dall'altro. In particolare, le coorti di Crevalcore e dei Ferrovieri di Roma si sono sempre collocate a livelli intermedi dei principali nutrienti ed alimenti ed intermedi per in-

cidenza o mortalità coronarica. Le loro caratteristiche erano simili a quelle di altre aree non strettamente Mediterranee del Sud Europa. La coorte di Montegiorgio, invece, era quasi sempre collocata nel settore comune ad altre coorti decisamente Mediterranee come la Dalmazia e le due coorti della Grecia, con grandi somiglianze per caratteristiche dietetiche ed incidenza-mortalità coronariche.

Come precedentemente accennato, analisi a livello individuale sono state condotte solo sul pool delle due aree rurali di Crevalcore e Montegiorgio. Le analisi qui riassunte si basavano sui dati raccolti al riesame del 1965, a distanza di 5 anni dal primo, su 1.536 uomini di età 45-64 anni, con follow-up variabili da 10 a 40 anni. I dati della dieta derivavano dalla storia dietetica e riguardavano singoli individui e la stima dei nutrienti derivava da tavole degli alimenti locali.

Già nel 1989 fu tentata un'analisi per definire i pattern dietetici da collegare con gli eventi cardiovascolari o di altra natura (37). Venne creato uno score dietetico a partire dalla *cluster analysis* che identificò 4 gruppi, molto diversi tra loro per abitudini dietetiche basate sui macro-nutrienti. Il *cluster* numero 2 era notevolmente diverso dagli altri tre ed era caratterizzato da un consumo di grassi poli-insaturi molto elevato, fino a 10 volte quello degli altri gruppi. In questo gruppo, la mortalità a 15 anni di follow-up era significativamente più bassa per tutte le cause, per cardiopatia coronarica, per incidenti cerebrovascolari e per tumori. Tale vantaggio tendeva a ridursi quando la stima riguardava la mortalità a 20 anni di follow-up.

Un altro *score* dietetico venne costruito in base al rischio minimo di morte in 20 anni, identificato in classi quartili dell'energia totale e di 5 nutrienti, cioè carboidrati, proteine, alcool, grassi saturi, gras-

si insaturi (38). Il punteggio individuale variava da 0 a 5. I soggetti con punteggio 0 presentavano la più bassa mortalità per tutte le cause, per cardiopatia coronarica e per tumori. I soggetti con tale punteggio erano quelli con il massimo introito calorico, consumo di carboidrati compreso tra 42 e 47%, consumo di alcool superiore al 27%, consumo di proteine superiore al 12%, consumo di grassi saturi tra 9 e 11% e di grassi insaturi tra il 19 e il 23%. Vi era una progressione del rischio, di solito significativa, dal punteggio 2-3 in su, che veniva mantenuta, anche se per quote ridotte, quando venivano utilizzati nei modelli predittivi anche altre covariate come l'età, l'attività fisica, il fumo, la pressione arteriosa, la colesterolemia. Il rischio relativo variava, tra le diverse classi verso quella di riferimento, tra 1,32 e 2,32.

La definizione di un altro pattern dietetico (39) venne eseguita classificando i soggetti in base alle raccomandazioni dietetiche dell'OMS, definite *a priori*, le quali suggerivano, sul totale delle calorie, livelli compresi tra 15 e 30% per i grassi totali, livelli inferiori al 10% per i grassi saturi, livelli compresi tra 3 e 7% per i grassi poli-insaturi, tra 55 e 75% per i carboidrati totali e tra 10 e 15% per le proteine. A parità di altre condizioni (età, fumo ed attività fisica), il rischio relativo di mortalità per coloro che seguivano tutte le raccomandazioni era 0,68 per la mortalità totale, 0,54 per la mortalità per tumori, 1,07 per la mortalità cardiovascolare. I primi 2 rischi relativi erano statisticamente significativi. Tale analisi, peraltro, ha dimostrato che se il consumo di carboidrati supera il 65% delle calorie totali non c'è spazio per aderire alle raccomandazioni riguardanti gli altri nutrienti. Una diversa analisi venne dedicata al ruolo degli alimenti vegetali in relazione ad un follow-up di 30 anni per la mortalità totale (40). In questo modo si

è spostata l'attenzione dai nutrienti agli alimenti. A parità di altre condizioni, chi consumava più di 60 g di vegetali al giorno aveva una speranza di vita 2 anni più lunga di chi ne consumava meno di 20 g. Tale vantaggio era più evidente tra i fumatori che tra i non fumatori.

