



Estudio piloto sobre la expresión de genes relacionados con el proceso de meta-inflamación en células mononucleares de sangre periférica de adultos jóvenes luego de una intervención nutricional con frutas

Jhonny Eddison Vargas Hernández

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Maestría en Genética Humana
Bogotá, Colombia
2016

Estudio piloto sobre la expresión de genes relacionados con el proceso de meta-inflamación en células mononucleares de sangre periférica de adultos jóvenes luego de una intervención nutricional con frutas

Jhonny Eddison Vargas Hernández

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título
de:

Magister en Genética Humana

Director:

M.Sc. Mauricio Rey Buitrago

Línea de Investigación:

Genética y medioambiente

Grupo de Investigación:

Genética Clínica

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Maestría en Genética Humana

Bogotá, Colombia

2016

Un día tuve una visión, luego trabajé por ella y la hice realidad, sin ser plenamente consciente de lo acontecido me di cuenta que la vida que se lleva siguiendo lo que el corazón y la mente dictan constituye lo que solemos buscar a diario en nuestros sueños.

Anónimo

Agradecimientos

Esta investigación fue culminada con éxito gracias a la voluntad de Dios y al apoyo incondicional de mis seres amados. Por otro lado, deseo agradecer de manera especial a mi director de tesis, profesor Mauricio Rey Buitrago, por su absoluto compromiso con mi proceso de formación, por tener plena confianza en lo que yo podía aportar a la ciencia a pesar de mis diversas limitaciones y, particularmente, por ser un indudable ejemplo como persona. Adicionalmente, deseo manifestar mi sincera gratitud a las siguientes personas cuyos aportes fueron importantes para este trabajo:

- A cada uno de los voluntarios(as) que participaron, por el gran interés y empeño que pusieron a cada una de las actividades que fueron requeridas en el estudio.
- A mis amigas *Liza, Milena, Melissa, Leandra, Samantha y Ángela*, así como a mis demás compañeros de la maestría, por brindarme siempre su valiosa ayuda y por motivarme a seguir adelante cuando surgieron obstáculos.
- A Mireyita por todas las gestiones, académicas y personales, las cuales siempre llevó a cabo de manera impecable y con una destacable disposición.
- A la profesora Clara Arteaga por su gran apoyo y por sus valiosos consejos.
- A los profesores Harvy Velazco, Edgar Garavito, William Usaquen, Juan Yunis, Alejandro Chaparro, Carlos Guerrero, Luis Gómez y Orlando Acosta, por cada una de sus enseñanzas y contribuciones.
- Al profesor Luis Fernando Cadavid, así como a Henry y Diego, por su enorme colaboración en la fase experimental de la investigación.
- A la Universidad, por su apoyo económico al proyecto a través de la *“Convocatoria del programa nacional de proyectos para el fortalecimiento de la investigación, la creación y la innovación en posgrados de la Universidad Nacional de Colombia 2013-2015”*.
- A la Fundación Juan Pablo Gutiérrez Cáceres por el apoyo para la culminación exitosa de mi formación como investigador.

Resumen

Objetivo. La presente investigación pretendió evaluar el efecto del consumo de la cantidad recomendada frutas enteras sobre la expresión de mRNA de genes potencialmente vinculados con un proceso que parece ser común dentro de la fisiopatología de las enfermedades crónicas no transmisibles denominado *meta-inflamación*.

Metodología. Los voluntarios seleccionados para el estudio diligenciaron un instrumento de frecuencia de consumo de alimentos y un cuestionario general de salud, tras lo cual fueron asignados a uno de dos grupos de estudio: intervención o control. Los individuos de cada grupo recibieron un desayuno de prueba para la realización de un ensayo agudo. Posteriormente, a los sujetos del grupo intervención se les suministró $\pm 400\text{g/d}$ de frutas enteras por un periodo de 15 días, durante el cual los sujetos del grupo control mantuvieron su dieta habitual. Dentro del tiempo de tratamiento se obtuvo un conjunto de muestras de sangre periférica de los voluntarios, las cuales fueron empleadas para la determinación de la concentración de algunos marcadores bioquímicos básicos y para la estimación del nivel de expresión de los genes *TNFR*, *IL1R*, *IL6R*, *TLR2*, *TLR4* y *NFκB*.

Resultados. La expresión de los genes *NFκB*, *IL6R* y *TLR2* fue diferencial respecto de la frecuencia de consumo de alimentos de los grupos *frutas enteras* y *lácteos y/o derivados*, además, la expresión del gen *NFκB* vario significativamente de acuerdo al nivel de estrés auto-reportado por los voluntarios. El ensayo agudo no evidenció ningún efecto de la ingesta de los desayunos sobre la expresión de los genes analizados. Finalmente, el tratamiento con frutas enteras por 15 días indujo cambios significativos en los niveles de expresión de los genes *NFκB* e *IL6R*, además, modificó significativamente la concentración sérica de glicemia, colesterol total y colesterol HDL.

Conclusión. En esta investigación se evidenció que la expresión de genes potencialmente relacionados con el proceso de *meta-inflamación* vario significativamente de acuerdo al comportamiento de algunas variables del estilo de vida. Además, en este estudio se

demostró, por primera vez, que la intervención *in vivo* en humanos con una cantidad de frutas enteras equivalente a aquella sugerida por la medida en salud pública influyó la expresión de genes clave en el proceso de meta-inflamación, lo cual puede ser de gran importancia en términos de la salud humana.

Palabras clave: *frutas, inflamación, expresión génica*

Abstract

Objective. The present research aimed to evaluate the effect of consumption of whole fruits on the mRNA expression of genes potentially linked to a process that appears to be common within the pathophysiology of chronic non-communicable diseases called *meta-inflammation*.

Methodology. Research participants completed a food consumption frequency instrument and a general health questionnaire, after which they were assigned to a study groups: intervention or control. Individuals in each group received a test breakfast for an acute trial. Subsequently, subjects in the intervention group were given $\pm 400\text{g/d}$ whole fruits for 15 days while the individuals in the control group maintained their usual diet during this period. A set of peripheral blood samples were obtained from the individuals during the treatment period, in which the concentration of some basic biochemical markers as well as the expression levels of the *TNFR*, *IL1R*, *IL6R*, *TLR2*, *TLR4* and *NF κ B* genes were determined.

Results. The expression of the *NF κ B*, *IL6R* and *TLR2* genes was differential respect to the habitual intake of *whole fruits* and *dairy products*, in addition, the expression of the *NF κ B* gene varied significantly according to the level of self-reported stress by the volunteers. The acute trial did not show any effect of the intake of the test breakfasts on the expression of the genes analyzed. Finally, the treatment with whole fruits for 15 days induced significant changes in the expression levels of the *NF κ B* and *IL6R* genes, in addition, this intervention significantly modified the seric concentration of glycemia, total cholesterol and HDL cholesterol.

Conclusion. In this research it was evidenced that the expression of genes potentially related to the meta-inflammation process significantly varied according to the behavior of some lifestyle variables. Moreover, this study demonstrated, for the first time, that *in vivo* human intervention with an amount of whole fruits, equivalent to the recommended quantity

of fruits and vegetables suggested in the public health measure, considerably influenced the expression of key genes in the meta-inflammation process.

Key words: *fruits, inflammation, gene expression*

Contenido

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	3
2. OBJETIVOS	6
2.1 GENERAL	6
2.2 ESPECÍFICOS	6
3. MARCO REFERENCIAL	7
3.1 GENÓMICA NUTRICIONAL	7
3.2 EXPRESIÓN GÉNICA.....	8
3.3 ALIMENTACIÓN, NUTRICIÓN Y SALUD HUMANA	11
3.4 META-INFLAMACIÓN Y SALUD HUMANA	12
3.5 FRUTAS Y SALUD HUMANA	14
3.6 ESTADO DEL ARTE: ALIMENTACIÓN, NUTRICIÓN Y EXPRESIÓN DE RNA EN HUMANOS	17
3.6.1 <i>Consideraciones</i>	17
3.6.2 <i>Evidencia científica reciente</i>	18
4. ASPECTOS METODOLÓGICOS	21
4.1 TIPO DE ESTUDIO, POBLACIÓN Y MUESTRA	21
4.2 DISEÑO EXPERIMENTAL	21
4.2.1 <i>Selección de los sujetos de estudio</i>	21
4.2.2 <i>Instrumentos de captura de la información empleados en la investigación</i> ...	23
4.2.3 <i>Selección de las frutas suministradas en la investigación</i>	26
4.2.4 <i>Intervención nutricional</i>	27
4.3 ASPECTO TÉCNICOS.....	31
4.3.1 <i>Toma de medidas antropométricas</i>	31
4.3.2 <i>Obtención y procesamiento de las muestras biológicas</i>	32
4.3.3 <i>Aislamiento de las células mononucleares</i>	33
4.3.4 <i>Extracción de RNA total</i>	34

4.3.5	<i>Reacción de transcripción reversa (RT)</i>	35
4.3.6	<i>Cebadores (primers) empleados en la investigación</i>	36
4.3.7	<i>Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)</i>	37
4.4	PROCESAMIENTO DE DATOS	41
4.4.1	<i>Variables evaluadas en la investigación</i>	41
4.4.2	<i>Pruebas estadísticas empleadas en la investigación</i>	44
5.	RESULTADOS	46
5.1	DESCRIPCIÓN DE LOS SUJETOS DE ESTUDIO	46
5.2	COMPORTAMIENTO DE LOS FACTORES NORMALIZADORES DE LA TASA DE EXPRESIÓN RELATIVA DE LOS GENES DE INTERÉS	48
5.3	PARTICULARIDADES DE LOS GENES <i>IL1R</i> Y <i>TLR4</i> EN LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS DE ESTUDIO	51
5.4	COMPORTAMIENTO DE LOS GENES DE INTERÉS EN LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS RESPECTO DE LAS DISTINTAS VARIABLES DE ESTUDIO	52
5.4.1	<i>Variables de salud y antropométricas</i>	52
5.4.2	<i>Variables de consumo</i>	54
5.4.3	<i>Variables bioquímicas</i>	56
5.5	EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON FRUTAS SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE INTERÉS EN LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS DE ESTUDIO	58
5.5.1	<i>Correlación entre las tasas de expresión de los genes de interés antes y después de la intervención nutricional</i>	58
5.5.2	<i>Diferencias en las tasas de expresión de los genes de interés luego de la ingesta de los desayunos de prueba</i>	59
5.5.3	<i>Diferencias en las tasas de expresión de los genes de interés antes y después de la intervención nutricional con frutas</i>	60
6.	DISCUSIÓN	64
7.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	73
7.1	CONCLUSIONES	73
7.2	RECOMENDACIONES	74

Lista de figuras

Figura 1. Procedimiento de asignación de los individuos a los grupos de estudio	28
Figura 2. Esquema de las etapas de la fase de intervención nutricional de la investigación	29
Figura 3. Esquema del procedimiento utilizado para el aislamiento de las células mononucleares de las muestras de sangre periférica	34
Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa de los amplificadores de los genes de estudio	38
Figura 5. Esquema general de la distribución de las muestras biológicas de estudio dentro de las placas de reacción utilizadas en el ensayo de qPCR	40
Figura 6. Cq del gen de referencia <i>rRNA 18S</i> en las muestras biológicas de estudio.....	50
Figura 7. Cociente Cq de los genes de referencia en las muestras biológicas de estudio	50
Figura 8. Curva de fusión (melting) para los genes <i>IL1R</i> y <i>TLR4</i> en las muestras biológicas de estudio.....	51
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de los genes <i>IL1R</i> y <i>TLR4</i>	52
Figura 10. Tasa de expresión del gen <i>NFκB (RELA)</i> de acuerdo a la variable nivel de estrés en la muestra biológica basal	53
Figura 11. Tasa de expresión de los genes <i>IL6R</i> y <i>TLR2</i> en la muestra biológica basal según los terciles de consumo de frutas enteras	54
Figura 12. Tasa de expresión de los genes <i>IL6R</i> y <i>NFκB (RELA)</i> en la muestra biológica basal según los terciles de consumo de lácteos y derivados	55
Figura 13. Tasa de expresión de los genes <i>IL6R</i> y <i>TNFR</i> según los terciles de consumo de los grupos de alimentos RTP y CHLs	55
Figura 14. Comportamiento de las variables bioquímicas en las muestras biológicas basal e Int_B de los individuos del grupo intervención	56
Figura 15. Tasas de expresión de los genes de interés en la muestra biológica Int_A según el tipo de desayuno consumido por los voluntarios.....	60

Figura 16. Tasas de expresión de los genes de interés en las muestras biológicas de los individuos del grupo control.....	60
Figura 17. Tasas de expresión de los genes de interés en las muestras biológicas de los individuos grupo intervención.....	61
Figura 18. Tasas de expresión de los genes <i>IL6R</i> y <i>TNFR</i> en las muestras biológicas de estudio del grupo intervención para el tercer tercil de expresión génica en la muestra basal	62
Figura 19. Tasas de expresión del gen <i>NFκB (RELA)</i> en las muestras biológicas de estudio del grupo intervención de acuerdo a los terciles de expresión génica en la muestra basal	63

Lista de tablas

Tabla 1. Proceso de selección de los sujetos de estudio para la fase de intervención....	23
Tabla 2. Características de las fuentes utilizadas para la construcción del instrumento de frecuencia de consumo de alimentos	25
Tabla 3. Frutas suministradas en la fase de intervención de la investigación	27
Tabla 4. Características de los desayunos suministrados durante la intervención nutricional	30
Tabla 5. Componentes de la solución de transcripción reversa (RT)	36
Tabla 6. Características de los cebadores de cada uno de los genes de estudio	37
Tabla 7. Eficiencia de la amplificación de los genes de estudio en los ensayos de qPCR	39
Tabla 8. Componentes de la solución de reacción para el ensayo de qPCR	40
Tabla 9. Procedimiento para el cálculo de la puntuación (score) a partir de los datos obtenidos del instrumento de frecuencia de consumo de alimentos	43
Tabla 10. Comportamiento de las variables de salud en la muestra de individuos analizada	46
Tabla 11. Comportamiento de las variables antropométricas y bioquímicas en la muestra de individuos analizada	47
Tabla 12. Comportamiento del Cq de los genes de estudio en la muestra calibradora ...	49
Tabla 13. Matriz de correlación entre las tasas de expresión de los genes de interés en la muestra biológica basal y las variables antropométricas	53
Tabla 14. Matriz de correlación entre las variables bioquímicas y las tasas de expresión de genes de interés en las muestras biológicas basal e Int_B para cada uno de los grupos de estudio	57
Tabla 15. Matriz de correlación entre las tasas de expresión de los genes de interés en las muestras biológicas de cada uno de los grupos de tratamiento.....	58

Lista de cuadros

Cuadro 1. Criterios de inclusión y exclusión establecidos para la investigación	22
Cuadro 2. Pautas para la construcción de instrumentos de frecuencia de consumo de alimentos	24
Cuadro 3. Guía para el consumo de frutas durante la intervención nutricional	30
Cuadro 4. Variables evaluadas en la investigación	41
Cuadro 5. Pruebas estadísticas aplicadas en la investigación	44

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolo/Abreviatura	Término
A	
<i>ACTB</i>	Actin beta
<i>ADGRE1</i>	Adhesion G protein-coupled receptor E1
<i>ARTN</i>	Artemin
B	
<i>BMP2</i>	Bone morphogenetic protein 2
C	
°C	Grados centígrados
<i>CD36</i>	CD36 molecule
<i>cDNA</i>	Complementary deoxyribonucleid acid
<i>CHO</i>	Carbohidratos
<i>cm</i>	Centímetro
<i>CNV</i>	Copy number variation
<i>COL1A1</i>	Collagen type I alpha 1 chain
<i>COX2</i>	Cytochrome c oxidase subunit II
<i>Cq</i>	Quantitation cycle
<i>CRP</i>	C reactive protein
<i>CST2</i>	Cystatin SA
<i>CTSG</i>	Cathepsin G
<i>CXCL1</i>	C-X-C motif chemokine ligand 1
<i>CXCL10</i>	C-X-C motif chemokine ligand 10
D	
<i>DE</i>	Desviación estándar
<i>DGAT1</i>	Diacylglycerol O-acyltransferase 1
<i>DHA</i>	Docosahexaenoic acid
<i>dL</i>	Decilitro
<i>DNA</i>	Deoxyribonucleic acid
<i>DNasa</i>	Desoxirribonucleasa
<i>dNTP</i>	Deoxynucleotide triphosphate
E	
<i>EDTA</i>	Ethylenediaminetetraacetic acid
<i>ENSIN</i>	Encuesta nacional de la situación nutricional
<i>EPA</i>	Eicosapentaenoic acid
<i>ER</i>	Endoplasmic reticulum
<i>ERCC1</i>	Excision repair 1, endonuclease non-catalytic subunit
F	
<i>FAS</i>	Fatty acid synthase
<i>FASLG</i>	Fas ligand
<i>FGF9</i>	Fibroblast growth factor 9

Símbolo/Abreviatura	Término
G	
<i>g</i>	Gravedades
GC	Guanina-citosina
<i>gp130</i>	Interleukin 6 signal transducer
H	
HDL	High density lipoprotein
HSPG2	Heparan sulfate proteoglycan 2
HYAL1	Hyaluronoglucosaminidase 1
I	
ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1
<i>IκB</i>	I kappa B kinase
IL10	Interleukin 10
IL18	Interleukin 18
IL1B	Interleukin 1 beta
IL1R (IL1R1)	Interleukin 1 receptor type 1
IL1RAP	Interleukin 1 receptor accessory protein
IL6	Interleukin 6
IL6R	Interleukin 6 receptor
IL7	Interleukin 7
ILR	Interleukin receptor
IMC	Índice de masa corporal
<i>Int_A</i>	Muestra biológica del momento 2 del estudio
<i>Int_B</i>	Muestra biológica del momento 3 del estudio
K	
<i>Kg</i>	Kilogramo
L	
LA	Lipoic acid
LDL	Low density lipoprotein
<i>Let-7b</i>	MicroRNA let-7b
Log	Logaritmo
LXR	Liver X receptor
M	
<i>m</i>	Metro
<i>mg</i>	Miligramo
<i>min</i>	Minuto
<i>ml</i>	Mililitro
<i>miRNA (miR)</i>	Micro ribonucleic acid
<i>mRNA</i>	Messenger ribonucleic acid
<i>mTOR</i>	Mechanistic target of rapamycin
N	
NCBI	National Center for Biotechnology Information
<i>NFκB</i>	Nuclear factor kappa B
<i>NFκB (RELA)</i>	RELA proto-oncogene, NF-kB subunit
<i>ng</i>	Nanogramo
NMB	Neuromedin B
O	
OGG1	8-oxoguanine DNA glycosylase
OMS	Organización mundial de la salud

Símbolo/Abreviatura	Término
P	
<i>pb</i>	Pares de base
<i>PBS</i>	Phosphate buffered saline
<i>PLIN1</i>	Perilipin 1
<i>PON1</i>	Paraoxonase 1
<i>PPAR</i>	Peroxisome proliferator activated receptor
<i>PPARA</i>	Peroxisome proliferator activated receptor alpha
<i>PPARD</i>	Peroxisome proliferator activated receptor delta
<i>PPARγ</i>	Peroxisome proliferator activated receptor gamma
<i>pre-mRNA</i>	Precursor messenger ribonucleic acid
Q	
<i>qPCR</i>	Quantitative polymerase chain reaction
R	
<i>RNA</i>	Ribonucleic acid
<i>RNasa</i>	Ribonucleasa
<i>rpm</i>	Revoluciones por minuto
<i>rRNA</i>	Ribosomal ribonucleic acid
<i>rRNA 18S (RNA18S5)</i>	RNA, 18S ribosomal 5
<i>RT</i>	Reverse transcription
<i>RUNX2</i>	Runt related transcription factor 2
S	
<i>SDC1</i>	Syndecan 1
<i>s</i>	Segundo
<i>SNP</i>	Single nucleotide polymorphism
<i>SREBF2</i>	Sterol regulatory element binding transcription factor 2
<i>STR</i>	Short Tandem Repeat
T	
<i>TACR1</i>	Tachykinin receptor 1
<i>TFGα</i>	Transforming growth factor alpha
<i>TLR</i>	Toll like receptor
<i>TLR2</i>	Toll like receptor 2
<i>TLR4</i>	Toll like receptor 4
<i>TNF</i>	Tumor necrosis factor
<i>TNFR (TNFRSF1A)</i>	TNF receptor superfamily member 1A
<i>T_m</i>	Melting temperature
<i>TRAF3</i>	TNF receptor associated factor 3
<i>tRNA</i>	Transfer ribonucleic acid
U	
μ l	Microlitro
μ M	Micromolar
V	
<i>VNTR</i>	Variable Number of Tandem Repeats
<i>v/día</i>	Número de veces por día
<i>v/mes</i>	Número de veces por mes
<i>v/sem</i>	Número de veces por semana

Introducción

El incremento particular de la morbilidad y mortalidad por las enfermedades crónicas no transmisibles despertó un interés mundial en generar medidas en salud pública que permitieran hacer frente a este fenómeno, destacándose como un pilar fundamental de estas últimas la promoción de estilos de vida saludable dentro de las poblaciones (1–4). La disminución del consumo de tabaco y de la ingesta de alcohol, junto con el fomento de la práctica de actividad física regular y de la adopción de hábitos alimentarios saludables, han sido las estrategias más importantes en esta materia (1–4). Respecto de este último, el enfoque de las medidas se ha enmarcado en reducir el consumo de alimentos ricos en sodio, carbohidratos simples y grasas saturadas e incentivar la ingesta de frutas y verduras (1–4).

La relevancia de la investigación básica respecto de los procesos biológicos involucrados en la prevención, desarrollo y/o mantenimiento de las enfermedades crónicas no transmisibles es indiscutible en la actualidad, ya que estas continúan teniendo un gran impacto sobre la salud de la población (4). Desde hace algunos años se ha incrementado el interés científico en un mecanismo biológico, que parece ser un factor común dentro de estas enfermedades, consistente en un proceso inflamatorio crónico de origen metabólico denominado *meta-inflamación* (5–8). La meta-inflamación parece ser causada por una estimulación persistente de mediadores inmunes e inflamatorios por parte de diversos *inductores* medioambientales, destacándose dentro de estos los vinculados con la dieta, los cuales generan una respuesta sistémica que afecta la capacidad homeostática del organismo promoviendo un comportamiento patológico de este último (5–12).

El proyecto del genoma humano abrió la puerta a un amplio espectro de disciplinas científicas que tienen la posibilidad de ahondar, en un nivel muy básico de la biología, acerca de las complejas relaciones entre el organismo y su entorno, lo cual en términos de salud-enfermedad ha resultado ser muy relevante. Dentro de estas disciplinas, la *genómica nutricional* ha surgido como un nuevo campo de investigación que ha mostrado tener un

gran potencial, ya que los estudios desarrollados en la materia han evidenciado un conjunto de interacciones sumamente complejas entre la dieta, el genoma y el epigenoma, lo cual está permitiendo identificar nuevos procesos biológicos involucrados en la historia natural de las enfermedades, nuevos biomarcadores y nuevos blancos terapéuticos que, en su conjunto, impactarán de manera favorable a las prácticas asistenciales y a las medidas en salud pública actualmente aplicadas (13–17).

Pese a lo señalado en los párrafos previos, un aspecto que irónicamente no ha sido objeto de estudio en las diversas investigaciones se relaciona con la exploración genético-molecular de los posibles mecanismos biológicos que explican por qué la adopción de las distintas medidas en salud pública, específicamente aquellas vinculadas con la promoción de hábitos alimentarios saludables, tienen la capacidad de reducir la carga de las enfermedades crónicas no transmisibles en la población. Con el propósito de constituirse en una aproximación preliminar a esta interrogante, en el presente documento se dan a conocer los fundamentos, métodos y resultados de una investigación que indaga acerca del efecto del suministro de una cantidad de frutas enteras, equivalente al número de porciones sugeridas por la medida relacionada con la promoción del consumo de frutas y verduras, sobre la expresión de mRNA de genes potencialmente vinculados con el proceso de meta-inflamación en muestras de sangre de adultos jóvenes sanos.

Vale la pena señalar que con esta investigación se pretende aportar al conocimiento científico acerca de los potenciales mecanismos biológicos subyacentes a la adopción *in vivo* de las diversas prácticas en alimentación por parte de los individuos, lo cual en un futuro podría soportar una fuente valiosa de información que será de utilidad para los distintos propósitos en salud. Por otro lado, se busca incentivar la difusión de los diferentes aspectos del campo de la genómica nutricional en el país, con un interés particular en los profesionales en nutrición y dietética, con lo cual se espera promover la puesta en marcha de nuevas investigaciones interdisciplinarias que involucren de manera activa a estos profesionales. Por último, se aspira estimular la enseñanza de las temáticas vinculadas con esta nueva disciplina científica en los diferentes contextos académicos del país y se desea promover la especialización de más profesionales en la materia.

1. Planteamiento del problema y justificación

La promoción de estilos de vida saludable ha sido uno de los pilares fundamentales para contrarrestar el impacto de las enfermedades crónicas no transmisibles, las cuales son la principal causa de muerte a nivel mundial en la actualidad (1,2,4). La exploración del comportamiento de cada una de estas enfermedades, así como del papel de los factores potencialmente relacionados con estas, constituyen un aspecto muy importante para la construcción de las distintas guías de práctica clínica y de las diferentes medidas en salud pública. Desde el punto de vista de la investigación básica, en los últimos años ha habido un creciente interés en un proceso inflamatorio crónico de origen metabólico, denominado *meta-inflamación*, el cual parece ser un factor común dentro de la fisiopatología de estas enfermedades (5–7,18–20).

La meta-inflamación hace referencia a un mecanismo biológico que se caracteriza por un aumento crónico en la circulación de diversos marcadores inmunes e inflamatorios a nivel sistémico, lo cual parece ser promovido por una serie de factores ambientales y/o comportamentales que incluyen a la dieta, el sedentarismo, el estrés, la privación del sueño, las partículas contaminantes del aire, los químicos interruptores endocrinos, etc. (6). La meta-inflamación consiste de una red de interacciones complejas, en distintos niveles biológicos, que involucran los procesos inmune, inflamatorio y metabólico, cuya activación parte de la estimulación de los sistemas sensores de las diferentes células del organismo por medio de algún *inductor*, lo que finalmente desencadena una serie de eventos moleculares que generan respuestas generalizadas de variada connotación (12,18,20–22).

La dieta ha sido sugerida como un importante regulador de la meta-inflamación, sin embargo, la evidencia disponible al respecto se ha enfocado en el papel de los lípidos y de algunos de los componentes no nutricionales contenidos en los alimentos (8,12,23–27). En el primer caso, se ha señalado que los lípidos puede tener efectos pro o anti-

inflamatorios que son dependientes de diversos factores dentro de los cuales se destaca el tipo de ácidos grasos ingeridos y las características de la matriz de alimento que contiene a estos últimos (8,12,23–29). En el segundo caso, se ha mostrado que los polifenoles tienen un impacto fundamentalmente anti-inflamatorio, lo que es en parte explicado por una serie de mecanismos de regulación negativa que afectan distintos factores de carácter pro-inflamatorio (8,23–25,27).

La meta-inflamación parece ser un importante engranaje biológico del vínculo entre el medio ambiente y la prevención y/o perpetuación de las enfermedades crónicas no transmisibles, por lo que develar su funcionamiento en los distintos niveles de la biología humana aportará una información muy valiosa para consolidar y/o reorientar algunas de las prácticas y/o medidas en salud aplicadas. Paradójicamente, un aspecto que no suele ser de interés científico se relaciona con la descripción del impacto de la adopción de las distintas medidas en salud pública, particularmente aquellas vinculadas con la alimentación y/o nutrición, sobre los diferentes procesos biológicos sugeridos como condicionantes para el desarrollo de las enfermedades crónicas no transmisibles, pese a que la evidencia epidemiológica ha señalado un efecto favorable de estas medidas sobre la morbimortalidad por dichas enfermedades en la población.

En este contexto, una aproximación desde el enfoque de la *genómica nutricional* podría ser muy atractiva dado que esta disciplina científica, derivada del proyecto del genoma humano, ha mostrado hallazgos muy interesantes para el entendimiento de los procesos de salud y enfermedad, los cuales pueden ser enmarcados en tres aspectos principales: la variación en la respuesta del organismo a la dieta o sus componentes de acuerdo a las características únicas en la secuencia de DNA de cada uno de los individuos; el impacto de la dieta o sus componentes sobre la producción de moléculas de RNA, proteína y metabolitos por parte los diversos tejidos que conforman el organismo humano; la modulación de los distintos mecanismos de regulación epigenética por parte de los diferentes componentes de la dieta, cuyas interacciones parecen tener implicaciones de tipo transgeneracional (30–37).

