



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE FARMACIA

EFFECTOS DE UNA DIETA CHILENA SUPLEMENTADA CON
***Gevuina avellana* versus UNA DIETA BAJA EN GRASAS SOBRE**
BIOMARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO E INFLAMACIÓN EN
CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA DE
POBLACIÓN ADULTA CHILENA CON HIPERCOLESTEROLEMIA
NO TRATADA FARMACOLÓGICAMENTE

POR CARLOS ALEXANDER GONZÁLEZ CONTRERAS

Tesis presentada a la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción
para optar al grado académico de Magíster en Bioquímica Clínica e Inmunología

Profesor guía:

Dr. Miquel Martorell Pons
Departamento de Nutrición y Dietética
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

Abril, 2023
Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

“Cuando te enfocas en la discapacidad de alguien, pasarán por alto sus habilidades, belleza y singularidad. Una vez aprendes a aceptarlos y amarlos por quienes son, subconscientemente aprendes a amarte a ti mismo incondicionalmente.”

- *Yvonne Pierre.*

AGRADECIMIENTO

Mis agradecimientos más sinceros a todas aquellas amistades que he logrado formar en estos últimos años, sin su motivación y que no dejaron que me rindiera durante todo el proceso de elaboración de esta tesis, quizás no podría haber finalizado este camino.

Agradezco de igual forma el acompañamiento de mi familia en general, de escucharme en momentos de estrés sin comprender las cosas que contaba o aconsejándome en la toma de algunas decisiones que me permitieron continuar con esta travesía y seguir hasta el final.

Dar gracias a mi tutor, Miquel, por apoyarme durante toda la tesis y depositar su confianza en mí en cuanto al tema del área experimental, me enseñó a ser más independiente y a lograr solucionar problemas de forma autónoma. Además, por ser un buen guía y que a pesar de lo muy ocupado que se encuentre, siempre tiene el tiempo para escucharte y ayudarte en resolver cosas que no ves salida o ya estas muy frustrado como para solucionarlo.

Agradecer a quienes me ayudaron con tips y me guiaron en la realización de algunos experimentos como a Héctor Contreras, Felipe Zuñiga, Jessica Lemus, Enrique Guzmán, Estefanía Nova, que sin su ayuda quizás no hubiese podido evidenciar los errores que estaba cometiendo en algunos experimentos, infinitas gracias por toda su ayuda y colaboración en la realización de esta tesis.

Quiero agradecer a mi madre, quien a pesar de no entender nada y preguntarme infinitas veces cuánto me faltaba por terminar el magíster, aun así me acompañó hasta horas muy tardes mientras terminaba algunos experimentos, me venía a dejar todos los días, me esperaba o acompañaba fines de semana, se emocionaba y no sabía que pasaba, pero a todo le toma una foto para compartírselo a su gente y a pesar de que a veces estaba muy cansado o estresado y no quería nada con nadie, ella aun así estaba ahí apoyándome.

Sin el acompañamiento de todos mis amigos durante este trabajo, quienes me ayudaban incluso con algunos experimentos cuando tenía demasiadas placas por hacer o DOT BLOT que terminar como lo hizo Gonzalo, o cuando estábamos en un caos porque las mediciones de actividades enzimáticas no funcionaban y que gracias a Sofía, Francisco y Esteban logramos estandarizar todo, o cuando tenía que esperar las incubaciones y Claudia, Jessica o Katherine me acompañaban para no estar solo o en horas en las que ya estaba demasiado cansado como para seguir y me iba a conversar con Barbarita en la cafetería para pasar la tarde. Gracias a todos sus minutos que me regalaron en acompañarme y ayudarme, pude tener la motivación, fuerza y gana de terminar este trabajo.

Finalmente, agradecerme a mí mismo, por las horas de dedicación, semanas y fines de semanas enteros trabajando, priorizando la terminación del trabajo ante

cualquier cosa, en querer siempre seguir mejorando y aprendiendo cosas nuevas, en no dudar de las cosas que podía hacer y en las decisiones que tomaba. Estas características propias me permitieron también finalizar y lograr con éxito este trabajo.

TABLA DE CONTENIDOS

| | Página |
|---|---------------|
| ÍNDICE DE TABLAS..... | XI |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | XIII |
| GLOSARIO..... | XV |
| RESUMEN..... | XIX |
| ABSTRACT | XXI |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1. Enfermedades cardiovasculares e hipercolesterolemia | 1 |
| 1.2. Metabolismo lipídico | 8 |
| 1.3. Estado redox y estrés oxidativo | 12 |
| 1.3.1. Sistema antioxidante | 18 |
| 1.4. Sistema inmunológico | 24 |
| 1.4.1. Células mononucleares de sangre periférica (PBMC) | 26 |
| 1.5. Hipercolesterolemia y su rol fisiopatológico en la aterosclerosis..... | 28 |
| 1.5.1. Fisiopatología de la aterosclerosis | 29 |
| 1.6. Tratamientos para hipercolesterolemia..... | 35 |
| 1.6.1. Tratamiento no farmacológico | 35 |

| | |
|--|----|
| 1.6.1.1. Dieta baja en grasas | 38 |
| 1.6.1.2. Dieta mediterránea | 39 |
| 1.6.2. Tratamiento farmacológico | 40 |
| 1.7. <i>Gevuina avellana</i> Molina | 44 |
| 1.8. Actualidad de hipercolesterolemia e intervención nutricional con avellana | 47 |
| 1.9. Problema de investigación..... | 52 |
| 1.10. Pregunta de investigación | 52 |
| 1.11. Hipótesis | 52 |
| 1.12. Objetivos | 53 |
| 1.12.1. Objetivo principal | 53 |
| 1.12.2. Objetivos específicos | 53 |
| 2. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 55 |
| 2.1. Diseño de estudio..... | 55 |
| 2.1.1. Tamaño muestral | 62 |
| 2.2. Variables biosociodemográficas y antropométricas | 63 |
| 2.3. Obtención muestra sanguínea..... | 64 |
| 2.4. Perfil lipídico sérico y hemograma | 64 |

| | | |
|--------|---|----|
| 2.5. | Aislamiento de PBMC (células mononucleares de sangre periférica) desde muestra sanguínea | 65 |
| 2.6. | Determinación de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en PBMC (células mononucleares de sangre periférica) | 66 |
| 2.7. | Determinación de la actividad enzimática de enzimas antioxidantes en PBMC (células mononucleares de sangre periférica) | 67 |
| 2.7.1. | Determinación actividad enzimática de superóxido dismutasa (SOD) en PBMC (células mononucleares de sangre periférica) | 67 |
| 2.7.2. | Determinación actividad enzimática de catalasa (CAT) en PBMC (células mononucleares de sangre periférica) | 68 |
| 2.7.3. | Determinación actividad enzimática de glutatión reductasa (GRd) en PBMC (células mononucleares de sangre periférica) | 68 |
| 2.8. | Cuantificación de MDA (malondialdehído) como marcador de daño oxidativo y nitrosativo en lípidos en PBMC (células mononucleares de sangre periférica) | 69 |
| 2.9. | Determinación del daño oxidativo y nitrosativo de proteínas en PBMC (células mononucleares de sangre periférica) mediante DOT-BLOT | 70 |
| 2.9.1. | Determinación de carbonilos en proteínas de PBMC (células mononucleares de sangre periférica) mediante DOT-BLOT | 70 |

| | |
|---|-----|
| 2.9.2. Determinación de nitrotirosina en proteínas de PBMC (células mononucleares de sangre periférica) mediante DOT-BLOT | 72 |
| 2.10. Aislamiento de ARN en PBMC (células mononucleares de sangre periférica)..... | 73 |
| 2.11. Determinación de expresión de genes de enzimas antioxidantes y biomarcadores de inflamación en PBMC (células mononucleares de sangre periférica) mediante RT-qPCR | 74 |
| 2.12. Análisis estadístico | 77 |
| 3. RESULTADOS | 78 |
| 4. DISCUSIÓN..... | 92 |
| 4.1. Fortalezas y limitaciones del estudio | 99 |
| 4.2. Proyecciones del estudio..... | 100 |
| 5. CONCLUSIÓN..... | 102 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA..... | 104 |
| 7. ANEXOS | 124 |
| 7.1. Consentimiento informado..... | 124 |
| 7.2. Encuesta de caracterización biosociodemográfica | 127 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | Página |
|---|---------------|
| Tabla 1-1. Factores de riesgo considerados en la evaluación del RCG. | 3 |
| Tabla 1-2. Categorización del RCG según cantidad de factores. | 4 |
| Tabla 1-3. Niveles patológicos de c-LDL (mg/dL) según categorías del RCG. | 4 |
| Tabla 1-4. Clasificación de la hipercolesterolemia según su etiología. | 5 |
| Tabla 1-5. Lista de ROS y RNS producidos durante el metabolismo. | 14 |
| Tabla 1-6. Reacciones enzimáticas llevadas a cabo por enzimas antioxidantes. | 23 |
| Tabla 1-7. Proporciones recomendadas de diversos micro y macronutrientes en un tratamiento dietoterapéutico para hipercolesterolemia. | 37 |
| Tabla 1-8. Dosis de medicamentos para tratar la hipercolesterolemia. | 43 |
| Tabla 1-9. Rango de composición de ácidos grasos de <i>G. avellana</i> en sus diversos orígenes de producción. | 46 |
| Tabla 2-1. Características nutricionales del grupo avellana. | 60 |
| Tabla 2-2. Resumen tratamiento nutricional para la hipercolesterolemia, características nutricionales grupo control. | 61 |
| Tabla 2-3. Lista de secuencia de primers y condiciones. | 76 |
| Tabla 3-1. Características de la población de estudio. | 79 |

| | |
|---|----|
| Tabla 3-2. Análisis estadístico de variables antropométricas en función del grupo y tiempo de intervención. | 80 |
| Tabla 3-3. Análisis estadístico del perfil lipídico según grupo y tiempo de intervención. | 81 |
| Tabla 3-4. Análisis estadístico del recuento de células mononucleares de sangre periférica obtenido desde hemograma. | 84 |
| Tabla 3-5. Análisis estadístico de la expresión de genes de estrés oxidativo e inflamación en PBMC pre-intervención. | 91 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Página |
|--|---------------|
| Figura 1-1. Prevalencia de niveles de colesterol total (CT) y c-LDL en total país (Chile) según la ENS 2016-17. | 7 |
| Figura 1-2. Fisiología el metabolismo lipídico. | 11 |
| Figura 1-3. Generación de los diferentes ROS mediante energía transferida o reducción univalente secuencial del oxígeno triplete en estado fundamental. .. | 16 |
| Figura 1-4. Proceso metabólico de producción de ROS y enzimas antioxidantes participantes en su eliminación. | 19 |
| Figura 1-5. Desarrollo de la placa ateromatosa. | 34 |
| Figura 2-1. Representación en diagrama de flujo del reclutamiento de las/os participantes del estudio. | 59 |
| Figura 3-1. Producción de ROS en PBMC mediante activación con Zymosan A, LPS y PMA pre y post intervención..... | 85 |
| Figura 3-2. Determinación de la actividad enzimática de SOD, CAT y GRd en PBMC pre y post intervención..... | 86 |
| Figura 3-3. Determinación de la concentración de MDA como marcador de daño oxidativo en lípidos en PBMC pre y post intervención..... | 88 |
| Figura 3-4. Determinación de daño oxidativo y nitrosativo (% de N-TYR y CO) mediante DOT-BLOT en PBMC pre y post intervención. | 89 |

| | |
|--|----|
| Figura 3-5. Caracterización de la expresión de genes de estrés oxidativo e inflamación en PBMC de población de estudio pre-intervención..... | 90 |
|--|----|

GLOSARIO

| Abreviatura | Definición |
|---------------------|---|
| %masa grasa: | Porcentaje masa grasa |
| 4-HNE: | 4-hidroxi-2-noenol |
| ADN: | Ácido Desoxirribonucleico |
| AGI: | Ácidos grasos insaturados |
| AGMI: | Ácidos grasos monoinsaturados |
| AGPI: | Ácidos grasos poliinsaturados |
| AGS: | Ácidos grasos saturados |
| AHA: | <i>American Heart Association</i> |
| ALK1: | Receptores de Activina tipo 1 |
| ApoAI: | Apolipoproteína AI |
| ApoB: | Apolipoproteína B |
| ApoB-100: | Apolipoproteína B-100 |
| ApoE: | Apolipoproteína E |
| BCR: | <i>B Cell Receptor</i> |
| CAT: | Catalasa |
| CD4: | Cúmulo de diferenciación 4 |
| Células NK: | Células <i>Natural Killer</i> |
| CETP: | Proteína Transferidora de Ésteres de Colesterol |
| c-HDL: | colesterol-HDL; <i>cholesterol-High Density Lipoprotein</i> |
| CitC: | Citocromo C |

| | |
|------------------------|--|
| c-LDL: | colesterol-LDL; <i>cholesterol-Low Density Lipoprotein</i> |
| CML: | Células del Músculo Liso |
| c-no HDL: | colesterol no HDL |
| CT: | Colesterol Total |
| CTE: | Cadena Transportadora de Electrones |
| Cu/Zn-SOD/SOD1: | Cobre/Zinc-Superóxido Dismutasa/Superóxido Dismutasa 1 |
| ECV: | Enfermedad Cardiovascular |
| eNOS: | Óxido Nítrico Sintasa endotelial |
| ENS 2016-17: | Encuesta Nacional de Salud años 2016-2017 |
| Fe-SOD: | Hierro-Superóxido Dismutasa |
| FLTP: | Proteína Transferidora de Fosfolípidos |
| GPx: | Glutación Peroxidasa |
| GRd: | Glutación Reductasa |
| GSH: | Glutación |
| GSSG: | Glutación Disulfato |
| HDL: | <i>High Density Lipoprotein</i> |
| HF: | Hipercolesterolemia Familiar |
| HMG-CoA: | 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA |
| ICAM-1: | <i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i> |
| IDL: | <i>Intermediate Density Lipoprotein</i> |
| IL-1: | Interleuquina-1 |
| IL-10: | Interleuquina-10 |
| IL-6: | Interleuquina-6 |
| IMC: | Índice de Masa Corporal |

| | |
|---------------------|---|
| LCAT: | Lecitin:Colesterol Aciltransferasa |
| LDL: | <i>Low Density Lipoprotein</i> |
| LDLR: | Receptor de LDL; <i>Low Density Lipoprotein Receptor</i> |
| LDLRAP1: | <i>Low Density Lipoprotein Receptor Adaptor Protein 1</i> |
| LH: | Lipasa Hepática |
| LOX-1: | Receptores tipo lectina de LDL oxidada 1 |
| LP: | Lipasa Pancreática |
| LPL: | Lipoproteína Lipasa |
| LPS: | Lipopolisacárido |
| MCP-1: | <i>Monocyte Chemoattractant Protein 1</i> |
| MDA: | Malondialdehído |
| MEC: | Matriz Extracelular |
| MedDiet: | Dieta Mediterránea |
| MINSAL: | Ministerio de Salud de Chile |
| Mn-SOD/SOD2: | Manganeso-Superóxido Dismutasa/Superóxido Dismutasa 2 |
| NADPH: | Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato |
| Ni-SOD: | Níquel-Superóxido Dismutasa |
| NNA: | Niños, niñas y adolescentes |
| NO: | Óxido Nítrico |
| NPC1L1: | Proteína 1 Niemann-Pick C1 |
| OMS: | Organización Mundial de la Salud |
| ox-LDL: | LDL oxidada |
| PBMC: | <i>Pheripheral Blood Mononuclear Cell</i> ; Células Mononucleares de Sangre Periférica |

| | |
|---------------------------------|---|
| PCR: | Proteína C Reactiva |
| PCSK-9: | <i>Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9</i> |
| PDGF: | Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas |
| PMA: | Forbol 12-miristato 13-acetato |
| PPARγ: | Receptor gamma activado por el proliferador de peroxisoma |
| QM: | Quilomicrón |
| RCG: | Riesgo Cardiovascular Global |
| RCV: | Riesgo Cardiovascular |
| REDOX: | Reducción-Oxidación |
| RNS: | Especie Reactiva del Nitrógeno |
| ROS: | Especie Reactiva del Oxígeno |
| RT-qPCR: | Transcripción reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa |
| SOD: | Superóxido Dismutasa |
| SR: | <i>Scavenger Receptor</i> |
| SR-B1: | <i>Scavenger Receptor B1</i> |
| TG: | Triglicéridos |
| TNF-α: | Factor de Necrosis Tumoral alfa |
| Trx: | Tioredoxina |
| VCAM-1: | <i>Vascular Cell Adhesion Molecule 1</i> |
| VEGF: | Factor de Crecimiento Endotelial Vascular |
| VLDL: | <i>Very Low Density Lipoprotein</i> |
| ZA: | Zysoman A |

RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte en Chile y el mundo, su principal factor de riesgo es la hipercolesterolemia, caracterizada por alteraciones del metabolismo lipídico y aumento del estrés oxidativo y respuesta inflamatoria. Frutos secos como la avellana mejoran estas alteraciones, pero no hay registro de estudios en población chilena. **Objetivo:** Comparar cambios de marcadores de estrés oxidativo en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y en parámetros del perfil lipídico en sujetos hipercolesterolémicos sometidos a dieta chilena suplementada con *Gevuina avellana* versus una dieta baja en grasas. **Metodología:** Estudio experimental aleatorizado mediante intervención nutricional de 6 meses con 81 participantes distribuidos en grupos dieta alta en grasas suplementada con avellana chilena y dieta baja en grasas. Se determinó el perfil lipídico sérico y en PBMCs la producción de ROS, actividad enzimática de superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión reductasa (GRd), marcadores de daño oxidativo (MDA, carbonilos y nitrotirosina) y expresión de genes (SOD, CAT y GRd, IL-10 y TNF- α). **Resultados:** En cuanto al perfil lipídico, se observó un aumento significativo en los niveles de HDL, mientras que en las PBMCs se observó una disminución en la producción de ROS y marcadores de daño oxidativo, y un aumento de reactividad inmune y mejora en la actividad enzimática de SOD y CAT en ambos tipos de dietas. **Conclusión:** Dieta chilena

alta en grasas suplementada con avellana chilena genera similares efectos beneficiosos en perfil lipídico y marcadores de estrés oxidativo que una dieta baja en grasas.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are the first cause of death in Chile and worldwide, their main risk factor is hypercholesterolemia characterized by alterations in lipid metabolism and increased oxidative stress and inflammatory markers. Nuts like hazelnuts improve these alterations, but there are no records of studies in the Chilean population. **Aim:** To compare changes in oxidative stress markers in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and lipid profile in subjects hypercholesterolemic that followed a Chilean diet supplemented with *Gevuina avellana* versus a low-fat diet. **Methods:** Randomized experimental study through nutritional intervention for 6 months with 81 participants divided into high-fat diet supplemented with Chilean hazelnut and low-fat diet. Lipid profile determination, and ROS production, enzymatic activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione reductase (GRd), oxidative stress markers (MDA, carbonyl and nitrotyrosine) and gene expression (SOD, CAT, GRd, IL-10 and TNF- α) in PBMCs was analyzed. **Results:** Increased of HDL levels, decrease in ROS production, increase immune reactivity, improvement in SOD and CAT enzymatic activity, and decrease in MDA and carbonyls in PBMC in both types of diet. **Conclusion:** High-fat Chilean diet supplemented with Chilean hazelnut generates similar beneficial effects in lipid profile and oxidative stress markers as a low-fat diet.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Enfermedades cardiovasculares e hipercolesterolemia

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la primera causa de muerte a nivel mundial, alcanzando 17,7 millones de muertes, equivalente al 31% de las defunciones según lo registrado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) durante el año 2015 (OMS, 2017). En la actualidad, se sabe un dato más concreto, donde la OMS indica que el 16% del total de muertes en el mundo tiene como responsable a la cardiopatía isquémica hasta el año 2019, pasando de 2 millones de defunciones en el año 2000 a 8,9 millones al 2019. Además, le sigue el accidente cerebrovascular como la segunda causa de defunción, con un 11% de los casos (OMS, 2020).

La situación nacional sigue un mismo patrón, según el Ministerio de Salud de Chile (MINSAL), las ECV continúan siendo la primera causa de muerte en nuestro país, llegando a ser un 24,5% del total de defunciones según lo registrado al año 2014 (MINSAL, 2017b).

La definición de las ECV se entiende como un conjunto de patologías donde se incluyen la cardiopatía coronaria, cardiopatías congénitas, enfermedades cerebrovasculares y cardiopatía reumática (OMS, 2017). A su vez, estas se desarrollan mediante un mecanismo fisiopatológico denominado aterosclerosis,

el cual es caracterizado por mantener un proceso inflamatorio y que además, tiene como principal factor de riesgo la hipercolesterolemia (MINSAL, 2018).

Este factor de riesgo conocido como hipercolesterolemia, forma parte de la subclasificación de un grupo mayor de patologías, conocidas como dislipidemias, definidas como un conjunto de patologías caracterizadas por mantener una alteración en los niveles séricos de lípidos, alcanzando niveles que significan un riesgo para la salud. Según las guías clínicas del MINSAL, es necesario establecer el nivel de riesgo cardiovascular global (RCG) identificando factores de riesgo específicos establecidos para cada nivel (**Tabla 1-1** y **Tabla 1-2**). Seguido de esto, se puede establecer un diagnóstico de hipercolesterolemia, que se establece cuando una persona presenta niveles aumentados exclusivamente de colesterol-LDL (c-LDL; *cholesterol-Low Density Lipoprotein*), según los parámetros definidos por el RCG específico (**Tabla 1-3**) (MINSAL, 2018).

La hipercolesterolemia puede clasificarse según la etiología que tenga. En ella podemos encontrar las que son de tipo primaria, quienes incluyen alteraciones en el metabolismo lipídico de causa genética, familiar o de aquellas descartadas por causas secundarias, donde estas últimas tienen relación con alguna enfermedad o alteración que modifica el metabolismo lipídico, pero que normalizando esto, la causa desaparece (**Tabla 1-4**) (MINSAL, 2000; José T. Real & Juan F. Ascaso).

Tabla 1-1. Factores de riesgo considerados en la evaluación del RCG.

Considerar presencia o ausencia de alguna manifestación clínica de enfermedad vascular aterosclerótica (coronaria, cerebral o periférica) y presencia de factores de riesgo cardiovascular, según listado:

1. Hombre mayor de 45 años
 2. Mujer postmenopáusica sin terapia de reemplazo estrogénico
 3. Antecedentes de aterosclerosis clínica en familiares de primer grado*
 4. Tabaquismo
 5. Hipertensión arteria
 6. Diabetes mellitus
 7. Colesterol HDL < 35 mg/dL
-

Si c-HDL > 60 mg/dL (factor protector), se resta 1 factor al puntaje de RCG

*Padres, hermanos, hijos (hombres < 55 años y mujeres < 65 años), c-HDL, *colesterol-High Density Lipoprotein*, colesterol-HDL.

Fuente: Obtenida de (MINSAL, 2000).

Tabla 1-2. Categorización del RCG según cantidad de factores.

| Categorías de riesgo | Factores de riesgo |
|-----------------------------|---|
| Bajo | < 2 factores de riesgo |
| Alto | 2 o > factores de riesgo |
| | Demostración de enfermedad vascular aterosclerótica |
| Máximo | Diabetes mellitus |
| | Dislipidemias aterogénicas genéticas severas |

Fuente: Obtenida de (MINSAL, 2000).

Tabla 1-3. Niveles patológicos de c-LDL (mg/dL) según categorías del RCG.

| Categoría del RCG | c-LDL (mg/dL) |
|--------------------------|----------------------|
| Bajo | ≥ 160 |
| Alto | ≥ 130 |
| Máximo | ≥ 100 |

Fuente: Modificado de (MINSAL, 2000).

Tabla 1-4. Clasificación de la hipercolesterolemia según su etiología.

| Etiología | Tipo | Detalle |
|--|--|---|
| Hipercolesterolemia familiar (HF) autosómica dominante heterocigota y homocigota | | Defecto de LDL-R (<i>Low Density Lipoprotein Receptor</i>) (gen <i>LDLR</i>) Defecto de ApoB (Apolipoproteína B) (gen <i>APOB</i>) Defecto funcional de PCSK-9 (gen <i>PCSK-9</i>) |
| HF autosómica recesiva | | Defecto de la proteína LDLRAP1 (gen <i>LDLRAP1</i>) |
| Primaria | Variantes de genes <i>APOE</i> pueden cursar con fenotipo clínico de HF | |
| | Hipercolesterolemia poligénica familiar o hipercolesterolemia multifactorial | |
| | Hipercolesterolemia mixta esporádica (HF combinada) | Aumento de colesterol y TG |
| Secundaria | Hipercolesterolemia con fenotipo II o III | Causas: Hipotiroidismo Síndrome nefrótico Colestasis Anorexia nerviosa Hepatoma Fármacos (ciclosporina, progestágenos, tiazidas, etc). |

Fuente: Confeccionado desde (*J. T. Real & J. F. Ascaso, 2021*).

Los datos entregados por la Encuesta Nacional de Salud de Chile realizada los años 2016-2017 (ENS 2016-17), indican que un 27,7% de la población adulta a nivel nacional presentó niveles de colesterol total (CT) superiores a los establecidos por las guías clínicas del MINSAL (CT > 200 mg/dL), y el 5,2% de la población mantuvo niveles elevados de c-LDL (> 160 mg/dL) (**Figura 1-1**) (MINSAL, 2017a).