L'indice MAI, descritto precedentemente quale approccio allo studio dei *pattern* alimentari del tipo *a priori* è stato calcolato per ogni soggetto ed è risultato fortemente correlato, in forma inversa, col rischio di morte coronarica sia a 20 che a 40 anni, anche dopo aver aggiustato la stima per altri 6 classici fattori di rischio coronarico (41).

Un approccio *a posteriori* è stato eseguito con la *factor analysis* che si basa sulle associazioni tra le variabili note (42), i cui principi sono stati accennati nel capitolo precedente. Furono testati 3 fattori ed i valori elevati del *factor score 2* risultarono caratterizzati da elevati consumi di pane, pasta, patate, vegetali, pesce ed olio e bassi consumi di latte, zucchero, frutta e bevande alcoliche. Nell'ambito del *factor score 2*, coloro che si trovavano nel terzile superiore della distribuzione, consumavano, rispetto a chi si trovava nel terzile inferiore, vegetali per oltre 3 volte, cereali e pane per circa 1,8 volte, olio per circa 1,5 volte e pesce per 2,8 volte. Chiaramente i valori più elevati del *factor score 2* corrispondevano alle caratteristiche tipiche della Dieta Mediterranea. Con l'analisi multivariata, a parità di altri fattori di rischio, una deviazione standard nel livello del *factor 2* si associava ad un rischio relativo di 0,88 per l'incidenza di cardiopatia coronarica in 20 anni, di 0,79 per la mortalità coronarica in 40 anni, di 0,87 per mortalità cardiovascolare in 40 anni, di 0,84 per la mortalità per tumori in 40 anni e di 0,89 per la mortalità per tutte le cause in 40 anni. Tutti questi rischi relativi erano statisticamente signifi-

ficativi. I soggetti situati nel 20% superiore del *factor score 2* avevano una speranza di vita 4,1 anni più lunga di quelli collocati nel 20% inferiore della stessa graduatoria. In un'analisi successiva le abitudini alimentari definite dalla *factor analysis* furono considerate unitamente ad altri stili di vita e cioè le abitudini al fumo e le abitudini motorie (attività fisica). I soggetti con una dieta non mediterranea, fumatori e sedentari, presentavano una speranza di vita inferiore di 4,8 anni (in 20 anni) e di 10,7 anni (in 40 anni) rispetto a coloro che adottavano una Dieta Mediterranea, erano non fumatori ed svolgevano un'attività fisica vigorosa (43).

Due analisi furono dedicate in modo specifico al consumo di alcool che nelle aree Italiane del Seven Countries era particolarmente elevato, in quegli anni, con una media di circa 84 g di alcool al giorno, legato quasi esclusivamente all'uso del vino. In un follow-up di 15 anni (44) le relazioni tra consumo di alcool, espresso quale percentuale dell'energia totale, era di tipo *J-shaped* per la mortalità cardiovascolare e per quella per tumori, mentre era lineare per la mortalità per cirrosi epatica. Anche aggiustando per età, fumo e professione rimaneva la relazione curvilinea sebbene la componente sinistra della curva perdesse la sua significatività quando venivano esclusi i soggetti portatori di una malattia cardiovascolare all'esame iniziale. In un follow-up di 30 anni (45) la maggiore sopravvivenza si verificò per consumi di 4-7 bicchieri al vino al giorno (tra 49 e 84 g di alcool), mentre sopravvivenze più brevi riguardavano coloro che bevevano meno o di più. Introducendo in un modello predittivo il consumo di alcool in forma lineare e parabolica ed aggiustando per età, fumo ed attività fisica, si confermava una relazione parabolica tra consumo di alcool e mortalità per tutte le cause. Era tuttavia

evidente che i maggiori consumi di alcool riguardavano i soggetti con attività fisica pesante che in ogni caso erano caratterizzati da una maggiore sopravvivenza.