Teniendo en cuenta lo señalado en los párrafos previos, la presente investigación pretende realizar una aproximación preliminar en la que se comparen los niveles de expresión de mRNA de un grupo de genes potencialmente relacionados con el proceso de meta-

inflamación (*TNFR*, *IL1R*, *IL6R*, *TLR2*, *TLR4* y *NFκB*) en células mononucleares de sangre periférica de adultos jóvenes, luego de que a los mismos se les suministre un cantidad de frutas enteras equivalente al número de porciones sugeridas por la medida en salud pública vinculada con la promoción del consumo de frutas y verduras, ésta última basada en la recomendación de un grupo de expertos quienes señalaron un impacto positivo de la ingesta de alimentos de estos grupos sobre la prevención del desarrollo de las enfermedades crónicas no transmisibles (1,38).

Con los posibles resultados de esta investigación se espera obtener información de un mecanismo biológico potencialmente regulado por la adopción *in vivo* de una medida alimentaria y/o nutricional ampliamente recomendada desde el punto de vista de la salud pública, con lo cual se busca aportar al conocimiento científico acerca del impacto de los hábitos alimentarios sobre la expresión de genes probablemente vinculados con distintos resultados en salud en el corto y largo plazo, por otro lado, contribuir al desarrollo en el país de investigaciones en el área de la genómica nutricional por parte de nutricionistas-dietistas que estén integrados a grupos interdisciplinarios y, por último, promover en un futuro la inclusión de este tipo de evidencia como fuente de información básica para la construcción de las guías de práctica asistencial y de las medidas en salud pública en materia de alimentación y/o nutrición.

2. Objetivos

2.1 General

Comparar los niveles de expresión de mRNA de genes relacionados con el proceso de meta-inflamación en células mononucleares de sangre periférica de adultos jóvenes, antes y después de una intervención nutricional con frutas.

2.2 Específicos

A. Realizar un análisis descriptivo de las variables nutricionales de los sujetos de estudio y los niveles de expresión de mRNA de los genes *TNFR*, *IL1R*, *IL6R*, *TLR2*, *TLR4* y *NFκB* antes de la intervención nutricional con frutas.

B. Establecer las diferencias en los niveles de expresión de mRNA de los genes *TNFR*, *IL1R*, *IL6R*, *TLR2*, *TLR4* y *NFκB*, antes y después de la intervención nutricional con frutas.

3. Marco referencial

3.1 Genómica nutricional

La relación del genoma con la alimentación y/o nutrición en la especie humana es objeto de estudio de una disciplina relativamente reciente de la ciencia, derivada del proyecto del genoma humano, denominada *genómica nutricional*. Si bien no hay un acuerdo respecto de su definición, ha sido comúnmente enmarcada en tres enfoques que son complementarios entre sí: uno en el cual se analiza el efecto de los distintos cambios en la secuencia de nucleótidos de la molécula de DNA sobre la respuesta a los componentes de la dieta; otro por el cual se evalúa el impacto de estos componentes sobre la expresión de la molécula de DNA y, finalmente, uno en el que se indaga acerca de las interacciones entre dichos componentes y los mecanismos epigenéticos que regulan la estructura y función de la molécula de DNA (13,14,39–41).

En el primer enfoque se busca determinar la existencia de asociaciones entre la dieta, o sus componentes, y algunas variaciones en la secuencia de nucleótidos de la molécula DNA (Ej. SNPs, CNVs, VNTRs, STRs, etc.), con el fin de identificar genotipos protectores, neutros o predisponentes para el desarrollo de enfermedades relacionadas con la alimentación (42–45). En el segundo enfoque se exploran los cambios que la dieta, o sus componentes, generan sobre la producción de moléculas de RNA, proteína y/o metabolito, de lo cual se pueden construir redes de interacción molecular que permiten identificar procesos biológicos potencialmente modulados en distintos estados fisiológicos y/o patológicos (24,37,46,47). En el tercer enfoque se establecen las interacciones entre la dieta, o sus componentes, y los distintos mecanismos epigenéticos tales como la remodelación de la cromatina, la modificación química de las proteínas histonas, la metilación del DNA, etc. (40,41,48,49).

La importancia de estos enfoques radica en la posibilidad de prescribir dietas que se ajusten al genotipo (*nutrición personalizada*); en la capacidad de identificar nuevos biomarcadores con potencial utilidad en la predicción temprana y/o seguimiento del riesgo, así como en el monitoreo de la evolución de los distintos estados patológicos; y en la determinación de nuevos procesos biológicos de interés terapéutico (15–17,50–52). Todos estos aspectos permitirán reducir la exposición, individual y/o colectiva, a potenciales factores de riesgo vinculados con las prácticas en alimentación, a través de la construcción y/o reorientación de las guías de manejo terapéutico y de las medidas en salud pública aplicadas en materia de alimentación y nutrición, por otro lado, favorecerán el desarrollo de nuevos productos farmacológicos, nutricionales y alimenticios con mayores propiedades favorables sobre la salud (15,50,51).

La genómica nutricional, en el contexto del organismo humano, enfrenta una serie de retos importantes en su aplicación dentro de los cuales se destacan aquellos vinculados con: la variabilidad interindividual, que en la molécula de DNA es representada por los distintos genotipos y por las diferentes manifestaciones funcionales de esta, mientras que en el caso de la dieta, se vincula con los distintos patrones alimentarios y por la enorme diversidad de características de los alimentos y/o productos alimenticios disponibles para el consumo; la dificultad en la realización de intervenciones nutricionales *in vivo*; la cuantificación de la dieta bajo aproximaciones retrospectivas y prospectivas no controladas; el limitado acceso a los distintos tejidos que conforman el organismo; el reducido conocimiento, interés y capacidad técnico-científica de los profesionales relacionados con la alimentación y/o nutrición; las diferentes consideraciones éticas, legales, socio-económicas y culturales de su aplicación, etc. (15,50,51).

3.2 Expresión génica

La expresión génica hace referencia a un mecanismo biológico altamente complejo que tiene como propósito la producción de moléculas de RNA y la síntesis de péptidos y/o proteínas a través de los procesos de *transcripción* y *traducción*, respectivamente (53–59). La expresión génica parte de la molécula de DNA cuyas fuentes principales en el organismo humano se ubican en el núcleo de las células, en las mitocondrias y en el microbioma (60–62). El DNA nuclear es particular ya que, además de almacenar la información primordial de la especie, es capaz de unirse a proteínas denominadas *histonas*

que le permiten superenrollarse en estructuras hiperdensas conocidas como *cromosomas*, las cuales exhiben una gran dinámica molecular que es determinante en la regulación de la actividad funcional del DNA (63–66).

El primer proceso involucrado en el mecanismo de expresión génica es la transcripción, en el cual diversas regiones del cromosoma se descondensan simultáneamente debido a una separación temporal entre el DNA y las histonas, lo que permite que proteínas denominadas factores de transcripción se unan a la doble hélice del DNA, promuevan el desacoplamiento transitorio de las dos cadenas nucleotídicas y, a partir de una de ellas, estimulen la síntesis de moléculas de RNA por acción de las enzimas RNA polimerasas (53–56,65,66). Las moléculas de RNA generadas son de distintos tipos dentro de las cuales se tienen las ribosomales (rRNA), las de transferencia (tRNA), las mensajeras (mRNA), las pequeñas no codificantes (p. ej. miRNAs), etc., todas ellas exportadas posteriormente al citoplasma donde participan de manera activa en el proceso de traducción (67–69).

La traducción es el segundo proceso vinculado con la expresión génica, el cual parte del acoplamiento de un complejo proteína-rRNA, conocido como *ribosoma*, a una molécula de mRNA. Una vez fijado en el mRNA, el ribosoma se mueve a través de éste en tripletas de nucleótidos (*codones*) hasta hallar una que contenga la secuencia AUG, a esta se une una tripleta complementaria (*anticodon*) contenida en un tRNA específico que a su vez transporta el aminoácido metionina en otro de sus extremos (56–59). La metionina se acopla a una región específica del ribosoma constituyendo el primer aminoácido de la cadena de péptido y/o proteína en construcción, a partir de este punto el ribosoma se mueve sin saltos por codones en el mRNA uniendo en cada caso el anticodon correspondiente, y por tanto enlazando de manera sucesiva un nuevo aminoácido a la cadena de péptido y/o proteína, mecanismo que culmina cuando el ribosoma se tope con un codón de parada para el cual no existe ningún tipo anticodon (56–59).

El péptido y/o proteína generada es liberada del ribosoma y posteriormente transportada, a través de distintos mecanismos, a su correspondiente sitio de acción (70–72). Un aspecto importante a destacar en este punto es que el mRNA es una versión madura de una molécula precursora denominada pre-mRNA., caracterizada por contener regiones codificantes o *exones* separadas entre sí por regiones no codificantes o *intrones* (73,74).

El pre-mRNA es sometido en el núcleo celular a complejos procesos de edición de bases y el corte-empalme (*splicing*), que tienen como fin unir los exones en una única molécula codificante, el mRNA (73–78). La importancia de este último hecho radica en que los exones de un pre-mRNA pueden ser combinados de distintas maneras para dar origen a dos o más mRNAs, y por tanto a un número igual de péptidos y/o proteínas, las cuales pueden expresarse o no de manera simultánea (73–78).

El conjunto de RNAs (*transcriptoma*), péptidos/proteínas (*proteoma*) y metabolitos (*metaboloma*) producidos en una muestra biológica, esta última obtenida en un momento y circunstancia específica, pueden ser determinados por medio de técnicas moleculares altamente robustas tales como los microarreglos, la secuenciación de última generación, la espectrometría de masas, etc. (79,80). La información obtenida es analizada haciendo uso de herramientas bioinformáticas que permiten generar perfiles de expresión, identificar vías metabólicas y construir redes de interacción, que establecen la identidad de las moléculas sintetizadas, el nivel de producción de cada una de ellas y las posibles relaciones funcionales entre las mismas, aspectos que son variables dependiendo del tipo de muestra y de los factores, intrínsecos y/o extrínsecos, a los que dicha muestra está expuesta en un entorno y momento determinado en el tiempo (81).

Finalmente, se debe tener presente que la variabilidad en la expresión génica da cuenta de interacciones dinámicas entre el componente genético y el medio en el que este se encuentra, aspecto que se ha sugerido es regulado por una serie de mecanismos complejos denominados *epigenéticos*, que parecen ser claves en la determinación de los rasgos -o *fenotipo*- que son propios de un individuo particular (82,83). Los mecanismos epigenéticos más relevantes para el proceso de expresión génica incluyen la modificación química de las proteínas histonas, la metilación de las regiones promotoras de las secuencias codificantes del DNA, la interferencia por RNAs no codificantes, etc., los cuales determinan que regiones del DNA se liberarán de manera temporal, que factores de transcripción podrán unirse a dichas secuencias y cuales moléculas de RNA van a ser producidas y/o traducidas a proteínas (82–86).

3.3 Alimentación, nutrición y salud humana

El impacto de la alimentación y/o nutrición sobre la salud de los individuos ha sido principalmente caracterizado por investigaciones de tipo epidemiológico que han señalado la importancia de las prácticas de alimentación sobre el comportamiento de la morbimortalidad por distintas enfermedades. Si bien diversas disciplinas de la ciencia, incluidas las moleculares, han buscado de manera simultánea develar los posibles mecanismos biológicos involucrados en este fenómeno, la evidencia actual aún es insuficiente para dar una explicación holística que permita determinar por qué y cómo un individuo puede mantener una condición saludable o, por el contrario, transitar hacia un estado de riesgo y/o enfermedad (15,50,51).

Desde el punto de vista de la expresión génica, las tecnologías masivas de uso reciente (microarrays, secuenciación, espectrometría de masas, etc.) han evidenciado la necesidad de caracterizar el estado *natural* de un organismo. Lo anterior, por ejemplo, ha sido plasmado en estudios que comparan variedades nativas y transgénicas de plantas, donde las diferencias observadas entre distintos especímenes de la misma variedad nativa han sido mayores que aquellas identificadas entre estas y su contraparte transgénica, aspecto que parece ser acentuado cuando dichas plantas no comparten los mismos estados fisiológicos ni las mismas condiciones medioambientales (87), sugiriendo un gran espectro en la variabilidad de un estado aparentemente indistinto entre los diferentes especímenes de un mismo tipo de organismo.

En el caso del organismo humano no ha sido definido un estado *natural*, que este contexto podría ser entendido como una condición *saludable*, no obstante, algunas aproximaciones que han contrastado el comportamiento genético de distintos individuos han señalado que existe una gran variabilidad en la expresión génica a nivel interindividual, así como entre los diferentes tejidos, indicando que el organismo humano es también diverso en su estado *natural* (26,88–91). Lo referido anteriormente destaca que en el organismo humano es también requerido una caracterización de la condición *saludable*, lo cual será particularmente relevante cuando se pretendan identificar de manera precisa los potenciales factores, así como los mecanismos vinculados a estos, que definen el comportamiento del binomio salud-enfermedad.

Considerando que la alimentación y/o nutrición constituye uno de los principales condicionantes para la salud, la investigación de sus efectos sobre la expresión génica es completamente pertinente, aunque bajo ninguna circunstancia resulta ser sencilla. En este sentido, se debe tener presente que la alimentación y/o nutrición humana es también altamente variable, lo cual se representa por un complejo proceso de selección e ingesta de alimentos, particular de cada individuo, que depende de una serie de factores de naturaleza biológica, cultural, socioeconómica, psicológica, etc. (92–95). Adicionalmente, otro aspecto que contribuye a la variabilidad de este condicionante es la diversidad casi ilimitada en los alimentos y/o productos alimenticios disponibles para el consumo, cuyas características intrínsecas influyen sobre la biodisponibilidad, la cual puede comportarse de manera diferencial cuando dichos alimentos y/o productos alimenticios se ingieren solos o en combinación con otros (96–100).

Finalmente, vale la pena señalar que las investigaciones que pretendan estudiar al organismo humano abordando los aspectos señalados, deben tener presente los siguientes aspectos: el tipo de estudio que se vaya a llevar a cabo, ya sea retrospectivo, prospectivo o una combinación de ambos; el modelo sobre el cual se va a analizar el comportamiento biológico (celular, tisular o *in vivo*), así como la condición fisiológica o fisiopatológica del mismo (saludable, a riesgo o patológica); la unidad alimentaria y/o nutricional que será objeto de análisis, dentro de las cuales se tiene al patrón alimentario, las comidas de prueba, los grupos de alimentos, los alimentos individuales, los nutrientes o los compuestos bioactivos no nutricionales; y el componente de la expresión génica a ser evaluado, el cual puede ser el transcriptoma, el proteoma, el metaboloma o distintas combinaciones de estos.

3.4 Meta-inflamación y salud humana

Las enfermedades y/o condiciones crónicas no transmisibles más persistentes en la actualidad (*obesidad, resistencia a la insulina, diabetes, etc.*) están estrechamente asociadas con un proceso de inflamación crónico caracterizado por una producción anormal de citoquinas, incremento de las moléculas de fase aguda y activación de una red de vías de señalización inflamatorias (5,6,11). Diversos mediadores importantes tales como las citoquinas (Ej. TNF, IL6 e IL1B), los receptores celulares (Ej. LXR, TLRs e ILRs), los factores de transcripción (Ej. PPARs y NFκB), etc., son los más relevantes durante los

procesos de inflamación, adicionalmente, el estrés del retículo endoplasmático (ER) ha sido sugerido como un mecanismo intermediario vital en el mantenimiento del estado crónico de este tipo de inflamación (5,11,12,101,102).

La meta-inflamación, denominada así por su relación con el sistema metabólico, es una condición inflamatoria crónica, principalmente activada por nutrientes y por el superávit metabólico, que cursa sin las marcas de la inflamación clásica (hinchazón, enrojecimiento, dolor y fiebre) aunque involucra los mismos mecanismos mediadores (5,6,11). La meta-inflamación difiere de la inflamación clásica en que es de bajo grado, puesto que causa un pequeño aumento en los marcadores inmunológicos y pro-inflamatorios, es persistente y resulta en alostasis crónica, tiene efectos sistémicos más que locales, es activada por distintos estímulos intrínsecos y extrínsecos, parece perpetuar más que resolver la condición inflamatoria y está asociada con una reducida tasa metabólica (6,10,11,27).

La meta-inflamación puede darse por una respuesta intermedia del sistema inmune a ciertos inductores los cuales, al ser persistentes, pueden conducir al desarrollo y mantenimiento de condiciones dismetabólicas que son relevantes para la adquisición de una condición patológica crónica (6,11). Dentro de los principales inductores identificados en este proceso inflamatorio se destacan aquellos relacionados con comportamientos del estilo de vida moderno tales como una nutrición inadecuada, inactividad física, falta de sueño y el estrés, así como los componentes del medioambiente actual como lo son la contaminación del aire, los químicos disruptores endocrinos y las condiciones socioeconómicas de inequidad y desigualdad, inductores que son agrupados en una categoría conocida como *antropógenos* ya que son producto de la actividad humana (6,10,11,27).

La meta-inflamación evidencia la estrecha relación entre el sistema inmune y el sistema metabólico, lo cual desde el punto de vista evolutivo ha sido ejemplificado por el *cuerpo graso* de *Drosophila*, estructura que constituye un tejido en el que confluyen las funciones de sus homólogos mamíferos: adiposo, hepático, inmune y hematopoyético (5). En el cuerpo graso se desarrollan funciones cruciales tales como la detección de la disponibilidad de energía/nutrientes y la coordinación de las respuestas a patógenos, siendo estas últimas dependientes, en gran medida, de las condiciones metabólicas del organismo, pese a que dichas funciones son llevadas a cabo por tejidos especializados en el caso de los mamíferos, al observar la arquitectura de dichos tejidos es claro que persiste

el vínculo entre el metabolismo y la inmunidad, ya que las células metabólicas e inmunológicas están muy cercanas unas de otras y muestran actividades interdependientes (5).

Si se considera lo anterior, no es de extrañar que los activadores metabólicos (Ej. nutrientes) puedan inducir respuestas inmunológicas (Ej. inflamación) y que los patógenos puedan evocar y regular respuestas metabólicas, aspecto que ha sido vital para la supervivencia de los organismos, sin embargo, frente a una situación como la actual, en la que hay un excesivo y continuo suministro de energía/nutrientes en un sistema sinérgico de delicado balance, tal como el inmuno-metabólico, parece haber un problema de falta de adaptación de dicho sistema que lleva a una alteración crónica de la homeostasis metabólica y por ende a respuestas inmunes aberrantes, las cuales han sido sugeridas como uno de los principales detonantes para el desarrollo de las enfermedades crónicas no transmisibles (5,6,10,11,27,101,102).

3.5 Frutas y salud humana

De forma estricta el término *fruta* se refiere al ovario maduro, las semillas y la estructura en que estos últimos se combinan, sin embargo, definiciones como la anterior no son aplicadas de manera uniforme en la práctica de la nutrición ya que al parecer factores sociales y culturales son los que determinan qué diferencia a una *fruta* de otros tipos de alimentos que botánicamente podrían ser denominados como tal (103,104). Este grupo de alimentos incluye distintas familias botánicas tales como Vitaceae (uvas), Rutaceae (pomelo, lima, mandarina, naranja), Rosaceae (manzana, mora, cereza, melocotón, pera, fresa, ciruela), Palmae (coco), Musaceae (banano), Cucurbitaceae (melón), Caricaceae (papaya), Bromeliaceae (piña), Annonaceae (chirimoya, anón), Actinidiaceae (kiwi), Anacardiaceae (mango), etc. (104).

Las estadísticas poblacionales respecto del consumo de frutas son variables tanto en la fuente de información de donde se obtienen, así como en el tipo de dato reportado. En Estados Unidos, el Centro para la Prevención y Control de Enfermedades señaló que el 13,1% de los adultos encuestados consumió la cantidad recomendada de frutas (105); en el Reporte Europeo de Salud y Nutrición se indicó que las regiones central, este y sur registraron los valores de ingesta de frutas más altos (± 200 g/d), los cuales fueron

considerablemente bajos en las regiones del norte y oeste (<130 g/d), no obstante, el reporte señaló que el continente no logró la meta de consumo de frutas y verduras (106); en Australia, la Encuesta Nacional de Salud evidenció que cerca del 26% de la población adulta alcanzó el consumo sugerido de frutas establecido en las guía alimentarias (107); finalmente, en el caso colombiano, la ENSIN 2010 indicó que alrededor del 27,7% de la población refirió una ingesta diaria de frutas enteras (108).

La Organización Mundial de la Salud (OMS), en acuerdo con los estados miembros, lanzó en 2004 la *Estrategia mundial de alimentación, actividad física y salud* dentro de la cual se recomendó promover el consumo de frutas y verduras, cuya meta poblacional fue establecida en la ingesta de al menos 400 g/d teniendo en cuenta la recomendación realizada por un comité de expertos (38), los cuales señalaron un efecto favorable de estos alimentos sobre la morbilidad por diversas enfermedades crónicas (1). A partir de este punto se extendió un interés en la investigación sobre distintos aspectos de estos grupos de alimentos incluyendo aquellos relacionados con su impacto en la salud, con la identificación de nuevos compuestos bioactivos no nutricionales de interés para industria farmacéutica y alimentaria con el fin de desarrollar nuevos medicamentos, productos nutricionales o alimentos funcionales, y con la aplicación de distintos procesos biotecnológicos con el propósito de incrementar las propiedades nutricionales de los alimentos que conforman dichos grupos (109–115).

En cuanto al impacto en salud, comúnmente el papel de la ingesta de frutas no se evalúa de manera independiente sino en conjunto con el de las verduras. Al respecto, un reciente meta-análisis que utilizó como fuente de datos estudios de cohorte de poblaciones de Estados Unidos y Europa, concluyó que la ingesta de frutas y verduras no se relacionó con el incidente por diabetes mellitus tipo 2 en los adultos mayores (116). Por otro lado, un estudio que analizó el papel del consumo de frutas y verduras sobre la incidencia de hipertensión en tres estudios de cohorte, reportó que las tasas de riesgo fueron de 0,92 (0,87-0,97) para la ingesta de frutas y de 0,95 (0,86-1,04) para el consumo de verduras, luego de comparar los individuos que ingirieron una cantidad de dichos alimentos inferior o superior a 4 porciones/semana, además, la investigación señaló que la ingesta de brócoli, zanahoria, soya, uvas pasas y manzana se asoció con un bajo riesgo de hipertensión (117).

Adicionalmente, un meta-análisis que abordó las relaciones de la ingesta de frutas y verduras con el riesgo de enfermedad cardiovascular, cáncer y la mortalidad general, indicó que asociaciones inversas fueron observadas entre el riesgo de enfermedad cardiovascular y el consumo de frutas cítricas, verduras de hoja verde y ensaladas, comportamiento que fue también evidenciado para el riesgo de cáncer y la ingesta de verduras de hoja amarilla (118). Por su parte, un estudio que buscó determinar si la asociación entre la ingesta de carne roja y distintas causas de mortalidad difirió de acuerdo al consumo de frutas y verduras en dos cohortes poblacionales, señaló que se presentó un incremento del 21% en el riesgo por todas las causas de mortalidad y del 29% en el riesgo de mortalidad por enfermedad cardiovascular, al comparar los individuos del quintil más bajo con aquellos ubicados en el quintil más alto de ingesta de carnes rojas, resultados que se mantuvieron constantes independientemente de las variaciones en la ingesta de frutas y verduras (119).

Por último, un meta-análisis que indaga acerca de la eficacia del suministro de frutas y verduras o del asesoramiento para promover un incremento en el consumo de estos alimentos en la prevención primaria de la enfermedad cardiovascular, indicó que los ensayos en los que se proporcionaron estos alimentos no se observó una fuerte evidencia de los efectos de esta intervención sobre los factores de riesgo cardiovascular, por el contrario, el asesoramiento mostró algunos efectos favorables sobre la presión sanguínea y los niveles de colesterol LDL (120). Pese a los resultados señalados, los autores resaltaron que el número de investigaciones que examinaron el suministro y/o asesoramiento para aumentar el consumo de frutas y verduras en ausencia de intervenciones adicionales fue sumamente limitado, por lo que es necesario que más estudios sean desarrollados para confirmar los hallazgos reportados (120).

Respeto del segundo aspecto, distintas frutas muestran un espectro interesante de compuestos bioactivos dentro de los cuales se destacan la cianidina, la malvidina, la pelargonidina, la delphinidina, la quercitina, la miricetina, el kaempferol, el resveratrol, los ácidos hidroxibenzoico e hidroxicinámico, la procianidina, la propelargonidina, los elaginatinos, los lignanos, la naringenina, la hesperidina, los carotenoides, los withanólidos, los fitoesteroles, etc., cuya concentración en este grupo de alimentos varía sustancialmente dependiendo de factores intrínsecos y extrínsecos tales como la genética, el clima, el suelo, etc (121–125). Las principales propiedades en salud atribuidas al

conjunto de compuestos bioactivos identificados en las frutas se vinculan con efectos antioxidantes, antitumorales, antiaterogénicos, antiinflamatorios, antimicrobianos, antivirales, antimutagénicos, antitóxicos, antilipogénicos, antiagregantes, etc (121–125).

Finalmente, con relación al tercer aspecto se tiene a la biofortificación, la cual se define como un proceso por el cual se aumenta la calidad nutricional de un alimento a través de prácticas de mejoramiento convencional o por medio de herramientas biotecnológicas, con el fin de mitigar las deficiencias nutricionales en las poblaciones más vulnerables (126) . La biofortificación ha sido extensamente aplicada sobre alimentos de alto consumo tales como el arroz, el maíz, la papa, etc., en los cuales se han incrementado los niveles de micronutrientes críticos para la nutrición humana como lo son la vitamina A, el zinc y el yodo (114,115). En términos de las frutas, los trabajos desarrollados se han enfocado en aumentar los niveles de vitamina A y hierro en el banano e incrementar las cantidades de antiocianinas en las manzanas (113,127,128), sin embargo, el uso de estos alimentos como parte de la dieta de los individuos es incierto debido, en gran medida, a las distintas discusiones de tipo político, social, económico y cultural vinculadas al consumo de alimentos obtenidos por medios biotecnológicos (113,115).

3.6 Estado del arte: alimentación, nutrición y expresión de RNA en humanos

3.6.1 Consideraciones

La investigación acerca del impacto de los distintos factores alimentarios y/o nutricionales sobre la expresión génica en humanos, particularmente sobre la producción de moléculas de RNA, ha sido realizada a través de estudios que han utilizado modelos *in vitro* (células y/o tejidos) y modelos *in vivo* (animal o humano). Si bien los datos obtenidos en cada uno de estos modelos aportan una información sumamente valiosa para el objeto de estudio inicialmente mencionado, la investigación aplicada en humanos considera una serie de factores que en los otros modelos no pueden ser evaluados, lo que en términos alimentarios y/o nutricionales están representados por los diversos determinantes ambientales, biológicos, psicológicos, socio-económicos y culturales que condicionan las decisiones en alimentación de cada uno de los individuos de la especie.

Los análisis realizados en humanos se han centrado en explorar los cambios en la expresión del RNA aplicando o no intervenciones alimentarias y/o nutricionales. En el primer caso, los estudios se han enfocado en dos aspectos principales: por un lado, establecer el efecto del suministro de nutrientes, compuestos bioactivos no nutricionales, alimentos, grupos de alimentos, comidas de prueba (*test meal*) o dietas específicas y, por el otro lado, determinar el impacto del asesoramiento nutricional. En el segundo caso, se ha optado por establecer posibles asociaciones considerando la información alimentaria y/o nutricional derivada de instrumentos de frecuencia de consumo de alimentos, tales como los patrones alimentarios y el consumo de nutrientes, compuestos bioactivos no nutricionales, alimentos y grupos de alimentos. Considerando lo anterior, algunos de los hallazgos disponibles en esta materia en el último año son descritos en el presente apartado.

3.6.2 Evidencia científica reciente

En una investigación en la que mujeres con exceso de peso siguieron una dieta restringida en energía, la cual se acompañó de un placebo o un suplemento compuesto por ácido α -lipoico (LA), ácido eicosapentaenoico (EPA) o una combinación de ambos, se observó que la intervención estimuló la expresión del gen *IL10* e inhibió la expresión del gen *ADGRE1* en las muestras de tejido adiposo de las voluntarias que recibieron EPA solo o en combinación (129). Por otro lado, el suministro de un suplemento compuesto por flavonoides y aceite de pescado a un grupo de mujeres con exceso de peso, generó un aumento en la expresión de genes relacionados con el mecanismo antiviral inducido por el interferón, así como una represión en la expresión de genes vinculados con el proceso de fagocitosis, en las muestras de sangre periférica de las participantes (130).