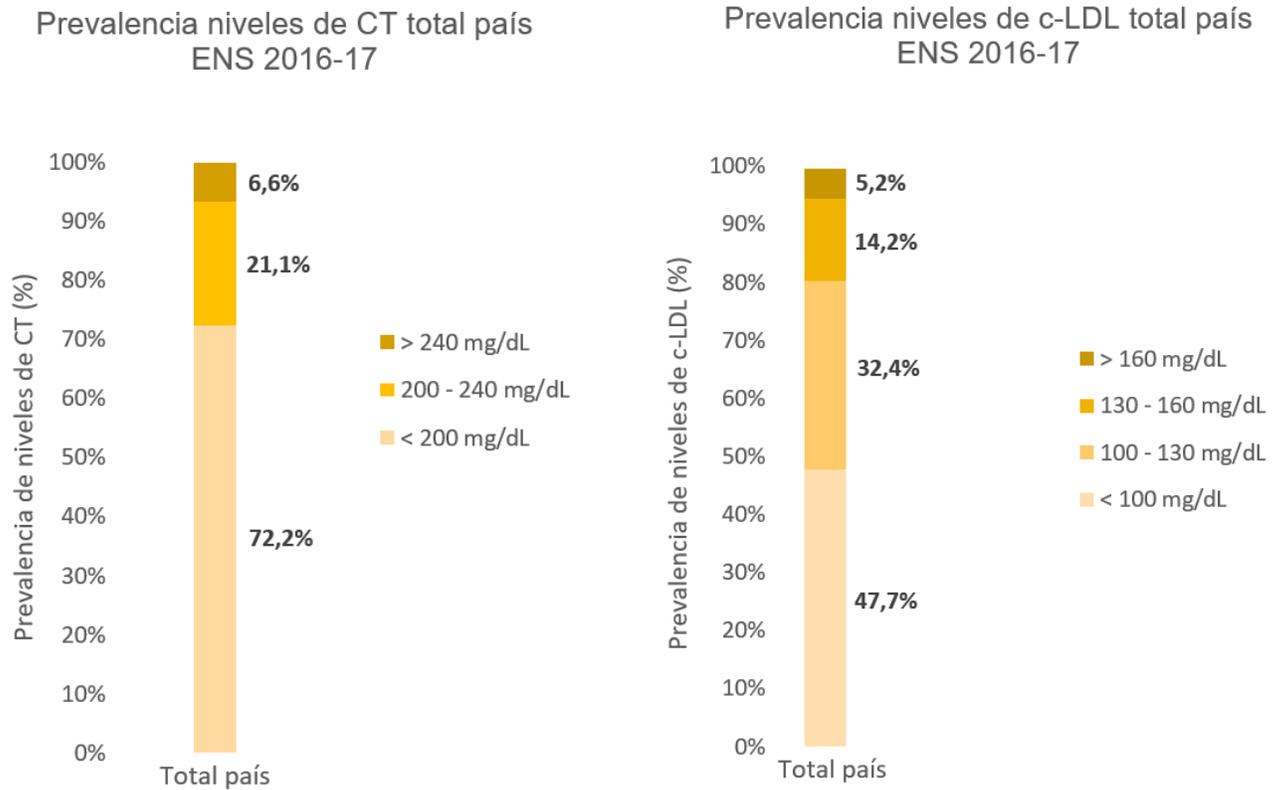


Figura 1-1. Prevalencia de niveles de colesterol total (CT) y c-LDL en total país (Chile) según la ENS 2016-17.

Se evidencia la prevalencia de un 27,7% de niveles aumentados de CT y prevalencia de un 5,2% de niveles aumentados de c-LDL en el total de la población, por sobre lo establecido en las guías clínicas del MINSAL.

Fuente: Modificado de ENS 2016-27 (MINSAL, 2017a).

1.2. Metabolismo lipídico

Dentro de la dinámica del metabolismo lipídico, el órgano central que participa regulando este proceso corresponde al hígado, y la molécula principal que interactúa con diferentes órganos es el colesterol, quien puede ser ingerido mediante la dieta, proceso conocido como vía exógena. Por otro lado, el colesterol puede ser biosintetizado mediante la vía endógena y su excreción se realiza mediante un proceso llamado transporte reverso, el cual culminará con la excreción intestinal (**Figura 1-2**). El colesterol por definición, cuando se encuentra en niveles aumentados para un respectivo RCG, genera una patología conocida como hipercolesterolemia (Aguillón-Osma et al., 2019; Cofan Pujol, 2014).

Las características estructurales del colesterol lo vuelven insoluble a nivel sanguíneo, por esto, es necesario que sea transportado mediante un conjunto de biomoléculas conocidas como lipoproteínas, donde se encuentran los quilomicrones (QM), VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*), IDL (*Intermediate Density Lipoprotein*), LDL (*Low Density Lipoprotein*) y HDL (*High Density Liprotein*) (Ramasamy, 2014).

Desde la dieta se obtienen triglicéridos (TG) y colesterol, en donde, los TG por la acción de las lipasas pancreáticas ubicadas en la luz intestinal, son hidrolizados y se unen a los ácidos biliares, generando una emulsión que permite su

absorción por parte de las células intestinales y dan forma a los QM. Estos QM, son quienes captan colesterol e incorporan hacia las células permitiendo su paso desde el sistema digestivo a circulación. Los QM son secretados a la linfa intestinal y finalmente pasan a circulación sanguínea, donde la lipoproteína lipasa (LPL) ubicada en el endotelio vascular, genera la hidrólisis de esta lipoproteína formando ácidos grasos libres, quienes son captados por diversos tejidos como el tejido adiposo, tejido cardíaco y macrófagos (Ramamy, 2014; J. T. Real & J. F. Ascaso, 2021).

Debido a la acción de la LPL, se disminuye el contenido de TG en los QM y mediante la acción de la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP) y la proteínas transferidora de fosfolípidos (FLTP) se generan moléculas de menor tamaño y contenido en TG, dando paso a los QM remanentes que son captados a nivel del hígado mediante receptores específicos para la apolipoproteína E (apoE), apolipoproteína que forma parte de su estructura (J. T. Real & J. F. Ascaso, 2021).

Desde el hígado, tanto TG como ésteres de colesterol, son transferidos hacia la ApoB-100 para dar forma a las VLDL, quienes permiten el transporte del colesterol hacia la sangre periférica, pero que, en este paso por los vasos sanguíneos, serán hidrolizadas por la LPL y darán forma a más ácidos grasos libres, generando una nueva lipoproteína conocida como IDL. La IDL tiene finalmente 2 caminos metabólicos, uno de ellos es ser catabolizada rápidamente por el hígado de forma similar a como ocurre con los QM remanentes o puede,

por otro lado, permanecer en circulación. Si la opción es permanecer en circulación, la IDL interactúa con la lipasa hepática (LH), esta es clivada y genera las LDL, que puede continuar por dos caminos metabólicos, donde uno de ellos es ser captadas por los LDL-R (*Low Density Lipoprotein Receptor*) del hígado, que ocurre en el 70% de los casos, o ser captada por los LDL-R de los tejidos periféricos o extrahepáticos, que ocurre en el 30% de los casos (Carvajal, 2014; Feingold, 2000; Ramasamy, 2014).

Cuando la ApoB-100 de las LDL se encuentra unida al LDL-R, se genera una endocitosis de una estructura llamada vesículas recubiertas y son transportadas hacia el citoplasma de la célula en forma de endosomas. Allí, el contenido proteico y lipídico es hidrolizado y se forman las unidades básicas de estas estructuras, aminoácidos y colesterol no esterificado, donde el colesterol no esterificado es citotóxico a cierta concentración, por lo que, la célula debe utilizar este producto para, por ejemplo, la síntesis de membranas u hormonas esteroideas. En el caso de haber un exceso de fosfolípidos y colesterol dentro de las células, se genera un eflujo de ellos, generando finalmente colesterol HDL, que será esterificado por la enzima lecitin:colesterol aciltransferasa (LCAT) y permitirá su salida hacia los hepatocitos, proceso conocido como transporte reverso. Finalmente, este colesterol podrá ser eliminado mediante la bilis y heces, tras la secreción hepática e intestinal (Errico et al., 2013; Feingold, 2000; Ramasamy, 2014).

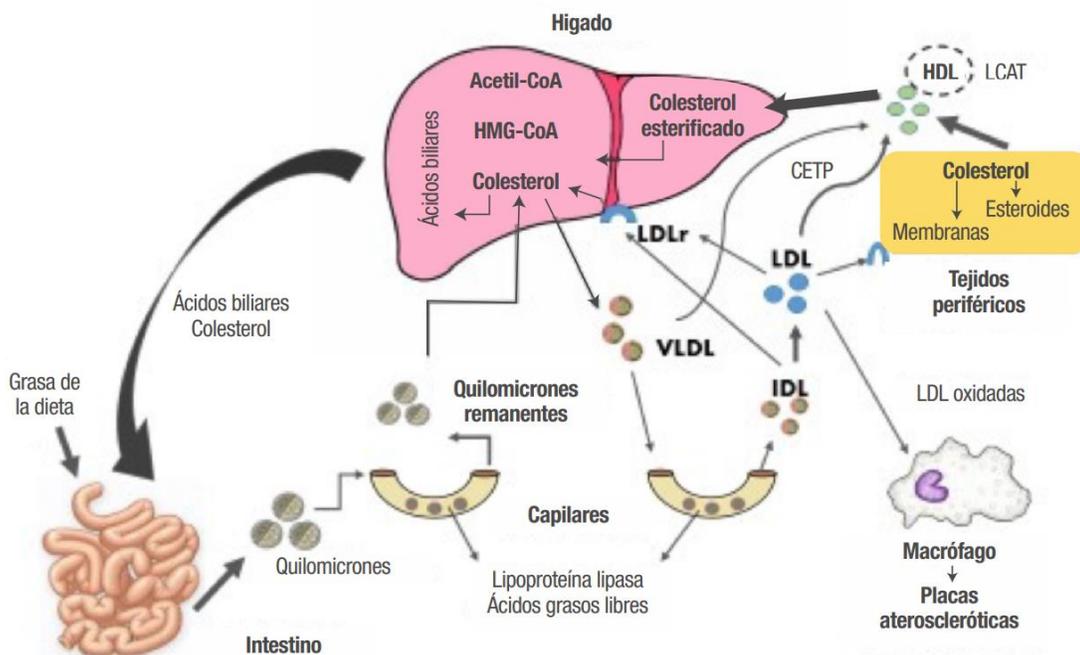


Figura 1-2. Fisiología el metabolismo lipídico.

Descripción del metabolismo lipídico a nivel general, donde se describe la obtención de colesterol desde la dieta, el cual es distribuido hacia el hígado mediante los QM. Estos QM son hidrolizados por la LPL y captados por los hepatocitos, constituyendo a la vía exógena. Respecto a la vía endógena, esta puede ocurrir por una biosíntesis de colesterol desde la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) o por un reordenamiento de los QM remanentes para dar forma a las VLDL. Las VLDL son hidrolizadas por la LPL y forman a las IDL quienes pueden ser reabsorbidas por el hígado o continuar su camino hacia los tejidos periféricos por los vasos sanguíneos, donde son hidrolizadas nuevamente formando las LDL, quienes pueden ser captadas por los hepatocitos o distribuidas hacia los tejidos extrahepáticos. Finalmente, ocurre el transporte reverso, donde se libera el colesterol en exceso mediante las HDL, quien va a ser excretado o reabsorbido mediante vía biliar y heces.

Fuente: *Obtenido de (Aguillón-Osma et al., 2019).*

1.3. Estado redox y estrés oxidativo

Las reacciones químicas de oxidación-reducción (REDOX) llevadas a cabo dentro de las células, quienes permiten llevar a cabo procesos fundamentales, son conocidas como señalización redox y control redox. Dentro de estos procesos fundamentales, es sabido que los sistemas biológicos aeróbicos utilizan moléculas de oxígeno para la respiración celular y obtención de energía, usando a nivel mitocondrial un 95% del oxígeno obtenido. Algunos intermediarios de estos procesos suelen ser tóxicos, de hecho, el 5% de oxígeno obtenido no consumido por parte de la mitocondria ocasiona la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) o radicales libres (Becker, 2004; Sies, 2015).

Un exceso en la formación de estas ROS y de especies reactivas del nitrógeno (RNS) o una insuficiencia en la remoción de altos niveles de estas especies es la definición de estrés oxidativo y nitrosativo. Producto de reacciones en cadena donde se van transfiriendo electrones, se generan diversas moléculas altamente oxidantes y dentro de estas se encuentran el ion superóxido, peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilos, peroxinitrito, entre otros (**Tabla 1-5** y **Figura 1-3**). El rol de estas moléculas es ser parte de la dinámica celular, puesto que son formadas por diversas macromoléculas pro-oxidativas como la cadena transportadora de electrones (CTE), NADPH oxidasa, xantina oxidasa y ciclooxigenasas. Estos radicales libres existen en células y tejidos biológicos en concentraciones que son bajas, pero que algunos de ellos pueden ser medidos

(como el H_2O_2) y su concentración está determinada por el equilibrio que existe en la producción y la eliminación de las mismas (Apel & Hirt, 2004; Csonka et al., 2016; Dröge, 2002; Phaniendra et al., 2015; Vaquero-Raya & Molero-Richard, 2005).

Tabla 1-5. Lista de ROS y RNS producidos durante el metabolismo.

| Radicales Libres | Símbolo | Vida media |
|---|------------------|---------------|
| Especies reactivas del oxígeno (ROS) | | |
| Radicales | | |
| Superóxido | $O_2^{\bullet-}$ | 10^{-6} s |
| Hidroxilo | OH^{\bullet} | 10^{-10} s |
| Radical alcoxilo | RO^{\bullet} | 10^{-6} s |
| Radical peroxilo | ROO^{\bullet} | 17 s |
| No radicales | | |
| Peróxido de hidrógeno | H_2O_2 | Estable |
| Oxígeno singlete | 1O_2 | 10^{-6} s |
| Ozono | O_3 | s |
| Peróxido Orgánico | $ROOH$ | Estable |
| Ácido hipocloroso | $HOCl$ | Estable (min) |
| Ácido hipobromoso | $HOBr$ | Estable (min) |
| Especies reactivas del nitrógeno (RNS) | | |
| Radicales | | |
| Óxido nítrico | NO^{\bullet} | s^a |
| Dióxido de nitrógeno | NO_2^{\bullet} | s |
| No radicales | | |
| Peroxinitrito | $ONOO^-$ | 10^{-3} s |
| Catión nitrosilo | NO^+ | s |
| Anión nitroxilo | NO^- | s |

| | | |
|---------------------------|----------|------------------|
| Trióxido de dinitrógeno | N_2O_3 | s |
| Tetraóxido de dinitrógeno | N_2O_4 | s |
| Ácido nitroso | HNO_2 | s |
| Ácido peroxinitroso | $ONOOH$ | Bastante estable |
| Cloruro de nitrilo | NO_2Cl | s |

^a La vida media de algunos radicales libres depende del medioambiente, por ejemplo, la vida media del NO^\bullet en una solución saturada de aire puede tardar unos minutos. s segundos, *min* minutos.

Fuente: Adaptada de (*Phaniendra et al., 2015*).

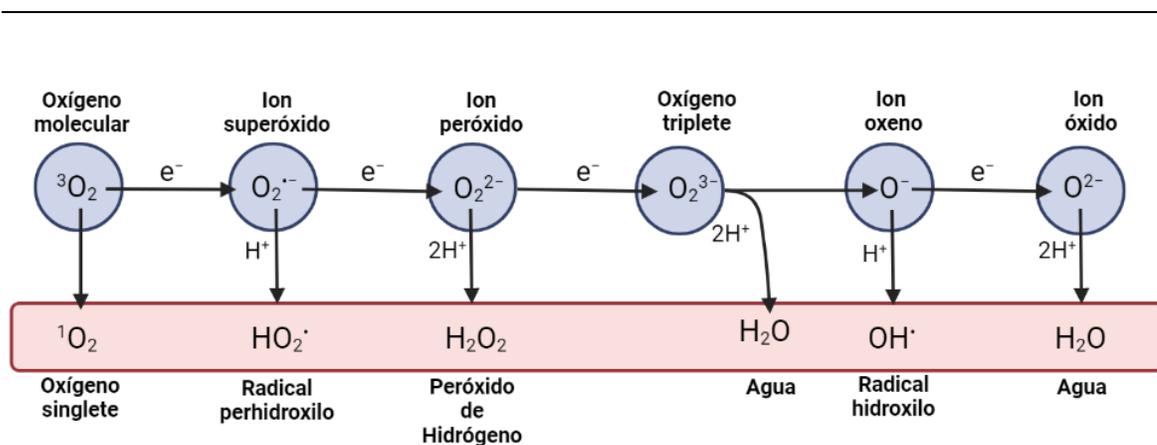


Figura 1-3. Generación de los diferentes ROS mediante energía transferida o reducción univalente secuencial del oxígeno triplete en estado fundamental.

Descripción de la generación de ROS a partir del oxígeno molecular o dioxígeno ($^3\text{O}_2$). A partir del dioxígeno se puede generar el oxígeno singlete y también, por transferencia electrónica, es posible generar un poderoso radical libre que es el ion superóxido. El ion superóxido al estar en presencia de protones (H^+) puede formar el radical perhidroxilo, en cambio, por transferencia de electrones, forma el ion peróxido. Este ion peróxido es capaz de formar el peróxido de hidrógeno en presencia de H^+ u oxígeno triplete, quien a su vez puede formar agua o ion oxeno. Este último tiene la capacidad de formar al radical hidroxilo en presencia de H^+ o ion óxido, quien finalmente forma agua.

Fuente: Confeccionada en biorender, adaptada y traducida de (Apel & Hirt, 2004).

Existen diversos mecanismos por los cuales las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) pueden ser activadas y producir una cantidad masiva de ROS, dentro de ellos se encuentra la peroxidación lipídica, activación lograda mediante lipopolisacárido (LPS), Zymosan A (ZA) y forbol 12-miristato 13-acetato (PMA). La producción de ROS masiva es un mecanismo de defensa utilizada por células como macrófagos y neutrófilos frente a patógenos. Cuando existe un aumento de estas ROS, se genera una propagación de reacciones químicas en cadena que inician con la peroxidación lipídica y que culmina en productos finales como el 4-hidroxi-2-noenol (4-HNE) y malondialdehído (MDA), quienes se acumulan en los sistemas biológicos. Como producto final de la peroxidación lipídica, se tiene el MDA quien posee una mayor afinidad con formar aductos con el ADN, pero cuando existe un aumento en su concentración a nivel citoplasmático, este puede generar aductos con proteínas, uniéndose a N ϵ -(2-propenal) lisina o uniones 1-amino-3-iminopropeno y piridil-1-dihidropiridina tipo lisina-lisina. Estos productos MDA-proteína son capaces de generar una reacción proinflamatoria, induciendo activación en linfocitos Th17, a su vez, también puede provocar un aumento en la expresión de TNF- α mediante un mecanismo de modificación de la albúmina a nivel del plasma (Dröge, 2002; Gęgotek & Skrzydlewska, 2019; Tan et al., 2018).

1.3.1. Sistema antioxidante

Para enfrentar este aumento en la producción de ROS, las células han implementado un sistema antioxidante capaz de disminuir y neutralizar estas moléculas y con ello llegar a un equilibrio redox. Dentro de los mecanismos utilizados por el sistema antioxidante, tenemos un componente endógeno enzimático y un componente no enzimático. Dentro del componente enzimático podemos encontrar enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa y reductasa (GPx y GRd), y tioredoxina (Trx), mientras que, en el componente no enzimático, tenemos compuesto hidrofílicos antioxidantes como el urato, ascorbato y flavonoides, además de radicales lipofílicos antioxidantes como el tocoferol, carotenoide o ubiquinol y también otros compuestos como minerales (selenio y zinc) y metabolitos (bilirrubina y melatonina). Si hablamos de la efectividad y eficiencia en la descomposición de ROS, el sistema humano tiene una batería de enzimas antioxidantes que por excelencia son el principal mecanismo protector, pudiendo disminuir el ataque oxidativo de forma masiva y jugando un rol importante en diversas condiciones patológicas como el daño por hipoxia, por radiación, trasplantes y proceso inflamatorio. Dentro de las enzimas más importantes se incluyen la CAT, SOD, GPx y GRd quienes son enzimas que tienen una mayor afinidad por ROS (Ali et al., 2020; Demirci-Çekiç et al., 2022; He et al., 2017; Su et al., 2019).

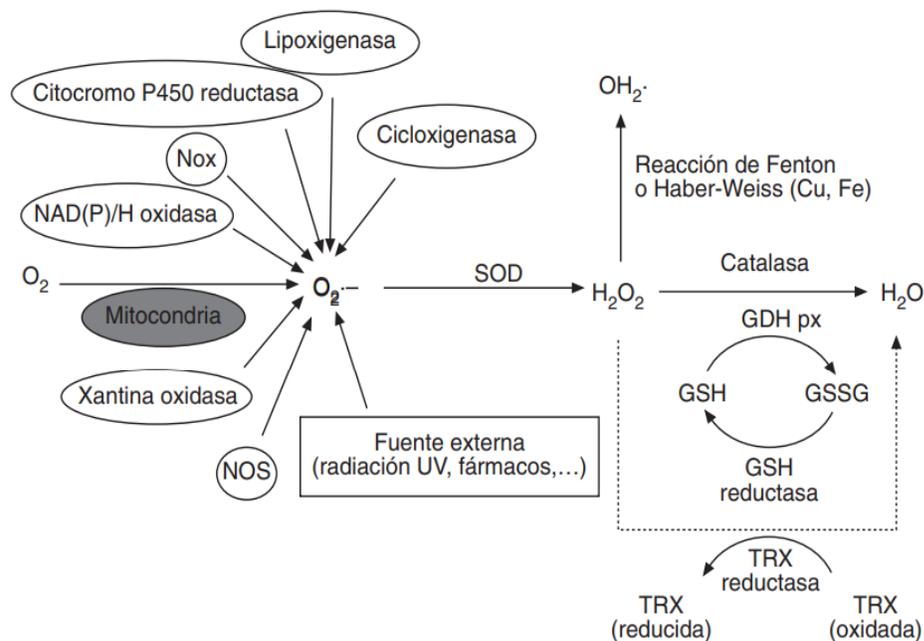


Figura 1-4. Proceso metabólico de producción de ROS y enzimas antioxidantes participantes en su eliminación.

Se representan los diversos factores que provocarían una producción de ROS y la maquinaria enzimática capaz de controlar esta producción de ROS. Se encuentran principalmente y biológicamente hablando, la mitocondria, también se incluyen enzimas como cicloxigenasas, lipoxigenasas, citocromo P450 reductasa, NADPH oxidasa, xantina oxidasa y factores externos como radiación UV o fármacos. Estas estructuras convierten al oxígeno molecular en radical perhidroxilo y para evitar su rápida conversión en moléculas más oxidantes, la superóxido dismutasa (SOD) convierte a este radical perhidroxilo en peróxido de hidrógeno. Tanto la catalasa (CAT), glutatión reductasa (GRd/GSH reductasa), glutatión peroxidasa (GPx/GDH px) y la tioredoxina reductasa (TRX reductasa), permiten la conversión del peróxido de hidrógeno en agua.

Fuente: Obtenido de (Vaquero-Raya & Molero-Richard, 2005).

Se ha establecido que la primera línea de defensa frente al estrés oxidativo es la metaloenzima SOD. Existe una gran mayoría de organismos que viven en presencia de oxígeno que son capaces de expresar al menos una de las isoformas de esta enzima. Respecto a estas isoformas, existen cuatro clases que poseen un diferente centro catalítico definido por un ion metálico, dentro de las cuales se encuentran la Cu/Zn-SOD o SOD1 (Cobre/Zinc-SOD), Mn-SOD o SOD2 (Manganeso-SOD), Fe-SOD (Hierro-SOD) y Ni-SOD (Níquel-SOD). En las células eucariontes solo se expresan la SOD1 a nivel del citoplasma y extracelular, permitiendo regular los niveles de ion superóxido en el espacio intermembrana, citosol y peroxisomas, mientras que la SOD2 es expresada a nivel de la mitocondria, donde se ha definido que esta isoforma es capaz de regular a nivel nanomolar, los niveles fisiológicos de $O_2^{\cdot-}$, además de modular los niveles de H_2O_2 en las células. La SOD1 corresponde a un homodímero que posee un centro activo de cobre quien sufre cambios de valencia durante la catálisis y también posee zinc que se cree desempeña un papel estructural, esta enzima posee un peso molecular de 32 kDa, en donde su deterioro se ha asociado a retinopatía diabética. Por otro lado, la SOD2 es un homotetrámero que contiene manganeso (III) en su sitio activo y tiene un peso molecular de 89 kDa, el deterioro en la función antioxidante de esta isoforma se ha relacionado con enfermedades como la aterosclerosis. Cualquiera de sus isoformas es capaz de realizar la reacción de dismutación del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) para formar el H_2O_2 y O_2 (**Tabla 1-6**) (Ali et al., 2020; Demirci-Çekiç et al., 2022;

Eleutherio et al., 2021; Miriyala et al., 2012; Pisoschi & Pop, 2015; Wang et al., 2018; Zhao et al., 2021).

La CAT es una enzima muy importante a nivel de la regulación redox y tiene como función disociar al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en oxígeno molecular (O_2) y agua (H_2O) (**Tabla 1-6**). Tiene un peso molecular equivalente a 250 kDa y su estructura consiste en 4 grupos de hemoproteínas donde cada una contiene un grupo hemo activo y NADPH. La CAT es considerada la enzima antioxidante más importante en la mayoría de las células, estando presente en peroxisomas de células animales y tiene la capacidad de reducir significativamente el estrés oxidativo. La actividad enzimática de CAT depende de la concentración de H_2O_2 , por lo que, cuando hay altas concentraciones, se genera la descomposición del H_2O_2 , pero en caso de concentraciones bajas, este compuesto puede realizar la reacción de peroxidación con otros compuestos como metanol o etanol. Su rol en el ser humano constituye en proteger a la hemoglobina del H_2O_2 generado y además tiene un papel de protección durante el proceso de inflamación, reduciendo los niveles de ROS (Ali et al., 2020; Demirci-Çekiç et al., 2022; Hadwan, 2018; Lu et al., 2021; Pisoschi & Pop, 2015; Putnam et al., 2000; Su et al., 2019).

La GRd es una flavoproteína homodimérica de 110 kDa aproximadamente, que tiene una alta participación en el metabolismo del glutatión (GSH), siendo capaz de catalizar la reducción NADPH dependiente del glutatión disulfato (GSSG) a GSH (**Tabla 1-6**), reacción que es esencial para mantener los niveles de GSH

controlados. Esta enzima tiende a acumularse en regiones celulares donde existe un alto flujo de electrones, donde las ROS y RNS son generadas y se sugiere que, debido al alto grado de conservación de la enzima desde bacterias (*Escherichia coli*) hasta humanos, la GRd cumple funciones que son esenciales para la vida de organismo aeróbicos. La GRd es la encargada de mantener la relación GSH/GSSG y es quien permite que haya una disponibilidad de GSH que será usada por la GPx y permitirá la conversión de H₂O₂ en H₂O (**Tabla 1-6**), puesto que la GPx utiliza el GSH como cofactor (Ali et al., 2020; Carlberg & Mannervik, 1985; Couto et al., 2016; Deponte, 2013; Kehrer et al., 2010).