Differenze tra le due aree rurali e trends temporali

Complessivamente le abitudini alimentari iniziali delle coorti rurali Italiane potevano essere considerate “Mediterranee” anche se con alcune differenze per cui l’area del nord aveva caratteristiche meno tipiche delle altre. Nel corso del tempo la situazione è peggiorata, per un sostanziale incremento nei consumi di latte, carne, dolci (ma anche vegetali e frutta) ed una riduzione dei cereali e dell’alcool. Tali variazioni erano più evidenti a Montegiorgio che a Crevalcore ed in generale rispecchiavano, almeno in parte, anche l’invecchiamento delle popolazioni in studio (21, 22). Utilizzando il MAI quale indicatore sintetico, i livelli a Crevalcore passavano da 2,6 nel 1960, a 2,9 nel 1965, a 2,0 nel 1970, a 2,2 nel 1991, mentre i corrispondenti livelli a Montegiorgio erano di 7,1, 5,6, 4,5 e 3,9 (23, 46-50). In definitiva l’area di Montegiorgio ha sempre presentato un teorico vantaggio su quella di Crevalcore per quanto riguarda le abitudini alimentari sinteticamente espresse dall’Indice MAI. In effetti anche in termini di incidenza di malattia e di mortalità c’è sempre stata una certa differenza tra le due coorti, la quale può essere in parte attribuita alle abitudini alimentari ma anche ai livelli iniziali dei principali fattori di rischio, specie la pressione arteriosa (decisamente più elevata a Crevalcore). A titoli esemplificativo, l’incidenza per eventi coronarici maggiori è stata, in 25 anni, di 13,6% a Montegiorgio e di 16,3% a Crevalcore; la mortalità coronarica a 25 anni di 5,8% e 9,9% rispettivamente, la stessa a 50 anni

di follow-up di 13,6% e 18,2%; la mortalità cardiovascolare complessiva a 50 anni fu invece superiore a Montegiorgio (46,9%) contro 42,9% a Crevalcore a causa di un eccesso di accidenti cerebrovascolari, fatto peraltro compensato da una più elevata mortalità per tumori a Crevalcore (29,8% contro 22,9%). Al termine dei 50 anni di follow-up i sopravvissuti a Montegiorgio erano il 3,5% contro l’1,6% a Crevalcore, riflettendo sistematiche differenze della mortalità per tutte le cause osservate lungo tutto il percorso del follow-up.

Limiti dello studio

Lo studio ha naturalmente presentato dei limiti, in gran parte legati all’epoca storica in cui fu condotto e quindi alle difficoltà economiche ed organizzative, oltre al contenuto delle ipotesi che potevano essere avanzate oltre 60 anni fa. Una delle critiche più comuni riguarda il piccolo numero di Paesi (7) e di coorti (16) disponibili per l’analisi ed eventualmente per una scelta mirata degli stessi. Di fatto l’idea era quella di confrontare culture molto contrastanti per lo stile di vita e le abitudini alimentari ed alla fine la scelta fu condizionata anche dai finanziamenti e dalle disponibilità locali di affrontare uno studio innovativo, lungo e complesso.

È interessante notare che uno degli studi ecologici di questo tipo basato sui dati della FAO per i consumi alimentari e su quelli dell’OMS per i dati di mortalità, venne pubblicato nel 1993 su 40 Paesi e tra questi erano presenti tutti quelli considerati nel Seven Countries Study (51). I coefficienti di correlazione tra alcuni gruppi di alimenti di originale animale e la mortalità coronarica risultarono straordinariamente simili a quelli osservati nel Seven Countries Study suggerendo che i 7 Paesi potevano appunto essere consi-

derati un piccolo campione *random* dei 40 descritti nello studio FAO-OMS. Va anche considerato che non ci si può aspettare che le abitudini alimentari e la dieta siano gli unici determinanti della cardiopatia coronarica, delle malattie cardiovascolari e della speranza di vita, essendo ben noto che molti altri fattori comportamentali e non contribuiscono al rischio.

Le ricadute pratiche

Le acquisizioni scientifiche sopra descritte sono state pubblicate nell'arco di quasi 50 anni, ma fin dall'inizio divenne molto chiaro che le abitudini alimentari di alcune aree costiere del Mediterraneo rappresentavano un modello desiderabile per la prevenzione di alcune malattie cardiovascolari e per la promozione della salute in generale. Anche la divulgazione di questi concetti è stata iniziata dal Prof Keys che ha pubblicato tre libri di dietica e di culinaria "Mediterranea" per il grande pubblico (52-54), di cui il più famoso contiene nel titolo il concetto esplicito di Dieta Mediterranea (54).