En un estudio se señaló una correlación negativa entre los niveles plasmáticos de ácido docosahexaenoico y eicosapentaenoico (DHA/EPA) y la expresión los genes *FAS* y *DGAT1*, esto último determinado en muestras de placenta de mujeres gestantes con exceso de peso que consumieron un suplemento de contenía DHA y EPA, comportamiento que fue también observado entre la tasa de ácidos grasos n-3:n-6 y la expresión de los genes *PPAR γ* , *DGAT1* y *PLIN2* en dichas muestras (131). Por su parte, un ensayo indicó que la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados influenció la expresión de genes relacionados con la regulación de la función mitocondrial, la organización de la matriz extracelular, la proteólisis y la inhibición de *mTOR* en biopsias de tejido muscular de

adultos mayores sanos (132). Por último, en una investigación que determinó el papel de la suplementación con DHA/EPA, hierro o una combinación de estos sobre la expresión génica en muestras de sangre periférica de niños sudafricanos, no se evidenció ningún efecto significativo de alguno de estos tratamientos (133).

El papel del consumo de un extracto de hojas de olivo en muestras de sangre periférica de hombres adultos sanos fue evaluado en un ensayo aleatorizado, en el cual se encontró que la expresión de genes relacionados con la inflamación, el metabolismo de lípidos y el proceso cancerígeno fueron suprimidos luego de la intervención (134). Por otro lado, una investigación que analizó el efecto del consumo de un extracto de pterocarpanos de hoja de soya, evidenció una reducción en la expresión de genes vinculados con la respuesta inmune en muestras de sangre periférica de individuos con exceso de peso (135). Por su parte, un estudio en el que se suministró una bebida con el extracto de la fruta *Wolfberry* (*baya de Goji*), reportó diferencias estadísticamente significativas en la expresión 33 genes relacionados con la inflamación y estrés oxidativo en las muestras de sangre periférica de un grupo de sujetos con sobrepeso e hipercolesterolemia (136).

Adicional a lo anterior, una investigación en la que se proporcionó tres tipos de extractos: uno compuesto por la fruta granada y semillas de uva (AR); uno constituido por las plantas *Fava d'anta* y *Licorice* (BF); y una mezcla de los dos anteriores (AR/BF), a un grupo de mujeres post-menopáusicas, refirió que la expresión génica en las muestras de sangre periférica de las participantes fue modulada por cada uno de los tratamientos, destacándose el efecto sobre genes relacionados con el metabolismo óseo (*HSPG2*, *HYAL1*, *IL7*, *IL6*, *CRP*, *CTSG*, *TACR1*, etc.) y la osteogénesis (*BMP2*, *COL1A1*, *ARTN*, *NMB*, *SDC1*, *CST2*) luego del consumo de los extractos AR y BF, respectivamente. Por otro lado, la investigación evidenció que la expresión génica fue diferencial cuando se ingirió la combinación de los dos extractos, lo cual influenció el comportamiento de genes como *FGF9*, *RUNX2*, *TFG α* , *CXCL10*, *CXCL1*, *FASLG*, *IL1RAP*, etc. (137).

En una investigación que evaluó el impacto de distintos factores de la dieta sobre la expresión génica en muestras normales de mucosa intestinal de adultos diagnosticados con cáncer, se reportó que la ingesta de carne y alimentos no cárnicos afectó la expresión de 68 y 65 genes, respectivamente, siendo los primeros asociados a procesos tumorales y de daño al organismo y, los segundos, vinculados con el desarrollo y función de los

sistemas nervioso y hematológico (138). Por otro lado, un estudio en que se analizó si la ingesta de la dieta *Nórdica* (ND) podría modificar la expresión genes relacionados con la inflamación y el metabolismo de lípidos durante una prueba de tolerancia oral a la glucosa, se observó que esta intervención indujo una reducción en la expresión de los genes *TLR4*, *IL18* y *CD36*, junto con un incremento en la expresión del gen *PPARD*, en las muestras de sangre periférica de individuos con síndrome metabólico (139).

El consumo de una dieta de tipo *mediterráneo*, como parte de un programa de pérdida de peso, influenció la producción de los microRNAs miR-155-3p y Let-7b en muestras de sangre periférica de sujetos con síndrome metabólico, lo cual no se correlacionó con la expresión de los genes pro-inflamatorios analizados. Por otro lado, en este ensayo se observó que la expresión de los microRNAs miR-125b, miR-130a, miR-132-3p, miR-422b y Let-7b se asoció con cambios en la calidad de dieta, destacándose que este último se relacionó negativamente con la ingesta de lípidos y ácidos grasos saturados (140). Por su parte, en una investigación en la que se comparó el efecto del consumo de una dieta normo (NP) o alta en proteínas (HP), se reportó la presencia de los microRNAs miR-16, miR-17, miR-126, miR-222 y miR-223, antes y después de los tratamientos, en las muestras de suero de hombres con exceso de peso, además, se resaltó la reducción significativa en la expresión del microRNA miR-223 luego de la ingesta de la dieta HP (141).

Finalmente, en un estudio en el que analizó el papel del consumo de una dieta restringida en energía sobre la presencia de microRNAs circulantes en muestras plasmáticas de sujetos con sobrepeso y obesidad, clasificados como altos (HiRes) o bajos (LoRes) respondedores para la pérdida de masa corporal, se observó que la expresión del microRNA miR-935 fue alta en las muestras de los individuos del grupo LoRes antes y después de la intervención nutricional. Por otro lado, se señaló que el nivel de los microRNAs miR-221-3p y miR-223-3p aumento en las muestras de ambos grupos de individuos tras el tratamiento. Por último, se indicó que la expresión del microRNA miR-140 fue mayor en las muestras de los sujetos del grupo LoRes, comparado con las muestras de los sujetos del grupo HiRes, luego de la ingesta de la dieta (142).

4.Aspectos metodológicos

4.1 Tipo de estudio, población y muestra

La investigación se desarrolló como un estudio piloto con diseño cuasi-experimental pretest-posttest (antes-después) al cual se adicionó un grupo control. La población de estudio fueron los estudiantes y trabajadores de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia. La muestra se seleccionó a conveniencia y estuvo constituida por 29 estudiantes voluntarios. Los procedimientos aplicados fueron avalados por el comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia (Anexo I).

4.2 Diseño experimental

4.2.1 Selección de los sujetos de estudio

Los criterios de inclusión y exclusión establecidos para la presente investigación son presentados en el cuadro 1. Los potenciales sujetos de estudio fueron invitados a participar en la investigación a través de un mensaje electrónico enviado por medio del correo institucional de la Universidad Nacional de Colombia. Las personas interesadas en ser parte del estudio fueron citadas en las instalaciones del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia donde los investigadores les dieron una explicación detallada de la investigación. Los individuos que aceptaron participar en el estudio firmaron el consentimiento informado (Anexo II), se les tomaron medidas antropométricas básicas (peso, talla y circunferencia de la cintura) y respondieron a dos cuestionarios específicamente diseñados para esta investigación: uno de salud y nutrición (Anexo III) y uno de frecuencia de consumo de alimentos (Anexo IV).

Cuadro 1. Criterios de inclusión y exclusión establecidos para la investigación

Inclusión	Exclusión
Estudiante activo y/o trabajador	Condición de embarazo o lactancia
Edad ≥ 18 y ≤ 30 años	Presencia de enfermedades crónicas
Firma del consentimiento informado	Auto-reporte de cirugía mayor reciente y de consumo crónico de medicamentos que alteren la respuesta inflamatoria
	Auto-reporte de hábito de fumar con un inicio mayor a 24 meses y con una frecuencia diaria
	Auto-reporte de consumo de alcohol con una frecuencia semanal y con un consumo mayor de 6 unidades/día
	Auto-reporte de actividad física con frecuencia mayor a 4 veces/semana y duración mayor a 60 min/día
	Auto-reporte de tratamiento terapéutico nutricional o seguimiento de dietas autoimpuestas
	Auto-reporte de alergias a frutas, verduras u otros alimentos no especificados
	Auto-reporte de variaciones importantes en el peso corporal en los últimos 6 meses y/o prácticas inadecuadas en el manejo del peso corporal
	Índice de masa corporal (IMC) $<18,5$ o $\geq 30,0$
	Incumplimiento $\geq 10\%$ en el consumo de los alimentos suministrados durante la fase de intervención

La información obtenida de los cuestionarios y de la toma de las medidas antropométricas fue registrada en una hoja de cálculo del programa Microsoft Excel (Anexo V). De los 47 individuos reclutados 10 fueron excluidos de la investigación luego de evaluar los criterios de inclusión/exclusión y 37 fueron preseleccionados para hacer parte de la fase de intervención (Tabla 1). Al grupo de sujetos preseleccionados se les envió un correo electrónico con el fin de acordar las fechas para llevar a cabo la fase de intervención, de estos un total de 29 individuos respondieron al llamado y todos ellos culminaron exitosamente con los aspectos establecidos para esta fase (Tabla 1).

Tabla 1. Proceso de selección de los sujetos de estudio para la fase de intervención

Proceso	Ítem	No. Individuos descartados
Evaluación de los criterios de inclusión	Edad ≥ 18 y ≤ 30 años	2
	Hábito de fumar con un inicio mayor a 24 meses y con una frecuencia diaria	1
Evaluación de los criterios de exclusión	Alergias a frutas, verduras u otros alimentos no especificados	5
	Variaciones importantes en el peso corporal en los últimos 6 meses y/o prácticas inadecuadas en el manejo del peso corporal	1
	Índice de masa corporal (IMC) $<18,5$ o ≥ 30.0	1
	Respuesta negativa o ausente al correo de coordinación de fechas para el desarrollo de la fase de intervención	8
Confirmación de la participación de los sujetos de estudio en la fase de intervención		
Total de sujetos descartados del estudio		18
Total de sujetos seleccionados para la fase de intervención		29
Total de sujetos reclutados al inicio de la investigación		47

4.2.2 Instrumentos de captura de la información empleados en la investigación

Los ítems incluidos en el cuestionario de salud y nutrición, diseñado para esta investigación, se basaron en aquellos contenidos en otros instrumentos similares - disponibles en la web- desarrollados por instituciones reconocidas. Una importante proporción de dichos ítems fueron tomados y adaptados de los instrumentos elaborados por la Universidad de Florida (143), la Universidad de Indiana (144) y la Universidad de Nebraska (145). La proporción restante fue adicionada y ajustada por los investigadores con base en su conocimiento y teniendo en cuenta las observaciones hechas a distintas versiones del instrumento, las cuales fueron aplicadas a individuos no relacionados con la investigación.

Para el diseño del cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos se realizó una revisión bibliográfica sobre los principales aspectos y/o pautas para su construcción (Cuadro 2). Dado que el cumplimiento estricto de algunos de estos aspectos excedía el alcance de la presente investigación, fue necesario orientar el diseño de este instrumento sobre otras fuentes tales como la frecuencia de consumo de alimentos de la Encuesta Nacional de la Situación Nutricional en Colombia – ENSIN 2010 (108), la frecuencia de consumo de alimentos publicada en la investigación de Monsalve et al (146) y los grupos de alimentos descritos en las bases técnicas de las guías alimentarias para la población colombiana (147).

Cuadro 2. Pautas para la construcción de instrumentos de frecuencia de consumo de alimentos

Pauta	Descripción
Establecer las características de la población de estudio	Grupo etario: niños, adolescentes, adultos, etc.
	Condición fisiológica especial: embarazo o lactancia
	Estado de salud: sano, en riesgo, enfermo
Determinar el objetivo de la frecuencia	Explorar el consumo de grupos de alimentos específicos
	Derivar patrones de consumo de alimentos
	Estimar la ingesta de energía, nutrientes u otros componentes de la dieta
Buscar las fuentes primarias	Instrumento para la estimación del consumo de alimentos aplicado en una encuesta nacional
	Instrumento para la estimación del consumo de alimentos aplicado en una investigación
Definir el periodo de tiempo a evaluar	Establecido en meses hasta por un periodo de un año
Establecer el tipo de frecuencia a utilizar	Cualitativo
	Semi-cuantitativo
Determinar la forma de aplicación de la frecuencia	Aplicado por un encuestador entrenado
	Diligenciado por el sujeto de estudio
Definir el método de comparación para la validación de la frecuencia	Registro de pesaje de alimentos
	Recordatorio de 24 horas

Una breve descripción de las características de las fuentes utilizadas en la construcción del instrumento de frecuencia de consumo de alimentos es mostrada en la tabla 2. En la primera etapa del diseño del instrumento se adoptaron los alimentos y grupos de alimentos descritos en las bases técnicas de las guías alimentarias para la población colombiana. En la segunda etapa, se hizo una comparación entre los alimentos incluidos en los grupos anteriores y aquellos listados en las frecuencias de la ENSIN 2010 y de Monsalve et al., con el fin incluir alimentos no considerados al inicio y/o para generar nuevos grupos de alimentos. En la tercera etapa, se realizó una prueba del instrumento sobre individuos no relacionados con la investigación, para evaluar el funcionamiento del mismo y realizar los ajustes pertinentes con base en las observaciones obtenidas de este proceso.

Tabla 2. Características de las fuentes utilizadas para la construcción del instrumento de frecuencia de consumo de alimentos

Fuente	Grupos de alimentos	No. Ítems de alimentos	Comentarios
ENSIN 2010	-	33	Instrumento cualitativo con 10 opciones de respuesta por ítem.
Monsalve et al.	I-Lácteos	13	Instrumento semi-cuantitativo con 9 opciones de respuesta por ítem, construido con base en la información de consumo registrada en la ENSIN 2005 por el método de recordatorio de 24 horas.
	II-Huevos, carnes, pescados	23	
	III-Leguminosas y harinas	26	
	IV-Frutas	16	
	V-Verduras y hortalizas	13	
	VI-Aceites y grasas	13	
	VII-Dulces y postres	14	
	VIII-Miscelánea	10	
	IX-Bebidas	16	

Tabla 2. Continuación

Fuente	Grupos de alimentos	No. ítems de alimentos	Comentarios
Guías alimentarias	Cereales, raíces, tubérculos y plátanos	52	Los ítems de alimentos indicados corresponden a los intercambios de alimentos sugeridos para cada uno de los grupos de alimentos descritos.
	Hortalizas, verduras y leguminosas verdes	31	
	Frutas	34	
	Carnes, huevos, leguminosas secas y mezclas vegetales	46	
	Lácteos	20	
	Grasas	10	
	Azúcares y dulces	18	

Finalmente, el producto generado fue una frecuencia de consumo de tipo cualitativo compuesta por 92 ítems de alimentos congregados en 16 grupos, la cual dispone de 9 opciones de respuesta, las mismas utilizadas en el instrumento de Monsalve et al (146)., ya que estas permiten estimar el consumo de cada uno de los ítems de alimentos en un periodo de un año (Anexo IV). Otro aspecto adicional incluido en este instrumento fue la especificación del método de cocción en el caso de los grupos *Raíces, tubérculos y plátanos* y *Carnes, huevos y leguminosas secas*, y del tipo de endulzante utilizado en el caso de los jugos naturales y de las infusiones calientes para el grupo *Bebidas* (Anexo IV).

4.2.3 Selección de las frutas suministradas en la investigación

Las frutas suministradas en la fase de intervención del estudio (Tabla 3) fueron seleccionadas con base en el criterio de mayor consumo poblacional de acuerdo con los datos registrados en el documento titulado *Perfil nacional de producción y consumo de frutas y verduras en Colombia* publicado por el Ministerio de Salud y Protección Social (148). La fuente de información sobre la cual se construyeron las tablas de consumo, mostradas en este documento, fueron las bases de datos de la Encuesta Nacional de la Situación Nutricional en Colombia – ENSIN 2005 (149).

Tabla 3. Frutas suministradas en la fase de intervención de la investigación

Alimento	Parte comestible (%)*	Proporción de consumo (% de individuos)		
		Nacional	Cundinamarca	Bogotá
Banano	65	15,0	20,0	20,0
Mango	60	15,0	12,6	11,0
Manzana	85	5,0	4,7	10,6
Mandarina	70	4,0	4,2	7,9
Naranja	60	8,0	8,4	6,5
Fresa	95	2,0	6,0	6,4
Uva	90	1,0	1,2	2,3
Durazno	85	1,0	4,4	1,3

*Este dato fue obtenido de la *Tabla de composición de alimentos colombianos* (150)

El primer paso del procedimiento de selección consistió en la transcripción de los datos de consumo de frutas a nivel nacional, en el departamento de Cundinamarca y en la ciudad de Bogotá, en un archivo del programa Microsoft Excel (Anexo VI). El siguiente paso fue identificar aquellas frutas que podrían ser suministradas enteras, luego de lo cual se listó, en una nueva hoja, las 8 primeras frutas que mostraron la mayor proporción de consumo en dos de los tres niveles de discriminación (Nacional, Cundinamarca, Bogotá). De este listado inicial, la *granadilla* tuvo que ser sustituida por el *durazno* debido a que el porcentaje de parte comestible de la primera es del 30%, lo cual implicaba suministrar varias unidades de dicha fruta para cubrir la cantidad neta requerida para la fase de intervención (± 100 g).

Finalmente, es importante mencionar que las frutas seleccionadas fueron adquiridas en un almacén de cadena reconocido con el fin de obtener un producto de mayor calidad y con menor riesgo de deterioro, fueron almacenadas en un lugar adecuado de acuerdo con sus características y fueron manipuladas siguiendo las normas vigentes relacionadas con las buenas prácticas de manufactura, especialmente las establecidas en el Decreto 3075 de 1997 y en la Resolución 2674 de 2013 (151,152).

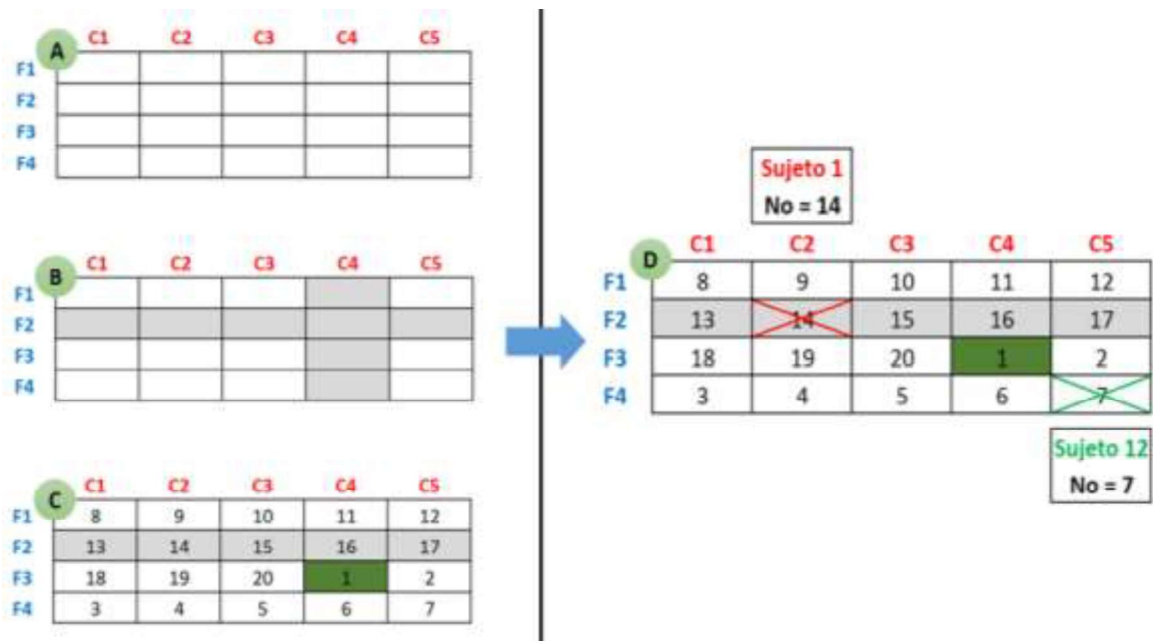
4.2.4 Intervención nutricional

Los individuos seleccionados para la intervención fueron asignados de manera aleatoria al grupo control (Ctr) o al grupo intervención (Int) en una relación de 1:3. En resumen, el

procedimiento partió de la construcción de una tabla en el programa Microsoft Excel sobre la cual, haciendo uso de la función *Aleatorio.entre*, se seleccionó una fila y una columna y de esta última una celda. En la tabla, la fila representaba la proporción de individuos a asignar al grupo control y la celda fue usada como punto de inicio para la numeración de la tabla (Figura 1).

Con la tabla anteriormente descrita, la cual fue diseñada para hombres y mujeres de manera independiente, se solicitó a cada voluntario(a) -de forma presencial o virtual- elegir un número de 1 a 20, el cual se buscó en la tabla correspondiente, con el fin de determinar el grupo de estudio al cual pertenecería cada uno de ellos (Figura 1). En este punto vale la pena indicar que en los casos donde el número de individuos seleccionados para la fase intervención supero los 20 espacios predefinidos en cada una de las tablas, se construyeron nuevas tablas independientes aplicando la metodología descrita en el párrafo anterior.

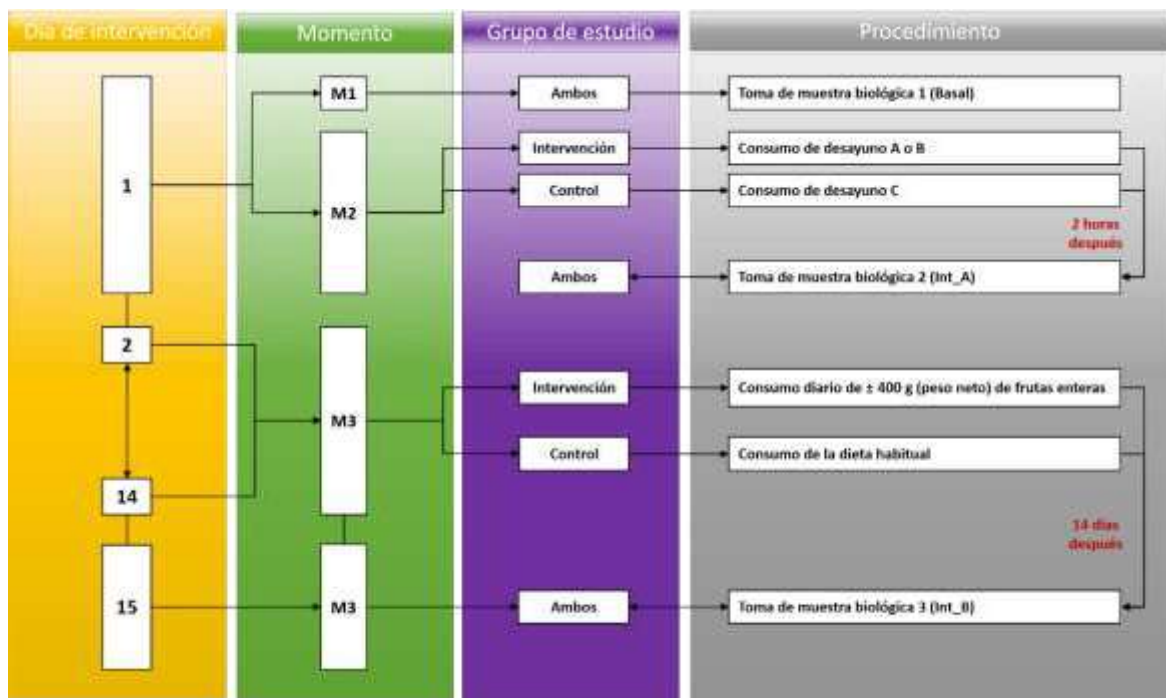
Figura 1. Procedimiento de asignación de los individuos a los grupos de estudio



A. Diseño de una tabla de 4 filas y 5 columnas. **B.** Selección aleatoria de una fila (Ej. F2), la cual representará a los individuos control, y de una columna (Ej. C4). **C.** Selección aleatoria de una celda dentro de la columna elegida en **B** (Ej. F3:C4) y numeración de la tabla de 1 a 20 a partir de dicha celda. **D.** Asignación aleatoria de los individuos a uno de los grupos de estudio (Ej. **Sujeto 1 al grupo control** y **sujeto 12 al grupo intervención**).

Los individuos asignados a su respectivo grupo de estudio fueron sometidos a los procedimientos de la fase intervención, la cual tuvo una duración de 2 semanas y fue dividida en tres momentos (Figura 2). En el primero (M1), los voluntarios fueron citados en las instalaciones del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia, luego de un ayuno previo de 10-12 horas, con el fin de tomar la muestra biológica inicial (Basal).

Figura 2. Esquema de las etapas de la fase de intervención nutricional de la investigación



La fase de intervención se desarrolló en un periodo de 15 días y fue dividido en 3 momentos principales (M1, M2 y M3), en cada uno de los cuales se tomó una muestra biológica (Basal, Int_A e Int_B).

El momento 2 (M2), que se llevó a cabo inmediatamente después de la toma de las muestras biológicas referidas en el párrafo anterior, se basó en el consumo de 1 de 3 desayunos posibles (Tabla 4) por parte de cada uno de los voluntarios. Los desayunos denominados A y B fueron asignados a los individuos del grupo intervención en orden de asistencia y el desayuno C fue exclusivo para los sujetos del grupo control. Luego de 2 horas de la ingesta de los desayunos, se tomó a los voluntarios una segunda muestra biológica (Int_A).

Tabla 4. Características de los desayunos suministrados durante la intervención nutricional

Desayuno	No. Ind	Alimentos	Cantidad promedio (g)	Contenido nutricional promedio*			
				Energía (Kcal)	Proteína (g)	Grasas (g)	CHO (g)
A	10	Banano Manzana Naranja Uva	410,9	226	2,67	1,03	51,56
B	12	Mandarina Fresa Durazno Mango	420,8	179	3,19	0,57	40,49
C	7	Kumis Galletas de soda	-	181	6,27	5,15	35,94

No. Ind. Número de individuos. **CHO.** carbohidratos | *Para el cálculo del contenido nutricional promedio se utilizó la información registrada en la versión online de la *Tabla de composición de alimentos colombianos* (153).

Para el momento 3 (M3), el cual se desarrolló entre los días 2 a 15, se proporcionó una cantidad diaria equivalente a 400g netos de fruta entera a los individuos del grupo intervención y en el caso de los voluntarios del grupo control se dejó que siguieran con su alimentación habitual. Para el suministro de las frutas se construyó una guía o minuta de 13 días, separada en dos partes o semanas, la cual estaba compuesta por agrupaciones de 3 frutas distintas por día (Cuadro 3). Las frutas de cada día fueron empacadas en bolsas individuales, previamente marcadas, para su entrega en tandas a cada uno de los voluntarios según su disponibilidad de tiempo.

Cuadro 3. Guía para el consumo de frutas durante la intervención nutricional

Parte	Frutas componentes por día						
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
1	Desayuno A o B	Naranja	Banano	Banano	Manzana	Banano	Manzana
		Uva Durazno	Uva Mandarina	Durazno Manzana	Naranja Mandarina	Mandarina Durazno	Uva Mandarina

Cuadro 3. Continuación

Parte	Frutas componentes por día						
	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	Día 12	Día 13	Día 14
2	Mandarina	Banano	Naranja	Banano	Manzana	Banano	Banano
	Uva	Manzana	Mandarina	Naranja	Naranja	Manzana	Naranja
	Durazno	Naranja	Durazno	Uva	Durazno	Uva	Mandarina

Una vez cada voluntario recibió las frutas de la primera tanda, la cual fue entregada al culminar los procedimientos del momento 2, se les proporcionó la parte 1 de la guía o minuta para que orientarán el consumo de dichas frutas de acuerdo a sus gustos, sin ingerir o combinar el contenido de más de una bolsa por día. Por otro lado, fueron instruidos para que, durante el periodo de intervención (incluyendo el día 1), no consumieran ninguna fruta entera adicional a las suministradas por los investigadores y enviaran evidencia fotográfica diaria de la ingesta de las mismas a través de medios electrónicos (e-mail, WhatsApp o similares).

Finalmente, en el día 15 de intervención los voluntarios fueron nuevamente citados en las instalaciones del Instituto de Genética de la Universidad Nacional, luego de un ayuno previo de 10-12 horas, para la toma de la muestra biológica final (Int_B). En este punto es importante señalar que todos los individuos incluidos en esta fase culminaron la misma de manera exitosa, por lo que se contó con muestras biológicas de 29 voluntarios para el desarrollo de las pruebas bioquímicas y genéticas.

4.3 Aspecto técnicos

4.3.1 Toma de medidas antropométricas

La valoración de las variables antropométricas (peso, talla y circunferencia de cintura) fue realizada por un profesional en nutrición y esta actividad se llevó cabo en uno de los consultorios el Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia, en el momento del día en que cada uno de los sujetos de estudio refirió tener disponibilidad. Para la toma de las medidas se solicitó a cada uno de los voluntarios usar ropa ligera el día de la prueba y se procuró realizar la estimación antes de que ellos ingirieran alguna de las comidas principales.

Para la estimación del peso corporal se utilizó una báscula mecánica marca *Health o Meter* con capacidad de 140 Kg y sensibilidad de 0,1 Kg. En el momento de la medición se pidió a cada individuo quitarse los zapatos y retirarse los objetos guardados en los bolsillos, así como aquellos usados como accesorios, tras lo que se les instruyó para subirse cuidadosamente a la báscula, fijando su mirada al frente y evitando moverse, para que el profesional realizará la toma de la medida, la cual repitió 2 o 3 veces de acuerdo a los resultados obtenidos.