Tabla 1-6. Reacciones enzimáticas llevadas a cabo por enzimas antioxidantes.

| Nombre enzima antioxidante | Reacción catalizada |
|----------------------------|--|
| SOD | $2 O_2^{\bullet -} \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$ |
| CAT | $2 H_2O_2 \xrightarrow{CAT} 2 H_2O + O_2$ |
| GRd | $GSSG + NADPH \xrightarrow{GRd} GSH + NADP^+$ |
| GPx | $GSH + 2H_2O_2 \xrightarrow{GPx} 2H_2O + O_2 + GSSG$ |

Fuente: Elaboración propia.

1.4. Sistema inmunológico

Dentro de los ya conocidos factores de riesgo asociados a ECV, la evidencia ya existente sugiere que a parte de una participación de la inmunidad innata, también hay una participación en la inmunidad adaptativa en el desarrollo de las ECV, esto debido a un aumento en las células T efectoras de memoria circulantes que se encuentran en pacientes con ECV y la correlación que existe con el aumento de los niveles de c-LDL. El hígado, como órgano central ligado al metabolismo lipídico, se sabe también que es un sitio inmunológico único, siendo la regulación homeostática inmunológica un factor particularmente importante a nivel hepático en el contexto de la aterosclerosis, puesto que en inflamaciones hepáticas subagudas empeora el desarrollo de lesiones, mientras que interrumpir la vía inflamatoria en hepatocitos permite aliviar la aterosclerosis. Sumado a lo anterior, tanto la respuesta inmune y otros procesos vitales de las células inmunológicas como lo son la sobrevivencia celular, el crecimiento celular, la proliferación y diferenciación celular, tienen directa relación con la presencia de ROS, otro de los participantes clave en el desarrollo de las ECV, mediante la presencia del estrés oxidativo. La presencia y evolución de lesiones ateroscleróticas a nivel endotelial se relaciona también con la aparición de células T CD4+ proaterogénicas, así como también lo hacen los macrófagos, de hecho, las células T reguladoras CD4+ originadas a nivel del timo o diferenciadas en la periferia expresan un factor de transcripción que

define el linaje FoxP3 y suprime la aterosclerosis, mientras que el desarrollo de la enfermedad se agrava en presencia de células T CD4+ proinflamatorias que son específicas capaces de reconocer la ApoB-100 expresada en el hígado (Mailer et al., 2017; Proto et al., 2018; Yang et al., 2013).

En enfermedades inflamatorias crónicas, como es el caso de la aterosclerosis, se encuentran las células inmunes innatas que corresponden a los monocitos, macrófagos y células dendríticas, quienes participan en la inflamación secretando factores proinflamatorios como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleuquina-6 (IL-6) y ROS. Junto a este tipo de respuesta innata, se genera una infiltración de células inmunes adaptativas que generan respuestas inmunes antígeno-específicas mediante células T efectoras productoras de citoquinas proinflamatorias o antiinflamatorias y de células B que se diferencian en células plasmáticas con su característica funcionalidad de producción de anticuerpos específicos, teniendo roles importantes en el proceso de aterosclerosis (Sun et al., 2020).

Es sabido que las células del sistema inmune utilizan ROS para ejercer su rol defensivo frente a diversos patógenos, como ocurre en el caso de las células fagocíticas como los macrófagos, quienes utilizan ROS como un arma efectiva en el procesos conocido como explosión oxidativa o estallido respiratorio. Dentro de las acciones que ejercen las células NK (*Natural Killer*) los ROS son requeridos en procesos como la citólisis de células cancerosas. Por otro lado, las células dendríticas utilizan ROS, específicamente los derivados de la

actividad mitocondrial, para iniciar su diferenciación a partir de precursores de monocitos o células hematopoyéticas, mientras que en lo que respecta a las funciones inmunológicas y ciclo de vida de las células T, estas son reguladas de forma sutil por la producción y señalización que desencadena la presencia de ROS. Finalmente, ciertos ROS como el H₂O₂, juegan un rol importante en la activación de las células B, así como contribuir en la señalización de los receptores de la célula B (BCR, *B cell receptor*) (Yang et al., 2013).

1.4.1. Células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)

Años de investigación han llevado a determinar que un buen biomarcador para evidenciar los cambios metabólicos a nivel de los tejidos son las PBMC. Dentro de ellas se encuentran diversas células inmunológicas de un único núcleo, donde un 70 – 90% corresponde a linfocitos T, linfocitos B y células NK, mientras que un 10 – 30% corresponde a monocitos/macrófagos y un ~1% corresponde a células dendríticas (Reynés et al., 2015; Silva et al., 2016).

En estudios de nutrición, es fundamental comprender el rol de la comida y los nutrientes en la regulación de los tejidos y cómo se llevan a cabo los mecanismos moleculares que finalmente reflejan los beneficios que son adquiridos mediante la dieta, esto principalmente en el hígado, tejido adiposo y tejido muscular. Debido a la limitación de obtener este tipo de muestras en

voluntarios humanos sanos, es que se ha vuelto imprescindible disponer de una herramienta alternativa que sea capaz de reflejar de forma fehaciente los cambios a nivel de diversos tejidos. De aquí surge como alternativa el uso de las PBMC, puesto que estas células son capaces de evidenciar la regulación hepática del metabolismo lipídico y pueden migrar a diversos tejidos a través de la circulación sanguínea, además de que la expresión génica de las PBMC reflejaría las respuestas metabólicas e inmunitarias en adipocitos y hepatocitos. Además, las PBMC son capaces de responder frente a cambios hormonales que son causados por respuestas metabólicas de diferentes órganos, debido a que poseen receptores para hormonas como lo son la insulina, glucagón y leptina, claves en la regulación metabólica y que influyen también en el metabolismo lipídico. Sumado a esto, las PBMC son capaces de relacionarse a enfermedades que tienen un factor nutricional, como es la obesidad o dislipidemias, puesto que son enfermedades inflamatorias que provocan cambios en la expresión de las PBMC para la activación de estas en la respuesta inmune (Caimari et al., 2010; de Mello et al., 2012; Reynés et al., 2015; Reynés et al., 2016).

Las PBMC son buenos biomarcadores metabólicos y esto se debe a que son células capaces de expresar una gran porción del genoma, son de fácil obtención y son capaces de reflejar de forma representativa, mediante su expresión génica, las variaciones en el metabolismo. Lo anterior es debido a que son células que se encuentran permanentemente en circulación y gracias a que

interacción con diversos tejidos, estas pueden responder a señales internas y externas, esta última referida a consumo de nutrientes, lo que ocasiona este cambio en la expresión génica. Han sido utilizadas en estudios de nutrición y obesidad, puesto que a nivel de variación en la expresión génica se puede evidenciar cambios agudos adaptativos, en lo que a homeostasis energética respecta, esto en distintas condiciones de alimentación en tejidos claves del metabolismo lipídico como lo son el hígado y el tejido adiposo (Costa et al., 2021; Oliver et al., 2013; Reynés et al., 2015).

1.5. Hipercolesterolemia y su rol fisiopatológico en la aterosclerosis

La aterosclerosis corresponde a una enfermedad inflamatoria crónica caracterizada por la acumulación de lípidos y células inflamatorias en las paredes de las arterias de mediano y gran tamaño. Este proceso patogénico involucra señales de activación proinflamatoria, expresión de citoquinas/quimioquinas y también el aumento del estrés oxidativo (Kattoor et al., 2017).

Diversos son los factores de riesgo que pueden desencadenar una ECV, dentro de ellos se encuentran la hipertensión, diabetes, hábito tabáquico, género masculino y posible presencia de marcadores de inflamación como proteína C reactiva (PCR) o citoquinas, pero el nivel elevado de colesterol en plasma es

quizás el único suficientemente capaz de generar el desarrollo de la aterosclerosis, incluso en ausencia de otros factores de riesgo conocidos. La hipercolesterolemia es asociada a un desorden de carácter metabólico que está caracterizado por un aumento de CT en sangre y dentro de esto, el mayor factor de riesgo específico corresponde a un aumento de c-LDL. Esto puede desencadenar el proceso patogénico denominado aterosclerosis y por consecuencia final, pero no obligatoria, el desarrollo de enfermedades cardíacas isquémicas (Csonka et al., 2016; Falk, 2006).

1.5.1. Fisiopatología de la aterosclerosis

El desarrollo de la aterosclerosis (**Figura 1-5**) se lleva a cabo en un tejido biológico específico, este es el endotelio vascular que corresponde a una monocapa de células endoteliales y la cual, respecto a la zona apical de estas células expuestas al lumen del vaso sanguíneo, es la que constituye a la primera barrera molecular y celular frente a patógenos circulantes. Esta inicia en presencia de la disfunción endotelial, que corresponde a aquella capaz de interrumpir la homeostasis de la regulación vascular, en donde el endotelio pierde la habilidad de mantener la homeostasis, lo que también se acompaña con una vasoconstricción en las paredes de los vasos, infiltración lipídica, adhesión leucocitaria, activación de plaquetas y estrés oxidativo (Cyr et al.,

2020; Jebari-Benslaiman et al., 2022; Rosenbaum et al., 2012; Wolf & Ley, 2019).

Diversas son las causas de disfunción endotelial, dentro de ellas se encuentra la fuerza hemodinámica, quien puede ocasionar un estrés físico sobre las paredes del vaso sanguíneo producto del flujo turbulento que pudiera provocarse a causa de la presión arterial o por la estructura misma de los vasos sanguíneos. Por otro lado, cuando existe un aumento de ROS se genera el proceso de estrés oxidativo quien, al no ser regulado, es capaz de provocar una injuria a nivel del endotelio, como es el caso de la disminución en la biodisponibilidad de óxido nítrico (NO), quien es la molécula que permite la relajación de las fibras musculares de los vasos sanguíneos. Cuando existe una disminución de NO se propicia un ambiente de agregación plaquetaria, oxidación e inflamación de tejidos. Dentro de las causas que provocan una disminución de NO es la hipercolesterolemia, debido a un aumento en el estrés oxidativo, ya que se promueve la síntesis de citoquinas proaterogénicas como TNF- α e interleuquina-1 (IL-1) e IL-6, moléculas de adhesión molecular como VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule 1*) e ICAM-1 (*Intercelular Adhesion Molecule 1*) y quimioquinas como MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein 1*), quienes inhiben la actividad de eNOS (Óxido Nítrico Sintasa endotelial) que permite la síntesis de NO (Cyr et al., 2020; Jebari-Benslaiman et al., 2022; Rosenbaum et al., 2012).

Con este aumento en el estrés oxidativo, son los lípidos los primeros en ser afectados por las ROS. Este proceso es conocido como peroxidación lipídica e involucra la peroxidación de fosfolípidos y ésteres de colesterol, donde las ROS son capaces de formar radicales lipídicos que interaccionan con el oxígeno presente y generan radicales peroxilos lipídicos, luego hidroperóxidos lipídicos y finalmente un producto no radical y oxígeno restante. Todo este proceso es llevado a cabo porque al haber una disfunción endotelial, la ApoB que contienen las LDL son capaces de penetrar el endotelio dañado mediante un mecanismo de transcitosis por medio de receptores Scavenger B1 (SR-B1) y receptores tipo 1 de activina A (ALK1) y finalmente caer en los efectos del estrés oxidativo, convirtiendo a la LDL en LDL oxidada (ox-LDL). Producto de la oxidación de la LDL y el daño a nivel de las células endoteliales, se desencadena una respuesta inflamatoria donde participan las PBMCs, el endotelio vascular, células del músculo liso (CML) y fibroblastos (Ascaso, 2010; Khatana et al., 2020).

Al existir esta infiltración transendotelial de la LDL hacia el espacio subendotelial y existir esta oxidación, se desencadena un proceso inflamatorio que promueve la formación de una placa aterosclerótica. Una de las más importantes modificaciones que sufre la LDL es a nivel de su apolipoproteína ApoB-100, la cual, producto de la oxidación, modifica su estructura a nivel de sus residuos de tirosina que, sumado a los otros cambios estructurales, se impide el reconocimiento por parte del LDLR, lo que incrementa el ingreso de LDL, puesto

que no existe un control por parte de este receptor (Ascaso, 2010; Jebari-Benslaiman et al., 2022).

La presencia de ox-LDL genera la activación del endotelio y con ello se secretan diversas moléculas de adhesión celular como VCAM-1 e ICAM-1, lo que provoca un reclutamiento de monocitos y linfocitos T en la pared del vaso sanguíneo, como también un aumento en la producción de citoquinas quimiotácticas que atraen a más monocitos. En el espacio subendotelial es donde finalmente los monocitos se diferencian en macrófagos, quienes expresan receptores Scavenger (SR) y receptores tipo lectina de ox-LDL 1 (LOX-1) y con ello internalizan a la ox-LDL, lo que finalmente provoca que haya una transformación de estos macrófagos en células de espuma, que corresponden a macrófagos con una gran cantidad de ox-LDL en su interior (Hansson & Hermansson, 2011; Jebari-Benslaiman et al., 2022; Khatana et al., 2020).

Las CML son aquellas que fisiológicamente tienen un rol en la contractilidad de los vasos sanguíneos y regulación del flujo de la sangre. Cuando las citoquinas secretadas por linfocitos T, debido al reconocimiento de diversos antígenos de la ox-LDL que le son presentados, propician e incrementan este estado proinflamatorio, provocan una activación del endotelio y de las CML que genera la secreción de factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de fibroblastos, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), iniciando una migración y proliferación de las CML desde la túnica

media del vaso sanguíneo hasta el sitio de inflamación. Sumado a lo anterior, las CML al cambiar su fenotipo debido a estos estímulos, comienzan a sintetizar componentes de la matriz extracelular (MEC) como el colágeno, elastina o proteoglicanos, generando así una cubierta fibrótica denominada placa fibrótica que va a recubrir a la placa ateromatosa, generando una cápsula que protege a esta lesión de alguna ruptura momentáneamente (Jebari-Benslaiman et al., 2022; Khatana et al., 2020; Rosenbaum et al., 2012; Tall & Yvan-Charvet, 2015; Zhang et al., 2021).

El movimiento de todo este componente celular va propiciando la formación de una placa necrótica que se encuentra en el centro de la placa fibrótica, la cual contiene restos y cuerpos celulares necróticos y células apoptóticas. Dentro de ese núcleo necrótico se genera un microambiente proinflamatorio y oxidativo que en conjunto con aumento en la producción de metaloproteasas que inician una degradación de la MEC sintetizada por las CML, ocasiona un debilitamiento de la placa fibrótica, y posteriormente desencadenan la ruptura de estas placas, teniendo una alta probabilidad de generar trombos (Jebari-Benslaiman et al., 2022; Khatana et al., 2020; Libby et al., 2019; Rosenbaum et al., 2012; Tall & Yvan-Charvet, 2015; Zhang et al., 2021; Zhu et al., 2018).

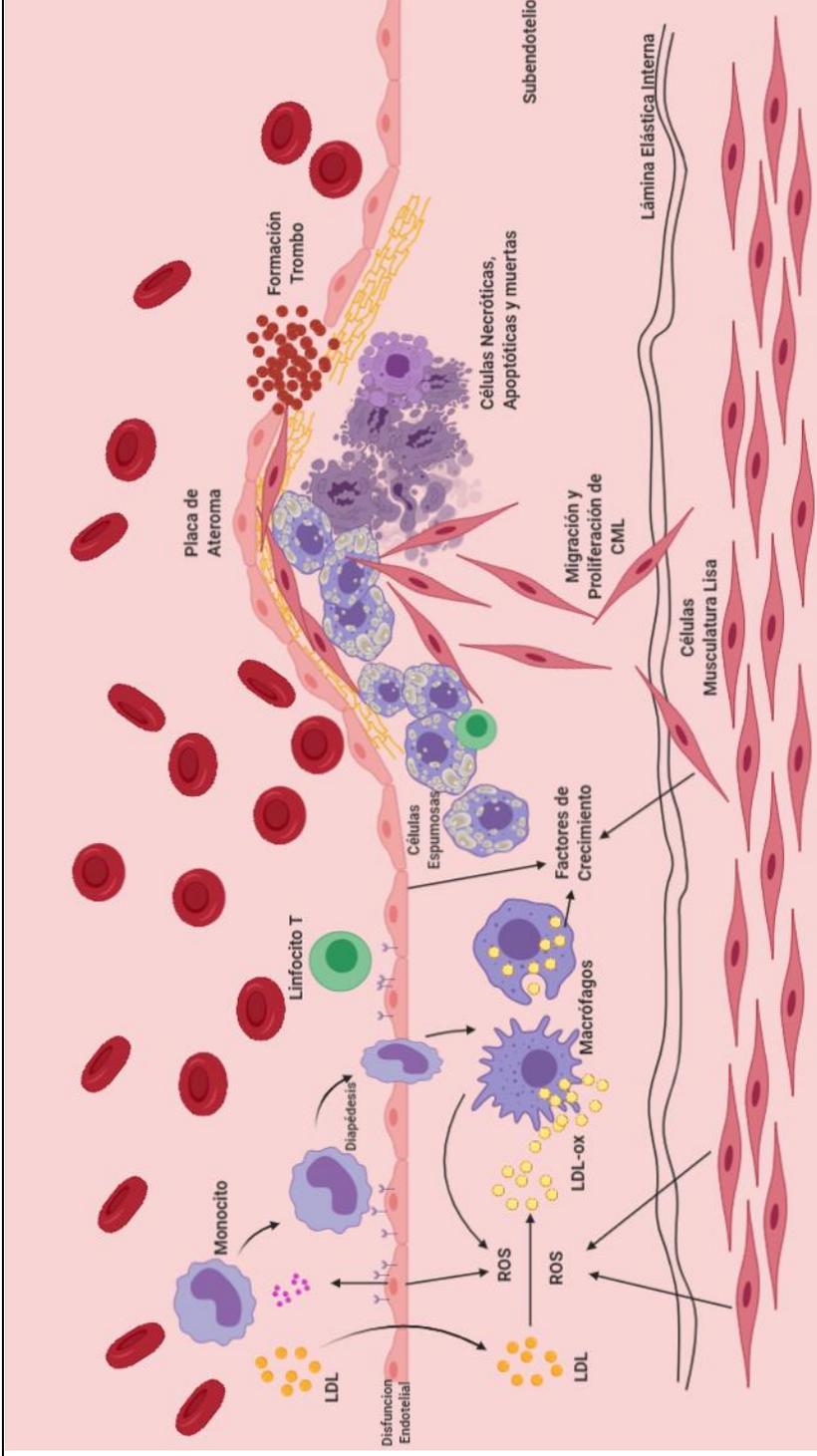


Figura 1-5. Desarrollo de la placa aterosclerótica.

Descripción gráfica del proceso fisiopatológico de la aterosclerosis. Comienza con la disfunción endotelial que aumenta la permeabilidad a la LDL, permitiendo así su ingreso al espacio subendotelial, donde debido al aumento del estrés oxidativo, se genera una oxidación de la LDL, convirtiéndola en ox-LDL. Esta lipoproteína oxidada desencadena la activación del endotelio y CML, liberando quimioatrayentes y moléculas de adhesión que permiten el reclutamiento de monocitos/macrófagos y linfocitos T, quienes también ingresan al espacio subendotelial. Allí, los macrófagos comienzan a internalizar la LDL-ox y se transforman en células de espuma, promoviendo a su vez, la expresión de factores de crecimiento que movilizan a las CML hacia el espacio subendotelial y cambian su fenotipo al de fibroblastos, secretando MEC. Este conjunto de células y biomoléculas propician la formación de la placa aterosclerótica y una futura ruptura de trombo.

Fuente: Elaboración propia desde biorender.

1.6. Tratamientos para hipercolesterolemia

1.6.1. Tratamiento no farmacológico

Las alternativas terapéuticas establecidas para enfrentar a la hipercolesterolemia constan de 2 vías, las cuales suelen ser utilizadas por separado, pero también en conjunto, dependiendo de la condición del paciente. Para evitar la administración de medicamentos, lo primero recomendado al paciente es comenzar un tratamiento no farmacológico o también establecido como tratamiento dietético y de actividad física, lo que involucra a grandes rasgos, un cambio de estilo de vida, donde se incluya un aumento progresivo en la actividad física del paciente y también un cambio a nivel de la dieta alimentaria (León & Solís, 2012; MINSAL, 2000).

Las guías clínicas del MINSAL frente al tratamiento de las dislipidemias fija como objetivo central del tratamiento el mejorar el colesterol aterogénico, es decir el c-LDL y/o c-no HDL (colesterol no HDL). En base a esto se indica a pacientes con un RCV bajo y moderado, el seguir un tratamiento dietoterapéutico en un plazo de 3 a 6 meses antes de comenzar con el tratamiento farmacológico, donde se incluye una distribución de macro y micronutrientes para equilibrar y variar la alimentación (**Tabla 1-7**). El enfoque de los nuevos tratamientos dietéticos es el enfrentamiento de la

hipercolesterolemia mediante dietas basadas en patrones dietarios cardioprotectores, puesto que en literatura se ha documentado la existencia de beneficios de nutrientes y componentes de la dieta frente a procesos aterogénicos y, por ende, hipercolesterolemia, pudiendo llegar a ser factores protectores que permitan retrasar o evitar estos procesos. Sumado a esto, también se incluyen aumentos en la actividad física que incluye entre 40 a 60 minutos de ejercicio aeróbico o fuerza dinámica al menos 4 días a la semana en una categoría de intensidad que va de moderada a vigorosa, pero que debe ser prescrita en base a la evaluación individual de cada paciente respecto a su capacidad cardiovascular y biomecánica. Finalmente, dentro de los cambios de estilo de vida se incluye la disminución del consumo de alcohol (< 20 g/día en hombres y < 10 g/día en mujeres, siendo dos y un trago al día según las medidas estándar de acuerdo con el grado alcohólico de la bebida a consumir) y dejar el hábito tabáquico, lo que se debe evaluar con cada paciente (MINSAL, 2018; Pino Ramos et al., 2019).

Tabla 1-7. Proporciones recomendadas de diversos micro y macronutrientes en un tratamiento dietoterapéutico para hipercolesterolemia.

| Micro/macronutriente | Proporción |
|--------------------------------------|---|
| Grasa total | 25 – 30% de calorías totales |
| Ácidos grasos saturados (AGS) | < 7% de las calorías totales |
| Ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) | < 10% de las calorías totales |
| Ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) | 10 – 20% de las calorías totales |
| Grasas trans | < 1% de las calorías totales |
| Carbohidratos | 45 – 55% de las calorías totales |
| Proteínas | 15% de las calorías totales |
| Colesterol | < 200 – 300 mg/día |
| Fibra | 20 – 35 g/día (10 a 25 g soluble) |
| Calorías totales | Necesarias para alcanzar y mantener peso deseable |

Indicar siempre algún patrón dietario de dieta saludable que incluya fruta fresca, verduras, legumbres, frutos secos, aceites saludables, pescado y lácteos descremados.

Fuente: Adaptado desde (MINSAL, 2018).

1.6.1.1. Dieta baja en grasas

La modificación en el estilo de vida, como se ha mencionado, es la primera y, por así decirlo, la más importante recomendación que se le entrega al paciente cuando es diagnosticado con hipercolesterolemia. Modificar tanto el estilo de vida como hacer cambios a nivel de la dieta son dos estrategias que permiten de forma certera el modificar los factores de riesgo de forma drástica, así como disminuir los riesgos de las ECV. En base a esto, seguir dietas saludables resulta un paso importante para tratar a las ECV (Chawla et al., 2020). La AHA (*American Heart Association*) recomienda seguir dietas que incorporen vegetales, frutas, frutos secos y pescado para reducir los RCV (Horn et al., 2016).

La dieta que ha sido recomendada con mayor frecuencia corresponde la dieta baja en grasas, la cual incorpora el 30% o menos de las calorías obtenidas desde las grasas. Por lo general, se incluyen alimentos como verduras, frutas, cereales integrales, la clara del huevo, pechuga de pollo, mariscos y lácteos bajos en grasas, entre otros (Bhandari P, 2022). Usualmente el 20 – 30% de la energía proviene de las grasas, esto se refiere a una ingesta calórica de 1000 – 1500 kcal/día, la cual proviene de grasas y tiene la ventaja de que existe una amplia gama de opciones respecto a los alimentos que se pueden elegir, teniendo como énfasis en esta dieta el control y moderación de las porciones (Raynor & Wing, 2005).

1.6.1.2. Dieta mediterránea

Otra de las dietas que suele ser recomendada es la dieta mediterránea (MedDiet), la cual tradicionalmente cuenta con alimentos como frutas, vegetales, cereales, papas, frutos secos y semillas, alimentos mínimamente procesados, aceite de oliva, huevos, pescado, entre otros, siendo saludables y observándose un efecto sobre mejorar los factores de riesgo de las ECV (Guasch-Ferré & Willett, 2021). Dentro de algunos componentes claves dentro de la MedDiet están el consumo moderado de vino tinto y el consumo de aceite de oliva, puesto que el primero contine varios polifenoles bioactivos a quienes se les atribuyen propiedades antiinflamatorias y además al aceite de oliva se le ha atribuido propiedades antiaterogénicas, debido a que contiene alto nivel de AGMI y polifenoles bioactivos, pero solo presentes en el aceite de oliva extra virgen, atribuyéndole propiedades cardioprotectoras (Martínez-González et al., 2019).

Se destacan diversas formas en las que la MedDiet puede contribuir, dentro de los cuales está su efecto hipolipemiante, protección frente al estrés oxidativo, inflamación y agregación plaquetaria, modificación de hormonas y factores de crecimiento envueltos en la patogenia del cáncer, inhibición de vías de detección de nutrientes mediante restricción de aminoácidos específicos y producción de metabolitos mediado por microbiota intestinal influyentes en la salud metabólica (Tosti et al., 2018).