Nel corso degli ultimi 25 anni molta ricerca è stata eseguita su questo problema per chiarire una serie di fatti ancora poco noti. In passato, l'enfasi sui benefici della Dieta Mediterranea era orientata prevalentemente nel segnalare i potenziali danni derivati dagli alimenti poco usati nell'area Mediterranea e molto usati nel Nord Europa e in Nord America ed in particolare la maggior parte degli alimenti di origine animale terrestre con i conseguenti diversi consumi di grassi saturi. In tempi successivi l'enfasi si è spostata verso i potenziali benefici derivanti dall'uso degli alimenti tipici della Dieta Mediterranea, come i cereali, i vegetali, la frutta, l'olio di oliva, il pesce ed anche di micronutrienti come ad esempio alcuni acidi grassi tipi-

ci del pesce, alcuni componenti vitaminici ed anti-ossidanti presenti nell'olio di oliva, nel vino e la fibra alimentare (55-59). Recentemente un trial condotto in Spagna ha ulteriormente documentato le proprietà benefiche della Dieta Mediterranea (60). In Italia la divulgazione scientifica della Dieta Mediterranea si è manifestata anche con la pubblicazione di due libri (61, 62).

Un'interessante revisione del problema è stata eseguita nel 2007 (63) discutendo il "how" ed il "why" della Dieta Mediterranea. Per "how" (come) l'Autore intendeva la ricerca delle ragioni perché tali abitudini sono benefiche rispetto ad altre nel mantenere la salute e prevenire alcune malattie; per "why" (perché) intendeva la ricerca delle origini storiche, evolutive e geo-politiche che hanno favorito tali abitudini in quel tempo ed in quei luoghi del Mediterraneo. In effetti, il discorso può essere molto ampliato, perché lo stesso Prof Keys in uno dei suoi libri divulgativi ammise che se avesse concentrato l'attenzione sulle diete del Giappone, della Corea e delle Filippine avrebbe probabilmente raggiunto le stesse conclusioni derivanti dallo studio di alcuni Paesi Mediterranei. Le valutazioni eseguite con la *factor analysis* e con l'indice MAI hanno d'altro canto confermato che per lo meno in Giappone la struttura della dieta, in termini di nutrienti, non è molto dissimile da quella Mediterranea. Queste nozioni hanno probabilmente influenzato le abitudini alimentari di milioni di persone e forse hanno contribuito al declino dell'incidenza e della mortalità per cardiopatia coronarica ed altre malattie cardiovascolari che si è verificato, a partire dagli anni 1970, in molti Paesi di tutto il mondo. Il modello della cosiddetta Dieta Mediterranea è diventato il punto di riferimento per tutte le campagne di prevenzione e non solo nel settore delle malattie cardiovascolari.

RIASSUNTO

Il Seven Countries Study of Cardiovascular Diseases è iniziato alla fine degli anni 1950 ed è ancora in corso dopo oltre 50 anni, avendo arruolato all'origine 16 campioni di popolazione in 8 nazioni di 7 Paesi per un totale di 12.763 uomini di età media. È il prototipo degli studi epidemiologici che ha considerato popolazioni diverse a livello internazionale.

Ha dimostrato che popolazioni diverse possono essere affette da diversi livelli di incidenza e mortalità per cardiopatia coronarica, altre malattie cardiovascolari e sopravvivenza a lungo termine, con quozienti più elevati in Nord America e Nord Europa e quozienti molti inferiori nel Sud Europa, specie Mediterraneo ed in Giappone. Tali differenze sono state in parte spiegate da diversi livelli medi nei consumi di grassi saturi, nei livelli della colesterolemia e di altri fattori di rischio.

Le varie popolazioni differivano anche per i pattern alimentari nell'ambito dei quali era marcatamente diverso il rapporto tra calorie derivate da alimenti di origine vegetale e del pesce da un lato e calorie derivate da alimenti di origine animale e dello zucchero dall'altro. Questa constatazione ha permesso di identificare la cosiddetta Dieta Mediterranea che è caratterizzata da un valore elevato di tale rapporto. Queste abitudini alimentari sono risultate associate con livelli molto più bassi di incidenza e mortalità coronarica ed in parte anche di mortalità a lungo termine per tutte le cause ed indirettamente con la sopravvivenza. Studi successivi più recenti hanno permesso di raffinare questi concetti e documentare su più ampia scala le virtù di queste abitudini alimentari.