En el caso de la talla, se usó un soporte de madera plano al cual se fijó una cinta métrica flexible a un metro del suelo. Durante la medición se solicitó a cada voluntario ubicarse delante de la cinta métrica juntando sus piernas, bajando sus brazos y fijando su mirada al frente, y simultáneamente se les pidió contactar sus talones, muslos, glúteos, espalda y cabeza al soporte. Una vez obtenida esta postura, se indicó a cada individuo que permitiera corregir la posición de su cabeza, que inhalara y exhalara profundamente y que se retirara del soporte una vez fuera indicado por el profesional, quien estimó la talla (en 2 o 3 ocasiones distintas) utilizando un segundo soporte que fue ubicado sobre la cabeza del voluntario y por debajo del cual se marcó la medida sobre la cinta métrica.

Finalmente, para la estimación de la circunferencia de la cintura se solicitó a cada sujeto subir su camiseta al nivel del pecho, cruzar sus brazos y fijar su mirada al frente, con esto el profesional ubicó el punto más estrecho de la cintura alrededor del cual posicionó una cinta métrica flexible. Seguidamente, se pidió a cada voluntario bajar sus brazos e inhalar y exhalar profundamente y, una vez que el individuo expulso todo el aire, el profesional capturó el valor de la medida. El proceso de medición señalado anteriormente fue repetido por duplicado o triplicado según los resultados obtenidos.

4.3.2 Obtención y procesamiento de las muestras biológicas

El material biológico consistió de muestras de sangre periférica obtenidas por punción venosa al vacío en uno de los antebrazos de cada uno de los voluntarios. El procedimiento fue desarrollado en los consultorios del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia, por una auxiliar de Enfermería y/o profesional en Bacteriología, de acuerdo con los protocolos estándar establecidos en la materia.

Un total de 8 muestras biológicas fueron obtenidas durante la fase de intervención: 3 en el momento 1 (Basal), 2 en el momento 2 (Int_A) y 3 en el momento 3 (Int_B). En los momentos 1 y 3 se recolectó una de las muestras en un tubo de tapa amarilla, que contenía sílice y un gel separador, mientras que las muestras restantes fueron recolectadas en un tubo tapa lila, que contenía el anticoagulante EDTA.

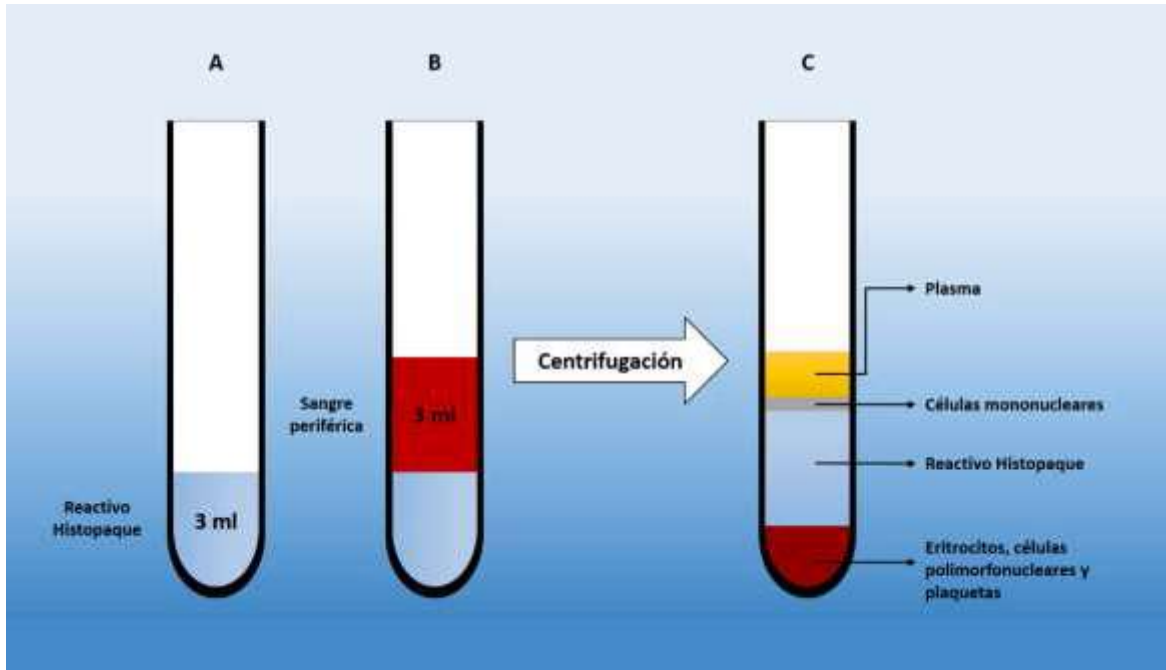
Las muestras contenidas en los tubos tapa amarilla fueron centrifugadas -dentro de un periodo de 5 a 15 min- a 2500 rpm por 10 min, luego de lo cual fueron refrigeradas hasta el momento de su envío a un laboratorio privado con el fin de que se les realizarán las pruebas bioquímicas de glicemia y perfil lipídico basal. Por otro lado, las muestras reservadas en los tubos tapa lila fueron procesadas en el Laboratorio 3 del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia, y fueron utilizadas de inmediato para la obtención de las células mononucleares.

4.3.3 Aislamiento de las células mononucleares

Este procedimiento se llevó a cabo utilizando el reactivo Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich) siguiendo las indicaciones del fabricante (154) con ajustes menores. El método consistió en la adición de 3 ml del reactivo a un tubo de 15 ml, al que posteriormente se agregó 3 ml de la muestra de sangre periférica teniendo cuidado de no generar ningún tipo mezcla. El tubo fue cargado en una centrifuga con rotor basculante, programada a ± 2.200 rpm por 30-40 min, para obtener un gradiente de densidad en el que las células mononucleares estaban representadas por la fase opaca ubicada entre el reactivo y el plasma (Figura 3).

Utilizando una pipeta de Pasteur se traspasó el pellet de células mononucleares a un segundo tubo de 15 ml, al cual se adicionó 10 ml de PBS 1X, con el fin de realizar una serie de lavados para eliminar trazas del reactivo y de otros componentes de la sangre. El contenido del tubo fue mezclado por inversión y seguidamente centrifugado a ± 2.200 rpm por 10 min, luego de lo cual se descartó el sobrenadante. El paso anterior fue repetido dos veces, adicionando esta vez 5 ml de PBS 1X, tras lo cual el pellet de células fue inmediatamente conservado a -80°C .

Figura 3. Esquema del procedimiento utilizado para el aislamiento de las células mononucleares de las muestras de sangre periférica



A. Adición del reactivo Histopaque a un tubo falcon de 15 ml. **B.** Adición de un volumen de la muestra de sangre periférica, la cual queda suspendida sobre el reactivo Histopaque. **C.** Gradiente de densidad obtenido luego de una centrifugación en un equipo con rotor basculante a ± 2200 rpm por 30-40 min.

4.3.4 Extracción de RNA total

La extracción de RNA total fue realizada haciendo uso del producto *PureLink® RNA Mini Kit* (Thermo Fische Scientific) siguiendo las indicaciones del fabricante (155), con ajustes menores, para obtención de RNA a partir de muestras de sangre total. El procedimiento, que fue desarrollado en un área especial haciendo uso de implementos descontaminados con el reactivo *RNase Away* (Thermo Fischer Scientific), se basó en 5 partes: a) mezcla del pellet de células con el búfer de lisis; b) adición de etanol absoluto a la mezcla anterior y traspaso del contenido a una columna; c) lavado de la columna con el búfer I e incubación de la columna con DNasa; d) lavado de la columna con el búfer II y e) elusión y almacenamiento del RNA.

La primera parte consistió en la adición de 200-300 μ l de búfer de lisis, el cual fue mezclado con el reactivo 2-mercaptoetanol, a 300-500 μ l del pellet de células mononucleares obtenidas previamente. Estos componentes se homogenizaron por pipeteo y se traspasaron a un tubo de 1,5 ml, que fue seguidamente sometido a una serie de

agitaciones a alta velocidad (*vortex*) y finalmente centrifugado 12.000 g por 2 min. En la segunda parte se añadió 200-300 µl de etanol absoluto a la mezcla, la cual fue transferida a una columna luego de aplicar una serie de agitaciones a alta velocidad. La muestra fue centrifugada a 12.000 g por 15 s tras lo cual el flujo de la columna, contenido en el tubo de colección, fue desechado.

En la tercera parte se agregó 350 µl del búfer I a la columna, se realizó una centrifugación a 12.000 g por 15 s, se descartó el flujo y se adicionó 80 µl de DNasa a la columna, que se dejó incubar por 15 min, luego de esto se añadió 350 µl de búfer I, se centrifugó de nuevo a 12.000 g por 15 s y se pasó la columna a un nuevo tubo de colección. En la cuarta parte se realizaron dos lavados consecutivos con el búfer II, en los que 500 µl de este fueron adicionados a la columna para su centrifugación a 12.000 g por 15 s, descartando entre cada lavado el flujo de reactivo. Después de culminar el segundo lavado, la columna fue centrifugada a 12.000 g por 2 min e insertada en un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml.

Finalmente, en la quinta parte se realizó la elución del RNA total agregando 30-40 µl de agua libre de nucleasas al centro de la columna para incubación por 2 min a temperatura ambiente, tras lo cual se llevó a cabo una centrifugación a 16.000 g por 2 min. Por último, 2 µl del RNA total obtenido fue cuantificado en un espectrofotómetro (*NanoDrop 2000 o NanoVue Plus*) y la cantidad restante fue almacenada a -80°C.

4.3.5 Reacción de transcripción reversa (RT)

La transcripción reversa fue realizada utilizando el producto *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Thermo Fischer Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante (156). Para la reacción se preparó una solución RT (Tabla 5) de la cual, luego de una homogenización corta en una microcentrifuga (spin), se transfirió 10 µl a un tubo de 0,2 ml el cual fue mantenido en hielo. Seguidamente se adicionó 10 µl de RNA total, este último con una concentración <200 ng/µl y con una relación 260/280 $\geq 1,8$, al tubo con la solución RT. Una vez la mezcla fue homogenizada, el tubo se cargó en un termociclador Bio-Rad T100 programado con las siguientes condiciones: a) 25°C x 10 min, b) 37°C x 120 min, c) 85°C x 5 min y d) 4°C x ∞. Finalmente, luego del proceso de termociclado, la muestra de cDNA obtenida fue almacenada entre -15 y -25°C hasta su uso.

Tabla 5. Componentes de la solución de transcripción reversa (RT)

Componente	Volumen por reacción (µl)
Búfer RT 10X	2,0
dNTPs 25X (10 mM)	0,8
Cebadores 10X (Random primers)	2,0
Enzima (Transcriptasa reversa)	1,0
Inhibidor de RNasas	1,0
Agua libre de nucleasas	3,2
Volumen total por reacción	10,0

RT. Reverse transcription. dNTP. Deoxynucleotide triphosphate. RNasa. Ribonucleasa.

4.3.6 Cebadores (primers) empleados en la investigación

Los cebadores (primers) utilizados fueron diseñados usando las herramientas bioinformáticas *Primer-Blast* (157) y *Primer3 Input* (158), prestando especial atención a aspectos como la ubicación del cebador entre las uniones intrón-exón, un contenido de guanina-citosina (GC) entre 40 y 60%, una temperatura de fusión (T_m) entre 55 y 65°C, un tamaño de amplicón ≤ 400 pb) y una baja complementariedad. Una vez los cebadores cumplieron con los criterios anteriores fueron enviados a un laboratorio externo especializado para su síntesis.

Un total de 8 parejas de cebadores fueron generados para los análisis de expresión relativa (Tabla 6), de las cuales 5 representaban genes que codifican para receptores de la membrana celular (*IL1R*, *IL6R*, *TLR2*, *TLR4* y *TNFR*) y una para un gen que codifica para un factor de transcripción (*NFκB*). Las dos parejas restantes representaban genes que fueron utilizados como referencias (*rRNA 18S* y *ACTB*), cuya elección se basó en la información de estudios previos.

Tabla 6. Características de los cebadores de cada uno de los genes de estudio

Gen	RNAs (ID_NCBI)	Cebadores (Primers)			
		Secuencia	%GC	Tm (°C)	Amplificación (pb)
IL1R (IL1R1)	NM_000877.3	F: CTGGACCCCTTGGTAAAAGAC	52,4	61,3	179
	NM_001288706.1	R: AGAGGACAGGGACGAACATC	55,0	60,5	
IL6R	NM_000565.3	F: GCACTTGCTGGTGGATGTTTC	55,0	60,5	128
	NM_001206866.1	R: AGAGCACAGCCTTTGTCGTC	55,0	60,5	
	NM_181359.2				
TLR2	NM_003264	F: GCCCATTGCTCTTCACTGC	55,0	60,5	175
		R: TGAGCTGCCCTTGACAGATAC	55,0	60,5	
TLR4	NM_138554.4 (v1)	F: TGCCTGAGACCAGAAAGCTG	55,0	60,5	259 (v1)
	NM_003266.3 (v3)	R: TAGAGAGGTGGCTTAGGCTCTG	54,5	64,0	379 (v3)
	NM_138557.2 (v4)				92 (v4)
TNFR (TNFRSF1A)	NM_001065.3	F: GTTGTGCCTACCCAGATTG	55,0	60,5	175
		R: CGATTTCCACAAACAATGGAG	45,5	60,3	
NFκB (RELA)	NM_001145138.1	F: CTCCTTTTCGCAAGCTGATGTG R: TTCTCCTCAATCCGGTGACG	50,0	62,1	192
	NM_001243984.1		55,0	60,5	
	NM_001243985.1				
	NM_021975.3				
ACTB	NM_001101.3	F: AGCACAGAGCCTCGCCTTTG	60,0	62,5	212
		R: AATCCTTCTGACCCATGCCAC	54,6	64,0	
rRNA 18S (RNA18S5)	NR_003286.2	F: GTAACCCGTTGAACCCATTC	52,4	61,3	165
		R: AGGGCCTCACTAAACCATCC	55,0	60,5	

ID_NCBI. Código asignado a la secuencia de RNA en la base de datos del NCBI. %GC. Porcentaje de guanina:citosina. Tm. Temperatura de fusión (melting) reportada por la compañía fabricante. V. Variante del gen | **IL1R (IL1R1)**. Interleukin 1 receptor type 1. **IL6R**. Interleukin 6 receptor. **TLR2**. Toll-like receptor 2. **TLR4**. Toll-like receptor 4. **TNFR (TNFRSF1A)**. TNF receptor superfamily member 1A. **NFκB (RELA)**. RELA proto-oncogene, NF-κB subunit. **ACTB**. Actin beta. **rRNA 18S (RNA18S5)**. RNA, 18S ribosomal 5.

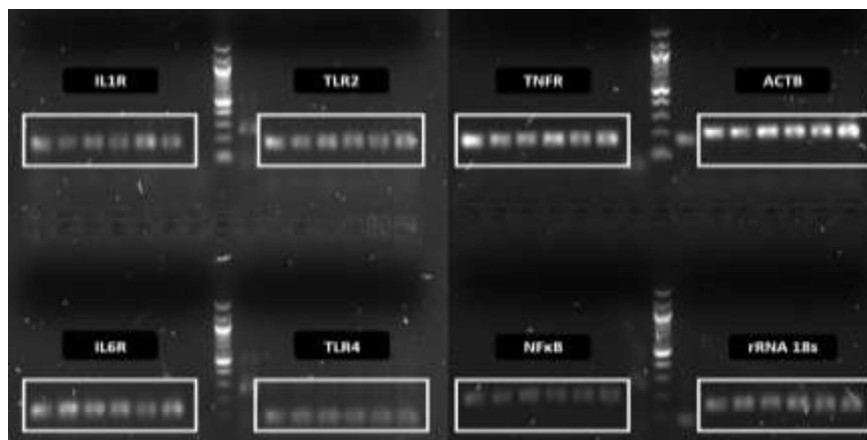
4.3.7 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)

El ensayo de qPCR fue utilizado para determinar el *ciclo de cuantificación (Cq)* de cada uno de los genes de estudio en cada una de las muestras biológicas evaluadas. El Cq hace referencia al ciclo de la reacción de qPCR en el que la fluorescencia, emitida por un agente intercalante que se fija únicamente al DNA de doble cadena, supera un valor umbral pre-establecido (159). Teniendo en cuenta esto, el Cq constituye una estimación indirecta e inversamente proporcional de la concentración de DNA presente en una muestra biológica particular, lo que permite realizar una evaluación óptima de los cambios en la expresión génica (159).

Con el propósito de estandarizar las condiciones de la qPCR se llevaron a cabo tres pruebas importantes: la primera para determinar la concentración adecuada de cebadores a utilizar; la segunda para evaluar la especificidad de unión de los cebadores a los genes de estudio y, la tercera, para establecer la eficiencia de la amplificación de los genes de estudio y definir el rango dinámico de la reacción de qPCR. En el primer caso, se realizó un ensayo de qPCR en el que se compararon tres concentraciones distintas de cada par de cebadores: 0,2 μM , 0,5 μM y 0,8 μM , el cual evidenció que las dos primeras eran las opciones más apropiadas por no mostrar mayores diferencias entre sí en términos del Cq obtenido (Anexo VII).

En el segundo caso, la especificidad de cada par de cebadores se evaluó por medio de un ensayo de qPCR, que se llevó a cabo sobre un conjunto de muestras de cDNA obtenidas de individuos no relacionados con el estudio, el cual evidenció la presencia de un pico único en la curva de fusión (*melting*) para cada uno de los casos, lo que fue indicativo de una alta especificidad de los cebadores en la amplificación de su gen blanco (Anexo VIII). Con el fin de verificar este resultado se realizó una electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos obtenidos de esta qPCR, la cual mostró que los productos amplificados se correspondieron con los tamaños de fragmento (*amplicón*) esperados para cada uno de los genes de estudio (Figura 4).

Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa de los amplificados de los genes de estudio



Las bandas enmarcadas en los rectángulos corresponden a los amplificados de cada uno de los genes analizados | Los marcadores de peso molecular en escala de 100 – 1.200 pb | Las bandas no enmarcadas corresponden a controles positivos | **IL1R** (*IL1R*). Interleukin 1 receptor type 1, 179 pb. **IL6R**. Interleukin 6 receptor, 128 pb. **TLR2**. Toll-like receptor 2, 175 pb. **TLR4**. Toll-like receptor 4; 259 pb, 379 pb y 92 pb para las variantes 1, 2 y 4, respectivamente. **TNFR** (*TNFRSF1A*). TNF receptor superfamily member 1A, 175 pb. **NFkB** (*RELA*). RELA proto-oncogene, NF-kB subunit, 192 pb. **ACTB**. Actin beta, 212 pb. **rRNA 18S** (*RNA18S5*). RNA, 18S ribosomal 5, 165 pb.

En el tercer caso, la eficiencia de amplificación de los genes de estudio y el rango dinámico de la reacción de qPCR fueron establecidos por medio de la construcción de una curva estándar relativa (Anexo IX). Para esto se partió de una muestra biológica, de características similares a las analizadas en la investigación, de la que el cDNA obtenido fue sometido a tres diluciones seriadas (1/5, 1/25 y 1/125) y posteriormente amplificado a través de una reacción de qPCR. El resultado de este ensayo indicó que concentraciones de cDNA entre 1 y 28 ng/μl (rango dinámico) podrían ser óptimas para llevar a cabo la prueba de qPCR sobre las muestras biológicas de estudio, además, que la eficiencia de la amplificación de cada uno de los genes de estudio fue adecuada puesto que se ubicó cerca del valor estándar de 2 (Tabla 7), donde este último indica el incremento exponencial esperado en la concentración de DNA tras la finalización de cada uno de los ciclos de cuantificación establecidos dentro de la reacción de qPCR (159).

Tabla 7. Eficiencia de la amplificación de los genes de estudio en los ensayos de qPCR

Gen	Eficiencia Ensayo 1	Eficiencia Ensayo 2	Eficiencia Promedio
<i>IL1R</i>	2,40	2,17	2,27
<i>IL6R</i>	2,15	2,06	2,10
<i>TLR2</i>	2,05	1,98	2,01
<i>TLR4</i>	2,05	2,09	2,07
<i>TNFR</i>	2,03	2,06	2,04
<i>NFκB</i>	2,02	2,04	2,03
<i>ACTB</i>	2,07	2,05	2,06
<i>rRNA 18S</i>	1.96	1.91	1.93

IL1R (IL1R1). Interleukin 1 receptor type 1. *IL6R*. Interleukin 6 receptor. *TLR2*. Toll-like receptor 2. *TLR4*. Toll-like receptor 4. *TNFR (TNFRSF1A)*. TNF receptor superfamily member 1A. *NFκB (RELA)*. RELA proto-oncogene, NF-κB subunit. *ACTB*. Actin beta. *rRNA 18S (RNA18S5)*. RNA, 18S ribosomal 5.

Finalmente, con la información obtenida de las tres pruebas descritas se procedió al desarrollo del ensayo de qPCR sobre las muestras biológicas de estudio, para lo cual se utilizó el kit de amplificación *FastStart Essential DNA Green Master* (Roche) siguiendo las indicaciones del fabricante (160). En resumen, 18 μl de una solución compuesta por búfer de reacción, cebadores y agua libre de nucleasas (Tabla 8), fue mezclada con 2 μl de cDNA a concentración de 2 ng/μl en cada uno de los pozos la placa de 96 reacciones. La

placa fue centrifugada a 1.500 g por 2 min y luego cargada en el termociclador de tiempo real *LigthCycler 96* (Roche).

Tabla 8. Componentes de la solución de reacción para el ensayo de qPCR

Componente	Volumen por reacción (µl)
Agua libre de nucleasas	6
Cebadores 10X (10 µM)	2
Búfer de reacción 2X (Master Mix)	10
Volumen total	18

El programa configurado en el termociclador consistió de: **a)** un ciclo de pre-incubación a 95°C por 600s (10 min); **b)** 40 ciclos con desnaturalización a 95°C por 30s, hibridación de los cebadores a 55°C por 30s y extensión a 72°C por 45s; **c)** un ciclo de fusión (*melting*) a 95°C por 5s, 55°C por 60s y 98°C por 1s; y **d)** un ciclo de enfriamiento a 40°C por 10s. Los datos obtenidos luego de la aplicación del proceso anterior, básicamente los valores Cq por gen y las curvas de fusión, fueron procesados usando el software LightCycler 96 SW versión 1.1 (Roche) teniendo en cuenta el esquema de distribución de las muestras de estudio dentro de cada una de las placas de reacción utilizadas en el ensayo de qPCR (Figura 5).

Figura 5. Esquema general de la distribución de las muestras biológicas de estudio dentro las placas de reacción utilizadas en el ensayo de qPCR

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	18S - Basal	18S - Int_A	18S - Int_B	18S - Cal	18S (-)							
B	TLR2 - Basal	TLR2 - Int_A	TLR2 - Int_B	TLR2 - Cal	TLR2 (-)							
C	IL1R - Basal	IL1R - Int_A	IL1R - Int_B	IL1R - Cal	IL1R (-)							
D	TNFR - Basal	TNFR - Int_A	TNFR - Int_B	TNFR - Cal	TNFR (-)							
E	ACTB - Basal	ACTB - Int_A	ACTB - Int_B	ACTB - Cal	ACTB (-)							
F	TLR4 - Basal	TLR4 - Int_A	TLR4 - Int_B	TLR4 - Cal	TLR4 (-)							
G	IL6R - Basal	IL6R - Int_A	IL6R - Int_B	IL6R - Cal	IL6R (-)							
H	NFκB - Basal	NFκB - Int_A	NFκB - Int_B	NFκB - Cal	NFκB (-)							

Basal. Muestra biológica del momento 1. **Int_A.** Muestra biológica del momento 2. **Int_B.** Muestra biológica del momento 3. **Cal.** Muestra calibradora. (-). Controles negativos. | **IL1R (IL1R1).** Interleukin 1 receptor type 1. **IL6R.** Interleukin 6 receptor. **TLR2.** Toll-like receptor 2. **TLR4.** Toll-like receptor 4. **TNFR (TNFRSF1A).** TNF receptor superfamily member 1A. **NFκB (RELA).** RELA proto-oncogene, NF-kB subunit. **ACTB.** Actin beta. **rRNA 18S (RNA18S5).** RNA, 18S ribosomal 5. | **Nota 1.** Cal es una única muestra biológica que se utiliza para normalizar los datos por las variaciones inter-ensayo que se presentan al llevar a cabo cada una de las reacciones de qPCR en una investigación | **Nota 2.** En cada placa de reacción se amplificaron las muestras biológicas de estudio de un único individuo.

4.4 Procesamiento de datos

4.4.1 Variables evaluadas en la investigación

Los datos obtenidos del cuestionario de salud y nutrición, del instrumento de frecuencia de consumo de alimentos, de las pruebas bioquímicas y de los ensayos genéticos fueron digitalizados y almacenados en un libro del programa Microsoft Excel (Anexo V), el cual constituyó la base de datos de la investigación. Las variables objeto de análisis se agruparon en 5 categorías principales a saber: salud, antropométricas, consumo, bioquímicas y genéticas (Cuadro 4).

Cuadro 4. Variables evaluadas en la investigación

Categoría	Variable	Descripción
Salud	Hábito de sueño	Auto-percepción de hábito de sueño Op-Rp: Si o No
	Consumo de alcohol	Auto-reporte de consumo actual de bebidas alcohólicas Op-Rp: Si o No
	Actividad física	Auto-reporte de práctica de actividad física Op-Rp: Si o No
	Hábitos alimentarios	Auto-percepción de hábitos alimentarios Op-Rp: Excelente, bueno, regular o malo
	Nivel de estrés	Auto-percepción del nivel general de estrés Op-Rp: 1, 2, 3, 4 o 5
Consumo	Frecuencia de consumo	Puntuación de consumo (score) para cada uno de los grupos de alimentos especificados en el instrumento de frecuencia de consumo
Antropométricas	Índice de masa corporal (IMC)	Relación del peso (Kg) sobre la talla (m) elevada al cuadrado
	Circunferencia de la cintura	Diámetro (cm) del punto más estrecho entre la última costilla y la cresta iliaca
Op_Rp. Opción de respuesta para la variable		

Cuadro 4. Continuación

Categoría	Variable	Descripción
Bioquímicas	Glicemia basal	Nivel sérico (mg/dL) de glicemia
	Colesterol total basal	Nivel sérico (mg/dL) de colesterol total
	Colesterol LDL basal	Nivel sérico (mg/dL) de colesterol LDL
	Colesterol HDL basal	Nivel sérico (mg/dL) de colesterol HDL
	Triglicéridos basales	Nivel sérico (mg/dL) de triglicéridos
Genéticas	Expresión génica	Tasa del valor Cq de un gen de interés sobre el valor Cq de dos genes de referencia en la muestra de estudio, ajustada por los valores Cq de los mismos genes en una muestra normalizadora
Cq. Ciclo de cuantificación		

En el caso particular de la variable *frecuencia de consumo* es importante mencionar que la puntuación (*score*), registrada en la base de datos, fue construida a partir de una variable cualitativa estimada por medio del instrumento de frecuencia de consumo de alimentos. En resumen, el procedimiento de transformación consistió en el cálculo de un factor de equivalencia, en número de veces por día, para cada una de las opciones de frecuencia indicadas en el instrumento. Luego de esto, el factor fue multiplicado por el número total de respuestas obtenidas para la opción respectiva dentro de cada uno de los grupos de alimentos evaluados. Finalmente, todos los productos anteriores fueron sumados y seguidamente divididos entre el número total de ítems de alimentos por grupo, tras lo cual se escaló el cociente obtenido a un valor entre 0 y 1 (Tabla 9).

Tabla 9. Procedimiento para el cálculo de la puntuación (score) a partir de los datos obtenidos del instrumento de frecuencia de consumo de alimentos

Opción de frecuencia	Factor de equivalencia	Factor de escalamiento	Ejemplo del cálculo de la puntuación (score) de consumo*				
			A	B	C	D	E
Casi nunca	0,0164	0,1667	Frutas enteras	13	4	0,0658	0,4254
1-3 v/mes	0,0667				3	0,2001	
1 v/sem	0,1429				1	0,1429	
2-4 v/sem	0,4286				5	2,1430	
5-6 v/sem	0,7857				-	-	
1 v/día	1,0000				-	-	
2-3 v/día	2,5000				-	-	
4-6 v/día	5,0000				-	-	
Más de 6 v/día	6,0000				-	-	
Totales					13	2,552	

v/mes. Número de veces por mes. v/sem. Número de veces por semana. v/día. Número de veces por día | A. Grupo de alimentos. B. Número de ítems de alimentos en A. C. Número de respuestas por opción de frecuencia. D. Producto del factor de equivalencia multiplicado por C. E. Producto del total de D multiplicado por el factor de escalamiento. Este dato representa la puntuación (score) registrado en la base de datos | *La puntuación (score) se calculó de la misma manera para cada uno de los grupos de alimentos del instrumento de frecuencia de consumo de alimentos.