1.6.2. Tratamiento farmacológico

Las alternativas existentes para el tratamiento del paciente hipercolesterolémico va a depender de su estado de salud. Como se mencionaba, la primera opción será el tratamiento no farmacológico, pero cuando éste ya no es efectivo, se hace necesaria la intervención de algún fármaco que permite regular estos niveles de lípidos en sangre (MINSAL, 2018).

Dentro de las opciones farmacológicas (**Tabla 1-8**), las estatinas como inhibidores competitivos de la HMG-CoA reductasa son los fármacos iniciales entregados para el tratamiento de la hipercolesterolemia. Su efecto sobre la biosíntesis hepática de colesterol y expresión del LDLR permite disminuir los niveles plasmáticos de c-LDL. También se ha descrito un aporte a la estabilidad de la placa ateromatosa, mejorando la disfunción endotelial. Rosuvastatina y atorvastatina son las más potentes, capaces de reducir en > 50% el c-LDL cuando son usadas en dosis altas. El rango de dosis para rosuvastatina va entre los 10 – 40 mg y para atorvastatina es de 10 – 80 mg, donde la recomendación del horario de administración es “a cualquier hora” (“Guía de Tratamiento Farmacológico de Dislipidemias para el primer nivel de atención.” 2013; MINSAL, 2018; Moráis López et al., 2009).

También se recomienda el uso de resinas que permiten la fijación de ácidos biliares, reduciendo así su reabsorción. Lo anterior permite incrementar la

producción de ácidos biliares y así disminuir el contenido de colesterol en el interior de los hepatocitos. Estos ácidos biliares participan como moduladores de cascadas de señalización intracelular lentas involucradas en inmunidad, apoptosis y carcinogénesis. Las resinas como la colestipol, colestiramina y colesevelam suelen ser recomendadas como medicamentos de segunda línea para la reducción de colesterol luego de las estatinas. Su dosis suele ser de 4 g de colestiramina o 5 g de colestipol con variación en el número de dosis diarias. Tienen una eficacia de reducir el c-LDL en un 18 – 25%, sin influir sobre el c-HDL. (Ahangari et al., 2018; Lazarte & Hegele, 2020; MINSAL, 2018; Moráis López et al., 2009).

La ezetimibe es un inhibidor selectivo de la absorción intestinal, bloqueando específicamente al transportador de colesterol NPC1L1 (Proteína 1 Niemann-Pick C1). Afecta la absorción del colesterol dietético como al colesterol contenido en la secreción biliar. Su dosis es de 10 mg/día con o sin alimentos y puede administrarse en combinación con estatina para incrementar su efecto, pero no con resinas. La ezetimibe es un medicamento de primera y segunda línea frente a la prevención de ECV y puede ser usada como monoterapia en pacientes intolerantes a las estatinas. Su eficacia como monoterapia es de un 15 – 22% de reducción de c-LDL y en combinación con estatinas, adiciona una eficacia de 15 – 20% (Ahangari et al., 2018; "Guía de Tratamiento Farmacológico de Dislipidemias para el primer nivel de atención," 2013; MINSAL, 2018; Moráis López et al., 2009).

Otra opción, de las más actuales, son el uso de los inhibidores de la PCSK-9 (*Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type 9*), quien participa en el metabolismo del LDLR. El desarrollo de anticuerpos monoclonales capaces de unirse a esta proteasa en plasma, permiten la inhibición de su función y evitan la degradación intracelular de los LDLR, aumentando la captación de LDL desde la sangre. Según lo dictaminado por el Instituto de Salud Pública de Chile (ISP), la dosis para Sybrava™ es de 284 mg en una sola inyección subcutánea, esto al inicio, luego a los 3 meses y después cada 6 meses. Respecto a su eficacia, los inhibidores de la PCSK-9 logran reducir entre un 50 – 70% los niveles de c-LDL tras 12 semanas de tratamiento en combinación con estatina y reducen significativamente el RCV en un 15% (Ahangari et al., 2018; ISP, 2021; Lazarte & Hegele, 2020; MINSAL, 2018).

Tabla 1-8. Dosis de medicamentos para tratar la hipercolesterolemia.

| Fármaco | Dosis | Eficacia |
|--------------------|---|-----------------|
| Estatinas | 10 – 40 mg (rosuvastatina) o 10 – 80 mg (atorvastatina) | > 50 % |
| Resinas | 4 g (colestiramina) o 5 g (colestipol) | 18 – 25% |
| Ezetimibe | 10 mg | 15 – 22% |
| Inhibidores PCSK-9 | 284 mg (Sybrava™) | 50 – 70% |

Fuente: Confeccionado desde (Ahangari et al., 2018; "Guía de Tratamiento Farmacológico de Dislipidemias para el primer nivel de atención.," 2013; ISP, 2021; Lazarte & Hegele, 2020; MINSAL, 2018; Moráis López et al., 2009).

1.7. *Gevuina avellana* Molina

Los frutos secos corresponden a un conjunto de alimentos a los que se les han atribuido propiedades antioxidantes y su consumo se ha asociado con una disminución del RCV frente a padecer una ECV, asociando estos efectos beneficiosos con la composición de estos frutos secos. Su composición consta de AGMI entre un 40 – 60% y AGS en un 7%, también se incluyen fibras, potasio, magnesio, cobre, vitamina E y arginina (De Lira-García et al., 2012).

Diversos frutos secos y semillas se hacen relevantes para el consumo humano, dentro de ellas se encuentran el coco (*Cocos nucífera* L.), maní (*Arachis hipogea* L.) y especies templadas como avellana (*Corylus avellana* L.), nuez (*Juglans* spp.) y almendras (*Prunus anygdalus* var. *Dulcis* Koehne) (Mercanligil et al., 2007)

La avellana chilena (*Gevuina avellana* Molina) es la representante más austral de la familia *Proteceae* en conjunto con la nuez macadamia (*Macadamia integrifolia* Maiden & Betche y *M. tetraphylla* L.A.S. Johnson). La recolección de la avellana chilena se remonta a la época prehispánica y se obtiene de árboles que se encuentran cercanos a la Cordillera de la Costa, soliendo ser recolectadas entre los meses de marzo y abril, con el objetivo de ser almacenada para las épocas de invierno, donde son descascaradas y tostadas antes del consumo. La avellana chilena cuenta con una composición rica en

ácidos grasos insaturados (AGI) que está por sobre la de AGS, habiendo mayor nivel de AGMI, por otro lado, también se encuentran ácidos grasos solubles, bioactivos como tocoferoles y fitoesteroles, vitamina E, minerales esenciales como el selenio, aminoácidos esenciales, antioxidantes fenólicos como ácido cafeico, fibras dietéticas solubles, bioactivos y fitoquímicos (**Tabla 1-9**) (Mercanligil et al., 2007; Pino Ramos et al., 2019).

Tabla 1-9. Rango de composición de ácidos grasos de *G. avellana* en sus diversos orígenes de producción.

| Composición | Proporción |
|---------------------|--|
| AGS totales | 10,4 ± 9,9 – 64,4 ± 11,2 g/L |
| AGMI totales | 598,7 ± 54,1 – 800,6 ± 74,0 g/L |
| AGPI totales | 42,0 ± 3,8 – 70,4 ± 6,4 g/L |
| Polifenoles totales | 1,6 ± 0,0 – 8,7 ± 0,1 g de ácido gálico equivalente/ 100 g de extracto enriquecido con polifenoles |

Fuente: Confeccionada desde (*Pino Ramos et al., 2019*)

1.8. Actualidad de hipercolesterolemia e intervención nutricional con avellana

En literatura se han evidenciado diversos estudios donde se ha observado una mejora en el perfil lipídico de sujetos hipercolesterolémicos que han mantenido un consumo de avellanas en determinados periodos de tiempo. Respecto a ésto, dentro de los estudios relevantes se encuentra uno que incluyó a 15 sujetos hipercolesterolémicos entre 22 y 59 años de la Universidad de Hacettepe en Turquía, el cual consistió en un estudio control de 2 periodos, uno de 4 semanas con una dieta control y luego 4 semanas con una dieta enriquecida con avellana. Los resultados evidenciaron reducción en variables antropométricas como el índice de masa corporal (IMC) y el porcentaje masa grasa (%masa grasa) que son significativos en el periodo de dieta enriquecida con avellanas en comparación con el control. En el perfil lipídico hubo una disminución de c-VLDL, TG y Apo B en un 29,5%, 31,8% y 9,2%, respectivamente, además de un aumento del 12,6% de c-HDL cuando hay una comparación entre la intervención con avellana y el control. Cabe resaltar que dentro de los resultados no se evidenció un cambio significativo en el c-LDL (3,3%), concluyendo que el consumo de una dieta enriquecida con avellana si modifica favorablemente al colesterol plasmático y el perfil de lipoproteínas a pesar de incrementar el contenido graso de la dieta (Mercanligil et al., 2007).

Un estudio controlado aleatorizado evaluó el cambio resultante del perfil lipídico por medio de una intervención dietética enriquecida con avellana, donde participaron 21 sujetos entre 34 y 54 años que duró 12 semanas. Este estudio fue dividido en 3 periodos, 4 semanas correspondientes al periodo control, luego 4 semanas que incluyó la intervención con avellana y finalmente 4 semanas de control nuevamente. En sus resultados observaron cambios significativos en IMC y %masa grasa, además de una disminución de CT, c-LDL, TG y relación Apo B/Apo AI, así como aumentos en c-HDL y Apo AI. También evaluaron los niveles de ox-LDL, encontrando una disminución de esta, además de un aumento en la vitamina E. La conclusión de este estudio es que las dietas enriquecidas con avellanas pueden servir como una herramienta antiaterogénica debido a que mejora la función endotelial, disminuye la oxidación de la LDL y marcadores inflamatorios, sumado al efecto que ejercen en el perfil lipídico y lipoproteínas, además, indican que este beneficio puede ser reversible en un periodo de 4 semanas (Orem et al., 2013).

Dentro de las intervenciones dietéticas más recientes registradas respecto al uso de avellanas como suplemento dietario, se encuentra un estudio controlado aleatorizado de 8 semanas donde se incluyeron un total de 60 niños, niñas y adolescentes (NNA) entre 6,7 y 17,5 años que fueron diagnosticados con hipercolesterolemia familiar, hiperlipidemia familiar combinada e hipercolesterolemia poligénica, reclutados desde el departamento de ciencias de la salud y pediatría de la Universidad de Turín, Italia. Sus resultados indicaron

que hay una reducción de c-LDL al suplementar la dieta con avellana en el caso de la hiperlipidemia primaria, especificando que esto ocurría en aquellos que consumían la avellana con piel, además aumentaba el ratio de c-HDL/c-LDL en el mismo caso de la avellana con piel (Deon et al., 2018).

En cuanto a atribuciones favorables en la disminución del estrés oxidativo e inflamación al consumir avellana como suplemento de un régimen dietario, se ha evidenciado en un estudio clínico prospectivo realizado en Roma, donde fueron incluidas 30 personas saludables reclutadas desde el departamento de biomedicina y prevención de la Universidad de Roma Tor Vergata. Estas personas siguieron una dieta suplementada con avellanas (40 g/día) durante 6 semanas y se evaluó el estado nutricional, oxidativo y estado inflamatorio de cada participante. En sus resultados se informó una disminución de CT, c-LDL y del ratio CT/c-HDL, además existe un proceso de regulación en la expresión de las enzimas con mayor capacidad antioxidante (CAT y SOD) e incluso un aumento en la expresión de PPAR γ (Receptor gamma Activado por el Proliferador de Peroxisomas) como marcador antiinflamatorio. Di Renzo et al. concluyen que se ha demostrado que las avellanas son capaces de reducir el RCV/riesgo aterogénico y de inflamación, pero sigue siendo una interrogante el mecanismo o las razones que indiquen claramente por qué se genera este efecto. De igual forma, aluden a que su estudio incluye un muestreo mínimo y con ello no se evidencia claramente el efecto real de la avellana (Di Renzo et al., 2019).

Múltiples estudios han indicado cuáles son los posibles efectos e incluso evidenciado estos mismos, sobre el perfil lipídico, estrés oxidativo e inflamación. De hecho, uno de los estudios recientemente publicados efectúa un metaanálisis de estudios realizados con intervención en la dieta suplementada con avellana y en él se indica que hay una evidencia en la mejora de algunos factores de riesgo cardiometabólicos como el c-LDL y CT, pero que existen limitaciones que dificultan la interpretación de estos resultados. Lo mismo ocurre para el caso de la mejora en cuanto a biomarcadores antioxidantes y antiinflamatorios, existiendo un aumento en la expresión de genes de este tipo y un mejoramiento en el estrés oxidativo e inflamación. Por otro lado, hay evidencia de que la dieta suplementada con avellanas no afecta el peso ni la composición corporal de forma negativa. Ningún estudio reporta resultados adversos y eso indica que realizar una dieta que sea suplementada con avellanas no mantendría efectos negativos y mencionan que son dietas capaces de perdurar con resultados alcanzables y sostenibles en el tiempo (Brown et al., 2022).

La literatura de base utilizada, en la cual se describe un efecto protector a partir de dietas que incorporan frutos secos, específicamente avellana, y con lo cual han logrado evidenciar una reducción en los niveles de CT y c-LDL, así como generar efectos benéficos en el funcionamiento de los sistemas antioxidantes y antiinflamatorios, permiten resaltar lo interesante e importante de estudiar el impacto del consumo de avellana en sujetos con hipercolesterolemia. Por lo

anterior, se realizó una intervención intensiva de 6 meses que consistió en una dieta chilena suplementada con avellana chilena *versus* una dieta baja en grasas en sujetos con hipercolesterolemia sin tratamiento farmacológico, a los cuales se les extrajo una muestra de sangre pre y post intervención. Se determinó el perfil lipídico y hemograma de estos sujetos, así como también se aislaron las PBMC de cada sujeto. Estas últimas fueron sometidas a análisis de actividad enzimática de enzimas antioxidantes (SOD, CAT y GRd), así como un análisis en su expresión génica mediante RT-qPCR para SOD y GRd (pre intervención), también se evaluó la producción de ROS, medición de daño oxidativo en lípidos mediante la determinación de MDA, la expresión de IL-10 como citoquina antiinflamatoria y TNF- α como citoquina proinflamatoria en PBMC mediante RT-qPCR (pre intervención) y medición del daño oxidativo y nitrosativo en proteínas mediante la cuantificación de carbonilos y nitrotirosina por medio de DOT-BLOT.

1.9. Problema de investigación

No existen estudios que asocien el efecto beneficioso de la *Gevuina avellana* en células mononucleares de sangre periférica y en el perfil lipídico de población adulta chilena con hipercolesterolemia no tratada farmacológicamente.

1.10. Pregunta de investigación

¿Qué diferencias existen en los marcadores de estrés oxidativo e inflamación de células mononucleares de sangre periférica y del perfil lipídico en población adulta chilena con hipercolesterolemia no tratada farmacológicamente sometido a una dieta chilena durante 6 meses suplementada con *Gevuina avellana* versus otra baja en grasas?

1.11. Hipótesis

Los marcadores de estrés oxidativo e inflamación en células mononucleares de sangre periférica y del perfil lipídico mejoran significativamente en sujetos con hipercolesterolemia que siguen una dieta chilena suplementada con *Gevuina avellana* en comparación con sujetos que siguen una dieta baja en grasas.

1.12. Objetivos

1.12.1. Objetivo principal

Comparar los cambios de marcadores de estrés oxidativo e inflamación en células mononucleares de sangre periférica y del perfil lipídico en población adulta chilena con hipercolesterolemia no tratada farmacológicamente sometidos a una dieta chilena suplementada con *Gevuina avellana* versus una dieta baja en grasas.

1.12.2. Objetivos específicos

- I. Analizar marcadores de estrés oxidativo y capacidad antioxidante en células mononucleares de sangre periférica pre y post intervención.
- II. Determinar la expresión de genes de inflamación en células mononucleares de sangre periférica pre intervención.
- III. Determinar el perfil lipídico en población adulta chilena con hipercolesterolemia no tratada farmacológicamente pre y post intervención.

- IV. Comparar los marcadores de estrés oxidativo en células mononucleares de sangre periférica y el perfil lipídico de población adulta chilena no tratada farmacológicamente pre y post intervención.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Diseño de estudio

Estudio experimental aleatorizado mediante una intervención nutricional en un periodo de 6 meses donde se formaron dos grupos, el experimental correspondiente a la dieta chilena alta en grasas suplementada con avellana chilena y el control definido por una dieta baja en grasas. Orientado para adultos/as entre 18 y 60 años. La aleatorización fue realizada en bloques asegurando una distribución por sexo. El reclutamiento de participantes se realizó mediante la difusión de un afiche digital y físico donde se invitó a la participación voluntaria. Se envió a todos los funcionarios/as y estudiantes de la Universidad de Concepción mediante correo institucional y se realizó difusión por redes sociales. Se realizó difusión en diversas asociaciones como compañías de bomberos, carabineros y centros de salud. Los participantes completaron un formulario online donde ingresaron datos de nombre, correo electrónico y número de teléfono. Se les citó en dependencias del Laboratorio Clínico PreveGen en la ciudad de Concepción, cumpliendo los requisitos de toma de muestra capilar y bioimpedancia mencionados posteriormente. El tiempo del reclutamiento fue de 3 semanas.

Dentro de los criterios de inclusión se contempló que fuesen mujeres y hombres de entre 18 y 60 años (n=100), con colesterol total (CT) sanguíneo esporádico elevado (> 200 mg/dL) y que presentaran su pase de movilidad habilitado respecto a la campaña de vacunación frente al SARS-CoV-2. Respecto a los criterios de exclusión, los participantes no podían participar si estaban bajo tratamiento médico asociado a hipercolesterolemia, presentaran enfermedades sistémicas como diabetes, hipertensión, enfermedad renal o hepática, embarazadas, en periodo de lactancia, que un miembro de su hogar o familiar directo hubiese sido previamente reclutado, presentar alergias a los frutos secos, tener implante electrónico como marcapasos, que no contaran con acceso a internet móvil o wifi dentro de su domicilio y/o que no contaran con los conocimientos o el apoyo necesario para hacer uso de plataformas digitales.

Los/as participantes que avanzaron a la siguiente etapa fueron aquellos que luego de la muestra capilar presentaron un CT > 200 mg/dL. Se dispusieron dos grupos que debían cumplir con los criterios de inclusión y firmar el consentimiento informado al momento del reclutamiento (**Anexo 7.1**). Los grupos se definieron según la característica de la intervención nutricional, al grupo experimental se le asignó el nombre de “grupo avellana” y al grupo control se le denominó como “grupo control” (**Figura 2-1**).

El grupo avellana siguió una dieta chilena (adaptada desde la MedDiet con productos chilenos (**Tabla 2-1**)) la cual fue suplementada con 30 g/día de avellana chilena durante los seis meses de intervención nutricional, además de

actividades de seguimiento nutricional de forma gratuita. La dieta chilena incorporó un mayor contenido de grasas de tipo AGM y AGPI, además de fibra dietaria, micronutrientes como potasio y magnesio y polifenoles aportados desde la avellana chilena. Por otro lado, el grupo control basó su dieta en lo dispuesto por la norma técnica de dislipidemia del MINSAL. Se elaboró junto al/la participante un plan de alimentación que incluyó en la medida de lo posible los alimentos que consume habitualmente, que estuvieran disponibles localmente y que fueran económicamente accesibles. Se mantuvo actividades de seguimiento nutricional con el objetivo de adoptar un patrón dietario de una dieta baja en grasas (calorías a partir de las grasas fue menor al 30% de la energía total, basado en GMI y GPI preferentemente (**Tabla 2-2**) (Estruch et al., 2013; MINSAL, 2018)).

Todos los procedimientos del estudio se realizaron bajos los estándares éticos establecidos en la Declaración de Helsinki de 1975, revisada en 1983. Observa los principios rectores de la Universidad de Concepción, los cuales están delineados en la Declaración de Singapur sobre la Integridad en la Investigación (2010), según Resolución Exenta N°157 del 24 de enero del 2013, de la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica – CONICYT, adoptados por la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo – ANID del Ministerio de Ciencia, Tecnología, Conocimiento e Innovación del Gobierno de Chile (lo anterior certificado por el Comité de Ética, Bioética y Bioseguridad de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo de la Universidad de Concepción,

CEBB 530-2019-M). Los participantes del proyecto de intervención nutricional PRODICHI (Proyecto de Dieta Chilena), debieron firmar el respectivo consentimiento informado, aprobado por parte del Comité Ético Científico del Servicio de Salud de Concepción.

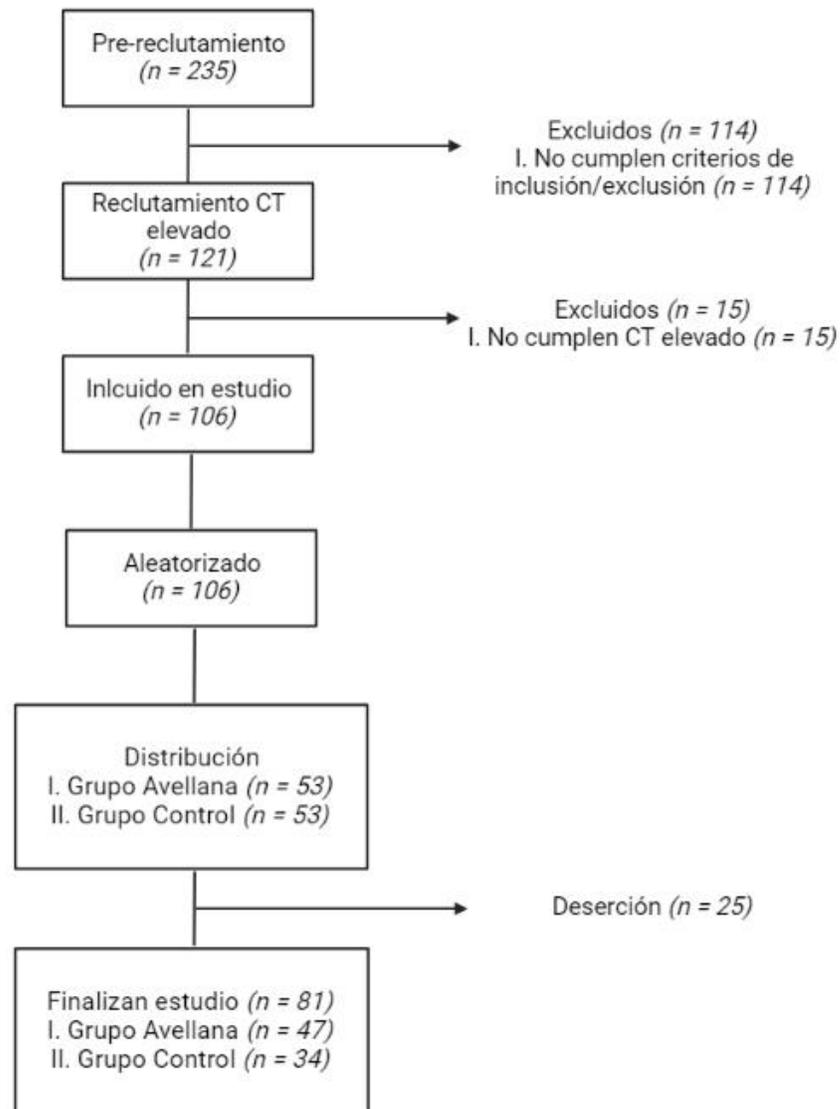


Figura 2-1. Representación en diagrama de flujo del reclutamiento de las/os participantes del estudio.

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 2-1. Características nutricionales del grupo avellana.

| | |
|------------------------|---|
| Calorías | Según gasto energético basal y factores de actividad física |
| Grasa total | 40 % del total de la energía |
| Colesterol | <300 mg/día |
| Proteínas | 13 % del total de energía |
| Carbohidratos | 40 – 45 % del total |
| Sodio | <2,4 g/día |
| Azúcares | <10 % calorías totales |
| Fibra dietética | 30 – 35 g/día |
| Agua | >2 litros diarios |

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 2-2. Resumen tratamiento nutricional para la hipercolesterolemia, características nutricionales grupo control.

| | |
|------------------------|--|
| Calorías | Según gasto energético basal y factores de actividad |
| Grasa total | <30 % del total de la energía |
| Colesterol | <300 mg/día |
| Proteínas | 15 % del total de energía |
| Carbohidratos | 45 – 55 % del total |
| Sodio | <2,4 g/día |
| Azúcares | <10 % calorías totales |
| Fibra dietética | 20 – 35 g/día (10 a 25 g soluble) |
| Agua | >2 litros diarios |

Fuente: Confeccionado desde (MINSAL, 2018).

2.1.1. Tamaño muestral

Según Perna, Perna et al. (Perna et al., 2016), donde se revisaron nueve ensayos clínicos teniendo 425 participantes, sobre el consumo de avellanas y lípidos en sangre, existen distintos diseños de estudios que se basan en una dieta de 30 – 86 g/día de avellanas y la duración de estos iban desde los 28 – 84 días (repitiéndose más veces 56 y 84 días). El tamaño muestral de estos estudios van de 15 a 107 participantes. Dentro de estos, la base para el cálculo de la muestra fue el estudio de Tey, et al. (2013), donde realizaron dos estudios paralelos controlados aleatorizados de 84 días con 35 participantes aproximadamente por grupo intervenido y 30 – 60 g/día de suplemento de avellana. Determinaron el tamaño muestral asumiendo una detección de 0,32 mmol/L o más de CT, asumiendo una desviación estándar (SD, *Standard Deviation*) de 0,70 y una correlación entre las mediciones de referencia y de seguimiento de 0,80. Se tenía en cuenta una tasa deserción del 20%, en base a esto, necesitamos reclutar aproximadamente 50 participantes por grupo, dando un total de 100 participantes totales (Tey et al., 2013). Este dato de participantes está relacionado con datos propios obtenidos a través de intervenciones nutricionales realizadas en sujetos con dislipidemia donde se puede observar una reducción en el CT.

2.2. Variables biosociodemográficas y antropométricas

La aplicación de encuestas y medición de variables antropométricas fue realizada por profesionales nutricionistas capacitadas y siguiendo protocolos estandarizados (Cardozo et al., 2016; Ramón et al., 2009). La recomendación indicada a los/as participantes fue mantener un ayuno de por lo menos 8 H, no haber bebido líquidos 2 H antes de la toma de muestra y no haber realizado actividad física intensa durante las 48 H previas a la visita de elegibilidad (Martorell et al., 2015).