Parole chiave: *dieta mediterranea, malattie cardiovascolari, sopravvivenza.*

Bibliografia

1. De Langen CD. Cholesterol metabolism and racial pathology (in Dutch). *Geneesk T Ned Indie* 1916; 56: 1-34.
2. Snapper I. Chinese lessons to western medicine. Interscience, New York, 1941, and Grune & Stratton, New York, 1965.
3. Malmros H. The relation of nutrition to health: a statistical study of the effect of the war-time on arteriosclerosis, cardiosclerosis, tuberculosis and diabetes. *Acta Med Scand* 1950 (Suppl. 246); 137-153.
4. Menotti A, Moschini-Antinori E, Splendiani G. Heart diseases in Tripolitania. A clinical and statistical study. *Malat Cardiov* (Florence) 1963, 4: 665-675.
5. The Seven Countries Study. A scientific adventure in cardiovascular disease epidemiology. D Kromhout, A Menotti, H Blackburn eds. 1994 Marjan Nijssen-Kramer Studio and RIVM, Bilthoven, The Netherlands, 1994: 1-219.
6. www.SevenCountriesStudy.com. Access June 2014.
7. Keys A, Aravanis C, Blackburn HW, Van Buchem FSP, Buzina R, Djordjević BS, Dontas AS, Fidanza F, Karvonen MJ, Kimura N, Lekos D, Monti M, Puddu V, Taylor HL. Epidemiological studies related to coronary heart disease. Characteristics of men aged 40-59 in Seven Countries. *Acta Med Scand* 1967; 460 (Suppl.) 180: 1-392.
8. Den Hartog C, Buzina R, Fidanza F, Keys A, Roine P. Dietary studies and epidemiology of heart diseases. Voeding, The Hague, The Netherlands 1968. 1-157.
9. Keys A, (ed) Blackburn H, Menotti A, Buzina R, Mohacek I, Karvonen MJ, Punsar S, Aravanis C, Corcondilas A, Dontas AS, Lekos D, Fidanza F, Puddu V, Taylor HL, Monti M, Kimura N, Van Buchem FSP, Djordjevic BS, Strasser T, Anderson JT, Den Hartog C, Pekkarinen M, Roine P, Sdrin H. Coronary heart disease in seven countries. *Circulation* 1970, 41, (Suppl. 1): 1-211.
10. Keys A (ed), Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Djordjevic BS, Dontas AS, Fidanza F, Karvonen MJ, Kimura N, Menotti A, Mohacek I, Nedeljkovic S, Puddu V, Punsar S, Taylor HL, Van Buchem F. Seven Countries Study. A multivariate analysis of death and coronary heart disease. Cambridge Mass, Harvard Univ Press, 1980, 1-381.
11. Kromhout D, Menotti A, Blackburn H. Prevention of coronary heart disease. Diet, lifestyle and risk factors in the Seven Countries Study. Norwell Ma, USA and Dordrecht, NL, Kluwer, 2002: 1-267.
12. Kromhout D, Keys A, Aravanis C, Buzina R, Fidanza F, Giampaoli S, Jansen A, Menotti A, Nedeljkovic S, Pekkarinen M, Simic BS, Toshima H. Food consumption patterns in the 1960s in Seven Countries. *Am J Clin Nutr* 1989, 49: 889-894.