Por su parte, en el caso de la variable *expresión génica*, se debe tener presente que la información almacenada en la base de datos corresponde a un valor de *expresión relativa* que está representado como una *tasa*, la cual fue calculada por el software del equipo de termociclado *LigthCycler 96* con base en la siguiente ecuación:

$$\frac{E_T^{(Cq_{T,cal}-Cq_T)}}{\sqrt{E_{R1}^{(Cq_{R1,cal}-Cq_{R1})} \times E_{R2}^{(Cq_{R2,cal}-Cq_{R2})}}}$$

donde **ET** y **ER** representan las eficiencias de la amplificación del gen de interés y de cada uno de los genes de referencia, respetivamente; **CqT** y **CqR** simbolizan el ciclo de cuantificación del gen de interés y de cada uno de los genes de referencia, respectivamente, en la muestra de estudio y; **CqT,cal** y **CqR,cal** se refieren al ciclo de

cuantificación (Cq) del gen de interés y de cada uno de los genes de referencia, respectivamente, en la muestra calibradora o normalizadora (159).

De la ecuación anterior es importante señalar que la tasa de expresión relativa se estima únicamente para cada uno de los genes de interés en cada una de las muestras de estudio, por otro lado, que el valor de dicha tasa es un número adimensional que cobra significado sólo cuando se utiliza para realizar comparaciones entre distintas muestras de estudio (159). Considerando lo indicado, los datos obtenidos para cada uno de los genes en la muestra calibradora, así como para los genes de referencia en la muestra de estudio, constituyen *factores normalizadores* de dicha tasa, cuyo requisito indispensable es que presenten un comportamiento relativamente constante independientemente de las condiciones de estudio, lo que permite ajustar los datos de los genes de interés por las variaciones, intrínsecas y extrínsecas, que se presentan durante el desarrollo de cada uno de los ensayos de qPCR en una investigación particular (159).

4.4.2 Pruebas estadísticas empleadas en la investigación

Las pruebas estadísticas aplicadas en esta investigación (Cuadro 5) fueron ejecutadas a través del software libre del programa RStudio (161). Previo al empleo de cada una de estas pruebas, se transformaron las tasas de la variable *expresión génica* a valores de la escala *logarítmica* en base 10, ya que la interpretación de la magnitud de los cambios es difícil de realizar cuando las tasas se ubican entre valores de 0 y 1. Por otro lado, en el caso de la variable *frecuencia de consumo*, se construyeron terciles de ingesta para cada uno de los grupos de alimentos evaluados de acuerdo al puntaje (score) de consumo calculado para cada uno de los sujetos de estudio.

Cuadro 5. Pruebas estadísticas aplicadas en la investigación

Tipo de análisis	Tipo de prueba	Relación entre grupos o muestras	Pruebas estadísticas empleadas	
			Inicial	Post-hoc
Comparaciones de dos grupos o muestras	Paramétrica	Independientes	t de Student	----
		Relacionados		

La línea punteada indica que el ítem no aplica para dicho caso

Cuadro 5. Continuación

Tipo de análisis	Tipo de prueba	Relación entre grupos o muestras	Pruebas estadísticas empleadas	
			Inicial	Post-hoc
Comparaciones de dos grupos o muestras	No paramétrica	Independientes	U de Mann-Whitney	----
		Relacionados	Wilcoxon	----
Comparaciones de tres o más grupos o muestras	Paramétrica	Independientes	Anova de una vía	Tukey HDS
		Relacionados		
	No paramétrica	Independientes	Kruskal-Wallis	U de Mann-Whitney*
		Relacionados	Friedman	Wilcoxon*
Correlación lineal	Paramétrica	----	Pearson	----
	No paramétrica		Spearman	

La línea punteada indica que el ítem no aplica para dicho caso | * El p-valor obtenido de estas pruebas fue ajustado aplicando el test de Bonferroni en todos los casos en los que se realizaron comparaciones múltiples

Finalmente, con el fin de identificar datos atípicos a 1,5 rangos intercuartílicos y definir también el tipo de prueba estadística a utilizar sobre las variables cuantitativas, se construyeron diagramas de caja y se aplicaron los test de Shapiro-Wilk y Levene para evaluar los supuestos de normalidad y homocedasticidad, respectivamente. Por último, con el propósito de establecer diferencias estadísticamente significativas entre los grupos o muestras objeto de análisis, se determinó un nivel de significación de $\alpha=0,05$ en todos los casos.

5. Resultados

5.1 Descripción de los sujetos de estudio

De las 47 personas reclutadas al inicio de la investigación el 61,7% (29 individuos) culminó exitosamente con todos los procedimientos establecidos para la misma. De este último grupo de individuos se destaca que el 79,3% refirió no estar bajo ningún tratamiento médico reciente, el 72,4% reportó no consumir medicamentos, 55,2% indicó consumir alcohol, el 65,5% señaló tener buenos hábitos alimentarios, el 55,2% reportó realizar algún tipo de actividad física y el 65,5% refirió tener un hábito de sueño óptimo (Tabla 10).

Tabla 10. Comportamiento de las variables de salud en la muestra de individuos analizada

Variable	Opción de Respuesta	Número de individuos	Proporción del total (%)
Tratamiento médico	Si	5	17,2
	No	23	79,3
	Sin Dato	1	3,5
Consumo de medicamentos	Si	8	27,6
	No	21	72,4
	Sin Dato	-	-
Consumo de alcohol	Si	16	55,2
	No	12	41,4
	Sin Dato	1	3,4
Hábito de sueño	Si	19	65,5
	No	10	34,5
	Sin Dato	-	-

Tabla 10. Continuación

Ítem	Opción de Respuesta	Número de individuos	Proporción del total (%)
Actividad física	Si	16	55,2
	No	13	44,8
	Sin Dato	-	-
Hábitos alimentarios	Excelente	-	-
	Bueno	19	65,5
	Regular	10	34,5
	Malo	-	-
	Sin Dato	-	-

La distribución por sexo en el grupo de sujetos de estudio fue de un 75,9% de mujeres y un 24,1% de hombres, por otro lado, la asignación de estos sujetos a los grupos de tratamiento fue de 75,9% para el grupo intervención y de 24,1% para el grupo control. Al comparar los datos de algunas variables de interés según el sexo, se observó que la circunferencia de la cintura fue significativamente mayor en los hombres respecto de las mujeres y que el nivel sérico de colesterol HDL fue significativamente inferior en los hombres comparado con las mujeres (Tabla 11). El contraste de dichas variables fue también realizado de acuerdo al grupo de tratamiento, sin embargo, no se evidenció ningún tipo de diferencia significativa en este caso (Tabla 11).

Tabla 11. Comportamiento de las variables antropométricas y bioquímicas en la muestra de individuos analizada

Variable	Sexo		Grupo de estudio		Todos (n=29)
	Mujeres (n=22)	Hombres (n=7)	Intervención (n=22)	Control (n=7)	
Edad (años)	23,8 ± 4,1	25,1 ± 2,1	24,2 ± 4,0	23,9 ± 2,8	24,1 ± 3,7
IMC (kg/m ²)	21,3 ± 2,1	23,7 ± 3,4	23,0 ± 2,7	21,0 ± 2,2	21,9 ± 2,6
Circunferencia de la cintura (cm)	70,4 ± 4,8	83,4 ± 11,8 [▯]	73,7 ± 9,3	73,0 ± 8,1	73,5 ± 8,9

Los valores presentados corresponden al promedio con su respectiva desviación estándar | [▯]p-valor (Hombres vs Mujeres) = 0,0009 según el test de Mann-Whitney

Tabla 11. Continuación

Variable	Sexo		Grupo de estudio		Todos (n=29)
	Mujeres (n=22)	Hombres (n=7)	Intervención (n=22)	Control (n=7)	
Glicemia basal (mg/dL)	82,3 ± 8,6	85,3 ± 8,0	82,1 ± 7,3	85,7 ± 11,3	83,0 ± 8,4
Colesterol total (mg/dL)	163,2 ± 24,1	155,7 ± 44,8	163,2 ± 24,9	155,7 ± 43,2	161,4 ± 29,6
Colesterol LDL (mg/dL)	87,3 ± 24,2	89,6 ± 41,1	87,0 ± 25,3	90,6 ± 39,6	87,8 ± 28,6
Colesterol HDL (mg/dL)	55,2 ± 9,0*	44,7 ± 6,3	53,4 ± 10,4	50,3 ± 5,7	52,7 ± 9,5
Triglicéridos (mg/dL)	102,7 ± 76,3	99,4 ± 55,4	110,7 ± 78,7	74,1 ± 24,8	101,9 ± 70,9

Los valores presentados corresponden al promedio con su respectiva desviación estándar | *p-valor (Mujeres vs Hombres) = 0,0041 según la prueba t de Student

5.2 Comportamiento de los factores normalizadores de la tasa de expresión relativa de los genes de interés

En el cálculo de la tasa de expresión relativa de los genes de interés, como fue indicado en la metodología, es necesario realizar un análisis del comportamiento de cada uno de sus factores normalizadores, en este caso de los genes de estudio en la muestra calibradora y de los genes de referencia en las muestras de estudio. De este aspecto, es importante mencionar que la muestra utilizada como calibradora en esta investigación corresponde a una muestra de sangre periférica obtenida de uno de los investigadores, cuyo cDNA fue amplificado por qPCR en cada una de las placas de reacción de cada uno de los sujetos de estudio. Por otro lado, se debe recordar que los genes *rRNA 18S* y *ACTB* fueron seleccionados como genes de referencia para este estudio.

En el primer caso, la evaluación del comportamiento del Cq de los genes de estudio en la muestra calibradora evidenció que, con excepción del gen *TLR4*, se presentaron datos atípicos dentro de las 58 réplicas de cada uno de dichos genes (Tabla 12). Por otro lado, al contrastar el Cq obtenido para cada uno de los genes de esta muestra en los 29 ensayos de qPCR realizados, se observaron diferencias estadísticamente significativas para cada uno de estos genes según la prueba de comparaciones múltiples, sin embargo, este resultado no fue validado por el test post-hoc correspondiente, ya que en el mismo no se identificó

ningún cambio significativo en el Cq de dichos genes entre los distintos ensayos (Tabla 12).

Tabla 12. Comportamiento del Cq de los genes de estudio en la muestra calibradora

Gen	No. Replicas*	No. Atípicos [∞]	Mediana (Cq)	Media (Cq)	DE (Cq)	Friedman (p-valor) [⌘]	Wilcoxon (p-valor) [Ⓢ]
<i>rRNA 18S</i>	58	3	11,16	11,22	0,42	2,621 e-14	> 0,05
<i>ACTB</i>	58	6	18,14	18,22	0,26	2,621 e-14	> 0,05
<i>IL1R</i>	58	4	29,18	29,21	0,49	2,621 e-14	> 0,05
<i>IL6R</i>	58	2	24,41	24,45	0,36	2,621 e-14	> 0,05
<i>NFκB</i>	58	4	23,91	23,98	0,31	2,621 e-14	> 0,05
<i>TLR2</i>	58	2	25,59	25,64	0,34	2,621 e-14	> 0,05
<i>TLR4</i>	58	-	23,73	23,80	0,47	2,621 e-14	> 0,05
<i>TNFR</i>	58	4	22,91	22,95	0,34	2,621 e-14	> 0,05

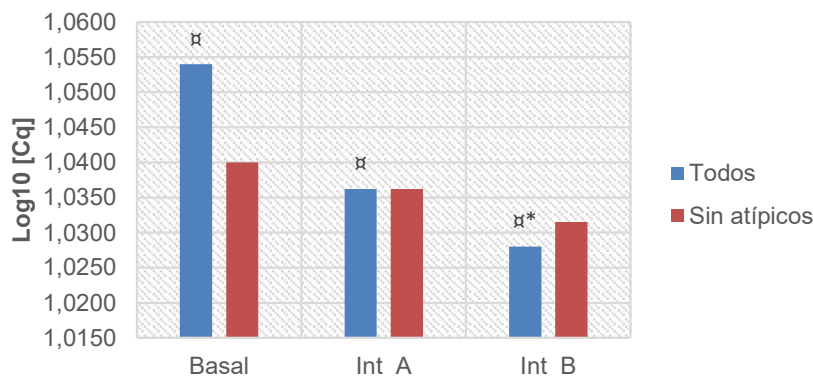
DE. Desviación estándar | * El número de réplicas por placa fue 2 y el número de placas utilizadas fue 29; [∞] Datos atípicos identificados a 1,5 rangos intercuartílicos a través de gráficos boxplot; [⌘] p-valor obtenido luego de comparar las réplicas de cada gen en las 29 placas; [Ⓢ] p-valor ajustado por la prueba de Bonferroni, el cual indica la tendencia del p-valor en todas las comparaciones realizadas en la prueba post-hoc | *IL1R (IL1R1)*. Interleukin 1 receptor type 1. *IL6R*. Interleukin 6 receptor. *TLR2*. Toll-like receptor 2. *TLR4*. Toll-like receptor 4. *TNFR (TNFRSF1A)*. TNF receptor superfamily member 1A. *NFκB (RELA)*. RELA proto-oncogene, NF-κB subunit. *ACTB*. Actin beta. *rRNA 18S (RNA18S5)*. RNA, 18S ribosomal 5.

En el segundo caso, el análisis del comportamiento de los genes de referencia partió de una inspección visual del valor Cq obtenido para cada uno de dichos genes entre las muestras de estudio. Este procedimiento permitió identificar tres datos atípicos en la muestra basal y un dato atípico en la muestra Int_B para el gen *rRNA 18S*, mientras que para el gen *ACTB* no se observó la presencia de datos atípicos en ninguna de las muestras de estudio (Anexo X-C). El proceso anterior fue replicado, esta vez sobre el cociente del Cq de ambos genes de referencia (*rRNA 18S/ACTB*), lo cual mostró dos datos atípicos en la muestra Basal y uno en la muestra Int_B (Anexo X-C).

Considerando lo anterior, se procedió a realizar las comparaciones de los valores Cq de los genes de referencia entre las muestras biológicas de estudio incluyendo y excluyendo los datos atípicos encontrados (Anexo X-C). En el caso del gen *rRNA 18S*, se observaron diferencias estadísticamente significativas en el valor Cq, específicamente entre las muestras basal e Int_B, cuando no se descartaron los datos atípicos, mientras que en el

caso donde dichos datos se eliminaron no se presentó ningún tipo de cambio significativo (Figura 6).

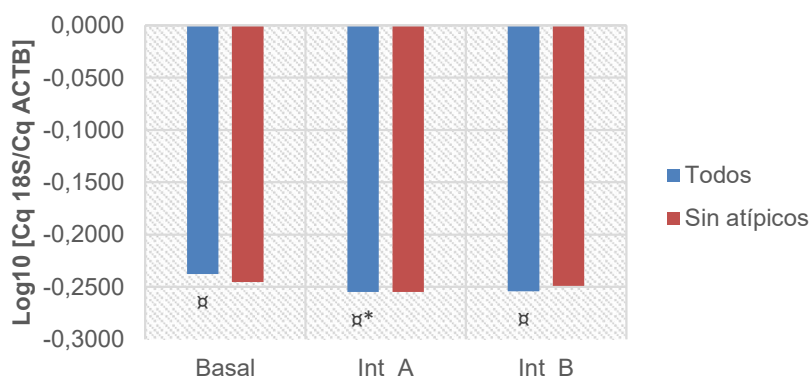
Figura 6. Cq del gen de referencia *rRNA 18S* en las muestras biológicas de estudio



Los valores presentados corresponden al promedio | **Basal.** Muestra biológica del momento 1. **Int_A.** Muestra biológica del momento 2. **Int_B.** Muestra biológica del momento 3 | α -valor (Basal vs Int_A vs Int_B) = 0,0116 según el test de Friedman; *p-valor ajustado (Basal vs Int_B) = 0.0110 según la prueba post-hoc de Wilcoxon con corrección por el test Bonferroni | n=29 para las columnas azules; n=26, n=29 y n=28 en las muestras Basal, Int_A e Int_B, respectivamente, para las columnas rojas.

Por otro lado, en el caso del gen *ACTB* no se identificaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores Cq de las muestras biológicas de estudio (Anexo X-C). Por último, al realizar los contrastes entre los cocientes del Cq de ambos genes en las muestras biológicas de estudio, se evidenciaron variaciones estadísticamente significativas, particularmente entre las muestras basal e Int_A (Figura 7).

Figura 7. Cociente Cq de los genes de referencia en las muestras biológicas de estudio



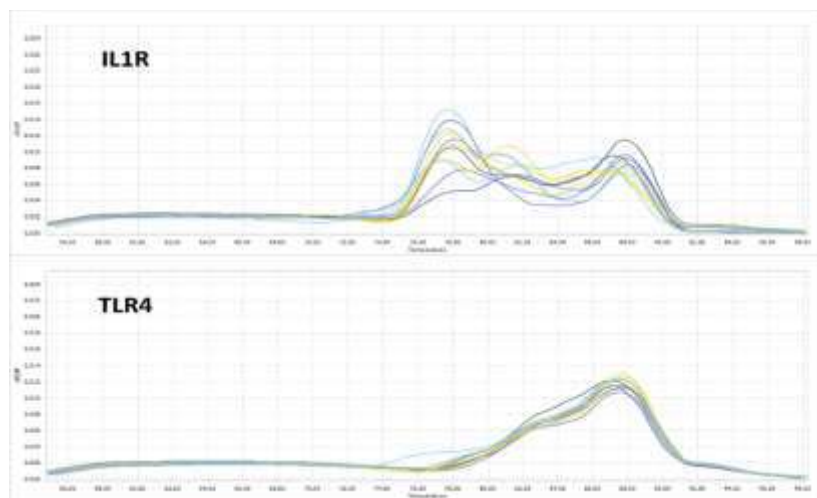
Los valores presentados corresponden al promedio | **Basal.** Muestra biológica del momento 1. **Int_A.** Muestra biológica del momento 2. **Int_B.** Muestra biológica del momento 3 | α -valor (Basal vs Int_A vs Int_B) = 0,0045 según el test de Friedman; *p-valor ajustado (Basal vs Int_A) = 0,0280 según la prueba post-hoc de Wilcoxon con corrección por el test Bonferroni | n=29 para las columnas azules; n=27, n=29 y n=28 en las muestras Basal, Int_A e Int_B, respectivamente, para las columnas rojas.

Teniendo en cuenta este último resultado se decidió suprimir, de todos los análisis posteriores, aquellos datos atípicos identificados en la inspección del cociente Cq, ya que para el cálculo de la tasa de expresión relativa se consideró adecuado el ajuste por los dos genes de referencia. Adicionalmente, esta decisión se justificó por el hecho de que los datos atípicos en el cociente Cq fueron producto de los datos atípicos identificados para el gen *rRNA 18S*, cuyos resultados fueron aislados y parecen ser debidos a un error de tipo técnico.

5.3 Particularidades de los genes *IL1R* y *TLR4* en las muestras biológicas de estudio

Un proceso de inspección llevado a cabo sobre los datos obtenidos del ensayo de qPCR en las muestras de estudio, mostró un comportamiento inconsistente en las curvas de fusión (*melting*) de los genes *IL1R* y *TLR4* respecto de lo observado en el pre-ensayo señalado en la *metodología* del presente documento. En general, en las muestras de estudio se evidenció la presencia de más de un pico en la curva de fusión para el gen *IL1R*, mientras que para el gen *TLR4* no se observó un pico claramente definido en dicha curva (Figura 8).

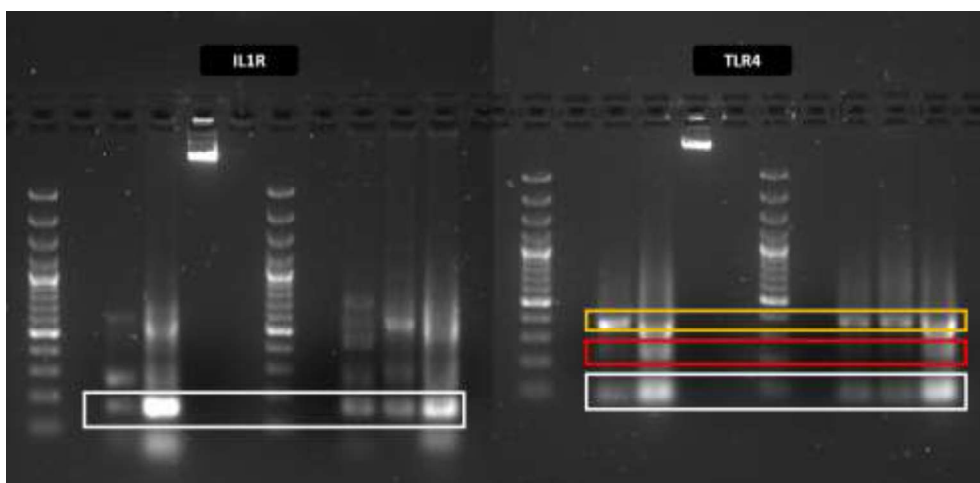
Figura 8. Curva de fusión (*melting*) para los genes *IL1R* y *TLR4* en las muestras biológicas de estudio



Curva de fusión generada por el software del termociclador LigthCycler 96 para las muestras de uno de los sujetos de estudio | ***IL1R (IL1R1)***. Interleukin 1 receptor type 1. ***TLR4***. Toll-like receptor 4 | **Nota.** La presencia de más de un pico en la curva de fusión es indicativa de la amplificación de fragmentos génicos adicionales durante el ensayo de qPCR

Con el fin de validar la inconsistencia mencionada, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa de los fragmentos obtenidos para dichos genes en un conjunto de muestras de estudio seleccionadas al azar. El resultado de esta prueba demostró que para el gen *IL1R* hubo una amplificación del fragmento esperado junto otros inespecíficos (Figura 9), por lo que este gen fue retirado de todos los análisis posteriores. En el caso del gen *TLR4*, si bien se observó la presencia de tres fragmentos de tamaños distintos, todos ellos se correspondieron con los amplificados esperados para sus respectivas variantes (Figura 9).

Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de los genes *IL1R* y *TLR4*



***IL1R (IL1R1)*.** Interleukin 1 receptor type 1. ***TLR4*.** Toll-like receptor 4 | Los cuadros indican los tamaños esperados para los fragmentos de cada uno de los genes evaluados: en *IL1R*, 179 pb (blanco); en *TLR4*, 279 pb (rojo), 379 pb (amarillo) y 92 pb (blanco) para las variantes 1, 3 y 4, respetivamente | Los marcadores de peso molecular en escala de 100 – 1.200 pb | Las bandas brillantes ubicadas en la parte superior de la figura corresponden a un control positivo de DNA genómico.

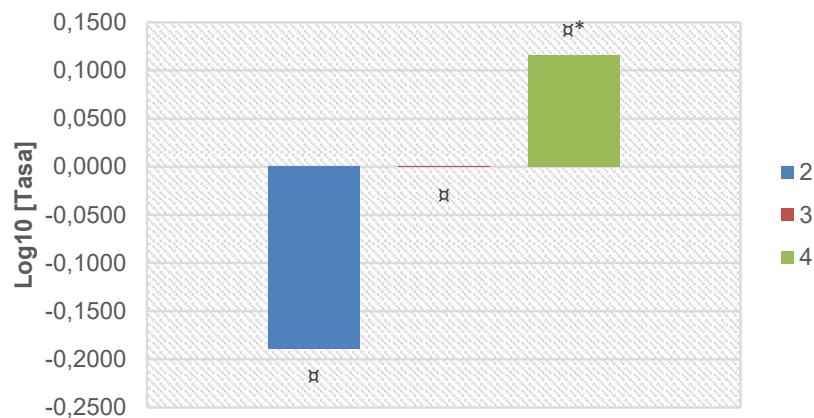
5.4 Comportamiento de los genes de interés en las muestras biológicas respecto de las distintas variables de estudio

5.4.1 Variables de salud y antropométricas

Los sujetos de estudio fueron agrupados según las respuestas proporcionadas en el cuestionario de salud y nutrición para cada una de las variables de salud, tras lo cual se contrastaron las tasas de expresión de cada uno de los genes de interés en la muestra basal de acuerdo a dichas respuestas (Anexo X-D). Para las variables *consumo de alcohol*, *calidad de sueño*, *actividad física* y *hábitos alimentarios*, no se observó ninguna diferencia significativa (Anexo X-D). Por otro lado, en el caso de la variable *nivel de estrés*, la tasa de

expresión del gen *NFκB* fue significativamente mayor en los individuos que reportaron el grado más alto de estrés comparado con aquellos que refirieron el más bajo (Figura 10).

Figura 10. Tasa de expresión del gen *NFκB* (*RELA*) de acuerdo a la variable *nivel de estrés* en la muestra biológica basal



Los valores presentados corresponden al promedio | p -valor (2 vs 3 vs 4) = 0,0486 según la prueba de Anova; * p -valor (2 vs 4) = 0,0439 según el test post-hoc de Tukey | $n=7$ para la columna azul, $n=13$ para la columna roja y $n=6$ para la columna verde.

Finalmente, se construyó una matriz de correlación entre las tasas de expresión de los genes de interés en la muestra biológica basal y cada una de las variables antropométricas, en la cual no se identificó la existencia de algún tipo de correlación entre el índice de masa corporal (*IMC*) o la circunferencia de la cintura y la expresión génica (Tabla 13).

Tabla 13. Matriz de correlación entre las tasas de expresión de los genes de interés en la muestra biológica basal y las variables antropométricas

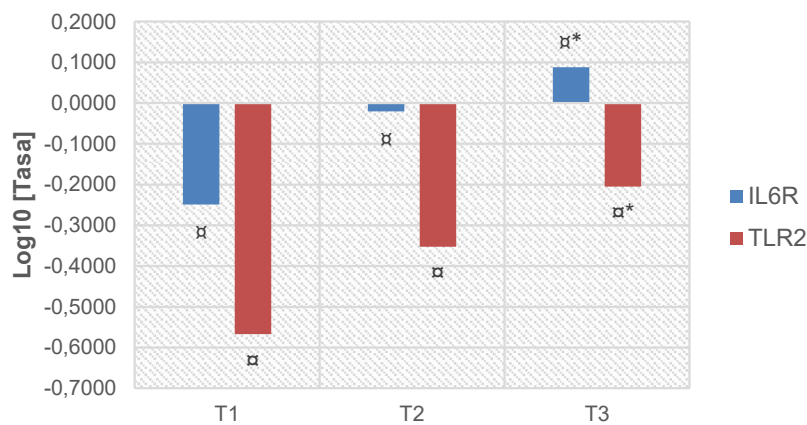
Genes de interés	Coeficiente de correlación de Spearman (ρ)	
	Índice de masa corporal (<i>IMC</i>)	Circunferencia de la Cintura
<i>IL6R</i>	-0,1693	0,1224
<i>NFκB</i>	-0,0614	0,1991
<i>TLR2</i>	-0,0529	0,1566
<i>TLR4</i>	-0,2704	0,0690
<i>TNFR</i>	0,0706	0,0956

$n=27$ para todos casos | *IL6R*. Interleukin 6 receptor. *TLR2*. Toll-like receptor 2. *TLR4*. Toll-like receptor 4. *TNFR* (*TNFRSF1A*). TNF receptor superfamily member 1A. *NFκB* (*RELA*). RELA proto-oncogene, NF-κB subunit.

5.4.2 Variables de consumo

Los voluntarios fueron agrupados por terciles de ingesta de alimentos según la puntuación (*score*) obtenida en cada uno de los grupos de alimentos incluidos en el instrumento de frecuencia de consumo, tras lo cual se contrastaron las tasas de expresión de los genes de interés, estimados en la muestra biológica basal, entre dichos terciles (Anexo X-F). Este análisis reveló que las tasas de expresión de los genes *IL6R* y *TLR2* variaron significativamente entre los terciles de consumo del grupo de alimentos *frutas enteras*, específicamente entre los terciles 1 y 3 (Figura 11).

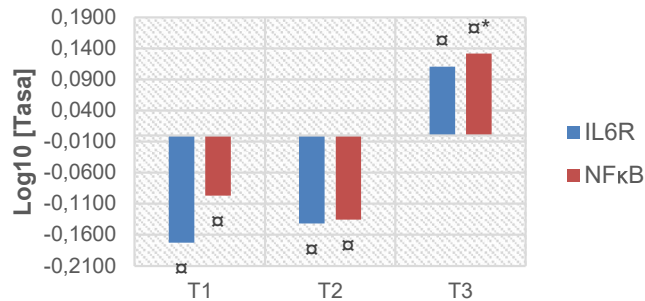
Figura 11. Tasa de expresión de los genes *IL6R* y *TLR2* en la muestra biológica basal según los terciles de consumo de frutas enteras



Los valores presentados corresponden al promedio | **T1.** Primer tercil. **T2.** Segundo tercil. **T3.** Tercer tercil | **IL6R.** Interleukin 6 receptor; $\#$ p-valor (T1 vs T2 vs T3) = 0,0113 según la prueba de Anova; *p-valor (T1 vs T3) = 0,0100 según el test post-hoc de Tukey | **TLR2.** Toll-like receptor 2; $\#$ p-valor (T1 vs T2 vs T3) = 0,0162 según la prueba de Kruskal-Wallis; *p-valor ajustado (T1 vs T3) = 0,0063 según el test post-hoc de Mann-Whitney con corrección por el test Bonferroni | n=10, n=8 y n=9 para T1, T2 y T3, respectivamente.