Se aplicó una encuesta de caracterización biosociodemográfica (**Anexo 7.2**), que incluyó variables de sexo, edad y nivel educacional.

Dentro de las variables antropométricas medidas estaban el peso corporal que fue determinado mediante una balanza marca Tanita modelo RBF 300 A, la estatura por medio de un tallímetro portátil marca Seca modelo 213, se realizó el cálculo del IMC (kg/m^2), la medición de circunferencia de cintura (CC) se realizó mediante una cinta métrica inextensible graduada en centímetros marca Seca modelo 20 y la clasificación del porcentaje (%) de grasa corporal por medio de impedancia bioeléctrica usando la balanza Tanita modelo TDF 300.

2.3. Obtención muestra sanguínea

La obtención de la muestra sanguínea fue ejecutada por parte de una profesional de enfermería y la recomendación indicada a los/as participantes fue mantener un ayuno mínimo de 8 H, no haber bebido líquidos 2 H antes de la toma de muestra y no haber realizado actividad física intensa durante las 48 H previas a la visita de elegibilidad (Martorell et al., 2015).

Se realizó una medición capilar de CT usando el dispositivo Accutrend plus para realizar un screening y seleccionar aquellos/as que tenían el CT elevado, donde sólo ellos pasaron a la siguiente etapa. A cada participante que tenía el CT elevado, se les extrajo 40 mL de sangre, manteniendo las muestras frías en hielo luego de su extracción. Las muestras fueron recolectadas en tubos vacutainer de color lila que contenían anticoagulante EDTA (ácido etilendiaminotetraacético).

2.4. Perfil lipídico sérico y hemograma

El Laboratorio Clínico PreveGen realizó para cada muestra la determinación de un hemograma completo mediante un contador hematológico automatizado (Analizador Hematológico DF 52 (DYMIND)) y una medición del perfil lipídico que incluyó CT, c-HDL y TG mediante colorimetría (Bioassays 240 Plus, Snibe).

Para la estimación de c-LDL se utilizó la fórmula de Friedewald (Friedewald et al., 1972).

2.5. Aislamiento de PBMC (células mononucleares de sangre periférica) desde muestra sanguínea

Para la obtención de las PBMCs, se usó una adaptación del método descrito por Boyum, A. (Boyum, 1964). En un tubo falcon de 50 mL se añadieron 12 mL de Ficoll (*Ficoll Paque Plus*), luego se agregaron 18 mL de sangre de forma lenta escurriendo por la pared del tubo sobre el Ficoll. Se realizó una centrifugación a 900 g/2200 rpm por 30 min a temperatura ambiente, con aceleración y desaceleración lenta. Se obtuvo el anillo de PBMCs, se extrajo mediante uso de pipeta Pasteur y se añadió a un nuevo tubo falcon de 50 mL. Se agregó PBS (8,0 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 0,923 Na₂HPO₄ y 0,2 g KH₂PO₄ en 1 L de agua destilada, ajustando pH a 7,4) hasta completar el tubo. Se centrifugó nuevamente a 900 g/2200 rpm por 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 18 mL de PBS. Este volumen se distribuyó en 3 partes, los primeros 6 mL de PBMC fueron añadidos a un tubo falcon de 15 mL, destinado a resuspensión con trizol (*TRI Reagent*[®]), otros 6 mL se agregaron a tubo falcon de 15 mL para ser resuspendido en agua destilada.

Los 6 mL faltantes se mantuvieron en el tubo falcon de 50 mL para ser resuspendidos en RIPA.

2.6. Determinación de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en PBMC (células mononucleares de sangre periférica)

Desde la muestra de 6 mL destinada a resuspensión con agua destilada se extrajo, para cada muestra, una alícuota de 150 μ L para realizar la determinación de ROS por triplicado. Se recogieron 50 μ L de PBMC y fue añadida al pocillo respectivo de la microplaca de 96 pocillos UV para fluorescencia. La determinación de la producción de ROS se realizó utilizando tres activadores diferentes de los cuales se tuvo ZA 1 mg/mL (*1 mg/mL de PBS*), también LPS de *E. coli* 100 μ g/mL (*1 mg/mL en PBS, dilución 1/10*) y finalmente PMA 10 ng/mL (*1 mg/mL en DMSO, dilución 1/100000*), añadiendo 50 μ L de cada uno. Finalmente se añadió la sonda fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DF) 30 μ L/mL (*1 mg/mL en etanol, dilución 30 μ L/mL de medio de Hanks*). La lectura se realizó en fluorímetro Biotek Synergy 2 mediante software Gen5 a una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 540 nm. Se determinó la pendiente máxima de cada curva de cinética (Capó et al., 2015).

2.7. Determinación de la actividad enzimática de enzimas antioxidantes en PBMC (células mononucleares de sangre periférica)

Los 6 mL destinados a resuspensión con agua para determinar actividad enzimática fueron centrifugados a 900 g/2200 rpm por 10 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante y resuspendió en 2 mL de agua destilada. Muestras fueron sonicadas a 50 – 60 Hz por 30 minutos, finalmente se resuspendió el pellet y se alicuotó 1 mL en cada tubo eppendorf. Fueron almacenadas a – 80 °C. La actividades enzimáticas fueron determinadas en equipo Biotek Synergy 2 mediante software Gen5. Se determinó la pendiente máxima de cada curva de cinética.

2.7.1. Determinación actividad enzimática de superóxido dismutasa (SOD) en PBMC (células mononucleares de sangre periférica)

En cada pocillo de la microplaca de 96 pocillos de plástico, se añadió 136 µL de la mezcla de Buffer potásico, xantina y citocromo C (*10 mL de xantina (0,076 g de xantina en 100 mL de NaOH 0,01 M), 100 mL de citocromo C (0,248 g de citocromo C en 100 mL de buffer potásico 50 mM, EDTA 0,1 mM pH 7,8 (7,938 g K_2HPO_4 , 0,68 g KH_2PO_4 y 0,37 g EDTA en 1 L de agua destilada))*). Se

incorporaron 10 μL de PBMC. Finalmente se añadieron 5 μL de xantina oxidasa (2 μL de xantina oxidasa en 100 μL de buffer potásico). La lectura se realizó a una longitud de onda de 550 nm. (Flohe, 1984).

2.7.2. Determinación actividad enzimática de catalasa (CAT) en PBMC (células mononucleares de sangre periférica)

En cada pocillo de microplaca de 96 pocillos de cuarzo, se añadió 100 μL de Buffer fosfato (4,26 g Na_2HPO_4 , se añade 1 L de agua destilada, pH 7,0). Se adicionó 1 μL de PBMC. Finalmente se agregaron 50 μL de H_2O_2 30 mM (340 μL de H_2O_2 X% en 100 mL de buffer fosfato). Previo a la lectura se realizó una incubación durante 3 min a 37 °C en oscuridad. La lectura se realizó a una longitud de onda de 260 nm (Aebi, 1984).

2.7.3. Determinación actividad enzimática de glutatión reductasa (GRd) en PBMC (células mononucleares de sangre periférica)

En cada pocillo de microplaca de 96 pocillos de plástico, se añadió 138 μL de Buffer fosfato 200 mM, EDTA 1 mM, pH 7,0 (17,08 g Na_2HPO_4 , 11,36 g NaH_2PO_4 , 0,37 g EDTA en 1 L de agua destilada, pH 7,0). Se agregaron 5 μL de

GSSG 65,3 mM (*0,04 g GSSG en 1 mL de agua destilada*). Se añadieron 5 μ L de PBMC. Finalmente se incorporaron 2,5 μ L de NADPH (*0,04 g NADPH en 1 mL de buffer fosfato*). La lectura se realizó a una longitud de onda de 339 nm (Goldberg, 1984).

2.8. Cuantificación de MDA (malondialdehído) como marcador de daño oxidativo y nitrosativo en lípidos en PBMC (células mononucleares de sangre periférica)

En tubo eppendorf se añadieron 650 μ L de reactivo 1 (*63,9 mg de 1-metil-2-fenilindol en 30 mL de acetonitrilo, luego diluido en razón 1:3 con metanol 100%; 10 mL de metanol 100% + 30 mL de reactivo 1*). Se añadieron 200 μ L de PBMC resuspendidas en agua destilada. Se realizó vórtex por 3 – 4 s y se añadieron 150 μ L de HCl 12 N bajo campana, luego se aplicó un vórtex. Se realizó incubación por 3 H a 45°C y se enfrió en hielo por 10 min. Se centrifugó a 15000 g por 10 min y se alicuotó 200 μ L de sobrenadante en la microplaca de 96 pocillos para la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 568 nm. Se confeccionó una curva patrón de concentraciones 0 μ M, 5,0 μ M, 10,0 μ M y 15,0 μ M para la cuantificación de MDA en muestras de PBMC (Capó et al., 2015).

2.9. Determinación del daño oxidativo y nitrosativo de proteínas en PBMC (células mononucleares de sangre periférica) mediante DOT-BLOT

Los 6 mL de muestra de PBMC fueron centrifugados a 900 g/2200 rpm para luego descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 400 µL de RIPA (1X) (*RIPA (5X): 12,5 mL buffer Tris/HCl 1 M, pH 8,0, 2,2 g NaCl, 2,5 g IGEPAL, 1,25 g ácido deoxicólico, 2,5 mL SDS 10% (0,3 g en 3 mL agua destilada), enrasar a 50 mL agua destilada*) y finalmente fueron alicuotadas en eppendorf. Para la determinación de daño oxidativo y nitrosativo, se determinó la concentración de proteínas mediante el método de Pierce (*Pierce BCA Protein assay kit, Thermofisher*).

2.9.1. Determinación de carbonilos en proteínas de PBMC (células mononucleares de sangre periférica) mediante DOT-BLOT

Se utilizó el kit basado en un método de inmunoensayo *OxiSelect™ Protein Carbonyl Immunoblot Kit (Cell Biolabs, INC)* para carbonilos. Se hizo uso de una membrana PVDF que fue activada en metanol 100% por 15 s, luego sumergida en agua destilada por 15 minutos y montada en sistema de DOT – BLOT HYBRI-SLOT™ MANIFOLD (Life Technologies, INC). Se añadieron 10 µg de

proteínas de cada muestra, se realizó succión con sistema de vacío, se añadió 50 μ L de agua destilada y se volvió a realizar succión con sistema de vacío. Se realizó proceso de derivatización con 20 mL de TBS 20% metanol (3,2 mL TBS (5x), 12,8 mL agua destilada y 4 mL metanol 100%) por 10 minutos, luego se lavó la membrana con 20 mL de HCl 2N por 5 minutos. Membrana fue incubada con 20 mL de DNPH (1x) disuelto en HCl 2N (2 mL DNPH (10x) en 18 mL de HCl 2N) por 5 minutos. Se realizaron 7 lavados de membrana con 20 mL de HCl 2N cada uno por 5 minutos y finalmente se lavó la membrana 5 veces con 20 mL de metanol:agua destilada (50:50) cada uno por 5 minutos. El bloqueo de la membrana se realizó con 45 mL de TBS-T 5% leche en polvo toda la noche (TBS: 24 g Tris, 88 g NaCl en 900 mL de agua destilada, ajustar pH a 7,6 y llevar a 1 L (solución 10X); TBS-T 1X: 200 mL TBS (5X), 1 g o 900 μ L Tween y aforar a 1 L de agua destilada; TBS-T 5% leche en polvo: 2,25 g leche en polvo, 45 mL TBS-T 1X). Se realizó lavado 6 veces con 20 mL de TBS-T por cada lavado y luego se realizó incubación de la membrana con anticuerpo primario (Ac 1°) anti-DNP de conejo diluido 1:4000 al 5% BSA y 0,005% NaN₃ por 2 H (30 mL TBS-T, 1,5 g BSA, 15 mg NaN₃ y 7,5 μ L Ac 1°). Se realizaron 6 lavados con 20 mL de TBS-T cada uno por 5 minutos. Se realizó incubación con anticuerpo secundario (Ac 2°) anti-conejo–HRP (*Horsedarish peroxidase*) diluido 1:10000 5% leche en polvo por 1 H (40 mL TBS-T, 2,0 g leche en polvo y 4 μ L Ac 2°). Se realizaron 6 lavados con 20 mL de TBS-T por 5 min cada uno. Finalmente, el revelado se realizó con luminol (1 mL peroxidasa + 1 mL luminol,

SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate, ThermoScientific) por 5 min en oscuridad y luego fue leído en equipo C-DiGit® Blot Scanner con software Image Studio™ Lite.

2.9.2. Determinación de nitrotirosina en proteínas de PBMC (células mononucleares de sangre periférica) mediante DOT-BLOT

Se empleó el kit basado en un método de inmunoensayo *OxiSelect™ Nitrotyrosine Immunoblot Kit (Cell Biolabs, INC)* para nitrotirosina. Se utilizó una membrana PVDF que fue activada en metanol 100% por 15 s, luego sumergida en agua destilada por 15 minutos y montada en sistema de DOT – BLOT HYBRI-SLOT™ MANIFOLD (Life Technologies, INC). Se añadieron 150 µg de proteínas de cada muestra, se completó volumen a 100 µL con agua destilada y luego se realizó succión en sistema de vacío. Se realizó el bloqueo de la membrana con 45 mL de TBS-T 5% en leche en polvo toda la noche (*TBS: 24 g Tris, 88 g NaCl en 900 mL de agua destilada, ajustar pH a 7,6 y llevar a 1 L (solución 10X); TBS-T 1X: 200 mL TBS (5X), 1 g o 900 µL Tween y aforar a 1 L de agua destilada; TBS-T 5% leche en polvo: 2,25 g leche en polvo, 45 mL TBS-T 1X*). Se realizaron 6 lavados con 30 mL de TBS-T por 5 min cada uno. Se realizó incubación con anticuerpo primario anti-nitrotirosina de conejo diluido 1:1000, 5% BSA, 0,005% NaN₃ (*15 mL TBS-T, 0,75 g BSA, 7,5 mg NaN₃, 15 µL*

Ac 1°) por 2 H para determinación de nitrotirosina. Se realizaron 6 lavados con 30 mL de TBS-T por 5 min cada uno. La segunda incubación con el anticuerpo secundario anti-conejo–HRP (*Horsedarish peroxidase*) diluido 1:1000 5% leche en polvo (15 mL TBS-T, 0,75 g leche en polvo, 15 µL Ac 2°) se realizó por 1 H. Fueron realizados 6 lavados con 30 mL de TBS-T por 5 min cada uno. Finalmente, el revelado se realizó con luminol (1 mL peroxidasa + 1 mL luminol, *SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate, ThermoScientific*) por 5 min en oscuridad y luego fue leído en equipo C-DiGit® Blot Scanner con software Image Studio™ Lite.

2.10. Aislamiento de ARN en PBMC (células mononucleares de sangre periférica)

Muestras destinadas a resuspender en trizol fueron centrifugadas a 900 g/2200 rpm por 10 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante y el pellet, bajo campana, fue resuspendido en 1 mL de trizol, siendo alicuotado en un eppendorf. En mismo tubo eppendorf se añadieron 200 µL de cloroformo homogenizando vigorosamente. Se incubaron por 3 a 5 min a temperatura ambiente, luego se centrifugaron a 12000 g por 15 min a 4 °C. Se separó la fase acuosa en un tubo eppendorf nuevo. Se añadieron 500 µL de isopropanol a fase acuosa recuperada y se homogenizó por inversión de forma suave. Se incubó

por 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 g por 10 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y dejó secar los restos de alcohol por 3 min. Se añadió 1 mL de etanol 75% y se resuspendió por inversión suave. Se realizó centrifugación a 7500 g por 5 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se dejó secando por toda la noche. Fueron almacenadas a – 20 °C.

2.11. Determinación de expresión de genes de enzimas antioxidantes y biomarcadores de inflamación en PBMC (células mononucleares de sangre periférica) mediante RT-qPCR

El ARN almacenado a – 20 °C fue resuspendido en 20 µL de agua libre de ARNasa. Para realización de transcripción reversa (RT) se tomaron 5 µL de muestra, se le añadieron 3 µL de random primers 100 ng/µL y finalmente se incorporaron 6,2 µL de agua libre de ARNasa. Se realizó una incubación a 65 °C por 5 min y luego se dejó enfriar a temperatura ambiente por 10 min. Se agregaron 2 µL Buffer 10X, 2 µL DTT, 0,8 µL dNTPs (25 µL de dATP, 25 µL de dGTP, 25 µL de dTTP y 25 µL de dCTP) y 1 µL de transcriptasa reversa. Se realizó incubación a 25 °C por 10 min, luego se mezcló y se dejó a 55 °C por 1 H. Finalmente, se realizó incubación a 70 °C por 15 min. Se dejaron almacenadas a – 20 °C. La expresión de genes (**Tabla 2-3**) fue analizada mediante q-PCR, la cual se realizó utilizando el reactivo *PowerTrackTM SYBRTM*

Green Master Mix. Se añadió 1 μL de muestra de ADN en la microplaca para PCR, luego se añadió 19 μL de la mezcla máster mix (10 μL Buffer 2X, 0,8 μL del primer forward (400 ng final) y 0,8 μL del primer reverse (400 ng final). Se completó con 7,4 μL de agua libre de ADNasa). Se utilizó el equipo PCR Applied FAST 7500 configurado con un ciclo de 95 °C por 2 min y luego 40 ciclos de 95 °C por 5 s y 60 °C por 30 s. Para la determinación de la curva de melting, se configuró a 95 °C por 15 s, 60 °C por 1 min y rampla 1% 95 °C por 15 s.

Tabla 2-3. Lista de secuencia de primers y condiciones.

| Primers genes enzimas antioxidantes | | | | | |
|--|-----|------------------------------------|--------------------|--------------------------|-----------------------|
| Gen | | Primer | Condiciones | Referencia | |
| CAT | Fw: | 5'-TTTGGCTACTTTGAGGTCAC-3' | 95 °C 120 s | (Capó et al., 2015) | |
| | Rv: | 5'-TCCCCATTTGCATTAACCAG-3' | 95 °C 5 s | | |
| | | | 60 °C 30 s | | |
| SOD | Fw: | 5'-TCAGGAGACCATTGCATCATT-3' | 95 °C 120 s | | |
| | Rv: | 5'-CGCTTTCCTGTCTTTGTACTTTCTTC-3' | 95 °C 5 s | | |
| | | | 60 °C 30 s | | |
| GRd | Fw: | 5'-TTCCCGTGCAACCAGTTTG-3' | 95 °C 120 s | (Capó, Martorell, | |
| | Rv: | 5'-TTCACCTCGCACTTCTCGAA-3' | 95 °C 5 s | Busquets-Cortés, et al., | |
| | | | 60 °C 30 s | 2016) | |
| Primers genes inflamatorios | | | | | |
| Gen | | Primer | Condiciones | Referencia | |
| IL-10 | Fw: | 5'-AGAACCTGAAGACCCTCAGGC-3' | 95 °C 120 s | (Capó, Martorell, | |
| | Rv: | 5'-CCACGGCCTTGCTCTTGTT-3' | 95 °C 5 s | | |
| | | | 60 °C 30 s | | |
| TNF- α | Fw: | 5'-CCCAGGCAGTCAGATCATCTTCTCGGAA-3' | 95 °C 120 s | | Sureda, et al., 2016) |
| | Rv: | 5'-CTGGTTATCTCTCAGCTCCACGCCATT-3' | 95 °C 5 s | | |
| | | | 60 °C 30 s | | |
| Primers gen de referencia | | | | | |
| Gen | | Primer | Condiciones | | |
| β -Actina | Fw: | 5'-ATTGCCGACAGGATGCAGAA-3' | 95 °C 120 s | | |
| | Rv: | 5'-GCTGATCCACATCTGCTGGAA-3' | 95 °C 5 s | | |
| | | | 60 °C 30 s | | |

Fw, forward; Rv, reverse; s, segundos.

2.12. Análisis estadístico

La caracterización respecto a los datos poblacionales se presentó como promedio y error estándar de la media (SEM) para las variables continuas y en porcentaje para las variables categóricas. Se aplicó la prueba de Shapiro-Wilks para la evaluación de la distribución normal de los datos experimentales. La significación estadística de los datos, $p < 0,05$, se evaluó mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores (tiempo de intervención (T) y grupo experimental (G)) con su respectivo análisis post-hoc DMS. Los conjuntos de datos en los que hubo una interacción significativa entre los factores analizados se probaron mediante ANOVA de 1 factor. Para el análisis de factores no paramétricos se realizó la prueba de Mann-Whitney y para factores paramétricos la prueba T-student. Los resultados se analizaron mediante el paquete estadístico SPSS versión 24 (SPSS Inc., Chicago, Illinois).

3. RESULTADOS

En cuanto a los resultados obtenidos sobre las características generales de las y los participantes del estudio, se presentan según el tipo de intervención (avellana y control) y se describen en la **Tabla 3-1**.

Respecto a las variables antropométricas expuestas en la **Tabla 3-2**, se observó que no hubo diferencias significativas de las variables peso, %grasa, IMC y CC, en ningún grupo experimental entre inicio y final de la intervención. Por otro lado, se observó una diferencia estadísticamente significativa en la talla entre grupos ($p = 0,003$).

En la **Tabla 3-3** se representa el perfil lipídico de las y los participantes. Respecto a este, se observó un aumento significativo de HDL en los dos grupos experimentales comparando los tiempos pre y post-intervención (T, $p = 0,034$), aumentando 6,8 mg/dL en el control y 6,5 mg/dL en el grupo avellanas. En los parámetros de CT, TG y LDL no se observó ninguna diferencia significativa.

Tabla 3-1. Características de la población de estudio.

| | Grupo Avellana | Grupo Control | Global |
|------------------------------|-----------------------|----------------------|---------------|
| n | 47 | 34 | 81 |
| Edad | 39,5 ± 12,2 | 38,8 ± 12,2 | 39,6 ± 12,1 |
| Sexo (%) | | | |
| Mujer | 53,1 | 67,6 | 59,3 |
| Hombre | 46,8 | 32,4 | 40,7 |
| Nivel educacional (%) | | | |
| Básica incompleta | 0 | 0 | 0 |
| Básica completa | 0 | 8,8 | 3,7 |
| Técnica superior incompleta | 0 | 0 | 0 |
| Técnica superior completa | 19,1 | 20,6 | 19,8 |
| Universitaria incompleta | 10,6 | 29,4 | 18,5 |
| Universitaria completa | 42,6 | 20,5 | 33,3 |
| Postgrado | 27,7 | 20,6 | 24,7 |

Datos presentados como promedio y SEM para variables continuas y como % para variables categóricas.

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 3-2. Análisis estadístico de variables antropométricas en función del grupo y tiempo de intervención.

| | Grupo | Inicio | | Final | | ANOVA | | |
|--------------------------------|----------|--------|--------|-------|--------|-------|--------------|-------|
| | | T | G | TxG | | | | |
| Peso (kg) | Control | 75,1 | ± 2,9 | 73,9 | ± 2,9 | 0,835 | 0,450 | 0,799 |
| | Avellana | 76,4 | ± 2,4 | 76,6 | ± 2,3 | | | |
| Talla (cm) | Control | 162,0 | ± 2,0 | 162,0 | ± 2,0 | 1,000 | 0,003 | 1,000 |
| | Avellana | 166,0 | ± 1,0* | 166,0 | ± 1,0* | | | |
| Grasa (%) | Control | 32,8 | ± 1,5 | 33,1 | ± 1,5 | 0,940 | 0,262 | 0,850 |
| | Avellana | 31,4 | ± 1,3 | 31,3 | ± 1,4 | | | |
| IMC (kg/cm²) | Control | 28,5 | ± 0,9 | 28,0 | ± 0,9 | 0,805 | 0,356 | 0,745 |
| | Avellana | 27,5 | ± 0,7 | 27,6 | ± 0,7 | | | |
| CC (cm) | Control | 93,7 | ± 2,5 | 91,3 | ± 2,4 | 0,555 | 0,766 | 0,575 |
| | Avellana | 93,2 | ± 1,9 | 93,1 | ± 1,8 | | | |

Datos presentados como promedio y SEM. Análisis estadístico: ANOVA dos factores, $p < 0,05$; ANOVA un factor, $p < 0,05$. T factor tiempo intervención, G factor grupo experimental, TxG interacción entre factor tiempo y grupo. (*) indica diferencia significativa respecto al grupo control y (#) indica diferencia significativa respecto al inicio de intervención.

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 3-3. Análisis estadístico del perfil lipídico según grupo y tiempo de intervención.

| | Grupo | Inicio | | Final | | ANOVA | | |
|---------------------------------|----------|--------|--------|-------|--------|--------------|-------|-------|
| | | | | | | T | G | TxG |
| Colesterol Total (mg/dL) | Control | 239,0 | ± 6,0 | 242,0 | ± 6,0 | 0,542 | 0,105 | 0,816 |
| | Avellana | 247,0 | ± 5,0 | 252,0 | ± 5,0 | | | |
| Triglicéridos (mg/dL) | Control | 164,0 | ± 11,0 | 174,0 | ± 12,0 | 0,903 | 0,323 | 0,466 |
| | Avellana | 161,0 | ± 11,0 | 154,0 | ± 11,0 | | | |
| LDL (mg/dL) | Control | 148,0 | ± 6,0 | 141,0 | ± 6,0 | 0,425 | 0,073 | 0,760 |
| | Avellana | 157,0 | ± 5,0 | 154,0 | ± 6,0 | | | |
| HDL (mg/dL) | Control | 59,0 | ± 3,3 | 65,8 | ± 4,2 | 0,034 | 0,862 | 0,957 |
| | Avellana | 58,6 | ± 2,0 | 65,1 | ± 3,0 | | | |

Datos presentados como promedio y SEM. Análisis estadístico: ANOVA dos factores, $p < 0,05$; ANOVA un factor, $p < 0,05$. T factor tiempo intervención, G factor grupo experimental, TxG interacción entre factor tiempo y grupo. (*) indica diferencia significativa respecto al grupo control y (#) indica diferencia significativa respecto al inicio de intervención.

Fuente: Elaboración propia.