13. Kromhout D, Menotti A, Bloemberg B, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Dontas AS, Fidanza F, Giampaoli S, Jansen A, Karvonen M, Katan M, Nissinen A, Nedeljkovic S, Pekkanen J, Pekkarinen M, Punsar S, Rasanen L, Simic B, Toshima H. Dietary saturated and trans fatty acids and cholesterol and 25-year mortality from coronary heart disease: the Seven Countries Study. *Prev Med* 1995; 24: 308-315.
14. Keys A, Aravanis C, Van Buchem F, Blackburn H, Buzina R, Djordjevic BS, Fidanza F, Karvonen MJ, Kimura N, Menotti A, Nedeljkovic S, Puddu V, Taylor HL. The diet and all causes death rate in the Seven Countries Study. *Lancet* 1981; 2: 58-61.
15. Keys A, Menotti A, Karvonen MJ, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Djordjevic BS, Dontas AS, Fidanza F, Keys MH, Kromhout D, Nedeljkovic S, Punsar S, Seccareccia F, Toshima H. The diet and 15-year death rate in the Seven Countries Study. *Am J Epidemiol* 1985; 124: 903-915.
16. Menotti A, Keys A, Aravanis C, Blackburn H, Dontas A, Fidanza F, Karvonen MJ, Kromhout D, Nedeljkovic S, Nissinen A, Pekkanen J, Punsar S, Seccareccia F, Toshima H. Seven Countries Study. First 20 year mortality data in 12 cohorts of the Seven Countries. *Ann Med* 1989; 21: 175-179.
17. Hertog MGL, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F, Giampaoli S, Jansen A, Menotti A, Nedeljkovic S, Pekkarinen M, Simic BS, Toshima H, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the Seven Countries Study. *Arch Intern Med* 1995; 155: 381-386.
18. Menotti A, Kromhout D, Blackburn H, Fidanza F, Buzina R, Nissinen A. Food intake patterns and 25-year mortality from coronary heart disease: cross-cultural correlations in the Seven Countries Study. *Eur J Epidemiol* 1999; 15: 507-515.
19. Huijbregts P, Feskens E, Rasanen L, Fidanza F, Nissinen A, Menotti A, Kromhout D. Dietary pattern and 20 year mortality in elderly men in Finland, Italy and the Netherlands: longitudinal cohort study. *Brit Med J* 1997; 315: 13-17.
20. World Health Organization. Diet, nutrition and prevention of chronic diseases. Report of a WHO Study Group. Geneva: World Health Organization. WHO Technical Report Series No. 797. 1990.
21. Alberti-Fidanza A, Fidanza F. Mediterranean Adequacy Index of Italian diets. *Pub Health Nutr* 2004; 7: 937-41.
22. Fidanza F. The Mediterranean Italian diet: keys to contemporary thinking. *Proc Nutr Soc* 1991; 50: 519-526.
23. Fidanza F, Alberti A, Lanti M, Menotti A. Mediterranean Adequacy Index: correlation with 25-year mortality from coronary heart disease in the Seven Countries Study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2004; 14: 254-258.
24. Fidanza F, Alberti A, Lanti M, Menotti A. Mediterranean diet score: correlation with 25-year mortality from coronary heart disease in the Seven Countries Study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2004; 14: 397.
25. Alberti A, Fruttini D, Fidanza F. The Mediterranean Adequacy Index: further confirming results of validity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2009; 19: 61-66.
26. Knoop KTM, de Groot LCPGM, Kromhout D, Perrin AE, Moreiras-Varela O, Menotti A, van Staveren WA. Mediterranean Diet, Lifestyle Factors, and 10-Year Mortality in Elderly European Men and Women. The HALE Project. *JAMA* 2004; 292: 1433-149.
27. Ocke' MC, Kromhout D, Menotti A, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F, Jansen A, Nedeljkovic S, Nissinen A, Pekkarinen M, Toshima H. Average intake of anti-oxidant (pro)vitamins and subsequent cancer mortality in the 16 cohorts of the Seven Countries Study. *Int J Cancer*. 1995; 61: 480-484.
28. Ocké MC, Bueno-de-Mesquita HB, Feskens EJ, Kromhout D, Menotti A, Blackburn H. Adherence to the European Code Against Cancer in relation to long-term cancer mortality: inter-cohort comparisons from the Seven Countries Study. *Nutr Cancer*. 1998; 30: 14-20.
29. Jansen MC, Bueno-de-Mesquita HB, Buzina R, Fidanza F, Menotti A, Blackburn H, Nissinen AM, Kok FJ, Kromhout D. Dietary fiber and plant foods in relation to colorectal cancer mortality: the Seven Countries Study. *Int J Cancer*. 1999; 81: 174-9.
30. Jansen MC, Bueno-de-Mesquita HB, Räsänen L, Fidanza F, Menotti A, Nissinen A, Feskens EJ, Kok FJ, Kromhout D. Consumption of plant foods and stomach cancer mortality in the seven countries study. Is grain consumption a risk factor? Seven Countries Study Research Group. *Nutr Cancer*. 1999; 34: 49-55.
31. Jansen MC, Bueno-de-Mesquita HB, Räsänen L, Fidanza F, Nissinen AM, Menotti A, Kok FJ, Kromhout D. Cohort analysis of fruit and vegetable consumption and lung cancer mortality in European men. *Int J Cancer*. 2001; 92: 913-918.
32. Tabak C, Feskens EJ, Heederik D, Kromhout