Por otro lado, para el caso de la ingesta del grupo de alimentos *lácteos y derivados*, se observaron diferencias estadísticamente significativas para los genes *IL6R* y *NFκB* entre los terciles de consumo, sin embargo, la pruebas post-hoc indicaron que únicamente para el gen *NFκB* se identificó un cambio estadísticamente significativo en la tasa de expresión, particularmente entre el primer y tercer tercil de ingesta (Figura 12).

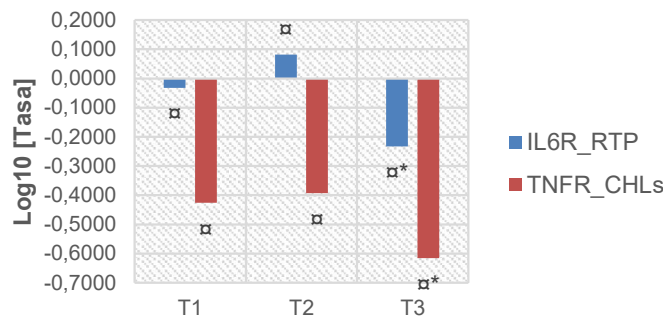
Figura 12. Tasa de expresión de los genes *IL6R* y *NFκB (RELA)* en la muestra biológica basal según los terciles de consumo de lácteos y derivados



Los valores presentados corresponden al promedio | **T1.** Primer tercil. **T2.** Segundo tercil. **T3.** Tercer tercil | **IL6R.** Interleukin 6 receptor; α p-valor (T1 vs T2 vs T3) = 0,0417 según la prueba de Kruskal-Wallis | **NFκB (RELA).** RELA proto-oncogene, NF-κB subunit; α p-valor (T1 vs T2 vs T3) = 0,0414 según la prueba de Kruskal-Wallis; *p-valor ajustado (T1 vs T3) = 0,0400 según el test post-hoc de Mann-Whitney con corrección por el test Bonferroni | n=10, n=8 y n=9 para T1, T2 y T3, respetivamente.

Adicionalmente, para el grupo de alimentos *raíces, tubérculos y plátanos*, se exhibieron diferencias estadísticamente significativas en las tasas de expresión del gen *IL6R* entre los terciles de consumo, básicamente entre el segundo y el tercero, cuando se refirió la ingesta de dichos alimentos en forma de frituras (Figura 13). Por último, en el grupo de alimentos *carnes, huevos y leguminosas secas*, se presentaron diferencias estadísticamente significativas en las tasas de expresión del gen *TNFR*, específicamente entre los terciles de consumo 2 y 3, de aquellos alimentos que se reportaron ingeridos en forma asada y/o rostizada (Figura 13).

Figura 13. Tasa de expresión de los genes *IL6R* y *TNFR* según los terciles de consumo de los grupos de alimentos RTP y CHLs

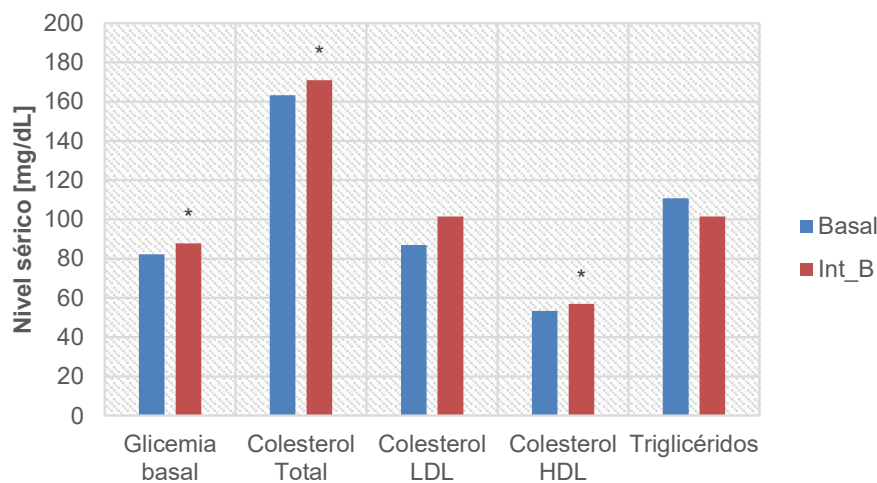


Los valores presentados corresponden al promedio | **RTP.** Raíces, tubérculos y plátanos. **CHLs.** Carnes, huevos y leguminosas secas | **T1.** Primer tercil. **T2.** Segundo tercil. **T3.** Tercer tercil | **IL6R.** Interleukin 6 receptor; α p-valor (T1 vs T2 vs T3) = 0,0373 según la prueba de Anova; *p-valor (T2 vs T3) = 0,0308 según el test post-hoc de Tukey; n=7, n=9 y n=9 para T1, T2 y T3, respetivamente | **TNFR (TNFRSF1A).** TNF receptor superfamily member 1A; α p-valor (T1 vs T2 vs T3) = 0,0324 según la prueba de Kruskal-Wallis; *p-valor ajustado (T2 vs T3) = 0,0280 según el test post-hoc de Mann-Whitney con corrección por el test Bonferroni; n=9, n=7 y n=8 para T1, T2 y T3, respetivamente.

5.4.3 Variables bioquímicas

En primer lugar, se realizó un contraste entre las muestras biológicas basal e Int_B respecto de los datos obtenidos para cada una de las variables bioquímicas por cada uno de los grupos de tratamiento (Anexo X-G). El resultado de este análisis mostró un aumento estadísticamente significativo en los niveles séricos de glicemia basal, colesterol total y colesterol HDL en la muestra biológica Int_B comparado con la muestra biológica basal en el caso de los individuos del grupo intervención (Figura 14). Por otro lado, para los voluntarios del grupo control, no se halló ningún tipo de diferencia entre las muestras biológicas mencionadas (Anexo X-G).

Figura 14. Comportamiento de las variables bioquímicas en las muestras biológicas basal e Int_B de los individuos del grupo intervención



Los valores presentados corresponden al promedio | **Basal**. Muestra biológica del momento 1, n=22. **Int_B**. Muestra biológica del momento 3, n=22 | *p-valor glicemia basal = 0,0081, p-valor colesterol total = 0,0401 y p-valor colesterol HDL = 0,0075 según la prueba t de Student.

En segundo lugar, se generaron matrices de correlación para las muestras biológicas basal e Int_B entre los datos de cada una de las variables bioquímicas y las tasas de expresión de cada uno de los genes de interés para cada grupo de tratamiento (Anexo X-H). En general, para la mayoría de los casos no se evidenciaron correlaciones, positivas o negativas, estadísticamente significativas entre las variables bioquímicas y la expresión de los genes de interés (Tabla 14).

Tabla 14. Matriz de correlación entre las variables bioquímicas y las tasas de expresión de genes de interés en las muestras biológicas basal e Int_B para cada uno de los grupos de estudio

Variable	GT	MB	Coeficiente de correlación				
			<i>IL6R</i>	<i>NFκB</i>	<i>TLR2</i>	<i>TLR4</i>	<i>TNFR</i>
Glicemia basal	Ctr	Basal	<u>-0,0870</u>	<u>-0,1739</u>	<u>0,0290</u>	<u>-0,2319</u>	<u>0,9276*</u>
		Int_B	-0,2933	-0,0720	0,5758	0,0284	0,4303
	Int	Basal	-0,4408*	-0,3319	-0,3361	-0,0191	0,1097
		Int_B	<u>-0,1057</u>	<u>-0,1823</u>	<u>-0,3531</u>	<u>-0,2016</u>	<u>-0,5317*</u>
Colesterol total	Ctr	Basal	-0,1301	-0,2149	-0,3201	-0,8345*	0,5367
		Int_B	-0,4477	-0,6589	0,0628	-0,0712	-0,0870
	Int	Basal	-0,1164	0,0666	-0,0381	-0,3922	-0,0525
		Int_B	<u>-0,4884*</u>	<u>-0,5010*</u>	<u>-0,1250</u>	<u>-0,2994</u>	<u>-0,3633</u>
Colesterol LDL	Ctr	Basal	-0,0373	-0,1197	-0,2353	-0,7612	0,5560
		Int_B	-0,3329	-0,5804	0,0281	0,0012	-0,1152
	Int	Basal	-0,2713	-0,1626	-0,2097	-0,3790	-0,0547
		Int_B	<u>-0,6099*</u>	<u>-0,5515*</u>	<u>-0,2780</u>	<u>-0,3891</u>	<u>-0,4846*</u>
Colesterol HDL	Ctr	Basal	-0,4753	-0,4898	-0,6086	-0,4396	-0,5746
		Int_B	-0,7066	-0,6644	-0,4074	-0,7709*	-0,3321
	Int	Basal	0,0900	0,0875	0,0535	-0,0279	0,0226
		Int_B	0,1413	-0,0651	0,1786	0,0055	0,0711
Triglicéridos	Ctr	Basal	-0,2405	-0,3042	-0,1741	-0,6713	0,8375*
		Int_B	-0,4749	-0,4084	0,5906	0,0966	0,3912
	Int	Basal	<u>-0,1664</u>	<u>-0,0591</u>	<u>-0,0949</u>	<u>-0,2021</u>	<u>-0,0650</u>
		Int_B	-0,0959	0,2146	-0,0664	0,0810	0,0282

Los valores subrayados fueron estimados a partir de la prueba de Spearman, los demás fueron calculados con la prueba de Pearson; *p-valor de la correlación < 0,05 | **GE.** Grupo de estudio. **MB.** Muestra biológica. **Ctr.** Grupo control. **Int.** Grupo intervención | **Basal.** Muestra biológica del momento 1; n=21 para el grupo intervención y n=6 para el grupo control. **Int_B.** Muestra biológica del momento 3; n=21 para el grupo intervención y n=7 para el grupo control | **IL6R.** Interleukin 6 receptor. **TLR2.** Toll-like receptor 2. **TLR4.** Toll-like receptor 4. **TNFR (TNFRSF1A).** TNF receptor superfamily member 1A. **NFκB (RELA).** RELA proto-oncogene, NF-κB subunit.

Pese al resultado indicado en el párrafo anterior, vale la pena resaltar el comportamiento de las variables *colesterol total* y *colesterol LDL* en la muestra biológica Int_B de los individuos del grupo intervención, donde para la primera variable se observaron correlaciones negativas estadísticamente significativas con la expresión de los genes *IL6R* y *NFκB*, mientras que para la segunda variable se presentó el mismo tipo de correlación con la expresión de los dos genes mencionados y con la expresión del gen *TNFR* (Tabla 14).

Otros aspectos a destacar son las correlaciones negativas estadísticamente significativas entre la variable *glicemia basal* y la expresión de los genes *IL6R* y *TNFR* en las muestras biológicas basal e Int_B, respectivamente, de los individuos del grupo intervención, así como la correlación positiva estadísticamente significativa entre dicha variable y la expresión del gen *TNFR* en la muestra biológica basal en los sujetos del grupo control (Tabla 14). Por otro lado, es importante resaltar la correlación negativa estadísticamente significativa de las variables *colesterol total* y *colesterol HDL* con la expresión del gen *TLR4* en las muestras biológicas basal e Int_B, respectivamente, de los voluntarios del grupo control (Tabla 14). Por último, se debe considerar la correlación negativa estadísticamente significativa entre la variable *triglicéridos* y la expresión del gen *TNFR* en la muestra biológica basal de los individuos del grupo control (Tabla 14).

5.5 Efecto del tratamiento con frutas sobre la expresión de los genes de interés en las muestras biológicas de estudio

5.5.1 Correlación entre las tasas de expresión de los genes de interés antes y después de la intervención nutricional

Se construyó una matriz de correlación entre las tasas de expresión de cada uno de los genes interés para cada una de las muestras biológicas en cada grupo de tratamiento (Anexo X-I). Este análisis mostró que la mayoría de las correlaciones estadísticamente significativas se registraron en las muestras biológicas del grupo intervención, además, que para el caso del gen *TNFR*, sólo se exhibieron correlaciones estadísticamente significativas en la muestra biológica Int_B de los individuos de dicho grupo (Tabla 15).

Tabla 15. Matriz de correlación entre las tasas de expresión de los genes de interés en las muestras biológicas de cada uno de los grupos de tratamiento

Gen	Grupo	Muestra	Coeficiente de correlación			
			<i>NFκB</i>	<i>TLR2</i>	<i>TLR4</i>	<i>TNFR</i>
<i>IL6R</i>	Ctr	Basal	0,9953*	0,8793*	0,5207	-0,2456
		Int_A	0,9308*	0,0337	0,0515	0,2539
		Int_B	0,8830*	0,2919	0,6844	0,4266

*p-valor de la correlación < 0,05 | **Ctr.** Grupo control. **Int.** Grupo intervención | **Basal.** Muestra biológica del momento 1; n=6 para el grupo control y n=21 para el grupo intervención. **Int_A.** Muestra biológica del momento 2; n=7 para el grupo control y n=22 para el grupo intervención. **Int_B.** Muestra biológica del momento 3; n=7 para el grupo control y n=21 para el grupo intervención | **IL6R.** Interleukin 6 receptor. **TLR2.** Toll-like receptor 2. **TLR4.** Toll-like receptor 4. **TNFR (TNFRSF1A).** TNF receptor superfamily member 1A. **NFκB (RELA).** RELA proto-oncogene, NF-κB subunit.

Tabla 15. Continuación

Gen	Grupo	Muestra	Coeficiente de correlación			
			<i>NFκB</i>	<i>TLR2</i>	<i>TLR4</i>	<i>TNFR</i>
<i>IL6R</i>	Int	Basal	0,7288*	0,8299*	0,6176*	0,0658
		Int_A	0,7010*	<u>0,4557*</u>	<u>0,6386*</u>	-0,0759
		Int_B	0,7613*	0,5946*	0,5107*	0,7393*
<i>NFκB</i>	Ctr	Basal		0,9028*	0,5910	-0,2671
		Int_A		0,1240	0,0367	0,2225
		Int_B		0,3329	0,6524	0,3594
	Int	Basal		0,4821*	0,3432	-0,1495
		Int_A		<u>0,5663*</u>	<u>0,5686*</u>	-0,0136
		Int_B		0,4771*	0,6097*	0,7845*
<i>TLR2</i>	Ctr	Basal			0,6962	-0,0086
		Int_A			0,9172*	0,5315
		Int_B			0,7491	0,9136*
	Int	Basal			0,6725*	0,3701
		Int_A			<u>0,5584*</u>	<u>-0,1971</u>
		Int_B			0,6564*	0,6432*
<i>TLR4</i>	Ctr	Basal				-0,2705
		Int_A				0,5557
		Int_B				0,6399
	Int	Basal				0,3790
		Int_A				<u>0,0367</u>
		Int_B				0,5978*

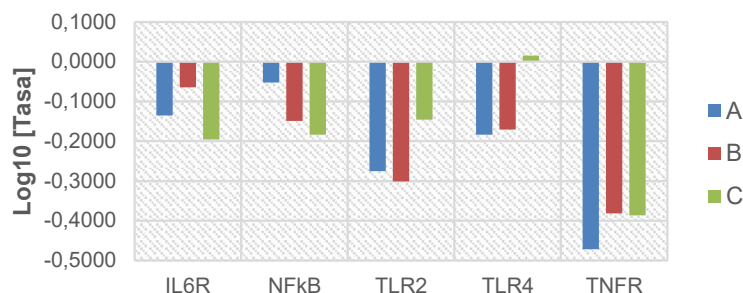
Los valores subrayados fueron estimados a partir de la prueba de Spearman, los demás fueron calculados con la prueba de Pearson; *p-valor de la correlación < 0,05 | **Ctr.** Grupo control. **Int.** Grupo intervención | **Basal.** Muestra biológica del momento 1; n=6 para el grupo control y n=21 para el grupo intervención. **Int_A.** Muestra biológica del momento 2; n=7 para el grupo control y n=22 para el grupo intervención. **Int_B.** Muestra biológica del momento 3; n=7 para el grupo control y n=21 para el grupo intervención | **IL6R.** Interleukin 6 receptor. **TLR2.** Toll-like receptor 2. **TLR4.** Toll-like receptor 4. **TNFR (TNFRSF1A).** TNF receptor superfamily member 1A. **NFκB (RELA).** RELA proto-oncogene, NF-κB subunit.

5.5.2 Diferencias en las tasas de expresión de los genes de interés luego de la ingesta de los desayunos de prueba

Los sujetos de estudio fueron agrupados según el tipo de desayuno consumido (A, B o C) en el momento 2 de la fase de intervención, tras lo cual se compararon las tasas de expresión de cada uno de los genes de interés entre dichos desayunos en la muestra biológica Int_A (Anexo X-J). El resultado de este procedimiento indicó que no hubo

diferencias estadísticamente significativas entre la expresión de los genes de estudio y el tipo de desayuno consumido por los voluntarios (Figura 15).

Figura 15. Tasas de expresión de los genes de interés en la muestra biológica Int_A según el tipo de desayuno consumido por los voluntarios

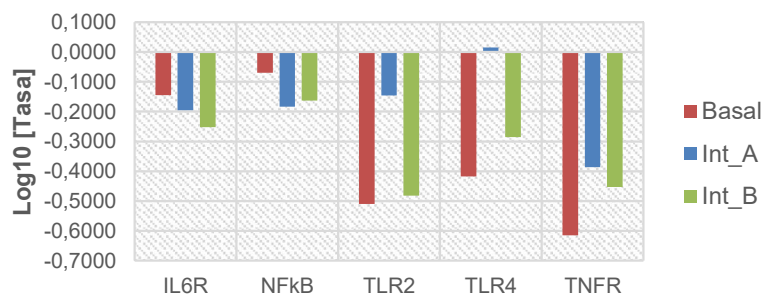


Los valores presentados corresponden al promedio | **A.** Desayuno A de los individuos del grupo intervención, n=10. **B.** Desayuno B de los individuos del grupo intervención, n=12. **C.** Desayuno de los individuos del grupo control, n=7 | **IL6R.** Interleukin 6 receptor. **TLR2.** Toll-like receptor 2. **TLR4.** Toll-like receptor 4. **TNFR (TNFRSF1A).** TNF receptor superfamily member 1A. **NFkB (RELA).** RELA proto-oncogene, NF-kB subunit.

5.5.3 Diferencias en las tasas de expresión de los genes de interés antes y después de la intervención nutricional con frutas

En un primer análisis se compararon las tasas de expresión de cada uno de los genes de interés entre las muestras biológicas de estudio por cada grupo de tratamiento (Anexo X-K), observándose que para el grupo de control no se presentaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de los genes evaluados entre las distintas muestras biológicas (Figura 16).

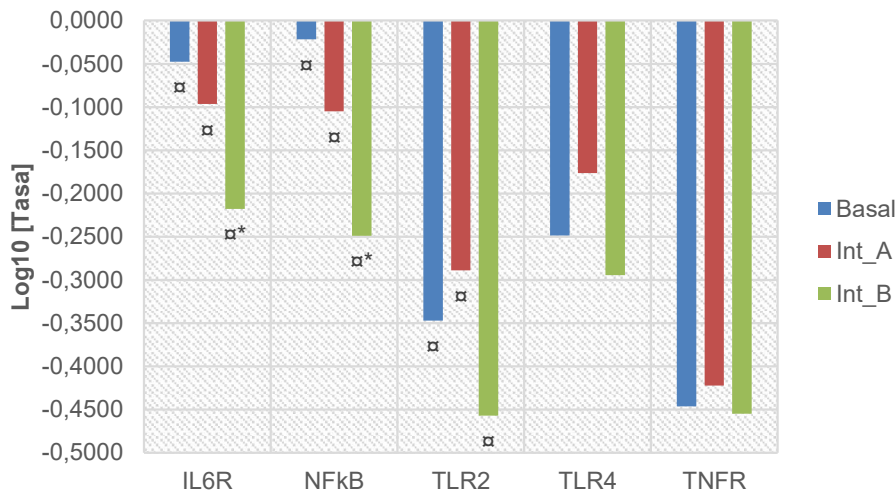
Figura 16. Tasas de expresión de los genes de interés en las muestras biológicas de los individuos del grupo control



Los valores presentados corresponden al promedio | **Basal.** Muestra inicial (momento 1), n=6. **Int_A.** Muestra de la intervención A (momento 2), n=7. **Int_B.** Muestra de la intervención B (momento 3), n=7 | **IL6R.** Interleukin 6 receptor. **TLR2.** Toll-like receptor 2. **TLR4.** Toll-like receptor 4. **TNFR (TNFRSF1A).** TNF receptor superfamily member 1A. **NFkB (RELA).** RELA proto-oncogene, NF-kB subunit.

Por otro lado, en el caso del grupo intervención se revelaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de los genes *IL6R*, *NFκB* y *TLR2* entre las muestras biológicas de estudio según la prueba de comparaciones múltiples (Figura 17). De este resultado es importante señalar que para los genes *IL6R* y *NFκB* se presentó una reducción estadísticamente significativa en las tasas de expresión estimadas para la muestra Int_B respecto de la muestra basal según la prueba post-hoc, la cual no identificó ningún tipo de cambio significativo en la expresión del gen *TLR2* entre las tres muestras biológicas evaluadas (Figura 17).

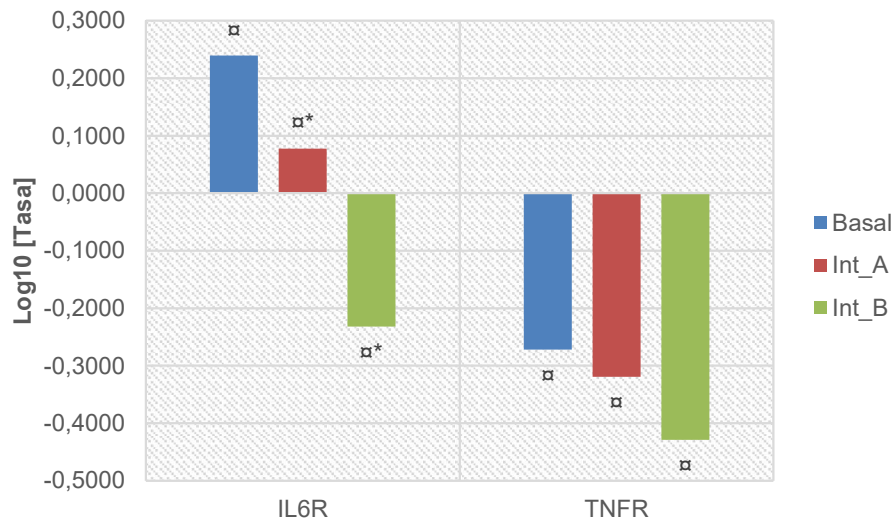
Figura 17. Tasas de expresión de los genes de interés en las muestras biológicas de los individuos grupo intervención



Los valores presentados corresponden al promedio | **Basal.** Muestra inicial (momento 1), n=21. **Int_A.** Muestra de la intervención A (momento 2), n=22. **Int_B.** Muestra de la intervención B (momento 3), n=21 | **IL6R.** Interleukin 6 receptor; *p-valor (Basal vs Int_A vs Int_B) = 0,0340 según la prueba de Anova; *p-valor (Basal vs Int_B) = 0,0313 según el test de Tukey. **TLR2.** Toll-like receptor 2; *p-valor (Basal vs Int_A vs Int_B) = 0,0474 según la prueba de Friedman. **TLR4.** Toll-like receptor 4. **TNFR (TNFRSF1A).** TNF receptor superfamily member 1A. **NFκB (RELA).** RELA proto-oncogene, NF-κB subunit; *p-valor (Basal vs Int_A vs Int_B) = 0,0208 según la prueba de Anova; *p-valor (Basal vs Int_B) = 0,0166 según el test de Tukey.

En un segundo análisis, se contrastaron las tasas de expresión de los genes de interés entre las muestras biológicas de estudio de los voluntarios del grupo intervención, luego de que los mismos fueran agrupados según los terciles de expresión génica de la muestra biológica basal (Anexo X-L). En el caso de los genes *IL6R* y *TNFR* se exhibieron reducciones estadísticamente significativas luego del tratamiento con las frutas en los individuos ubicados en el tercer tercil según la prueba de comparaciones múltiples, sin embargo, la prueba post-hoc sólo validó las diferencias entre la muestra biológica Int_B respecto de las muestras basal e Int_A, respectivamente, para el gen *IL6R* (Figura 18).

Figura 18. Tasas de expresión de los genes *IL6R* y *TNFR* en las muestras biológicas de estudio del grupo intervención para el tercer tercil de expresión génica en la muestra basal



Los valores presentados corresponden al promedio | **Basal.** Muestra biológica del momento 1. **Int_A.** Muestra biológica del momento 2. **Int_B.** Muestra del momento 3 | **IL6R.** Interleukin 6 receptor; α p-valor (Basal vs Int_A vs Int_B) = 0,0013 según la prueba de Anova; *p-valor (Int_A vs Int_B) = 0,0248 y (Basal vs Int_B) = 0,0010 según el test de Tukey; n=7 para Basal e Int_A y n=6 para Int_B | **TNFR (TNFRSF1A).** TNF receptor superfamily member 1A; α p-valor (Basal vs Int_A vs Int_B) = 0,0498 según la prueba de Friedman; n=7 para todas las muestras.

Por otro lado, en el caso del gen *TLR4* se registraron diferencias estadísticamente significativas entre las tasas de expresión de las muestras biológicas de estudio de los individuos ubicados en el primer tercil de expresión génica para la muestra basal, particularmente un aumento en la tasa de expresión en la muestra biológica Int_A respecto de la muestra biológica basal. Un comportamiento similar al anterior fue también observado para el gen *TLR2*, aunque para el caso de este gen el p-valor obtenido fue superior al nivel de significancia establecido (Anexo X-L).

Finalmente, para el caso del gen *NFκB* se identificaron cambios estadísticamente significativos entre las muestras biológicas de estudio de los individuos asignados al segundo y tercer tercil de expresión génica, respectivamente, de la muestra biológica basal (Figura 19). En el primer grupo de sujetos se presentó una disminución en las tasas de expresión del gen *NFκB* en las muestras Int_A e Int_B respecto de la muestra basal, sin embargo, dicha diferencia solo fue significativa para la muestra Int_B según la prueba post-hoc (Anexo X-L). Por otro lado, en el segundo grupo de voluntarios la prueba post-hoc no

reportó ningún cambio estadísticamente significativo en la expresión del gen *NFκB* entre las muestras biológicas evaluadas (Anexo X-L).

Figura 19. Tasas de expresión del gen *NFκB* (*RELA*) en las muestras biológicas de estudio del grupo intervención de acuerdo a los terciles de expresión génica en la muestra basal



Los valores presentados corresponden al promedio | **T1.** Primer tercil. **T2.** Segundo tercil. **T3.** Tercer tercil | **Basal.** Muestra biológica del momento 1. **Int_A.** Muestra biológica del momento 2. **Int_B.** Muestra del momento 3 | αp-valor T2 (Basal vs Int_A vs Int_B) = 0,0237 según la prueba de Anova, *p-valor T2 (Basal vs Int_B) = 0,0331 según el test de Tukey, n=7 para todas las muestras; αp-valor T3 (Basal vs Int_A vs Int_B) = 0,0057 según la prueba de Friedman, n=7 para Basal e Int_A y n=6 para Int_B.

6. Discusión

En términos de la muestra de estudio es importante indicar que el reclutamiento de trabajadores fue nulo y que la captación de voluntarios del sexo masculino fue considerablemente baja, siendo este último aspecto una importante limitación para la investigación ya que no fue posible realizar un análisis discriminatorio según la variable sexo, cuya influencia sobre el comportamiento biológico de los individuos es claramente conocida. Por otro lado, dado que la muestra estuvo constituida por estudiantes activos de la Facultad de Medicina, vale la pena considerar que en aquellos asignados al grupo intervención se pudo presentar un efecto positivo del tratamiento dado su conocimiento acerca del papel benéfico del consumo de frutas sobre la salud.

La variable circunferencia de la cintura en este estudio mostró ser significativamente mayor en los hombres respecto de las mujeres, sin embargo, los valores promedio en ambos casos se ubicaron dentro los parámetros normales según el punto de corte adoptado para Colombia (108). El comportamiento indicado para esta variable fue consistente con el reportado en investigaciones desarrolladas previamente en estudiantes que fueron admitidos a las carreras de Medicina y Nutrición de la Universidad Nacional de Colombia (162,163), así como con lo señalado en la ENSIN 2010 para el grupo de edad de 18 y 32 años (108), lo cual sugiere una subordinación de la circunferencia de la cintura a la variable sexo en personas consideradas como *saludables*.