En cuanto al recuento de las células mononucleares del hemograma, estos datos se presentan en la **Tabla 3-4**. En ella podemos observar que hubo aumentos significativos en linfocitos (T, $p = 0,046$), monocitos (T, $p = 0,049$) y PBMC (T, $p = 0,040$), al final de la intervención respecto al inicio. No hubo diferencias entre grupos. Respecto a eosinófilos y basófilos, no hubo diferencias estadísticamente significativas.

En los análisis de producción de ROS expuestos en la **Figura 3-1**, se observó una interacción significativa entre tiempo de intervención y grupo experimental al activar las PBMC con LPS (TxG, $p = 0,047$). El grupo control disminuyó significativamente la producción de ROS debido a la intervención, lo cual no se observó en el grupo avellana. Respecto a la activación de PBMC mediante Zymosan A, se observó una disminución en los dos grupos por el tratamiento (T, $p < 0,001$), que para el grupo avellana fue de un 43,1%, mientras que en el grupo control fue de un 57,9%. No hubo diferencias entre grupos. Para la activación de PBMC mediante PMA, se observó un aumento en la producción de ROS por efecto tratamiento (T, $p < 0,001$), el cual fue de un 51,2% en el grupo control y de 30,1% en el grupo avellana. No se registró otras diferencias.

Para el análisis de las actividades de enzimas antioxidantes presentado en la **Figura 3-2**, se evidenció un aumento estadísticamente significativo en la actividad enzimática de SOD (T, $p = 0,023$) y CAT (T, $p = <0,001$), provocado por el tiempo de intervención en los dos grupos experimentales. Para SOD el

aumento fue de 44,0% en el grupo avellana y de 56,9% para el grupo control, por otro lado, para CAT los aumentos fueron de 118,3% y 181,4%, respectivamente. No hubo diferencias entre grupos y respecto a GRd, no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 3-4. Análisis estadístico del recuento de células mononucleares de sangre periférica obtenido desde hemograma.

| | Grupo | Inicio | | Final | | ANOVA | | |
|-------------------------------------|----------|--------|---------|--------|---------|--------------|-------|-------|
| | | | | | | T | G | TxG |
| Linfocitos (mm³) | Control | 2053,0 | ± 104,0 | 2216,0 | ± 105,0 | 0,046 | 0,078 | 0,760 |
| | Avellana | 1855,0 | ± 84,0 | 2076,0 | ± 89,0 | | | |
| Monocitos (mm³) | Control | 353,0 | ± 26,0 | 373,0 | ± 18,0 | 0,049 | 0,110 | 0,378 |
| | Avellana | 307,0 | ± 16,0 | 360,0 | ± 15,0# | | | |
| Eosinófilos (mm³) | Control | 168,0 | ± 16,0 | 165,0 | ± 17,0 | 0,690 | 0,940 | 0,795 |
| | Avellana | 172,0 | ± 25,0 | 158,0 | ± 19,0 | | | |
| Basófilos (mm³) | Control | 43,5 | ± 3,2 | 44,6 | ± 3,5 | 0,336 | 0,131 | 0,199 |
| | Avellana | 42,8 | ± 2,9 | 35,2 | ± 3,5 | | | |
| PBMC (mm³) | Control | 2618,0 | ± 115,0 | 2799,0 | ± 115,0 | 0,040 | 0,052 | 0,734 |
| | Avellana | 2377,0 | ± 94,0 | 2629,0 | ± 96,0 | | | |

Datos presentados como promedio y SEM. Análisis estadístico: ANOVA dos factores, $p < 0,05$; ANOVA un factor, $p < 0,05$. T factor tiempo intervención, G factor grupo experimental, TxG interacción entre factor tiempo y grupo. (*) indica diferencia significativa respecto al grupo control y (#) indica diferencia significativa respecto al inicio de intervención.

Fuente: Elaboración propia.

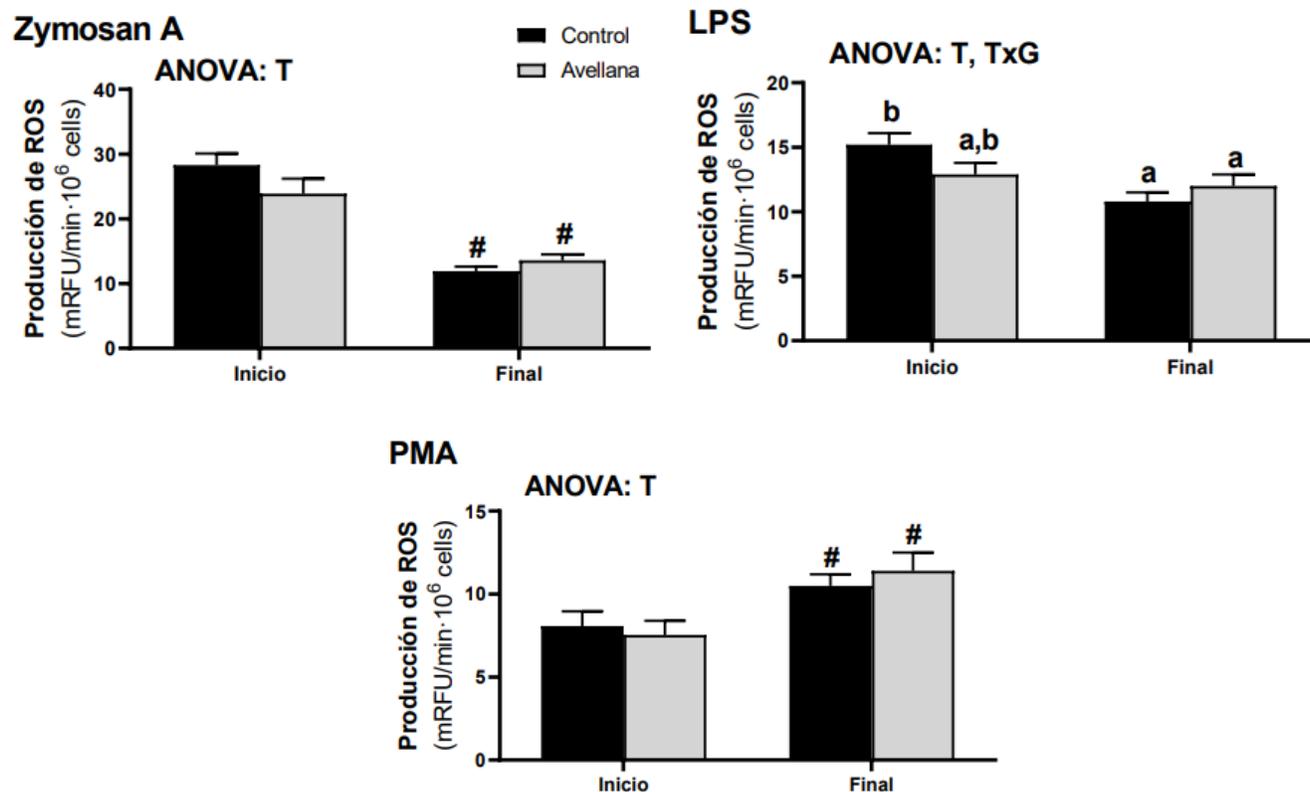


Figura 3-1. Producción de ROS en PBMC mediante activación con Zymosan A, LPS y PMA pre y post intervención.

PBMC estimuladas con concentraciones fijas de Zymosan A (1 mg/mL), LPS (100 µg/mL) y PMA (10 ng/mL), donde se determinó la producción de especies reactivas del oxígeno. Datos presentados como promedio y SEM. Análisis estadístico: ANOVA dos factores, $p < 0,05$; ANOVA un factor, $p < 0,05$. T factor tiempo intervención, G factor grupo experimental, TxG interacción entre factor tiempo y grupo. (*) indica diferencia significativa respecto al grupo control, (#) indica diferencia significativa respecto al inicio de intervención, (a;b) igualdad de letras indica no diferencias entre factores tiempo y grupo.

Fuente: Elaboración propia.

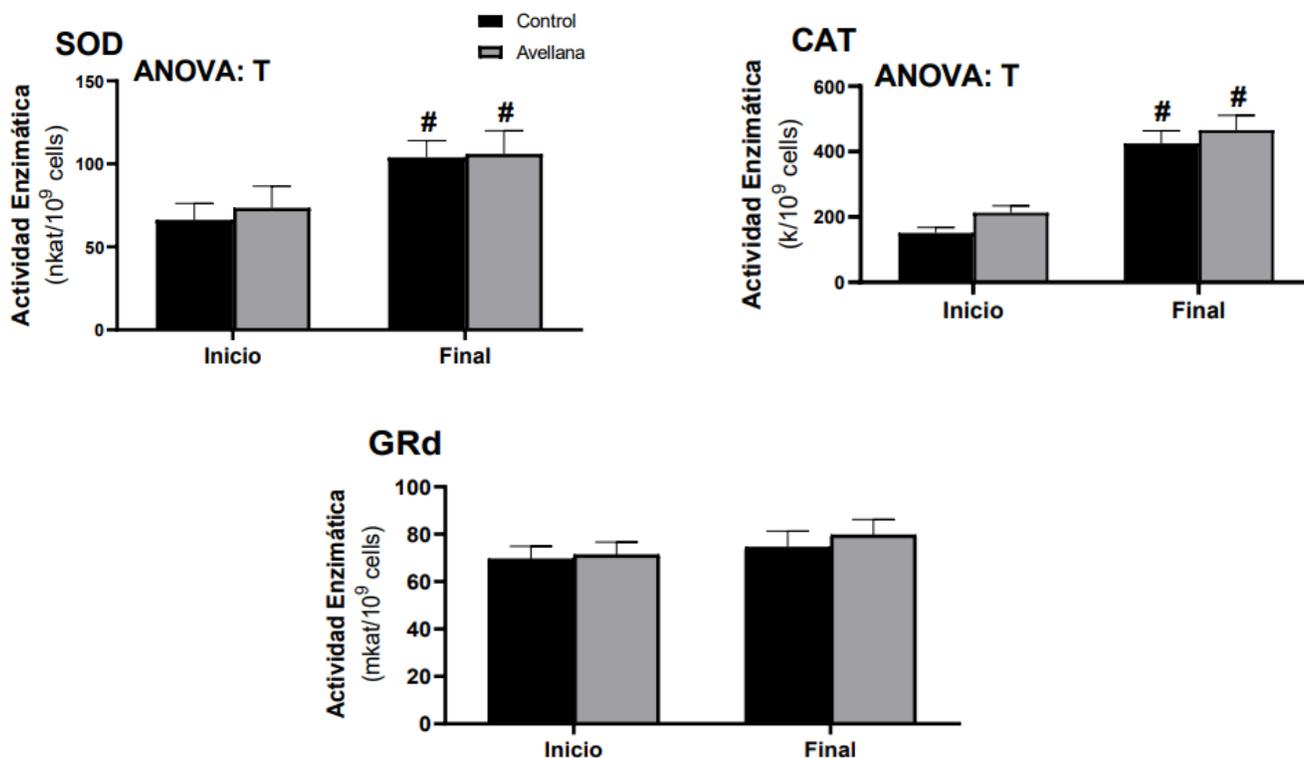


Figura 3-2. Determinación de la actividad enzimática de SOD, CAT y GRd en PBMC pre y post intervención.

Cuantificación de la actividad enzimática de enzimas antioxidantes SOD, CAT y GRd en PBMC donde se determinó la absorbancia de los compuestos citocromo C (SOD), peróxido de hidrógeno (CAT) y NADPH (GRd). Datos presentados como promedio y SEM. Análisis estadístico: ANOVA dos factores, $p < 0,05$; ANOVA un factor, $p < 0,05$. T factor tiempo intervención, G factor grupo experimental, TxG interacción entre factor tiempo y grupo. (*) indica diferencia significativa respecto al grupo control, (#) indica diferencia significativa respecto al inicio de intervención, (a;b) igualdad de letras indica no diferencias entre factores tiempo y grupo.

Fuente: Elaboración propia.

Respecto a la determinación de MDA (**Figura 3-3**), hubo una interacción significativa entre tiempo de intervención y grupo experimental (TxG, $p = 0,021$). Al final de la intervención los niveles de MDA disminuyeron significativamente debido al tratamiento, 2,9 veces en el grupo avellana y 1,9 veces en el grupo control.

En cuanto a la determinación de daño oxidativo y nitrosativo en proteínas mediante DOT – BLOT descrito en la **Figura 3-4**, se observó que en el porcentaje de nitrotirosina no hubo cambios significativos entre grupos y periodos de tiempo. Respecto al porcentaje de carbonilos, se observó una diferencia significativa respecto al factor de tiempo de intervención (T, $p < 0,001$), donde el grupo control presentó una disminución del 51,8% y el grupo avellana de un 54,3%. No hubo diferencias significativas entre grupos.

En cuanto a la caracterización de la expresión de genes en PBMC pre-intervención expuestos en la **Figura 3-5**, se observa una agrupación de los valores de $-\Delta Ct$ en el grupo avellana y control, tanto para los genes indicativos de estrés oxidativo como los asociados a inflamación. Al comparar entre grupos, en la **Tabla 3-5** podemos ver que no existen diferencias significativas en cuanto la expresión de genes, excepto en el caso de la IL-10, donde existe una diferencia en el grupo avellana de 1,1 veces ($p = 0,017$) con respecto al control.

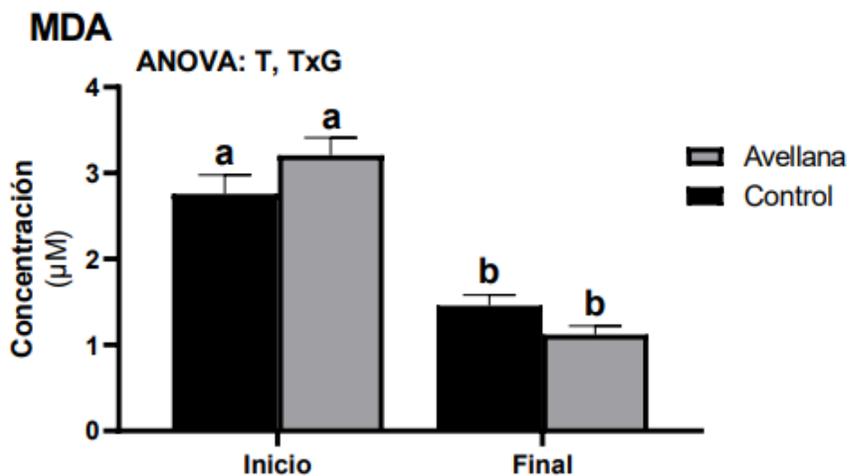


Figura 3-3. Determinación de la concentración de MDA como marcador de daño oxidativo en lípidos en PBMC pre y post intervención.

Cuantificación de MDA mediante técnica colorimétrica en PBMC pre y post intervención. Datos presentados como promedio y SEM. Análisis estadístico: ANOVA dos factores, $p < 0,05$; ANOVA un factor, $p < 0,05$. T factor tiempo intervención, G factor grupo experimental, TxG interacción entre factor tiempo y grupo. (*) indica diferencia significativa respecto al grupo control, (#) indica diferencia significativa respecto al inicio de intervención, (a;b) igualdad de letras indica no diferencias entre factores tiempo y grupo.

Fuente: Elaboración propia.

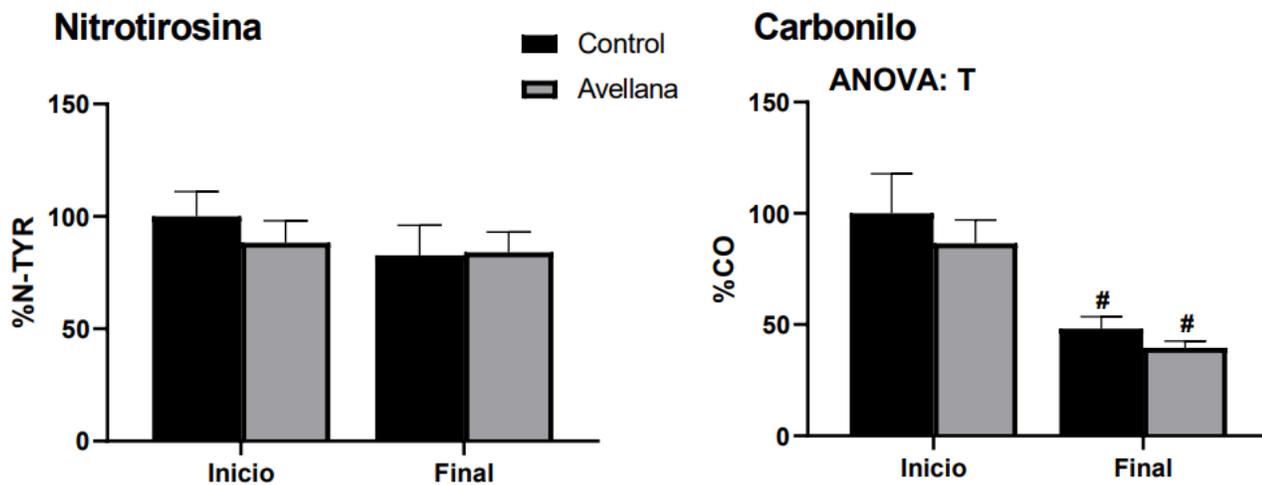


Figura 3-4. Determinación de daño oxidativo y nitrosativo (% de N-TYR y CO) mediante DOT-BLOT en PBMC pre y post intervención.

Determinación del % de nitrotirosina (N-TYR) y carbonilos (CO) mediante inmunoensayo DOT-BLOT en PBMC pre y post intervención. Datos presentados como promedio y SEM. Análisis estadístico: ANOVA dos factores, $p < 0,05$; ANOVA un factor, $p < 0,05$. T factor tiempo intervención, G factor grupo experimental, TxG interacción entre factor tiempo y grupo. (*) indica diferencia significativa respecto al grupo control, (#) indica diferencia significativa respecto al inicio de intervención, (a;b) igualdad de letras indica no diferencias entre factores tiempo y grupo.

Fuente: Elaboración propia.

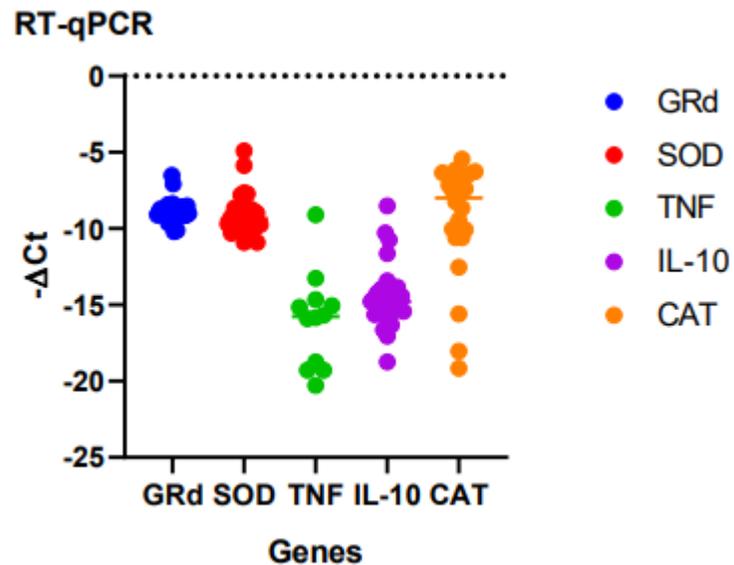


Figura 3-5. Caracterización de la expresión de genes de estrés oxidativo e inflamación en PBMC de población de estudio pre-intervención.

Determinación de la expresión de genes de estrés oxidativo e inflamación mediante técnica de RT-qPCR en PBMC pre-intervención. Se graficó la distribución de la población en general respecto a cada gen analizado, siendo GRd SOD y CAT para marcadores de estrés oxidativo y TNF- α e IL-10 como marcadores de inflamación.

Fuente: Elaboración propia

Tabla 3-5. Análisis estadístico de la expresión de genes de estrés oxidativo e inflamación en PBMC pre-intervención.

| | Genes | Grupo | -ΔCt | | | T-test |
|-------------------------|--------------|--------------|-------------|---|--------|---------------|
| Estrés Oxidativo | GRd | Control | -9,051 | ± | 0,107 | 0,445 |
| | | Avellana | -8,781 | ± | 0,224 | |
| | SOD | Control | -9,200 | ± | 0,297 | 0,926 |
| | | Avellana | -9,116 | ± | 0,358 | |
| | CAT | Control | -9,976 | ± | 1,285 | 0,652 |
| | | Avellana | -8,839 | ± | 1,037 | |
| Inflamación | TNF-α | Control | -15,330 | ± | 1,413 | 0,388 |
| | | Avellana | -16,980 | ± | 0,842 | |
| | IL-10 | Control | -13,650 | ± | 0,605* | 0,017 |
| | | Avellana | -15,380 | ± | 0,457* | |

Datos presentados como promedio y SEM. Análisis estadístico: Mann-Whitney para factores no paramétricos y T-student para factores paramétricos, $p < 0,05$. (*) indica diferencia significativa respecto al grupo control.

Fuente: Elaboración propia.

4. DISCUSIÓN

Las guías clínicas del MINSAL mencionan que para el manejo de la hipercolesterolemia se debe indicar dietas bajas en grasa (MINSAL, 2018). Sin embargo, nuestros resultados evidencian que hay un efecto similar si las personas siguen una dieta alta en grasas suplementada con avellana chilena, mostrando mejoras en el perfil lipídico y un mejoramiento en los marcadores de estrés oxidativo, fortaleciendo la defensa antioxidante en igualdad de magnitudes.

La producción de ROS en las PBMC tiene por objetivo ser un mecanismo de defensa frente a patógenos, lo cual se puede lograr mediante el uso de moléculas capaces de desencadenar la activación de receptores o proteínas claves en la metabolización de compuestos oxigenados, generando un intercambio de electrones que dan lugar a las reacciones oxidativas (Dröge, 2002; Tan et al., 2018). En particular, respecto a la medición de marcadores de estrés oxidativo y capacidad antioxidante en PBMC en ambos grupos de intervención pudimos evidenciar que hubo una disminución significativa en la producción de ROS en ambas dietas. Esta disminución está asociada a la activación de PBMC con LPS y ZA, donde en ambos casos se traducen como una contribución en la disminución del estrés oxidativo.

Lo anterior ocurre de manera diferente cuando las PBMC fueron activadas con PMA, observando en ambos grupos un aumento en la producción de ROS al finalizar el estudio. Esto indicaría un mejoramiento en la capacidad de respuesta de las PBMC frente a este tipo de estimuladores. El mecanismo molecular por el cual el PMA es capaz de activar a las PBMC tiene directa relación con la activación de la cascada de señalización de la Proteína Kinasa C (PKC) debido a que, el PMA es capaz de atravesar la membrana plasmática y desencadenar la activación de esta vía a nivel del citoplasma. Esta activación se da por un mimetismo molecular con el diacilglicerol, estimulando a las PBMC y aumentando la producción de citoquinas y ROS a nivel mitocondrial, método característico usado para lograr la activación y diferenciación celular (Mandal et al., 2021; Taşlı, 2022; Tran et al., 2018). Por otro lado, LPS logra su activación mediante el receptor TLR4 (*Toll Like Receptor 4*), quien a su vez logra activar a la NADPH oxidasa y en consecuencia activa la producción de ROS, promoviendo el estado proinflamatorio (Hua et al., 2013; Lee et al., 2012; Orecchioni et al., 2019). Mientras que para ZA, la vía de activación utilizada corresponde a la que activa cuando se une al receptor Dectina-1 quien colabora con el receptor TLR2 (*Toll Like Receptor 2*), donde son capaces de producir, mediante la vía de las proteínas Syk y Src, la generación de interleuquinas y citoquinas que contribuyen a la defensa oxidativa e inflamatoria desde las PBMC (Baram et al., 2014; ElSORI et al., 2011; Kelly et al., 2010; Li et al., 2016). Así, se puede indicar que existe una similitud en la activación de PBMC y su respuesta

frente a la capacidad de producir ROS tanto en la dieta control, como en la dieta suplementada con avellana, que contiene un mayor aporte de grasas, pero que estas son del tipo mono y poliinsaturadas. Lo anterior solo presenta diferencias a nivel de la activación con LPS, donde observamos una menor producción de ROS en PBMC del grupo control en comparación con el grupo avellana.

En concordancia con los resultados anteriores, observamos una disminución en el marcador de daño lipídico MDA, quien es un subproducto de la peroxidación lipídica y tiene la capacidad de formar aductos con proteínas, provocando la oxidación de estas (Gęgotek & Skrzydlewska, 2019). Como bien se mencionaba, el MDA es un producto de la peroxidación lipídica de los AGPI en las PBMC, y a pesar de que en el grupo avellana hubo un mayor consumo de grasas y que estas fueron del tipo poliinsaturadas, no observamos un aumento en este producto oxidativo. Esto se puede relacionar con dos de los resultados obtenidos, principalmente aquellos que tienen que ver con la producción de ROS a nivel mitocondrial, donde claramente observamos una disminución de esta vía en el caso de la activación de PBMC con LPS, pero también tiene una directa relación con la capacidad de generar modificaciones a nivel de las proteínas, ya que se sabe que el MDA es, por ejemplo, capaz de provocar modificaciones a nivel estructural de la ApoB-100 en las LDL, contribuyendo a la formación de las ox-LDL (Nakamura et al., 2014; Vandemoortele et al., 2020; Videla et al., 2022). Lo anterior, se ve reflejado específicamente en el %CO en proteínas de PBMC, que a diferencia de lo que ocurre con el %N-TYR, se

observó una disminución significativa en ambos grupos de estudio y como se indicaba anteriormente, es esperable esta disminución de carbonilos si es que existe la disminución de MDA.