- D, Menotti A, Blackburn H. Fruit and fish consumption: a possible explanation for population differences in COPD mortality. (The Seven Countries Study). *Eur J Clin Nutr* 1998; 52: 819-825.
33. Tabak C, Smit HA, Rasanen I, Fidanza F, Menotti A, Nissinen A, Feskens EJM, Heederik D, Kromhout D. Dietary factors and pulmonary function: a cross sectional study in middle aged men from three European countries. *Thorax* 1999; 54: 1021-1026.
 34. Tabak C, Smit HA, Rasanen L, Fidanza F, Menotti A, Nissinen A, Feskens EJ, Heederik D, Kromhout D. Alcohol consumption in relation to 20-year COPD mortality and pulmonary function in middle-aged men from three European Countries. *Epidemiology* 2001; 12: 239-245.
 35. Walda IC, Tabak C, Smit HA, Räsänen L, Fidanza F, Menotti A, Nissinen A, Feskens EJ, Kromhout D. Diet and 20-year chronic obstructive pulmonary disease mortality in middle-aged men from three European countries. *Eur J Clin Nutr*. 2002; 56: 638-643.
 36. Kromhout D, Bosschieter EB, De Lezenne Coulander C. The inverse relation between fish consumption and 20-year mortality from coronary heart disease. *N Engl J Med* 1985; 312: 1205-1209.
 37. Farchi G, Mariotti S, Menotti A, Seccareccia F, Torsello S, Fidanza F. Diet and 20 year mortality in two rural population groups of middle-aged men in Italy. *Am J Clin Nutr* 1989; 50: 1095-1003.
 38. Farchi G, Fidanza F, Mariotti S, Menotti A. Is diet an independent risk factor for mortality? 20 year mortality in the Italian rural cohorts of the Seven Countries Study. *Eur J Clin Nutr* 1994; 48: 19-29.
 39. Farchi G, Fidanza F, Grossi P, Lancia A, Mariotti S, Menotti A. Relationship between eating patterns meeting recommendations and subsequent mortality in 20 years. *Eur J Clin Nutr* 1995; 49: 408-419.
 40. Seccareccia F, Alberti-Fidanza A, Fidanza F, Farchi G, Freeman K, Mariotti S, Menotti A. Vegetable intake and long-term survival among middle-aged men in Italy. *Ann Epidemiol* 2003; 13: 424-430.
 41. Menotti A, Alberti-Fidanza A, Fidanza F. The association of the Mediterranean Adequacy Index with fatal coronary events in an Italian middle-aged male population followed for 40 years. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2012; 22: 369-375.
 42. Menotti A, Alberti-Fidanza A, Fidanza F, Lanti M, Fruttini D. Factor analysis in the identification of dietary patterns and their predictive role in morbid and fatal events. *Pub Hlth Nutr* 2012; 15: 1232-1239.
 43. Menotti A, Puddu PE, Lanti M, Maiani G, Catasta G, Alberti-Fidanza A. Lifestyle habits and mortality from all and specific causes of death: 40-year follow-up in the Italian Rural Areas of the Seven Countries Study. *J Nutr Health Aging* 2014; 18: 314-321.
 44. Farchi G, Fidanza F, Mariotti S, Menotti A. Alcohol and mortality in the Italian rural cohorts of the Seven Countries Study. *Int J Epidemiol* 1992; 21: 74-82.
 45. Farchi G, Fidanza F, Giampaoli S, Mariotti S, Menotti A. Alcohol and survival in the Italian rural cohorts of the Seven Countries Study. *Int J Epidemiol* 2000; 29: 667-671.
 46. Fidanza F, Alberti AF. Food and nutrient consumption of two rural population groups of Italy followed for ten years. *Nutr Metab* 1975; 18:176-189.
 47. Fidanza F, Fidanza AA, Coli R, Contini AM. Food and nutrient consumption of two rural Italian population groups followed for twenty years. *Int J Vitam Nutr Res* 1984; 54: 91-97.
 48. Fidanza AA, Seccareccia F, Torsello S, Fidanza F. Diet of two rural population groups of middle-aged men in Italy. *Int J Vitam Nutr Res* 1988; 58: 442-451.
 49. Alberti-Fidanza A, Paolacci CA, Chiuchiù MP, Coli R, Fruttini D, Verducci G, Fidanza F. Dietary studies on two rural Italian population groups of the Seven Countries Study. 1. Food and nutrient intake at the thirty-first year follow-up in 1991. *Eur J Clin Nutr* 1994; 48: 85-91.
 50. Alberti-Fidanza A, Fidanza F, Chiuchiù MP, Verducci G, Fruttini D. Dietary studies on two rural Italian population groups of the Seven Countries Study. 3. Trend of food and nutrient intake from 1960 to 1991. *Eur J Clin Nutr* 1999; 53: 854-860.
 51. Artaud-Wild SM, Connor SL, Sezton G, Donnor WE. Differences in coronary mortality can be explained by differences in cholesterol and saturated fat intake in 40 countries but not in France and Finland. A paradox. *Circulation* 1993; 88: 2771-2779.
 52. Keys A, Keys M. *Eat well and stay well*. Garden City, New York, Doubleday & Co, Inc, 1959 and 1963.
 53. Keys A, Keys M. *The benevolent bean*. Noonday, New York, 1972.
 54. Keys A, Keys M. *How to eat well and stay well. The Mediterranean Way*. Garden City, New York, Doubleday & Co, Inc, 1975.