En esta investigación el nivel sérico de colesterol HDL fue significativamente superior en mujeres comparado con los hombres y en ambos casos los valores promedio estuvieron dentro del punto de corte considerado como óptimo (≥ 40 mg/dL). Al respecto, el estudio realizado por Galvis et al., en el cual se establecieron intervalos biológicos de referencia (*IBR*) para el perfil lipídico con base en pruebas realizadas en adultos sanos antioqueños, señaló que para el colesterol HDL se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres, siendo el IBR para los primeros de 46,4 - 51,8

mg/dL y para las segundas de 61,1 - 68,9 mg/dL (164). Estos hallazgos también sugieren un impacto del sexo sobre los niveles séricos de colesterol HDL, sin embargo, es conocido que otros condicionantes tienen una importante influencia sobre este marcador del metabolismo lipídico (165–167).

El Cq de los genes de estudio en la muestra calibradora, así como el Cq de los genes de referencia en las muestras biológicas de estudio, no mostraron cambios estadísticamente significativos en ninguno de los casos, lo cual sugiere que la variación intra e inter ensayo fue relativamente constante entre las distintas pruebas, siendo este comportamiento el esperado para estos factores normalizadores (159,168,169). De lo anterior, es importante señalar que el criterio de selección utilizado para la elección de los genes de referencia en esta investigación es considerado *arbitrario*, ya que las investigaciones al respecto indican que se debe partir de un gran panel de potenciales genes de referencia, que deben ser sometidos al ensayo de qPCR bajo todas las condiciones que un estudio particular pretenda evaluar, con el fin de identificar aquellos genes que presentan el comportamiento más estable, lo cual se determina a través de alguna de las metodologías estadísticas desarrolladas para tal fin (168–170).

Respecto de este último aspecto, dado que la naturaleza del presente estudio fue exploratoria y que el mismo buscaba en parte determinar la factibilidad para desarrollar una investigación de este tipo sobre una muestra representativa de individuos, no se consideró apropiado aplicar una metodología de panel a este nivel debido al alto costo que implica su ejecución en términos de tiempo y recursos, además, porqué su empleo en estudios de intervención nutricional *in vivo* en humanos no es suficientemente claro, particularmente con relación al número de individuos y/o muestras biológicas requeridos para su implementación. No obstante, para los investigadores es recomendable la implementación de la metodología de panel en el desarrollo de estudios futuros que consideren las distintas variables nutricionales y genéticas en grandes muestras de individuos.

En el apartado *resultados* se señaló una inconsistencia para dos de los genes de interés entre las muestras del pre-ensayo y las muestras biológicas de estudio, sin embargo, para el caso del gen *IL1R* el comportamiento observado fue inesperado puesto que la prueba *in silico* de los cebadores de este gen, la cual fue realizada en el programa *Primer-Blast*,

no evidenció que estos pudiesen amplificar fragmentos inespecíficos, por lo tanto, solo la secuenciación de los fragmentos obtenidos podría permitir dar una posible explicación a esta particularidad técnica y/o biológica. Por otro lado, si bien el comportamiento del gen *TLR4* fue el esperado, según el resultado de la electroforesis en gel de agarosa, se debe tener presente que no fue posible discriminar el nivel de expresión de cada una de las variantes de este gen, en cada una de las muestras de estudio, a partir de los datos del ensayo de qPCR, por lo que no se podría descartar un posible efecto variante-dependiente de los distintos tratamientos aplicados en esta investigación.

Las diferencias identificadas para el gen *NFκB* de acuerdo al nivel de estrés reportado por los sujetos de estudio fue un hallazgo interesante, lo cual parece estar en consonancia con los resultados de algunas investigaciones que han evaluado el efecto del estrés psicosocial en seres humanos. Al respecto, el estudio de Kuebler U et al (2015)., señaló un incremento significativo en los niveles de mRNA de los genes *IL-1β*, *IL-6* e *IκB*, junto con un aumento en la actividad de unión de *NFκB* al DNA, en muestras de sangre periférica de los individuos que fueron sometidos a una prueba de estrés aguda (171). De manera similar, la investigación de McInnis CM et al (2015)., indicó una elevación en el nivel de expresión de los genes *IL6*, *IL1β*, *NFκB* e *IκB* en las muestras de sangre periférica de los sujetos de estudio luego de aplicar una primera prueba de estrés agudo, sin embargo, los autores refirieron una *habitación* en la expresión de dichos genes luego de aplicar una segunda prueba (172).

En un intento de identificación de los posibles determinantes de la respuesta de *NFκB* al estrés agudo, la investigación de Wolf JM et al (2009)., reportó que la edad, el estado del cortisol, el nivel de IL6 y la percepción de estrés agudo y crónico fueron factores importantes dentro de la muestra de individuos evaluada (173). En cuanto a este último determinante, en el presente estudio no se hizo ningún tipo de discriminación respecto de la naturaleza aguda o crónica del nivel de estrés, por otro lado, tampoco fue posible establecer la existencia de interacciones entre el consumo de frutas y el auto-reporte de estrés sobre la expresión de *NFκB* ya que el tamaño de muestra fue muy reducido. Tomando en conjunto lo indicado, es importante considerar la variable *estrés* en futuros estudios e indagar si la misma puede condicionar el comportamiento de la expresión génica ante estímulos nutricionales.

En esta investigación no se observó ningún tipo de correlación entre las variables antropométricas y la expresión de los genes de interés, sin embargo, este resultado debe ser considerado con cautela ya que en este estudio los valores obtenidos para el IMC y la circunferencia de la cintura se ubicaron dentro del rango de normal, lo cual también impidió realizar un análisis discriminado de acuerdo con los puntos de corte establecidos para cada una de dichas variables (108). Por lo tanto, es plausible que la expresión de estos genes esté condicionada a estados indicativos de riesgo tales como el exceso de peso y la obesidad abdominal para el IMC y la circunferencia de la cintura, respectivamente.

Respecto de esto último, el estudio de Freedman et al (2010)., reportó que en muestras de sangre periférica de 1857 adultos se identificaron asociaciones significativas entre la expresión de algunos de los genes inflamatorios evaluados y el IMC, lo cual fue particularmente evidente en las plaquetas comparado con las células mononucleares (174). Por otro lado, la investigación de Pivovarova et al (2016)., indicó que en muestras de tejido adiposo subcutáneo de individuos *saludables* con exceso de peso, se observaron correlaciones significativas del IMC y la circunferencia de la cintura con la expresión de algunos de los genes de regulación circadiana analizados (175). Por último, el estudio de Shea J et al (2009)., encontró que 385 genes fueron diferencialmente expresados entre las muestras de tejido adiposo subcutáneo de individuos obesos comparado con el mismo tipo de muestras en sujetos delgados (176).

El comportamiento de las tasas de expresión génica en la muestra basal, de acuerdo a los terciles de la puntuación (*score*) de consumo para el grupo de alimentos *frutas enteras*, discrepó del resultado esperado y no fue concordante con el reportado en la investigación de Hermsdorff et al (2010)., donde los individuos ubicados en el tercil más alto para la ingesta de frutas y verduras mostraron valores estadísticamente más bajos en la expresión de los genes *ICAM1*, *IL1R1*, *IL6*, *TNF α* y *NF κ B1* (177). En cuanto al grupo de alimentos *lácteos y derivados*, un estudio de intervención desarrollado por Labonté ME et al (2014)., no identificó ningún cambio en la expresión génica de *IL18*, *IL1B*, *NF κ B*, *PPARA*, *SREBF2*, *TNF* y *TRAF3* al comparar la ingesta de una dieta *láctea* con una dieta *control* (178). Respecto de los otros dos grupos de alimentos, se esperaba que la expresión génica fuese mayor en el tercer tercil de ingesta, particularmente para los alimentos consumidos como frituras, dado que estos últimos han sido clásicamente vinculados a perfiles de salud desfavorables.

Adicional a lo descrito anteriormente, el estudio de Bouchard-Mercier A et al (2013)., comparó el transcriptoma de individuos sanos según la *alta* o *baja puntuación (score)* para los patrones alimentarios *prudente* y *occidentalizado*, observándose la expresión diferencial de 2.083 transcritos en hombres y 1.136 en mujeres para el primer caso, y de 1.021 transcritos en hombres y 1.163 transcritos en mujeres para el segundo caso (179). Por otro lado, la investigación Pellatt AJ et al (2016)., contrastó el transcriptoma de muestras normales de colon de pacientes con cáncer de acuerdo a distintas agrupaciones de la variable consumo, evidenciándose expresión diferencial de 65 genes entre las categorías de *alta* o *baja ingesta* para las variables no relacionadas con el consumo de carne roja (*nonmeat*) y de 64 genes para la variable vinculada al consumo de carne roja (*meat*), destacándose en la primera una variación en la expresión de 26 y 37 genes debido a la ingesta de verduras y granos enteros, respectivamente (138).

Con base en lo referido en los dos párrafos previos, es importante mencionar que la aproximación planteada en esta investigación fue realmente limitada ya que la evaluación de la expresión génica de acuerdo a los terciles de consumo de grupos de alimentos resulta ser eminentemente descriptiva, esto debido a que dicho abordaje no toma en cuenta las posibles interacciones entre los grupos de alimentos analizados ni permite estimar la verdadera influencia de estos últimos de manera individual y/o conjunta, siendo estos aspectos mucho más informativos. No obstante, la aproximación señalada se consideró adecuada para este estudio teniendo en cuenta el reducido número de individuos, la ausencia de una evaluación de la validez del instrumento de frecuencia de consumo utilizado y la naturaleza exploratoria de la investigación.

La ingesta de las frutas enteras suministradas durante el periodo de estudio de 15 días indujo incrementos significativos en los niveles séricos de glicemia, colesterol total y colesterol HDL, los cuales se ubicaron dentro del rango normal. Con relación a estos resultados, el estudio de McEvoy CT et al (2015)., no encontró ningún tipo de diferencia significativa al comparar los niveles séricos de lípidos de los individuos con riesgo cardiovascular que consumieron cantidades distintas de frutas y verduras luego de un periodo de 12 semanas (180). Por otro lado, la investigación de Lamb M et al (2016)., llevaba a cabo en pacientes diabéticos de reciente diagnóstico, reportó que no se observó ninguna asociación entre el aumento del consumo de frutas y/o verduras y los factores de

riesgo cardiovascular luego de 5 años de seguimiento, con excepción del colesterol HDL, el cual mostró un incremento estimado en 0,04 mmol/L (181).

Complementario a lo anterior, el estudio desarrollado por Zasowska-Nowak A et al (2016)., en el que se determinó el efecto del consumo de 500 g/d de pulpa de fresas, por un periodo de un 30 días, como parte de la dieta habitual de un grupos de voluntarios sanos no obesos, indicó que la intervención no promovió cambios significativos en los niveles sanguíneos de colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL o triglicéridos, pero si indujo una reducción en la actividad de la enzima PON1 (182). Por otro lado, la investigación de Leelarungrayub J et al (2016)., señaló que la ingesta diaria de una bebida con 100 g de carambolo (*star fruit*) durante 30 días, estimuló un incremento significativo en los niveles de colesterol HDL junto con una reducción significativa en los niveles de colesterol LDL en muestras de sangre de adultos mayores sanos (183). Considerando lo descrito en los párrafos anteriores, es claro que la evidencia del impacto del consumo de frutas sobre el comportamiento de las variables bioquímicas parece ser discrepante, por lo que es necesario que se lleven a cabo estudios adicionales.

En cuanto a las correlaciones entre las variables bioquímicas y las tasas de expresión de los genes de interés, se puede sugerir que los hallazgos identificados en las muestras biológicas de los sujetos del grupo control son indicativos de la posible influencia de algún factor desconocido, por otro lado, con los resultados determinados en las muestras biológicas de los voluntarios del grupo intervención es posible señalar un efecto del tratamiento sobre el comportamiento de las variables correlacionadas. Pese a lo anterior, es importante señalar que el análisis de correlación lineal no permite establecer una relación causal entre las variables evaluadas, la cual puede estar condicionada por factores desconocidos, ni tampoco descartar la existencia de una relación no lineal entre dichas variables, por lo tanto, es necesario que se realicen estudios adicionales en los que se consideren estos aspectos.

El ensayo realizado con el suministró de los tres tipos de desayuno fue planteado con el propósito de explorar si el consumo agudo de alimentos podría generar un cambio significativo en la expresión génica en un punto de tiempo definido y, de ser afirmativo lo anterior, indagar si estos cambios eran diferenciales dada la distinta composición de cada uno de dichos desayunos. Estos aspectos fueron evaluados por otros estudios, tal como

el publicado recientemente por Parvaresh Rizi E et al (2016)., el cual señaló que la ingesta de una bebida alta en carbohidratos indujo, en distintos puntos de tiempo, la expresión diferencial de genes inflamatorios en muestras de sangre periférica de individuos *insulino-resistentes* comparado con las muestras de sujetos *insulino-sensibles*, efecto que no fue observado cuando las bebidas consumidas fueron altas en grasas o proteínas (184).

Por otro lado, la investigación de Ghanim H et al (2016)., indicó que el consumo de una comida alta en calorías y grasa promovió un aumento significativo en la expresión genes inflamatorios en muestras de sangre periférica de voluntarios sanos, lo cual fue atenuado cuando los voluntarios ingirieron la misma comida junto con una adición de 30 g de fibra insoluble (185). Por último, el estudio de De Lorenzo A et al (2016)., evidenció que la ingesta de los dos tipos de comidas evaluadas, mediterránea enriquecida con tocoferol u occidentalizada alta en grasa, modificó significativamente la expresión de genes relacionados con la inflamación y el estrés oxidativo en muestras de sangre periférica de individuos sanos, además, que el patrón de expresión observado para estas comidas fue diferencial entre las mismas (186).

En caso de la presente investigación, no se presentó ningún cambio estadísticamente significativo en la expresión de los genes analizados luego del consumo de los desayunos suministrados, sin embargo, es necesario que lleven a cabo estudios adicionales que determinen el papel de la normalización de la dieta de los individuos participantes previo al desarrollo de la prueba aguda, que estimen el efecto de desayunos con distintos aportes calóricos y que evalúen el comportamiento de la expresión génica en diferentes puntos de tiempo, ya que estos factores no fueron objeto de análisis en esta investigación y, por lo tanto, se desconoce si pudieron condicionar o no el resultado obtenido.

Contrario del resultado obtenido para el ensayo anteriormente descrito, la intervención con ± 400 g/d de frutas enteras tuvo un importante impacto sobre la expresión de los genes *IL6R* y *NFkB*, los cuales exhibieron también una fuerte correlación positiva que fue constante en cada una de las muestras biológicas analizadas. Este hallazgo es muy relevante dado que este es el primer estudio que revela el efecto, sobre potenciales marcadores genéticos del proceso de inflamación de origen metabólico (meta-inflamación), de una intervención *in vivo* en humanos en la que se suministró una cantidad de frutas

equivalente al número de porciones sugeridas en la medida en salud pública relacionada con la promoción del consumo de frutas y verduras (1,2,38).

Si bien no se cuenta con antecedente que sea similar al presente estudio, otras investigaciones han adoptado una aproximación basada en la medida en salud mencionada. El estudio de Moller P et al (2003)., por ejemplo, reportó que la ingesta de 600 g/d de frutas y verduras, en un periodo de 21 días, no indujo cambios en la expresión de los genes de reparación *OGG1* y *ERCC1*, resultado que no fue distinto luego del tratamiento placebo o del suplementado con vitaminas y/o minerales (187). Por su parte, la investigación de Almendingen A et al (2005)., señaló que el tratamiento con 2 o 5 porciones por día de frutas y verduras no afectó la expresión del gen *COX2* en muestras de sangre periférica de estudiantes universitarios luego de 14 días de intervención (188). Finalmente, el estudio de Paskan WJ et al (2013)., identificó cambios en la expresión génica en muestras de tejido adiposo de individuos delgados y obesos que consumieron 200 g/d de verduras por un periodo de 4 semanas, destacando un rol central del factor de transcripción nuclear NFκB (189).

En términos de las muestras biológicas evaluadas, los resultados permiten sugerir tres aspectos principales. En primer lugar, que el comportamiento de la expresión de los genes de interés en la muestra basal podría estar reflejando el impacto neto de los distintos hábitos de vida de cada uno de los sujetos participantes, ya que el efecto del tratamiento fue particularmente marcado en aquellos con la expresión inicial más alta. En segundo lugar, que el impacto de la intervención pareció ser de tipo acumulativo y no dosis dependiente, ya que la prueba aguda no generó ningún cambio significativo en la expresión de los genes de interés en la muestra Int_A. En tercer lugar, que la disminución en las tasas de expresión de los genes *IL6R* y *NFκB* en la muestra Int_B podría estar dando indicios de un potencial efecto anti-inflamatorio, ya que esta última es una de las propiedades generalmente atribuida al consumo de frutas y verduras (9,190,191).

Los potenciales mecanismos que explican el efecto del tratamiento con frutas podrían ser deducidos a partir del conocimiento los procesos moleculares en los que los genes afectados están involucrados. En el caso del gen *IL6R*, la actividad de la proteína codificada por este gene se vincula con la función de la interleuquina 6 (IL6), la cual es una proteína importante para diversos procesos, incluido el inmune e inflamatorio. IL6 ejerce

sus efectos a través de su unión a un complejo receptor conformado por las proteínas IL6R y gp130, tras lo cual se desencadena una serie de cascadas de señalización intracelular que promueven la transcripción de genes de distinta naturaleza, incluso en tejidos no sensible a IL6, esto último explicado por la existencia de una versión soluble de la proteína IL6R que participa en un proceso denominado *trans-signaling* (192–194).

Por otro lado, en el caso del gen *NFκB* existe una evidencia robusta que señala que la actividad de la proteína que es codificada por este gen, la cual algunos autores consideran como un regulador maestro, requiere de la estimulación previa de receptores de la membrana celular tales como IL1R, TLR2, TLR4, TNFR, etc., por sus ligandos respectivos, lo cual genera señales intracelulares que liberan a NFκB de su proteína inhibidora a nivel citoplasmático y favorece translocación de esta proteína al núcleo celular, donde promueve la transcripción de un número importante de genes involucrados en un gran espectro de funciones biológicas que son muy relevantes para el funcionamiento del organismo humano (195–198). Considerando los aspectos descritos, es posible que la reducción observada en la expresión de los genes *IL6R* y *NFκB* haya derivado en una disminución de la disponibilidad de sus respectivas proteínas, limitando de esta manera la activación de sus blancos moleculares, particularmente aquellos con actividad pro-inflamatoria.

Finalmente, es importante tener presente que en esta investigación se evaluó la expresión de un número muy limitado de genes vinculados con el proceso de meta-inflamación, por lo que se desconoce si el tratamiento con frutas pudo tener un impacto sobre la expresión de otros genes importantes para este mecanismo biológico, así como para la expresión de genes potencialmente involucrados con otros procesos biológicos relacionados con la prevención y/o desarrollo de las enfermedades crónicas no transmisibles. Por otro lado, en este estudio no se consideró explorar el comportamiento de las proteínas codificadas por los genes seleccionados, lo cual deja abierta la cuestión acerca de la concordancia entre los resultados de ambos niveles moleculares luego de aplicar una intervención nutricional con frutas.

7. Conclusiones y recomendaciones

7.1 Conclusiones

En esta investigación se evidenció que, en las muestras biológicas pre-intervención de los sujetos de estudio, la expresión de los genes *NFκB*, *IL6R* y *TLR2* fue diferencial respecto de la frecuencia de consumo de los alimentos pertenecientes a los grupos de *lácteos y/o derivados* y *frutas enteras*, además, que la expresión del gen *NFκB* vario significativamente de acuerdo al nivel de estrés auto-reportado por los voluntarios participantes en el estudio.

Por otro lado, en esta investigación se demostró, por primera vez, que la intervención *in vivo* en humanos con una cantidad de frutas enteras, equivalente a aquella sugerida por la medida en salud pública vinculada con la promoción del consumo de frutas y verduras, indujo una reducción significativa en la expresión de los genes *IL6R* y *NFκB* en las muestras biológicas del grupo de adultos jóvenes evaluado luego de 15 días de tratamiento.

Finalmente, con la socialización de los hallazgos de esta investigación se espera promover en el país la investigación en los distintos aspectos de la *genómica nutricional* por parte de los diferentes profesionales relacionados con la salud, particularmente de los nutricionista-dietistas, con el fin de que la valiosa información derivada de esta disciplina pueda ser utilizada en un futuro para generar y/o reorientar las guías de manejo asistencial y las medidas en salud pública.

7.2 Recomendaciones

Con base en la experiencia obtenida durante el desarrollo de esta investigación se sugiere realizar estudios adicionales que consideren lo siguiente:

- Incrementar el tamaño de muestra de los sujetos de estudio, la cual cuente con una proporción por sexo de 1:1 e incluya individuos bajo condiciones de riesgo y/o enfermedad.
- Evaluar el efecto crónico de la intervención con frutas sobre el transcriptoma y el proteoma de muestras sangre periférica, así como de muestras de otros tejidos potencialmente disponibles tales como el adiposo y muscular.
- Realizar la prueba aguda empleando comidas de prueba (*test meal*) con distinto aporte calórico y tomando muestras biológicas en distintos puntos de tiempo dentro de un periodo de análisis más amplio.
- Plantear un diseño metodológico que permita caracterizar de manera precisa, antes y después de la intervención nutricional, la influencia de los patrones alimentarios de los sujetos de estudio sobre la expresión génica.
- Establecer una estrategia metodológica que posibilite determinar si el efecto de la intervención nutricional es dosis-dependiente, acumulativo o de otro tipo.
- Analizar la contribución e interacciones de variables del estilo de vida, del medioambiente, del contexto psicosocial y fisiológico de los individuos sobre el comportamiento de la expresión génica.
- Explorar la utilidad de la información obtenida de los ensayos de expresión génica con el fin de construir un panel de biomarcadores con potencial uso terapéutico.

A. Anexos electrónicos I-X:

- I. Acta de aprobación del proyecto por parte del comité de ética
- II. Consentimiento informado
- III. Cuestionario de salud y nutrición
- IV. Instrumento de frecuencia de consumo de alimentos
- V. Base de datos de la investigación
- VI. Base de datos del consumo de frutas en Colombia
- VII. Base de datos del ensayo de optimización de la concentración de cebadores (primers)
- VIII. Curvas de fusión (melting) de los genes de estudio
- IX. Base de datos del ensayo de eficiencia de los cebadores (primers) y del rango dinámico de la reacción de qPCR
- X. Base de datos de los resultados de los análisis estadísticos aplicados en la investigación

Bibliografía

1. Organización Mundial de la Salud (OMS). Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas [Internet]. Ginebra; 2003 [citado el 27 de Dic. de 2016]. Disponible desde: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/006/ac911s/ac911s00.pdf>
2. Organización Mundial de la Salud (OMS). Estrategia mundial sobre régimen alimentario, actividad física y salud [Internet]. Ginebra; 2004 [citado el 3 de Ene. de 2017]. Disponible desde: http://www.who.int/dietphysicalactivity/strategy/eb11344/strategy_spanish_web.pdf?ua=1
3. World Health Organization (WHO). Global status report on noncommunicable diseases 2010 [Internet]. Geneva; 2010 [citado el 3 de Ene. de 2017]. Disponible desde: http://www.who.int/nmh/publications/ncd_report_full_en.pdf
4. World Health Organization (WHO). Global status report on noncommunicable diseases 2014 [Internet]. Geneva; 2014 [citado el 14 de Dic. de 2016]. Disponible desde: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/148114/1/9789241564854_eng.pdf?ua=1
5. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* [Internet]. 2006, Dic. [citado 2016 Diciembre 14];444(7121):860–7. Disponible desde: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature05485>
6. Egger G. In Search of a Germ Theory Equivalent for Chronic Disease. *Prev Chronic Dis* [Internet]. 2012, May. [citado el 14 de Dic. de 2016];9. Disponible desde: http://www.cdc.gov/pcd/issues/2012/11_0301.htm
7. Pereira SS, Alvarez-Leite JL. Low-Grade Inflammation, Obesity, and Diabetes. *Curr Obes Rep* [Internet]. 2014, Dic. [citado el 15 de Dic. de 2016];3(4):422–31. Disponible desde: <http://link.springer.com/10.1007/s13679-014-0124-9>
8. Minihane AM, Vinoy S, Russell WR, Baka A, Roche HM, Tuohy KM, et al. Low-grade inflammation, diet composition and health: current research evidence and its translation. *Br J Nutr* [Internet]. 2015, Oct. [citado el 29 de Dic. de 2016];114(7):999–

1012. Disponible desde:
http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0007114515002093
9. Calder PC, Ahluwalia N, Brouns F, Buetler T, Clement K, Cunningham K, et al. Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. *Br J Nutr* [Internet]. 2011, Dic. [citado el 12 de Dic. de 2016];106(S3):S5–78. Disponible desde: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0007114511005460
 10. Haimovich B, Zhang Z, Calvano JE, Calvano SE, Kumar A, Macor MA, et al. Cellular metabolic regulators: novel indicators of low-grade inflammation in humans. *Ann Surg* [Internet]. 2014, May. [citado el 29 de Dic. de 2016];259(5):999–1006. Disponible desde: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23817504>
 11. Kotas ME, Medzhitov R. Homeostasis, Inflammation, and Disease Susceptibility. *Cell* [Internet]. 2015, Feb. [citado el 29 de Dic. de 2016];160(5):816–27. Disponible desde: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25723161>
 12. Hotamisligil GS, Erbay E. Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2008, Dic. [citado el 14 de Dic. de 2016];8(12):923–34. Disponible desde: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nri2449>
 13. Bouchard C, Ordovas JM. Fundamentals of nutrigenetics and nutrigenomics. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2012;108:1–15.
 14. Simopoulos AP. Nutrigenetics/Nutrigenomics. *Annu Rev Public Health*. 2010;31:53–68.
 15. Kohlmeier M, De Caterina R, Ferguson LR, Görman U, Allayee H, Prasad C, et al. Guide and Position of the International Society of Nutrigenetics/Nutrigenomics on Personalized Nutrition: Part 2 - Ethics, Challenges and Endeavors of Precision Nutrition. *J Nutrigenet Nutrigenomics* [Internet]. 2016 [citado el 29 de Dic. de 2016];9(1):28–46. Disponible desde:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27286972>
 16. Odriozola L, Corrales FJ. Discovery of nutritional biomarkers: future directions based on omics technologies. *Int J Food Sci Nutr* [Internet]. 2015, Ene. [citado el 29 de Dic. de 2016];66(sup1):S31–40. Disponible desde:
<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/09637486.2015.1038224>
 17. Corella D, Ordovás JM. Biomarkers: background, classification and guidelines for applications in nutritional epidemiology. *Nutr Hosp* [Internet]. 2015, Feb. [citado el 29 de Dic. de 2016];31 Suppl 3:177–88. Disponible desde:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25719785>

18. Jin C, Henao-Mejia J, Flavell RA. Innate Immune Receptors: Key Regulators of Metabolic Disease Progression. *Cell Metab.* 2013;17(6):873–82.
19. Xu H. Obesity and metabolic inflammation. *Drug Discov Today Dis Mech* [Internet]. 2013, Jun. [citado el 15 de Dic. de 2016];10(1–2). Disponible desde: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24003334>
20. Skeldon AM, Faraj M, Saleh M. Caspases and inflammasomes in metabolic inflammation. *Immunol Cell Biol* [Internet]. 2014, Abr. [citado el 15 de Dic. de 2016];92(4):304–13. Disponible desde: <http://www.nature.com/doi/10.1038/icb.2014.5>
21. Jin C, Flavell RA. Innate sensors of pathogen and stress: Linking inflammation to obesity. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;132(2):287–94.
22. Lyons CL, Kennedy EB, Roche HM. Metabolic Inflammation-Differential Modulation by Dietary Constituents. *Nutrients* [Internet]. 2016, Abr. [citado el 15 de Dic. de 2016];8(5). Disponible desde: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27128935>
23. Galland L. Diet and Inflammation. *Nutr Clin Pract* [Internet]. 2010, Dic. [citado el 15 de Dic. de 2016];25(6):634–40. Disponible desde: <http://ncp.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/0884533610385703>
24. Afman L, Milenkovic D, Roche HM. Nutritional aspects of metabolic inflammation in relation to health-insights from transcriptomic biomarkers in PBMC of fatty acids and polyphenols. *Mol Nutr Food Res* [Internet]. 2014, Ago. [citado el 15 de Dic. de 2016];58(8):1708–20. Disponible desde: <http://doi.wiley.com/10.1002/mnfr.201300559>
25. Connaughton RM, McMorrow AM, McGillicuddy FC, Lithander FE, Roche HM. Impact of anti-inflammatory nutrients on obesity-associated metabolic-inflammation from childhood through to adulthood. *Proc Nutr Soc* [Internet]. 2016, May. [citado el 15 de Dic. de 2016];75(2):115–24. Disponible desde: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0029665116000070
26. Olsen KS, Skeie G, Lund E. Whole-Blood Gene Expression Profiles in Large-Scale Epidemiological Studies: What Do They Tell? *Curr Nutr Rep* [Internet]. 2015, Dic. [citado el 29 de Dic. de 2016];4(4):377–86. Disponible desde: <http://link.springer.com/10.1007/s13668-015-0143-5>
27. De Rosa V, Galgani M, Santopaolo M, Colamatteo A, Laccetti R, Matarese G. Nutritional control of immunity: Balancing the metabolic requirements with an appropriate immune function. *Semin Immunol.* 2015;27(5):300–9.