La maquinaria antioxidante es clave en la regulación del estrés oxidativo y con lo cual mantener el equilibrio REDOX, esto a través de la transformación de las ROS en moléculas de fácil metabolización que finalmente llegan a convertirse en agua. Dentro de estas enzimas se encuentran las de primera línea defensiva ubicadas a nivel de la membrana plasmática, citoplasma y mitocondria, correspondientes a SOD y CAT, quienes tienen la capacidad de metabolizar en ion superóxido y el peróxido de hidrógeno, respectivamente, los cuales son 2 ROS potencialmente oxidativos capaces de generar daño a nivel celular si se encuentran en exceso (Hadwan, 2018; Wang et al., 2018). Así es como resulta interesante analizar la actividad enzimática en PBMC, de la cual observamos un aumento significativo en la actividad de SOD y CAT en ambos grupos de estudio, siendo de similar magnitud en su capacidad de metabolizar los ROS. Así es como se puede indicar que ambas enzimas mejoran su actividad en ambas dietas, aumentando la capacidad antioxidante de las PBMC, independiente del consumo de grasas que se tenga. No hay documentación de la actividad enzimática en estudios de intervención nutricional con avellana, siendo lo más cercano un estudio de Monserrat-Mesquida, et al. (2022), donde 67 personas con enfermedad de hígado graso no alcohólico en España, siguieron una dieta mediterránea por 6 meses y que registraron un aumento de

la actividad enzimática de SOD y CAT al finalizar el estudio en ambos grupos, similar a lo que hemos obtenido e incluso en el mismo periodo de tiempo. Cabe destacar de igual manera, que estas personas presentaban un aumento en su CT > 200 mg/dL, cumpliendo el criterio de ser hipercolesterolémicos (Monserrat-Mesquida et al., 2022).

Se obtuvo la caracterización de la población respecto a la expresión de genes ligados al estrés oxidativo también a la inflamación. En el primer caso se observó que había una clara tendencia en la distribución población de la expresión de genes de SOD, CAT y GRd, evidenciando que ambas poblaciones de los dos grupos (control y avellana) presentan igual expresión de genes relacionados a estas enzimas antioxidantes.

Por otro lado, obtuvimos el mismo patrón respecto al TNF- α , que corresponde a una citoquina proinflamatoria y que en ambos grupos sigue la misma tendencia de expresión, donde no encontramos diferencias significativas entre grupos. Distinto fue el caso de la IL-10, citoquina antiinflamatoria, la cual, si presentó una diferencia entre grupos, que puede ser interpretada como que en el grupo avellana hay una mayor inflamación con respecto al grupo control al inicio de la intervención, puesto que, al haber una menor expresión de esta citoquina, podemos inferir que habrá mayor predominancia sobre el estado proinflamatorio.

Respecto a los resultados que obtuvimos sobre el perfil lipídico, podemos observar que en ambos grupos no hubo efectos sobre la mayoría de estos

parámetros. Ninguno de los dos modelos dietéticos ejerció un efecto a nivel del perfil lipídico, salvo el caso de la HDL, donde esta sí presentó un aumento significativo, siendo de igual magnitud tanto en el grupo control como en el grupo avellana. El aumento de la HDL tiene un impacto positivo en lo que relevancia clínica respecta, puesto que el aumento de HDL se encuentra superior a los 60 mg/dL, sobre los valores de referencia que se establecen en las guías clínicas del MINSAL, puesto que se indica que la HDL tiene una función protectora frente a la ECV (MINSAL, 2018). Lo anterior se ve relacionado directamente al rol que cumple la HDL en el metabolismo lipídico, permitiendo el proceso de transporte reverso y con ello impidiendo que exista una acumulación de colesterol a nivel de los tejidos periféricos, disminuyendo el riesgo ateroesclerótico y con ello disminuyendo el RCV (Errico et al., 2013; MINSAL, 2018; Ramasamy, 2014). Este aumento de HDL también ha sido descrito en otros estudios, dentro de ellos se encuentra el de Mercanligil, et al. (2017), donde obtuvieron un aumento de 5,5 mg/dL de la HDL en el grupo dieta enriquecido con avellana y sin cambios en el control, donde el estudio incluía a 15 sujetos hipercolesterolémicos que siguieron una dieta por 2 periodos de 4 semanas cada uno, siendo el primero control y el segundo una dieta enriquecida con avellana en Turquía, con la diferencia de que ellos sí obtuvieron disminución de otros parámetros del perfil lipídico como TG y c-VLDL (Mercanligil et al., 2007). También se describe algo similar en el caso del estudio realizado por Orem, et al. (2013), donde se tenían a 21 sujetos en una intervención dietética

de 12 semanas, donde se dividió en 3, siendo primero control, luego intervención con avellana y, por último, control nuevamente y que evidenciaron un aumento de HDL de 2,7 mg/dL después de la intervención con avellana y que también encontraron disminuciones en otros parámetros como CT, TG y LDL (Orem et al., 2013). A diferencia de los estudios con los que se pueden hacer pequeñas comparaciones, estos difieren claramente en el número de participantes y evidentemente nuestro aumento en HDL de 6,8 y 6,5 mg/dL para el grupo control y avellana, respectivamente, es muy superior a los registrados por los autores presentados.

Ambas dietas son capaces de generar efectos benéficos en el contexto del estrés oxidativo y del perfil lipídico. Estos resultados sustentan la posibilidad de lograr que las y los participantes puedan adaptar sus dietas e integren alimentos beneficiosos sin la necesidad de restringir o modificar en gran medida su alimentación, que es lo que busca la dieta chilena, en donde esta dieta pueda entregar un aporte calórico en grasas, pero que estas grasas provengas desde una fuente rica en AGMI y AGPI, como lo son los frutos secos, donde su composición principal es este tipo de ácidos grasos, específicamente el caso de la avellana chilena.

Como se menciona, incorporar frutos secos a la dieta trae beneficios tangibles y sostenibles en el tiempo, permitiendo mejorar las condiciones metabólicas de las/os pacientes hipercolesterolémicos y así, con ello evitar continuar al

siguiente paso del tratamiento frente a las dislipidemias, que consiste en la administración de fármacos. Esta mejoría no sólo se ha evidenciado en nuestro estudio, sino que han sido diversos los autores que han descrito estas propiedades benéficas y que los han demostrado a través de investigaciones similares a la nuestra, las cuales se han agrupado en el metaanálisis realizado por Brown, et al (2022), donde concluye, igual que nosotros, que la evidencia acredita que el uso de este tipo de dietas y suplementaciones con avellana tienen efectos y beneficios que son sostenibles en el tiempo (Brown et al., 2022).

4.1. Fortalezas y limitaciones del estudio

Dentro de las fortalezas de nuestro estudio se cuenta con que corresponde al primero realizado en Chile y el mundo donde se busca evidenciar los efectos de la avellana chilena como producto nacional, potenciando el consumo de alimentos originarios del país y evidenciando que también tienen la capacidad de generar efectos benéficos en la salud de la población. Además, nuestro estudio cuenta con una gran variedad de parámetros que permiten evidenciar cambios a nivel metabólico en cuanto al estrés oxidativo y una población de estudio significativamente grande, pudiendo entregar resultados sólidos y confiables en cuanto a estadística se refiere.

Por otro lado, respecto a las limitaciones, es importante considerar que no se ha descrito en su totalidad la composición de la *G. avellana*, por lo que, podría haber componentes que tengan efectos que no estemos considerando, así como aportes de otros componentes de la dieta que podría aportar. También es relevante mencionar que nuestro estudio no cuenta con el análisis completo de la expresión de genes de marcadores de estrés oxidativo e inflamación, por lo que, se dificulta el poder realizar algunas comparaciones o darle motivo a alguno de los resultados obtenidos referentes a estas variables. Cabe decir que otra de las limitaciones es no poder contar con una mayor cantidad de biomarcadores como ox-LDL o daño oxidativo en el material genético para complementar con más información los efectos de una dieta suplementada con avellana chilena.

4.2. Proyecciones del estudio

Referente a las proyecciones del estudio, podemos indicar que nuestros resultados marcan el inicio en la investigación, a nivel nacional, sobre el uso de avellana como un suplemento alimenticio capaz de generar efectos positivos en la salud humana, teniendo impacto incluso en aquellos sujetos que presenten hipercolesterolemia, así como también, resulta ser el primer estudio a nivel mundial que evidencia los efectos de la *G. avellana* sobre la salud humana. Esto

da paso a generar una gran variedad de estudios en donde se busque determinar la composición de la *G. avellana*, así como también analizar otros efectos metabólicos que podrían incidir en la salud de la población, como podrían ser el analizar el efecto sobre la oxidación de la LDL, determinar otros marcadores de RCV como homocisteína, proteína C reactiva, así como también otros marcadores de estrés oxidativo como daño oxidativo a nivel del material genético mediante ensayo del cometa, medición de 4-HNE, determinación de NO y nitratos para ver el efecto en el estrés nitrosativo o incluso marcadores de inflamación como la medición de IL-1, IL-6 e IL-10 y también TNF- α y PPAR γ , que permitan definir con mayor certeza los beneficios de la avellana chilena, complementando los resultados obtenidos en nuestra investigación.

5. CONCLUSIÓN

Una dieta chilena alta en grasas suplementada con avellana chilena logra generar similares efectos beneficiosos a nivel del perfil lipídico y marcadores de estrés oxidativo que la dieta baja en grasas que establecen las guías clínicas del MINSAL.

En cuanto al perfil lipídico, existe una mejora significativa en la HDL, pero no en los demás parámetros determinados.

Respecto a los marcadores de estrés oxidativo, hay una disminución significativa respecto a la producción de ROS en PBMC, así como un aumento en la capacidad de respuesta de estas mismas al ser activadas con PMA, traducido en una mejoría de la respuesta inmune.

Las dos intervenciones provocaron mejoras en la maquinaria antioxidante enzimática correspondiente principalmente a SOD y CAT, lo que indica que ambas dietas tienen la capacidad de mejorar la primera línea de defensa frente a la presencia de ROS y fortalecer el mecanismo antioxidante de las PBMC.

Otra variable que nos indica una mejora en la capacidad antioxidante de las PBMC es la disminución de marcadores oxidativos en ambas intervenciones, provocando una disminución del daño oxidativo sobre proteínas en estas células.

Con este estudio se abre el camino a la investigación de los efectos que podrían provocar el consumo de estos alimentos ricos en AGMI y AGPI en personas que padezcan de factores de riesgo para la ECV y mejorar con ellos sus condiciones metabólicas, su estado oxidativo e inflamatorio.

6. BIBLIOGRAFÍA

Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymol*, 105, 121-126.
[https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05016-3)

Aguillón-Osma, J., Loango-Chamorro, N., & Landazuri, P. (2019). Liver cell models for studying lipid metabolism. Literature review. *Revista de la Facultad de Medicina*, 67(1), 109-116.

Ahangari, N., Ghayour Mobarhan, M., Sahebkar, A., & Pasdar, A. (2018). Molecular aspects of hypercholesterolemia treatment: current perspectives and hopes. *Ann Med*, 50(4), 303-311.
<https://doi.org/10.1080/07853890.2018.1457795>

Ali, S. S., Ahsan, H., Zia, M. K., Siddiqui, T., & Khan, F. H. (2020). Understanding oxidants and antioxidants: Classical team with new players. *J Food Biochem*, 44(3), e13145. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13145>

Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol*, 55, 373-399.
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>

Ascaso, J. F. (2010). [Advances in cholesterol-lowering interventions]. *Endocrinol Nutr*, 57(5), 210-219. <https://doi.org/10.1016/j.endonu.2010.03.008>
(Avances en el tratamiento de la hipercolesterolemia.)

Baram, L., Cohen-Kedar, S., Spektor, L., Elad, H., Guzner-Gur, H., & Dotan, I. (2014). Differential stimulation of peripheral blood mononuclear cells in Crohn's disease by fungal glycans. *J Gastroenterol Hepatol*, 29(12), 1976-1984. <https://doi.org/10.1111/jgh.12701>

Becker, L. B. (2004). New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovascular Research*, 61(3), 461-470. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2003.10.025>

Bhandari P, S. A. (2022). Low Fat Diet. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553097/>

Boyum, A. (1964). SEPARATION OF WHITE BLOOD CELLS. *Nature*, 204, 793-794. <https://doi.org/10.1038/204793a0>

Brown, R., Ware, L., & Tey, S. L. (2022). Effects of Hazelnut Consumption on Cardiometabolic Risk Factors and Acceptance: A Systematic Review. *Int J Environ Res Public Health*, 19(5). <https://doi.org/10.3390/ijerph19052880>

Caimari, A., Oliver, P., Keijer, J., & Palou, A. (2010). Peripheral blood mononuclear cells as a model to study the response of energy homeostasis-related genes to acute changes in feeding conditions. *Omic*s, 14(2), 129-141. <https://doi.org/10.1089/omi.2009.0092>

Capó, X., Martorell, M., Busquets-Cortés, C., Sureda, A., Riera, J., Drobnic, F., Tur, J. A., & Pons, A. (2016). Effects of dietary almond- and olive oil-based

docosahexaenoic acid- and vitamin E-enriched beverage supplementation on athletic performance and oxidative stress markers. *Food Funct*, 7(12), 4920-4934. <https://doi.org/10.1039/c6fo00758a>

Capó, X., Martorell, M., Sureda, A., Llompart, I., Tur, J. A., & Pons, A. (2015). Diet supplementation with DHA-enriched food in football players during training season enhances the mitochondrial antioxidant capabilities in blood mononuclear cells. *Eur J Nutr*, 54(1), 35-49. <https://doi.org/10.1007/s00394-014-0683-2>

Capó, X., Martorell, M., Sureda, A., Riera, J., Drobnic, F., Tur, J. A., & Pons, A. (2016). Effects of Almond- and Olive Oil-Based Docosahexaenoic- and Vitamin E-Enriched Beverage Dietary Supplementation on Inflammation Associated to Exercise and Age. *Nutrients*, 8(10). <https://doi.org/10.3390/nu8100619>

Cardozo, L. A., Cuervo Guzman, Y. A., & Murcia Torres, J. A. (2016). Body fat percentage and prevalence of overweight-obesity in college students of sports performance in Bogotá, Colombia. *Nutrición clínica y dietética hospitalaria*, 36(3), 68-75.

Carlberg, I., & Mannervik, B. (1985). Glutathione reductase. *Methods Enzymol*, 113, 484-490. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(85\)13062-4](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(85)13062-4)

Carvajal, C. (2014). Lipoproteínas: metabolismo y lipoproteínas aterogénicas. *Medicina Legal de Costa Rica*, 31, 88-94.

http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152014000200010&nrm=iso

Chawla, S., Tessarolo Silva, F., Amaral Medeiros, S., Mekary, R. A., & Radenkovic, D. (2020). The Effect of Low-Fat and Low-Carbohydrate Diets on Weight Loss and Lipid Levels: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*, 12(12). <https://doi.org/10.3390/nu12123774>

Cofan Pujol, M. (2014). Mecanismos básicos. Absorción y excreción de colesterol y otros esteroides. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, 26, 41-47. <http://www.elsevier.es/es/linksolver/ft/pii/S0214916813001277>

Costa, A., Reynés, B., Konieczna, J., Martín, M., Fiol, M., Palou, A., Romaguera, D., & Oliver, P. (2021). Use of human PBMC to analyse the impact of obesity on lipid metabolism and metabolic status: a proof-of-concept pilot study. *Sci Rep*, 11(1), 18329. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96981-6>

Couto, N., Wood, J., & Barber, J. (2016). The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radic Biol Med*, 95, 27-42. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.028>

Csonka, C., Sárközy, M., Pipicz, M., Dux, L., & Csont, T. (2016). Modulation of Hypercholesterolemia-Induced Oxidative/Nitrative Stress in the Heart. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 3863726. <https://doi.org/10.1155/2016/3863726>

Cyr, A. R., Huckaby, L. V., Shiva, S. S., & Zuckerbraun, B. S. (2020). Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction. *Crit Care Clin*, 36(2), 307-321.

<https://doi.org/10.1016/j.ccc.2019.12.009>

De Lira-García, C., Bacardí-Gascón, M., & Jiménez-Cruz, A. (2012). [Effectiveness of long-term consumption of nuts, seeds and seeds' oil on glucose and lipid levels; systematic review]. *Nutr Hosp*, 27(4), 964-970.

<https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.4.5781> (Efecto del consumo de nueces, semillas y aceites sobre marcadores bioquímicos y el peso corporal; revisión sistemática.)

de Mello, V. D., Kolehmanien, M., Schwab, U., Pulkkinen, L., & Uusitupa, M. (2012). Gene expression of peripheral blood mononuclear cells as a tool in dietary intervention studies: What do we know so far? *Mol Nutr Food Res*, 56(7), 1160-1172. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201100685>

Demirci-Çekiç, S., Özkan, G., Avan, A. N., Uzunboy, S., Çapanoğlu, E., & Apak, R. (2022). Biomarkers of Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *J Pharm Biomed Anal*, 209, 114477. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114477>

Deon, V., Del Bo, C., Guaraldi, F., Abello, F., Belviso, S., Porrini, M., Riso, P., & Guardamagna, O. (2018). Effect of hazelnut on serum lipid profile and fatty acid composition of erythrocyte phospholipids in children and adolescents with primary hyperlipidemia: A randomized controlled trial. *Clin Nutr*, 37(4), 1193-1201. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2017.05.022>

Deponte, M. (2013). Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim Biophys Acta*, 1830(5), 3217-3266. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.018>

Di Renzo, L., Cioccoloni, G., Bernardini, S., Abenavoli, L., Aiello, V., Marchetti, M., Cammarano, A., Alipourfard, I., Ceravolo, I., & Gratteri, S. (2019). A Hazelnut-Enriched Diet Modulates Oxidative Stress and Inflammation Gene Expression without Weight Gain. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 4683723. <https://doi.org/10.1155/2019/4683723>

Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 82(1), 47-95. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>

Eleutherio, E. C. A., Silva Magalhães, R. S., de Araújo Brasil, A., Monteiro Neto, J. R., & de Holanda Paranhos, L. (2021). SOD1, more than just an antioxidant. *Arch Biochem Biophys*, 697, 108701. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108701>

Elsori, D., Yakubenko, V., Roome, T., Thiagarajan, P., Bhattacharjee, A., Yadav, S., & Cathcart, M. (2011). Protein kinase C is a critical component of Dectin-1 signaling in primary human monocytes. *Journal of leukocyte biology*, 90, 599-611. <https://doi.org/10.1189/jlb.0610376>

Errico, T. L., Chen, X., Martin Campos, J. M., Julve, J., Escolà-Gil, J. C., & Blanco-Vaca, F. (2013). Mecanismos básicos: estructura, función y metabolismo de las lipoproteínas plasm [10.1016/j.arteri.2013.05.003]. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, 25(2), 98-103. <https://doi.org/10.1016/j.arteri.2013.05.003>

Estruch, R., Ros, E., Salas-Salvadó, J., Covas, M. I., Corella, D., Arós, F., Gómez-Gracia, E., Ruiz-Gutiérrez, V., Fiol, M., Lapetra, J., Lamuela-Raventos, R. M., Serra-Majem, L., Pintó, X., Basora, J., Muñoz, M. A., Sorlí, J. V., Martínez, J. A., & Martínez-González, M. A. (2013). Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *N Engl J Med*, *368*(14), 1279-1290. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1200303>

Falk, E. (2006). Pathogenesis of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*, *47*(8 Suppl), C7-12. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.09.068>

Feingold, K. R. (2000). Introduction to Lipids and Lipoproteins. In K. R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce, G. Chrousos, W. W. de Herder, K. Dhatariya, K. Dungan, J. M. Hershman, J. Hofland, S. Kalra, G. Kaltsas, C. Koch, P. Kopp, M. Korbonits, C. S. Kovacs, W. Kuohung, B. Laferrère, M. Levy, E. A. McGee, R. McLachlan, J. E. Morley, M. New, J. Purnell, R. Sahay, F. Singer, M. A. Sperling, C. A. Stratakis, D. L. Trencé, & D. P. Wilson (Eds.), *Endotext*. MDText.com, Inc.

Copyright © 2000-2022, MDText.com, Inc.

Flohe, L. (1984). [10] Superoxide dismutase assays. In *Methods in enzymology* (Vol. 105, pp. 93-104). Elsevier.

Friedewald, W. T., Levy, R. I., & Fredrickson, D. S. (1972). Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*, *18*(6), 499-502.

Gęgotek, A., & Skrzydlewska, E. (2019). Biological effect of protein modifications by lipid peroxidation products. *Chemistry and Physics of Lipids*, 221, 46-52.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2019.03.011>

Goldberg, D. M. (1984). Glutathione reductase. *Methods of enzymatic analysis*, 3, 258-265.

Guasch-Ferré, M., & Willett, W. C. (2021). The Mediterranean diet and health: a comprehensive overview. *J Intern Med*, 290(3), 549-566.

<https://doi.org/10.1111/joim.13333>

Guía de Tratamiento Farmacológico de Dislipidemias para el primer nivel de atención. (2013). *Revista mexicana de cardiología*, 24 (3), 103-129.

Hadwan, M. H. (2018). Simple spectrophotometric assay for measuring catalase activity in biological tissues. *BMC Biochem*, 19(1), 7.

<https://doi.org/10.1186/s12858-018-0097-5>

Hansson, G. K., & Hermansson, A. (2011). The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol*, 12(3), 204-212. <https://doi.org/10.1038/ni.2001>

He, L., He, T., Farrar, S., Ji, L., Liu, T., & Ma, X. (2017). Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cell Physiol Biochem*, 44(2), 532-553. <https://doi.org/10.1159/000485089>

Horn, L. V., Carson, J. A. S., Appel, L. J., Burke, L. E., Economos, C., Karmally, W., Lancaster, K., Lichtenstein, A. H., Johnson, R. K., Thomas, R. J., Vos, M.,

Wylie-Rosett, J., & Kris-Etherton, P. (2016). Recommended Dietary Pattern to Achieve Adherence to the American Heart Association/American College of Cardiology (AHA/ACC) Guidelines: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*, 134(22), e505-e529.

<https://doi.org/doi:10.1161/CIR.0000000000000462>

Hua, K.-F., Chou, J.-C., Lam, Y., Tasi, Y.-L., Chen, A., Ka, S.-M., Fang, Z., Liu, M.-L., Yang, F.-L., Yang, Y.-L., Chiu, Y.-C., & Wu, S.-H. (2013). Polyenylpyrrole Derivatives Inhibit NLRP3 Inflammasome Activation and Inflammatory Mediator Expression by Reducing Reactive Oxygen Species Production and Mitogen-Activated Protein Kinase Activation. *PLOS ONE*, 8(10), e76754.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076754>

ISP. (2021). FOLLETO DE INFORMACIÓN AL PROFESIONAL SYBRAVA SOLCUIÓN INYECTABLE 284 mg/ 1,5 mL. *Instituto de Salud Pública, Chile*.

Jebari-Benslaiman, S., Galicia-García, U., Larrea-Sebal, A., Olaetxea, J. R., Alloza, I., Vandebroek, K., Benito-Vicente, A., & Martín, C. (2022). Pathophysiology of Atherosclerosis. *Int J Mol Sci*, 23(6).

<https://doi.org/10.3390/ijms23063346>

Kattoor, A. J., Pothineni, N. V. K., Palagiri, D., & Mehta, J. L. (2017). Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*, 19(11), 42.

<https://doi.org/10.1007/s11883-017-0678-6>

Kehrer, J. P., Robertson, J. D., & Smith, C. V. (2010). 1.14 - Free Radicals and Reactive Oxygen Species. In C. A. McQueen (Ed.), *Comprehensive Toxicology (Second Edition)* (pp. 277-307). Elsevier.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00114-7>

Kelly, E. K., Wang, L., & Ivashkiv, L. B. (2010). Calcium-activated pathways and oxidative burst mediate zymosan-induced signaling and IL-10 production in human macrophages. *J Immunol*, *184*(10), 5545-5552.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901293>

Khatana, C., Saini, N. K., Chakrabarti, S., Saini, V., Sharma, A., Saini, R. V., & Saini, A. K. (2020). Mechanistic Insights into the Oxidized Low-Density Lipoprotein-Induced Atherosclerosis. *Oxid Med Cell Longev*, *2020*, 5245308.

<https://doi.org/10.1155/2020/5245308>

Lazarte, J., & Hegele, R. A. (2020). Dyslipidemia Management in Adults With Diabetes. *Can J Diabetes*, *44*(1), 53-60.

<https://doi.org/10.1016/j.cjcd.2019.07.003>

Lee, C. W., Kim, S. C., Kwak, T. W., Lee, J. R., Jo, M. J., Ahn, Y. T., Kim, J. M., & An, W. G. (2012). Anti-inflammatory effects of bangpungtongsung-san, a traditional herbal prescription. *Evid Based Complement Alternat Med*, *2012*, 892943.

<https://doi.org/10.1155/2012/892943>

León, R. L., & Solís, J. U. (2012). Propiedades antioxidantes de los frutos secos y la disminución del colesterol total y LDL- colesterol.

Li, J.-T., Wang, W.-Q., Wang, L., Liu, N.-N., Zhao, Y.-L., Zhu, X.-S., Liu, Q.-Q., Gao, C.-F., Yang, A.-G., & Jia, L.-T. (2016). Subanesthetic isoflurane relieves zymosan-induced neutrophil inflammatory response by targeting NMDA glutamate receptor and Toll-like receptor 2 signaling. *Oncotarget*, 7(22).

<https://www.oncotarget.com/article/9091/text/>

Libby, P., Buring, J. E., Badimon, L., Hansson, G. K., Deanfield, J., Bittencourt, M. S., Tokgözoğlu, L., & Lewis, E. F. (2019). Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Primers*, 5(1), 56. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0106-z>

Lu, Z., Lightcap, I. V., & Tennyson, A. G. (2021). An organometallic catalase mimic with exceptional activity, H₂O₂ stability, and catalase/peroxidase selectivity. *Dalton Trans*, 50(43), 15493-15501.

<https://doi.org/10.1039/d1dt02002a>

Mailer, R. K. W., Gisterå, A., Polyzos, K. A., Ketelhuth, D. F. J., & Hansson, G. K. (2017). Hypercholesterolemia Induces Differentiation of Regulatory T Cells in the Liver. *Circ Res*, 120(11), 1740-1753.

<https://doi.org/10.1161/circresaha.116.310054>

Mandal, J. P., Shiue, C.-N., Chen, Y.-C., Lee, M.-C., Yang, H.-H., Chang, H.-H., Hu, C.-T., Liao, P.-C., Hui, L.-C., You, R.-I., & Wu, W.-S. (2021). PKC δ mediates mitochondrial ROS generation and oxidation of HSP60 to relieve RKIP inhibition on MAPK pathway for HCC progression. *Free Radical Biology and Medicine*, 163, 69-87.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.12.003>

Martínez-González, M. A., Gea, A., & Ruiz-Canela, M. (2019). The Mediterranean Diet and Cardiovascular Health. *Circ Res*, *124*(5), 779-798.