55. 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
56. Trichopoulou A, Orfanos P, Norat T, Bueno-de-Mesquita B, Ocké MC, Peeters PH, van der Schouw YT, Boeing H, Hoffmann K, Boffetta P, Nagel G, Masala G, Krogh V, Panico S, Tumino R, Vineis P, Bamia C, Naska A, Benetou V, Ferrari P, Slimani N, Pera G, Martinez-Garcia C, Navarro C, Rodriguez-Barranco M, Dorransoro M, Spencer EA, Key TJ, Bingham S, Khaw KT, Kesse E, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Berglund G, Wirfalt E, Hallmans G, Johansson I, Tjønneland A, Olsen A, Overvad K, Hundborg HH, Riboli E, Trichopoulos D. Modified Mediterranean diet and survival: EPIC-elderly prospective cohort study. *BMJ* 2005; 330(7498): 991.
57. Dilis V, Katsoulis M, Lagiou P, Trichopoulos D, Naska A, Trichopoulou A. Mediterranean diet and CHD: the Greek European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition cohort. *Br J Nutr* 2012; 108: 699-709.
58. Buckland G, Travier N, Barricarte A, Ardanaz E, Moreno-Iribas C, Sánchez MJ, Molina-Montes E, Chirlaque MD, Huerta JM, Navarro C, Redondo ML, Amiano P, Dorransoro M, Larrañaga N, Gonzalez CA. Olive oil intake and CHD in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Spanish cohort. *Br J Nutr* 2012; 108: 2075-2082.
59. Bendinelli B, Masala G, Saieva C, Salvini S, Calonico C, Sacerdote C, Agnoli C, Gioni S, Frasca G, Mattiello A, Chiodini P, Tumino R, Vineis P, Palli D, Panico S. Fruit, vegetables, and olive oil and risk of coronary heart disease in Italian women: the EPICOR Study. *Am J Clin Nutr* 2011; 93: 275-283.
60. Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, Covas MI, Corella D, Arós F, Gómez-Gracia E, Ruiz-Gutiérrez V, Fiol M, Lapetra J, Lamuela-Raventós RM, Serra-Majem L, Pintó X, Basora J, Muñoz MA, Sorlí JV, Martínez JA, Martínez-González MA; PREDIMED Study Investigators and 233 Collaborators. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *N Engl J Med* 2013; 368: 1279-1290.
61. Agradi E. Le basi scientifiche delle Dieta Mediterranea. *Nutrizione e Salute*. Roma, 1988, Verduci Editore.
62. D'Alessandro A. La Dieta Mediterranea. Le evidenze scientifiche del suo ruolo protettivo nei confronti dell'aterosclerosi coronarica e delle malattie dismetaboliche. Bari 2013. Cacucci Editore.
63. Mackenbach JP. The Mediterranean diet story illustrates that "why" questions are as important as "how" questions in disease explanation. *J Clin Epidemiol* 2007; 60: 105-109.