<https://doi.org/10.1161/circresaha.118.313348>

Martorell, M., Capó, X., Bibiloni, M. M., Sureda, A., Mestre-Alfaro, A., Batle, J., Llompart, I., Tur, J., & Pons, A. (2015). Docosahexaenoic acid supplementation promotes erythrocyte antioxidant defense and reduces protein nitrosative damage in male athletes. *Lipids*, *50*(2), 131-148.

Mercanligil, S. M., Arslan, P., Alasalvar, C., Okut, E., Akgül, E., Pinar, A., Geyik, P. O., Tokgözoğlu, L., & Shahidi, F. (2007). Effects of hazelnut-enriched diet on plasma cholesterol and lipoprotein profiles in hypercholesterolemic adult men.

Eur J Clin Nutr, *61*(2), 212-220. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602518>

MINSAL. (2000). Dislipidemias. *Ministerio de Salud de Chile (MINSAL)*.

<https://www.minsal.cl/portal/url/item/75fetc3f8128c9dde04001011f0178d6.pdf>

MINSAL. (2017a). Encuesta Nacional de Salud (ENS) 2016-2017. *Ministerio de Salud de Chile (MINSAL)*.

MINSAL. (2017b). Mes del Corazón 2017. *Ministerio de Salud de Chile (MINSAL)*, Disponible en: <https://www.minsal.cl/mes-del-corazon-2017/>.

MINSAL. (2018). Orientación Clínica Dislipidemias. *Ministerio de Salud de Chile (MINSAL)*.

Miriyala, S., Spasojevic, I., Tovmasyan, A., Salvemini, D., Vujaskovic, Z., St Clair, D., & Batinic-Haberle, I. (2012). Manganese superoxide dismutase, MnSOD and its mimics. *Biochim Biophys Acta*, 1822(5), 794-814.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.12.002>

Montserrat-Mesquida, M., Quetglas-Llabrés, M., Bouzas, C., Montemayor, S., Mascaró, C. M., Casares, M., Llompарт, I., Ugarriza, L., Martínez, J. A., Tur, J. A., & Sureda, A. (2022). Increased Adherence to the Mediterranean Diet after Lifestyle Intervention Improves Oxidative and Inflammatory Status in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Antioxidants (Basel)*, 11(8).
<https://doi.org/10.3390/antiox11081440>

Moráis López, A., Lama More, R. A., & Dalmau Serra, J. (2009). Hipercolesterolemia. Abordaje terapéutico. *Anales de Pediatría*, 70(5), 488-496.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2009.02.005>

Nakamura, M. T., Yudell, B. E., & Loor, J. J. (2014). Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. *Prog Lipid Res*, 53, 124-144.
<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.12.001>

Oliver, P., Reynés, B., Caimari, A., & Palou, A. (2013). Peripheral blood mononuclear cells: a potential source of homeostatic imbalance markers associated with obesity development. *Pflugers Arch*, 465(4), 459-468.
<https://doi.org/10.1007/s00424-013-1246-8>

OMS. (2017). Enfermedades cardiovasculares. *Organización Mundial de la Salud (OMS)*, Disponible en: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)).

OMS. (2020). Las 10 principales causas de defunción. *Organización Mundial de la Salud (OMS)*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>

Orecchioni, M., Ghosheh, Y., Pramod, A. B., & Ley, K. (2019). Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages. *Front Immunol*, 10, 1084. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01084>

Orem, A., Yucesan, F. B., Orem, C., Akcan, B., Kural, B. V., Alasalvar, C., & Shahidi, F. (2013). Hazelnut-enriched diet improves cardiovascular risk biomarkers beyond a lipid-lowering effect in hypercholesterolemic subjects. *J Clin Lipidol*, 7(2), 123-131. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2012.10.005>

Perna, S., Giacosa, A., Bonitta, G., Bologna, C., Isu, A., Guido, D., & Rondanelli, M. (2016). Effects of Hazelnut Consumption on Blood Lipids and Body Weight: A Systematic Review and Bayesian Meta-Analysis. *Nutrients*, 8(12). <https://doi.org/10.3390/nu8120747>

Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem*, 30(1), 11-26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>

Pino Ramos, L. L., Jiménez-Aspee, F., Theoduloz, C., Burgos-Edwards, A., Domínguez-Perles, R., Oger, C., Durand, T., Gil-Izquierdo, Á., Bustamante, L., Mardones, C., Márquez, K., Contreras, D., & Schmeda-Hirschmann, G. (2019). Phenolic, oxylipin and fatty acid profiles of the Chilean hazelnut (*Gevuina avellana*): Antioxidant activity and inhibition of pro-inflammatory and metabolic syndrome-associated enzymes. *Food Chem*, 298, 125026.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125026>

Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem*, 97, 55-74.

<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>

Proto, J. D., Doran, A. C., Subramanian, M., Wang, H., Zhang, M., Sozen, E., Rymond, C. C., Kuriakose, G., D'Agati, V., Winchester, R., Sykes, M., Yang, Y. G., & Tabas, I. (2018). Hypercholesterolemia induces T cell expansion in humanized immune mice. *J Clin Invest*, 128(6), 2370-2375.

<https://doi.org/10.1172/jci97785>

Putnam, C. D., Arvai, A. S., Bourne, Y., & Tainer, J. A. (2000). Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *J Mol Biol*, 296(1), 295-309. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3458>

Ramasamy, I. (2014). Recent advances in physiological lipoprotein metabolism. *Clin Chem Lab Med*, 52(12), 1695-1727. <https://doi.org/10.1515/cclm-2013-0358>

Ramón, J., Cruz, A., Dolores, M., & Porta, J. (2009). Protocolo de valoración de la composición corporal para el reconocimiento médico-deportivo. documento de consenso del grupo español de cineantropometría (grec) de la federación española de medicina del deporte (femedede). Versión 2010. *Arch. Med. Deporte*, 26, 166-179.

Raynor, H., & Wing, R. (2005). 20 - The effectiveness of popular diets: an overview. In D. J. Mela (Ed.), *Food, Diet and Obesity* (pp. 412-430). Woodhead Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1533/9781845690540.3.412>

Real, J. T., & Ascaso, J. F. (2021). Lipid metabolism and classification of hyperlipaemias. *Clin Investig Arterioscler*, 33 Suppl 1, 3-9. <https://doi.org/10.1016/j.arteri.2020.12.008> (Metabolismo lipídico y clasificación de las hiperlipemias.)

Real, J. T., & Ascaso, J. F. (2021). Metabolismo lipídico y clasificación de las hiperlipemias [10.1016/j.arteri.2020.12.008]. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*. <https://doi.org/10.1016/j.arteri.2020.12.008>

Reynés, B., Díaz-Rúa, R., Cifre, M., Oliver, P., & Palou, A. (2015). Peripheral blood mononuclear cells as a potential source of biomarkers to test the efficacy of weight-loss strategies. *Obesity (Silver Spring)*, 23(1), 28-31. <https://doi.org/10.1002/oby.20918>

Reynés, B., García-Ruiz, E., Palou, A., & Oliver, P. (2016). The intake of high-fat diets induces an obesogenic-like gene expression profile in peripheral blood

mononuclear cells, which is reverted by dieting. *Br J Nutr*, 115(11), 1887-1895.

<https://doi.org/10.1017/s0007114516001173>

Rosenbaum, M. A., Miyazaki, K., & Graham, L. M. (2012). Hypercholesterolemia and oxidative stress inhibit endothelial cell healing after arterial injury. *J Vasc Surg*, 55(2), 489-496.

<https://doi.org/10.1016/j.jvs.2011.07.081>

Sies, H. (2015). Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine.

Redox Biol, 4, 180-183. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>

Silva, C., Santa, C., Anjo, S. I., & Manadas, B. (2016). A reference library of peripheral blood mononuclear cells for SWATH-MS analysis. *Proteomics Clin Appl*, 10(7), 760-764.

<https://doi.org/10.1002/prca.201600070>

Su, L.-J., Zhang, J.-H., Gomez, H., Murugan, R., Hong, X., Xu, D., Jiang, F., & Peng, Z.-Y. (2019). Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 5080843.

<https://doi.org/10.1155/2019/5080843>

Sun, L., Wang, X., Saredy, J., Yuan, Z., Yang, X., & Wang, H. (2020). Innate-adaptive immunity interplay and redox regulation in immune response. *Redox Biol*, 37, 101759.

<https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101759>

Tall, A. R., & Yvan-Charvet, L. (2015). Cholesterol, inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 15(2), 104-116. <https://doi.org/10.1038/nri3793>

Tan, B. L., Norhaizan, M. E., & Liew, W. P. (2018). Nutrients and Oxidative Stress: Friend or Foe? *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 9719584. <https://doi.org/10.1155/2018/9719584>

Taşlı, P. N. (2022). Usage of celery root exosome as an immune suppressant; Lipidomic characterization of apium graveolens originated exosomes and its suppressive effect on PMA/ionomycin mediated CD4(+) T lymphocyte activation. *J Food Biochem*, 46(12), e14393. <https://doi.org/10.1111/jfbc.14393>

Tey, S. L., Gray, A. R., Chisholm, A. W., Delahunty, C. M., & Brown, R. C. (2013). The dose of hazelnuts influences acceptance and diet quality but not inflammatory markers and body composition in overweight and obese individuals. *J Nutr*, 143(8), 1254-1262. <https://doi.org/10.3945/jn.113.174714>

Tosti, V., Bertozzi, B., & Fontana, L. (2018). Health Benefits of the Mediterranean Diet: Metabolic and Molecular Mechanisms. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 73(3), 318-326. <https://doi.org/10.1093/gerona/glx227>

Tran, H. T. T., Herz, C., Ruf, P., Stetter, R., & Lamy, E. (2018). Human T2R38 Bitter Taste Receptor Expression in Resting and Activated Lymphocytes. *Front Immunol*, 9, 2949. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02949>

Vandemoortele, A., Babat, P., Yakubu, M., & De Meulenaer, B. (2020). Behavior of Malondialdehyde and Its Whey Protein Adducts during In Vitro Simulated Gastrointestinal Digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(42), 11846-11854. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c03947>

Vaquero-Raya, E. C., & Molero-Richard, X. (2005). Especies reactivas de oxígeno en las enfermedades inflamatorias del páncreas: ¿una posible diana terapéutica? *Gastroenterología y Hepatología*, 28(8), 473-484. <https://doi.org/https://doi.org/10.1157/13078997>

Videla, L. A., Hernandez-Rodas, M. C., Metherel, A. H., & Valenzuela, R. (2022). Influence of the nutritional status and oxidative stress in the desaturation and elongation of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids: Impact on non-alcoholic fatty liver disease. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 181, 102441. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2022.102441>

Wang, Y., Branicky, R., Noë, A., & Hekimi, S. (2018). Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J Cell Biol*, 217(6), 1915-1928. <https://doi.org/10.1083/jcb.201708007>

Wolf, D., & Ley, K. (2019). Immunity and Inflammation in Atherosclerosis. *Circ Res*, 124(2), 315-327. <https://doi.org/10.1161/circresaha.118.313591>

Yang, Y., Bazhin, A. V., Werner, J., & Karakhanova, S. (2013). Reactive oxygen species in the immune system. *Int Rev Immunol*, 32(3), 249-270. <https://doi.org/10.3109/08830185.2012.755176>

Zhang, S., Li, L., Chen, W., Xu, S., Feng, X., & Zhang, L. (2021). Natural products: The role and mechanism in low-density lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Phytother Res*, 35(6), 2945-2967. <https://doi.org/10.1002/ptr.7002>

Zhao, H., Zhang, R., Yan, X., & Fan, K. (2021). Superoxide dismutase nanozymes: an emerging star for anti-oxidation. *J Mater Chem B*, 9(35), 6939-6957. <https://doi.org/10.1039/d1tb00720c>

Zhu, Y., Xian, X., Wang, Z., Bi, Y., Chen, Q., Han, X., Tang, D., & Chen, R. (2018). Research Progress on the Relationship between Atherosclerosis and Inflammation. *Biomolecules*, 8(3). <https://doi.org/10.3390/biom8030080>

7. ANEXOS

7.1. Consentimiento informado



CONSENTIMIENTO INFORMADO

Proyecto 11190641. FONDECYT de Iniciación en investigación 2019

Título del Proyecto: Efectos de una dieta chilena suplementada con avellana chilena (*Gevuina avellana*) sobre el perfil lipídico en humanos con hipercolesterolemia [Effects of a Chilean diet supplemented with *Gevuina avellana* on lipid profile in hypercholesterolemic subjects]

Investigador responsable: Miquel Martorell Pons, Bioquímico. Departamento de Nutrición y Dietética, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, Concepción.

El propósito de este documento es invitarlo a participar a un proyecto de investigación y entregarle toda la información necesaria para que Ud. pueda decidir libre y voluntariamente si desea participar en la investigación que se le ha explicado verbalmente, y que a continuación se describe en forma resumida.

Objetivo: determinar el efecto sobre el perfil lipídico de una dieta chilena suplementada con avellana chilena a través de una intervención intensiva versus una dieta baja en grasas. Además, se va a evaluar el efecto de las intervenciones sobre la composición corporal, presión arterial, cambios en el perfil de ácidos grasos de glóbulos rojos, y marcadores de capacidad antioxidante, daño oxidativo e inflamación en sangre.

Para lograr dicho objetivo, se hace necesario realizar un estudio de 6 meses de duración, en voluntarios entre 18-60 años de edad, con colesterol elevado (> 200 mg/dL), sin alergias a los frutos secos, sin tratamiento médico asociado, ni enfermedades sistémicas como diabetes, hipertensión, enfermedad renal o hepática, no estar embarazada o lactando, que un miembro de su hogar o familiar directo haya sido previamente reclutado en este estudio, tener implante electrónico como marcapasos o prótesis activa, tengan ambas dosis incluidas en la campaña de vacunación SARS-Cov-2 y cuenten con su respectivo pase de movilidad. Es necesario recolectar información personal, que sólo usted nos puede proporcionar y son fundamentales para el desarrollo de esta intervención.

Una vez ingresado al estudio usted será asignado a un grupo control (dieta baja en grasas) o a un grupo experimental (dieta chilena suplementada con avellana chilena). Independientemente del grupo al que sea asignado, como voluntario deberá comprometerse en seguir las pautas nutricionales indicadas, mantener su rutina diaria, actividad física y hábitos de estilo de vida, y asistir a las diferentes actividades presenciales y virtuales donde se le pedirá información personal, de consumo de alimentos, hábitos de vida, y se tomarán mediciones de peso corporal, talla, composición corporal, presión arterial y recolectaran muestras sanguíneas en ayuno: capilar (una gota) y venosa braquial (40 mL, 4 cucharadas soperas, mediante punción de brazo derecho u izquierdo con aguja hipodérmica, al inicio y final del estudio).

BENEFICIOS Y RIESGOS.

Participar del presente estudio le permitirá **beneficiarse** con un seguimiento nutricional individualizado a cargo de una nutricionista, obteniendo información detallada sobre cómo seguir una dieta saludable. Si queda seleccionado en el grupo avellana, se le entregarán gratuitamente 30 gramos de avellana chilena para su consumo diario.

La obtención de la muestra de sangre estará a cargo de una enfermera y si bien es un procedimiento de rutina puede haber ciertos **riesgos**. Antes de la obtención de la muestra de sangre venosa, para corroborar criterio de inclusión de colesterol elevado (> 200 mg/dL), se obtendrá una gota de sangre capilar. Lo anterior puede ocasionar molestia, dolor o hematoma al extraer sangre capilar debido a la punción realizada en la zona del costado de un dedo (utilizando lanceta de diámetro fino). En la obtención de muestra sanguínea venosa en algunos casos se puede presentar sensación de mareo, un leve sangramiento que deberá pasar dentro de los primeros minutos y en muy pocos casos existe riesgo leve de formar un pequeño hematoma (moretón) que desaparecerá en dos días aproximadamente. Puede quedar una sensación de dolor que pasará en los primeros minutos. Riesgos personalizados: se consultará si el individuo(a) está con tratamiento anticoagulante para evitar riesgos de sangramiento y en



aquellos casos se observará por más de 5 minutos la formación del tapón plaquetario y cese de sangrado en el brazo del paciente. Sujetos que indiquen desmayos anteriores, serán tratados con mayor cuidado con personal de asistencia en caso de un eventual desmayo. Se podrían presentar alergias alimentarias al incluir nuevos alimentos en la dieta, tales como urticaria, tos, inflamación de las vías respiratorias y molestias gástricas. Si presenta alguna de estos síntomas deberá ponerse en contacto con el investigador responsable.

Existe el riesgo de contagio por COVID 19, por lo anterior los procedimientos que se realicen en forma presencial, además de observar los protocolos y procedimientos por el Comité de Crisis de la Universidad de Concepción y estar condicionados a la respectiva autorización, se realizarán bajo estricto cumplimiento de las Recomendaciones sobre aseo y desinfección de superficies ambientales para la prevención de Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (IAAS) – COVID 19.

Se minimizará el riesgo del mal uso de la información privada, para ello es importante señalar que todos los datos personales obtenidos son confidenciales y la información obtenida será utilizada exclusivamente para fines científicos. Esta información será custodiada por el investigador responsable, Miquel Martorell, quien mantendrá los registros de datos en archivos pertenecientes al proyecto de investigación, y el anonimato será resguardado entregando un número correlativo a su nombre. Los resultados obtenidos de este estudio serán publicados en revistas y reuniones científicas, manteniendo en confidencialidad la identidad de los participantes.

Para cumplir el objetivo propuesto, **es necesario que usted participe durante los 6 meses del estudio de manera activa y responsable, realizando todas las actividades que se detallan a continuación:**

1. Visita de elegibilidad (1 h): explicación proyecto, firma consentimiento informado, realización cuestionarios elegibilidad, obtención muestra capilar, obtención muestra sanguínea venosa, medición presión arterial y mediciones antropométricas (peso, talla, circunferencia cintura y bioimpedancia eléctrica) a realizar en Laboratorio Clínico PreveGen Ltda. Si usted no cumple con algún criterio de elegibilidad quedará fuera del estudio. Si es elegido, se programará reunión virtual individualizada para realización de cuestionarios (control inicial).
2. Control inicial, 2 y 4 (meses 0, 2 y 4 del estudio, 1 h): realización de cuestionarios y educación alimentaria mediante entrevista individual virtual.
3. Sesiones grupales a los meses 1, 3 y 5 del estudio (40 min): educación alimentaria grupal virtual.
4. Durante los 6 meses del estudio usted deberá seguir los consejos de adhesión a la dieta. Si es seleccionado en el grupo experimental, usted deberá consumir 30 gramos al día de avellana chilena, la cual se entregará gratuitamente.
5. Control 6 presencial (mes 6 del estudio, 30 min): obtención de muestra sanguínea, medición de presión arterial y mediciones antropométricas (peso, talla, circunferencia cintura y bioimpedancia eléctrica) a realizar en Laboratorio Clínico PreveGen Ltda.
6. Control 6 virtual (40 min): realización de cuestionarios mediante entrevista individual virtual.

Cabe mencionar, que la participación en el estudio está exenta de compensación económica.

Los resultados estarán disponibles para usted, y para ello debe comunicarse con el investigador responsable.

A su vez destacar que su participación es completamente libre y voluntaria. Si no desea participar del presente proyecto de investigación su negativa no traerá ninguna consecuencia para usted. De la misma manera si lo estima conveniente usted puede dejar de participar en el estudio en cualquier momento de éste.

Adicionalmente, el investigador responsable Miquel Martorell, correo electrónico mmartorell@udec.cl y número de contacto +569 5763 1466, le manifiesta su voluntad en orden a aclarar cualquier duda que le surja sobre su participación en la actividad realizada. Para consultas sobre sus derechos puede contactar al Presidente Comité Ético Científico S. S. Concepción, teléfono (41) 272 2745, dirección San Martín 1436, Concepción.



FONDECYT
Fondo Nacional de Desarrollo
Científico y Tecnológico



PreveGen
INNOVACIÓN Y PREVENCIÓN EN SALUD



Universidad
de Concepción



Facultad
de Farmacia



CÓDIGO: _____

HOJA DE FIRMAS DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

TÍTULO DEL ESTUDIO: Efectos de una dieta chilena suplementada con avellana chilena (*Gevuina avellana*) sobre el perfil lipídico en humanos con hipercolesterolemia.

[Effects of a Chilean diet supplemented with *Gevuina avellana* on lipid profile in hypercholesterolemic subjects]

ANTES DE FIRMAR, CONFIRMO QUE:

- He sido informado sobre el proyecto de intervención a desarrollar previamente a su aplicación y con la descripción necesaria para conocerlas en un nivel suficiente.
- He sido también informado en forma previa a la intervención, que los procedimientos que se realicen, no implican un costo que yo deba asumir. Junto a ello he recibido una explicación satisfactoria sobre el propósito de la actividad.
- Acepto que la información necesaria obtenida sea recopilada, utilizada y divulgada conforme a lo descrito en esta información escrita para mí y formulario de consentimiento informado.
- Acepto que las muestras queden almacenadas en un biobanco anonimizado para futuras determinaciones.
- Estoy en pleno conocimiento que la información obtenida con la actividad en la cual participaré, será absolutamente confidencial, y que no aparecerá mi nombre ni mis datos personales en libros, revistas y otros medios de difusión derivadas de la investigación ya descrita.
- Sé que la decisión de participar en esta investigación, es absolutamente libre y voluntaria. Si no deseo participar en ella o, una vez iniciada la investigación, no deseo proseguir colaborando, puedo hacerlo sin problemas. En ambos casos, se me asegura que mi negativa no implicará ninguna consecuencia negativa para mí.
- He leído el documento, entiendo las declaraciones contenidas en él y la necesidad de hacer contar mi consentimiento, para lo cual lo firmo libre y voluntariamente, recibiendo en el acto, copia de este documento ya firmado y fechado.
- Mis preguntas han sido respondidas a mi entera satisfacción y considero que comprendo toda la información proporcionada acerca del estudio.
- Sé que al firmar este documento, no renuncio a ninguno de mis derechos legales.

Nombre del participante Firma del participante Fecha (DD/MM/AAA)

Yo, el que suscribe, investigador, confirmo que he entregado verbalmente la información necesaria acerca del estudio, que he contestado toda duda adicional y que no ejercí presión alguna para que el participante ingrese al estudio.

Declaro que procedí en completo acuerdo con los principios éticos descritos en las Directrices de GCP (Buenas Prácticas Clínicas) y otras leyes nacionales e internacionales vigentes.

Se le proporcionará al paciente una copia de esta información escrita para el participante y formulario de consentimiento firmado.

Nombre investigador Firma investigador Fecha (DD/MM/AAA)

Nombre Ministro de fe Firma Ministro de fe Fecha (DD/MM/AAA)

7.2. Encuesta de caracterización biosociodemográfica

Estudio PRODICHI
Anexo 2.2
Encuesta de caracterización



FONDECYT
Fondo Nacional de Desarrollo
Científico y Tecnológico



PreveGen
INNOVACIÓN Y PREVENCIÓN EN SALUD



Universidad de Concepción



Facultad
de Farmacia



N° Folio

Encuestador:

INTRUCCIONES DE LLENADO

1. Completar con letra imprenta, legible y con lápiz pasta.
2. Revisar que todas las preguntas tengan una respuesta válida antes de finalizar la encuesta.
3. Recuerde que el entrevistado debe tener carta de presentación del estudio y consentimiento informado.
4. En cada pregunta, lea todas las alternativas de respuesta y anote la respuesta que señale el entrevistado.

DATOS ENCUESTADOR

Nombre encuestador(a) completo _____ Rut _____
 Correo electrónico _____ Teléfono _____
 Fecha de aplicación de la encuesta / / Hora de inicio
 Hora de Término

DATOS ENTREVISTADO

Nombres del entrevistado(a) _____ Rut _____
 Apellidos _____ Edad Años
 Teléfono 1 _____
 Sexo 1 Hombre 2 Mujer Teléfono 2 _____
 Correo electrónico _____
 Dirección Laboral _____
 Dirección Personal _____ Comuna _____

MÓDULO1 CARACTERIZACIÓN DEL ENTREVISTADO

A continuación le voy a realizar algunas preguntas generales sobre usted y su grupo familiar.

Nota: Marcar en el recuadro el número que corresponda

| 1.1 ¿Cuál es su estado civil actual? | |
|--------------------------------------|---|
| Casado(a) | 1 |
| Conviviente | 2 |
| Divorciado(a) | 3 |
| Viudo(a) | 4 |
| Soltero(a) | 3 |

| 1.2 ¿Cuántas personas viven en su hogar? | N° de personas |
|--|----------------|
| Niños menores de 5 años | A |
| Niños mayores de 5 años | B |
| Adultos | C |
| Adultos Mayores | D |

| 1.3 ¿Cuál fue su último nivel de estudios? | |
|--|---|
| Básica incompleta | 1 |
| Básica completa | 2 |
| Técnica superior incompleta | 3 |
| Técnica superior completa | 4 |
| Universitaria incompleta | 5 |
| Universitaria completa | 6 |
| Postgrado | 7 |

| 1.4 ¿Cuál es la ocupación de los miembros de su hogar? | N° de personas |
|--|----------------|
| Estudiantes sin trabajo remunerado | |
| Estudiantes con trabajo remunerado | |
| Trabajador remunerado | |
| Pensionado o jubilado | |
| Trabajo no remunerado | |

Anotar total con trabajo remunerado

| 1.5 ¿Cuál es su sistema previsional de salud ? | |
|--|---|
| FONASA | A |
| FFAA y de Orden | E |
| ISAPRE | F |

| 1.6 ¿Cuál es aproximadamente el ingreso mensual de su grupo familiar | |
|--|---|
| \$215.000 a \$291.999 | 1 |
| \$292.000 a \$378.999 | 2 |
| \$379.000 a \$473.999 | 3 |
| \$474.000 a \$598.999 | 4 |
| \$599.000 a \$753.999 | 5 |
| \$754.000 a \$1.015.999 | 6 |
| \$1.016.000 a \$1.551.999 | 7 |
| \$1.552.000 o más | 8 |
| No sabe No responde | 9 |