28. Laugerette F, Vors C, Peretti N, Michalski M-C. Complex links between dietary lipids, endogenous endotoxins and metabolic inflammation. *Biochimie*. 2011;93(1):39–45.
29. Ertunc ME, Hotamisligil GS. Lipid signaling and lipotoxicity in metaflammation: indications for metabolic disease pathogenesis and treatment. *J Lipid Res* [Internet]. 2016, Dic. [citado el 15 de Dic. de 2016];57(12):2099–114. Disponible desde: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27330055>
30. Szic KS, Diciembrelerck K, Vidaković M, Vanden Berghe W, López-Otín C, Blasco M, et al. From inflammaging to healthy aging by dietary lifestyle choices: is epigenetics the key to personalized nutrition? *Clin Epigenetics* [Internet]. 2015, Dic. [citado el 16 de Dic. de 2016];7(1):33. Disponible desde: <http://www.clinicalepigeneticsjournal.com/content/7/1/33>
31. Toraño EG, García MG, Fernández-Morera JL, Niño-García P, Fernández AF, Ferná, et al. The Impact of External Factors on the Epigenome: *In Utero* and over Lifetime. *Biomed Res Int* [Internet]. 2016 [citado el 16 de Dic. de 2016];2016:1–17. Disponible desde: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2016/2568635/>
32. Jimenez-Chillaron JC, Ramon-Krauel M, Ribo S, Diaz R, Finucane MM, Stevens GA, et al. Transgenerational epigenetic inheritance of diabetes risk as a consequence of early nutritional imbalances. *Proc Nutr Soc* [Internet]. 2016, Feb. [citado el 16 de Dic. de 2016];75(1):78–89. Disponible desde: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0029665115004231
33. Fitó M, Konstantinidou V. Nutritional Genomics and the Mediterranean Diet's Effects on Human Cardiovascular Health. *Nutrients* [Internet]. 2016, Abr. [citado el 16 de Dic. de 2016];8(4):218. Disponible desde: <http://www.mdpi.com/2072-6643/8/4/218>
34. Chamoun E, Mutch DM, Allen-Vercoe E, Buchholz AC, Duncan AM, Spriet LL, et al. A review of the associations between single nucleotide polymorphisms in taste receptors, eating behaviours, and health. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet]. 2016, May. [citado el 16 de Dic. de 2016]. Disponible desde: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408398.2016.1152229>
35. Joffe YT, Houghton CA. A Novel Approach to the Nutrigenetics and Nutrigenomics of Obesity and Weight Management. *Curr Oncol Rep* [Internet]. 2016, Jul. [citado el 16 de Dic. de 2016];18(7):43. Disponible desde: <http://link.springer.com/10.1007/s11912-016-0529-6>
36. Ferguson JF, Allayee H, Gerszten RE, Ideraabdullah F, Kris-Etherton PM, Ordovás JM, et al. Nutrigenomics, the Microbiome, and Gene-Environment Interactions: New

- Directions in Cardiovascular Disease Research, Prevention, and Treatment. *Circ Cardiovasc Genet*. 2016
37. Piroddi M, Albin A, Fabiani R, Giovannelli L, Luceri C, Natella F, et al. Nutrigenomics of extra-virgin olive oil: A review. *BioFactors* [Internet]. 2016, Ago. [citado el 16 de Dic. de 2016]; Disponible desde: <http://doi.wiley.com/10.1002/biof.1318>
 38. Organización Mundial de la Salud (OMS), Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Un marco para la promoción de frutas y verduras a nivel nacional [Internet]. Philippines; 2005 [citado el 27 de Dic. de 2016]. Disponible desde:
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/70208/1/WHO_NMH_CHP_PCD_05.02_spa.pdf
 39. Alpert PT. Nutrigenetics and Nutrigenomic Is Changing the Field of Nutrition. *Home Health Care Manag Pract*. 2015, Ene;28(1):73–5.
 40. Remely M, Stefanska B, Lovrecic L, Magnet U, Haslberger AG. Nutriepigenomics: the role of nutrition in epigenetic control of human diseases. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2015;18(4):328–33.
 41. Johnson IT, Belshaw NJ. Nutrition and epigenetics: An emerging field. *Nutr Bull* [Internet]. 2014, Dic. [citado el 28 de Dic. de 2016];39(4):313–21. Disponible desde: <http://doi.wiley.com/10.1111/nbu.12120>
 42. Harrington JM, Phillips CM. Nutrigenetics: Bridging Two Worlds to Understand Type 2 Diabetes. *Curr Diab Rep* [Internet]. 2014, Abr. [citado el 28 de Dic. de 2016];14(4):477. Disponible desde: <http://link.springer.com/10.1007/s11892-014-0477-1>
 43. Abdullah MMH, Jones PJH, Eck PK. Nutrigenetics of cholesterol metabolism: observational and dietary intervention studies in the postgenomic era. *Nutr Rev* [Internet]. 2015, Ago. [citado el 28 de Dic. de 2016];73(8):523–43. Disponible desde: <http://nutritionreviews.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/nutrit/nuv016>
 44. Solas M, Milagro FI, Martínez-Urbistondo D, Ramirez MJ, Martínez JA. Precision Obesity Treatments Including Pharmacogenetic and Nutrigenetic Approaches. *Trends Pharmacol Sci*. 2016;37(7):575–93.
 45. Elsamanoudy AZ, Neamat-Allah MAM, Mohammad FAH, Hassanien M, Nada HA. The role of nutrition related genes and nutrigenetics in understanding the pathogenesis of cancer. *J Microsc Ultrastruct*. 2016;4(3):115–22.
 46. Wittwer J, Rubio-Aliaga I, Hoefft B, Bendik I, Weber P, Daniel H. Nutrigenomics in

- human intervention studies: Current status, lessons learned and future perspectives. *Mol Nutr Food Res* [Internet]. 2011, Mar. [citado el 28 de Dic. de 2016];55(3):341–58. Disponible desde: <http://doi.wiley.com/10.1002/mnfr.201000512>
47. Konstantinidou V, Covas M-I, Sola R, Fitó M. Up-to date knowledge on the in vivo transcriptomic effect of the Mediterranean diet in humans. *Mol Nutr Food Res* [Internet]. 2013, May. [citado el 28 de Dic. de 2016];57(5):772–83. Disponible desde: <http://doi.wiley.com/10.1002/mnfr.201200613>
 48. Sapienza C, Issa J-P. Diet, Nutrition, and Cancer Epigenetics. *Annu Rev Nutr* [Internet]. 2016, Jul. [citado el 28 de Dic. de 2016];36(1):665–81. Disponible desde: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-nutr-121415-112634>
 49. Hernández-Aguilera A, Fernández-Arroyo S, Cuyàs E, Luciano-Mateo F, Cabre N, Camps J, et al. Epigenetics and nutrition-related epidemics of metabolic diseases: Current perspectives and challenges. *Food Chem Toxicol*. 2016;96:191–204.
 50. Camp KM, Trujillo E. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Nutritional Genomics. Vol. 114, *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*. 2014.
 51. Fogelholm M. Nutrition recommendations and science: next parallel steps. *J Sci Food Agric* [Internet]. 2016, Mar. [citado el 29 de Dic. de 2016];96(4):1059–63. Disponible desde: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.7479>
 52. Remely M, Lovrecic L, De La Garza AL, Migliore L, Peterlin B, Milagro FI, et al. Therapeutic perspectives of epigenetically active nutrients. *British Journal of Pharmacology*. 2015, Jun;172(11):2756–68.
 53. Dahan O, Gingold H, Pilpel Y. Regulatory mechanisms and networks couple the different phases of gene expression. *Trends Genet*. 2011;27(8):316–22.
 54. Shandilya J, Roberts SGE. The transcription cycle in eukaryotes: From productive initiation to RNA polymerase II recycling. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech*. 2012;1819(5):391–400.
 55. Allen BL, Taatjes DJ. The Mediator complex: a central integrator of transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2015, Feb. [citado el 28 de Dic. de 2016];16(3):155–66. Disponible desde: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrm3951>
 56. de Klerk E, 't Hoen PAC. Alternative mRNA transcription, processing, and translation: insights from RNA sequencing. *Trends Genet*. 2015;31(3):128–39.
 57. Aitken CE, Lorsch JR. A mechanistic overview of translation initiation in eukaryotes. *Nat Struct Mol Biol* [Internet]. 2012, Jun. [citado el 28 de Dic. de 2016];19(6):568–76. Disponible desde: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nsmb.2303>

58. Hinnebusch AG. The Scanning Mechanism of Eukaryotic Translation Initiation. *Annu Rev Biochem* [Internet]. 2014, Jun. [citado el 28 de Dic. de 2016];83(1):779–812. Disponible desde: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-biochem-060713-035802>
59. Andreev DE, O'Connor PBF, Loughran G, Dmitriev SE, Baranov P V, Shatsky IN. Insights into the mechanisms of eukaryotic translation gained with ribosome profiling. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2016, Dic. [citado el 28 de Dic. de 2016];In Press. Disponible desde: <http://nar.oxfordjournals.org/content/early/2016/12/06/nar.gkw1190.full>
60. Schon EA, DiMauro S, Hirano M. Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. *Nat Rev Genet*. 2012;13(12):878–90.
61. Grice EA, Segre JA. The Human Microbiome: Our Second Genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2012;13:151–70.
62. Encode Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*. 2013;489(7414):57–74.
63. Natoli G, Andrau J-C. Noncoding Transcription at Enhancers: General Principles and Functional Models. *Annu Rev Genet* [Internet]. 2012, Dic. [citado el 28 de Dic. de 2016];46(1):1–19. Disponible desde: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-genet-110711-155459>
64. Yáñez-Cuna JO, Kvon EZ, Stark A. Diciembrephering the transcriptional cis-regulatory code. *Trends Genet*. 2013;29(1):11–22.
65. Voss TC, Hager GL. Dynamic regulation of transcriptional states by chromatin and transcription factors. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2013, Dic. [citado el 28 de Dic. de 2016];15(2):69–81. Disponible desde: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrg3623>
66. Venkatesh S, Workman JL. Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2015, Feb. [citado el 28 de Dic. de 2016];16(3):178–89. Disponible desde: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrm3941>
67. Grünwald D, Singer RH, Rout M. Nuclear export dynamics of RNA–protein complexes. *Nature* [Internet]. 2011, Jul. [citado el 28 de Dic. de 2016];475(7356):333–41. Disponible desde: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature10318>
68. Björk P, Wieslander L. Mechanisms of mRNA export. *Semin Cell Dev Biol*.

- 2014;32:47–54.
69. Jung H, Gkogkas CG, Sonenberg N, Holt CE. Remote Control of Gene Function by Local Translation. *Cell*. 2014;157(1):26–40.
 70. Luscher B, Fuchs T, Kilpatrick CL. GABAA Receptor Trafficking-Mediated Plasticity of Inhibitory Synapses. *Neuron*. 2011;70(3):385–409.
 71. Margadant C, Monsuur HN, Norman JC. Mechanisms of integrin activation and trafficking. *Curr Opin Cell Biol*. 2011;23(5):607–14.
 72. Wang Y-N, Hung M-C, Avraham R, Yarden Y, Citri A, Yarden Y, et al. Nuclear functions and subcellular trafficking mechanisms of the epidermal growth factor receptor family. *Cell Biosci [Internet]*. 2012 [citado el 29 de Dic. de 2016];2(1):13. Disponible desde:
<http://cellandbioscience.biomedcentral.com/articles/10.1186/2045-3701-2-13>
 73. De Conti L, Baralle M, Buratti E. Exon and intron definition in pre-mRNA splicing. *Wiley Interdiscip Rev RNA [Internet]*. 2013, Ene. [citado el 28 de Dic. de 2016];4(1):49–60. Disponible desde: <http://doi.wiley.com/10.1002/wrna.1140>
 74. Kelemen O, Convertini P, Zhang Z, Wen Y, Shen M, Falaleeva M, et al. Function of alternative splicing. *Gene*. 2013;514(1):1–30.
 75. Gray MW. Evolutionary Origin of RNA Editing. *Biochemistry [Internet]*. 2012, Jul. [citado el 28 de Dic. de 2016];51(26):5235–42. Disponible desde: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi300419r>
 76. Picardi E, Manzari C, Mastropasqua F, Aiello I, D'Erchia AM, Pesole G. Profiling RNA editing in human tissues: towards the inosinome Atlas. *Sci Rep [Internet]*. 2015, Oct. [citado el 28 de Dic. de 2016];5:14941. Disponible desde: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26449202>
 77. Kornblihtt AR, Schor IE, Alló M, Dujardin G, Petrillo E, Muñoz MJ. Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation. *Nat Rev Mol Cell Biol [Internet]*. 2013, Feb. [citado el 28 de Dic. de 2016];14(3):153–65. Disponible desde: <http://www.nature.com/doi/abs/10.1038/nrm3525>
 78. Lee Y, Rio DC. Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing. *Annu Rev Biochem [Internet]*. 2015 [citado el 28 de Dic. de 2016];84:291–323. Disponible desde: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25784052>
 79. Parnell LD. Advances in technologies and study design. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2012;108:17–50.
 80. Coughlin SS. Toward a road map for global -omics: a primer on -omic technologies.

- Am J Epidemiol. 2014, Dic;180(12):1188–95.
81. Ritchie MD, Holzinger ER, Li R, Pendergrass SA, Kim D. Methods of integrating data to uncover genotype–phenotype interactions. *Nat Rev Genet*. 2015;16(2):85–97.
 82. Mazzió EA, Soliman KFA. Basic concepts of epigenetics: impact of environmental signals on gene expression. *Epigenetics*. 2012;7(2):119–30.
 83. Duncan EJ, Gluckman PD, Dearden PK. Epigenetics, plasticity, and evolution: How do we link epigenetic change to phenotype? Vol. 322, *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*. 2014. p. 208–20.
 84. Barrett LW, Fletcher S, Wilton SD. Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2012, Nov. [citado el 28 de Dic. de 2016];69(21):3613–34. Disponible desde: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-012-0990-9>
 85. Pelechano V, Steinmetz LM. Gene regulation by antisense transcription. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2013, Nov. [citado el 28 de Dic. de 2016];14(12):880–93. Disponible desde: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrg3594>
 86. Cech TR, Steitz JA. The Noncoding RNA Revolution—Trashing Old Rules to Forge New Ones. *Cell*. 2014;157(1):77–94.
 87. Valdés A, Simó C, Ibáñez C, García-Cañas V. Foodomics strategies for the analysis of transgenic foods. *TrAC Trends Anal Chem*. 2013;52:2–15.
 88. Hulse AM, Cai JJ. Genetic Variants Contribute to Gene Expression Variability in Humans. *Genetics*. 2012;193(1).
 89. Elliott RM, de Roos B, Duthie SJ, Bouwman FG, Rubio-Aliaga I, Crosley LK, et al. Transcriptome analysis of peripheral blood mononuclear cells in human subjects following a 36 h fast provides evidence of effects on genes regulating inflammation, apoptosis and energy metabolism. *Genes Nutr* [Internet]. 2014, Nov. [citado el 29 de Dic. de 2016];9(6):432. Disponible desde: <http://link.springer.com/10.1007/s12263-014-0432-4>
 90. Melé M, Ferreira PG, Reverter F, DeLuca DS, Monlong J, Sammeth M, et al. The human transcriptome across tissues and individuals. *Science*. 2015;348(6235).
 91. Chhibber A, French CE, Yee SW, Gamazon ER, Theusch E, Qin X, et al. Transcriptomic variation of pharmacogenes in multiple human tissues and lymphoblastoid cell lines. *Pharmacogenomics J* [Internet]. 2016, Feb. [citado el 29 de Dic. de 2016]; Disponible desde: <http://www.nature.com/doi/10.1038/tpj.2015.93>

92. Jacobs DR, Tapsell LC. Food, not nutrients, is the fundamental unit in nutrition. *Nutr Rev.* 2007;65(10):439–50.
93. Mullie P, Guelinckx I, Clarys P, Degraeve E, Hulens M, Vansant G. Cultural, socioeconomic and nutritional determinants of functional food consumption patterns. *Eur J Clin Nutr.* 2009;63(11):1290–6.
94. Novaković R, Cavelaars A, Geelen A, Nikolić M, Altaba II, Viñas BR, et al. Review Article Socio-economic determinants of micronutrient intake and status in Europe: a systematic review. *Public Health Nutr [Internet].* 2014, May. [citado el 29 de Dic. de 2016];17(5):1031–45. Disponible desde: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S1368980013001341
95. Mayen A-L, Marques-Vidal P, Paccaud F, Bovet P, Stringhini S. Socioeconomic determinants of dietary patterns in low- and middle-income countries: a systematic review. *Am J Clin Nutr [Internet].* 2014, Dic. [citado el 29 de Dic. de 2016];100(6):1520–31. Disponible desde: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25411287>
96. Parada J, Aguilera JM. Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *J Food Sci.* 2007;72(2).
97. Rodríguez-Roque MJ, de Ancos B, Sánchez-Vega R, Sánchez-Moreno C, Cano MP, Elez-Martínez P, et al. Food matrix and processing influence on carotenoid bioaccessibility and lipophilic antioxidant activity of fruit juice-based beverages. *Food Funct.* 2015.
98. Laparra JM, Sanz Y. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. *Pharmacological Research.* 2010, Mar. 61(3):219–25.
99. Rein MJ, Renouf M, Cruz-Hernandez C, Actis-Goretta L, Thakkar SK, da Silva Pinto M. Bioavailability of bioactive food compounds: A challenging journey to bioefficacy. *Br J Clin Pharmacol.* 2013;75(3):588–602.
100. Turgeon SL, Rioux LE. Food matrix impact on macronutrients nutritional properties. *Food Hydrocoll.* 2011;25(8):1915–24.
101. Bettigole SE, Glimcher LH. Endoplasmic Reticulum Stress in Immunity. *Annu Rev Immunol [Internet].* 2015, Mar. [citado el 29 de Dic. de 2016];33(1):107–38. Disponible desde: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-immunol-032414-112116>
102. Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell [Internet].* 2010, Mar. [citado el 29 de Dic. de

- 2016];140(6):900–17. Disponible desde:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20303879>
103. Agudo A. Measuring intake of fruit and vegetables [Internet]. World Health Organization (WHO). Kobe; 2005 [citado el 27 de Dic. de 2016]. Disponible desde:
http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/f&v_intake_measurement.pdf
 104. Thompson MD, Thompson HJ. Capítulo 1 – Botanical Diversity in Vegetable and Fruit Intake: Potential Health Benefits. En: *Bioactive Foods in Promoting Health*. 2010. p. 1–17.
 105. Moore L V, Thompson FE. Adults Meeting Fruit and Vegetable Intake Recommendations - United States, 2013. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* [Internet]. 2015, Jul. [citado el 27 de Dic. de 2016];64(26):709–13. Disponible desde:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26158351>
 106. Elmadfa I, Meyer A, Nowak V, Hasenegger V, Putz P, Verstraeten R, et al. 2. Outlook. En: *European Nutrition and Health Report 2009* [Internet]. Basel: KARGER; 2009 [citado el 27 de Dic. de 2016]. p. 12–3. Disponible desde:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20081327>
 107. Australian Bureau of Statistics. Australian Health Survey: Consumption of food groups from the Australian Dietary Guidelines Australia [Internet]. Canberra; 2011 [citado el 27 de Dic. de 2016]. Disponible desde:
[http://www.ausstats.abs.gov.au/ausstats/subscriber.nsf/0/12E8766EBAB492B0CA257FAF001A3CFD/\\$File/43640do002_20112012.pdf](http://www.ausstats.abs.gov.au/ausstats/subscriber.nsf/0/12E8766EBAB492B0CA257FAF001A3CFD/$File/43640do002_20112012.pdf)
 108. Ministerio de la Protección Social. Encuesta nacional de la situación nutricional en Colombia 2010 - ENSIN [Internet]. Primera. DA VINCI EDITORES Y CÍA, editor. Bogotá; 2011. Disponible desde:
<http://www.icbf.gov.co/portal/page/portal/PortalICBF/bienestar/nutricion/ensin/LibroENSIN2010.pdf>
 109. Sun-Waterhouse D. The development of fruit-based functional foods targeting the health and wellness market: a review. *Int J Food Sci Technol* [Internet]. 2011, May. [citado el 27 de Dic. de 2016];46(5):899–920. Disponible desde:
<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.2010.02499.x>
 110. O'Shea N, Arendt EK, Gallagher E. Dietary fibre and phytochemical characteristics of fruit and vegetable by-products and their recent applications as novel ingredients in food products. *Innov Food Sci Emerg Technol*. 2012;16:1–10.
 111. Karim AA, Azlan A. Fruit Pod Extracts as a Source of Nutraceuticals and

- Pharmaceuticals. *Molecules* [Internet]. 2012, Oct. [citado el 27 de Dic. de 2016];17(12):11931–46. Disponible desde: <http://www.mdpi.com/1420-3049/17/10/11931/>
112. Babbar N, Oberoi HS, Sandhu SK. Therapeutic and Nutraceutical Potential of Bioactive Compounds Extracted from Fruit Residues. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet]. 2015, Feb. [citado el 27 de Dic. de 2016];55(3):319–37. Disponible desde: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2011.653734>
113. Gruber K. Giving fruit a nutritional boost. *Nat Plants* [Internet]. 2016, Dic. [citado el 27 de Dic. de 2016];2(12):16191. Disponible desde: <http://www.nature.com/articles/nplants2016191>
114. Hefferon KL. Can Biofortified Crops Help Attain Food Security? *Curr Mol Biol Reports* [Internet]. 2016, Dic. [citado el 27 de Dic. de 2016];2(4):180–5. Disponible desde: <http://link.springer.com/10.1007/s40610-016-0048-0>
115. Hallerman E, Grabau E. Crop biotechnology: a pivotal moment for global acceptance. *Food Energy Secur* [Internet]. 2016, Feb. [citado el 27 de Dic. de 2016];5(1):3–17. Disponible desde: <http://doi.wiley.com/10.1002/fes3.76>
116. Mamluk L, O'Doherty MG, Orfanos P, Saitakis G, Woodside J V, Liao LM, et al. Fruit and vegetable intake and risk of incident of type 2 diabetes: results from the consortium on health and ageing network of cohorts in Europe and the United States (CHANCES). *Eur J Clin Nutr* [Internet]. 2016, Ago. [citado el 27 de Dic. de 2016]; Disponible desde: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ejcn.2016.143>
117. Borgi L, Muraki I, Satija A, Willett WC, Rimm EB, Forman JP. Fruit and Vegetable Consumption and the Incidence of Hypertension in Three Prospective Cohort Studies: Novelty and Significance. *Hypertension*. 2016;67(2).
118. Aune D, Giovannucci E, Boffetta P, Fadnes L, Keum N, Norat T, et al. Fruit and vegetable intake and the risk of cardiovascular disease, total cancer and all-cause mortality – a systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *Int J Epidemiol* [Internet]. 2016 [citado el 27 de Dic. de 2016]; In Press. Disponible desde: <http://eprints.whiterose.ac.uk/106013/>
119. Bellavia A, Stilling F, Wolk A. High red meat intake and all-cause cardiovascular and cancer mortality: is the risk modified by fruit and vegetable intake? *Am J Clin Nutr* [Internet]. 2016, Oct. [citado el 27 de Dic. de 2016];104(4):1137–43. Disponible desde: <http://ajcn.nutrition.org/cgi/doi/10.3945/ajcn.116.135335>
120. Hartley L, Igbinedion E, Thorogood M, Clarke A, Stranges S, Hooper L, et al.

- Increased consumption of fruit and vegetables for the primary prevention of cardiovascular diseases. *Cochrane database Syst Rev* [Internet]. 2012 [citado el 27 de Dic. de 2016];2012(5). Disponible desde: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25267919>
121. Viuda-Martos M, Fernández-López J, Pérez-Álvarez JA. Pomegranate and its Many Functional Components as Related to Human Health: A Review. *Compr Rev Food Sci Food Saf* [Internet]. 2010, Nov. [citado el 27 de Dic. de 2016];9(6):635–54. Disponible desde: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1541-4337.2010.00131.x>
 122. Ramadan MF. Bioactive phytochemicals, nutritional value, and functional properties of cape gooseberry (*Physalis peruviana*): An overview. *Food Res Int*. 2011;44(7):1830–6.
 123. Kaume L, Howard LR, Devareddy L. The Blackberry Fruit: A Review on Its Composition and Chemistry, Metabolism and Bioavailability, and Health Benefits. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2012, Jun. [citado el 27 de Dic. de 2016];60(23):5716–27. Disponible desde: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf203318p>
 124. Basu A, Nguyen A, Betts NM, Lyons TJ. Strawberry As a Functional Food: An Evidence-Based Review. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet]. 2014, Ene. [citado el 27 de Dic. de 2016];54(6):790–806. Disponible desde: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2011.608174>
 125. Khan MK, Zill-E-Huma, Dangles O. A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. *J Food Compos Anal*. 2014;33(1):85–104.
 126. World Health Organization. WHO | Biofortification of staple crops [Internet]. WHO. World Health Organization; 2016 [citado el 27 de Dic. de 2016]. Disponible desde: <http://www.who.int/elena/titles/biofortification/en/>
 127. Ghag SB, Ganapathi TR. Genetically modified bananas: To mitigate food security concerns. *Sci Hortic (Amsterdam)*. 2017;214:91–8.
 128. Paul J-Y, Khanna H, Kleidon J, Hoang P, Geijskes J, Daniells J, et al. Golden bananas in the field: elevated fruit pro-vitamin A from the expression of a single banana transgene. *Plant Biotechnol J* [Internet]. 2016, Dic. [citado el 27 de Dic. de 2016]; Disponible desde: <http://doi.wiley.com/10.1111/pbi.12650>
 129. Huerta AE, Prieto-Hontoria PL, Sainz N, Martinez JA, Moreno-Aliaga MJ. Supplementation with α -Lipoic Acid Alone or in Combination with Eicosapentaenoic Acid Modulates the Inflammatory Status of Healthy Overweight or Obese Women Consuming an Energy-Restricted Diet. *J Nutr* [Internet]. 2016, Abr. [citado el 2 de

- Ene. de 2017];146(4):889S–896S. Disponible desde: <http://jn.nutrition.org/cgi/doi/10.3945/jn.115.224105>
130. Cialdella-Kam L, Nieman D, Knab A, Shanely R, Meaney M, Jin F, et al. A Mixed Flavonoid-Fish Oil Supplement Induces Immune-Enhancing and Anti-Inflammatory Transcriptomic Changes in Adult Obese and Overweight Women—A Randomized Controlled Trial. *Nutrients* [Internet]. 2016, May. [citado el 2 de Ene. de 2017];8(5):277. Disponible desde: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27187447>
131. Calabuig-Navarro V, Puchowicz M, Glazebrook P, Haghiac M, Minium J, Catalano P, et al. Effect of ω -3 supplementation on placental lipid metabolism in overweight and obese women. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 2016, Abr. [citado el 2 de Ene. de 2017];103(4):1064–72. Disponible desde: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26961929>
132. Yoshino J, Smith GI, Kelly SC, Julliard S, Reeds DN, Mittendorfer B. Effect of dietary n-3 PUFA supplementation on the muscle transcriptome in older adults. *Physiol Rep* [Internet]. 2016, Jun. [citado el 2 de Ene. de 2017];4(11):e12785. Disponible desde: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27252251>
133. Malan L, Baumgartner J, Zandberg L, Calder PC, Smuts CM. Iron and a mixture of DHA and EPA supplementation, alone and in combination, affect bioactive lipid signalling and morbidity of iron deficient South African school children in a two-by-two randomised controlled trial. *Prostaglandins, Leukot Essent Fat Acids* [Internet]. 2016, Feb. [citado el 2 de Ene. de 2017];105:15–25. Disponible desde: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26869087>
134. Boss A, Kao C, Murray P, Marlow G, Barnett M, Ferguson L. Human Intervention Study to Assess the Effects of Supplementation with Olive Leaf Extract on Peripheral Blood Mononuclear Cell Gene Expression. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2016, Dic. [citado el 2 de Ene. de 2017];17(12):2019. Disponible desde: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27918443>
135. Ryu R, Jeong T-S, Kim Y, Choi J-Y, Cho S-J, Kwon E-Y, et al. Beneficial Effects of Pterocarpan-High Soybean Leaf Extract on Metabolic Syndrome in Overweight and Obese Korean Subjects: Randomized Controlled Trial. *Nutrients* [Internet]. 2016, Nov. [citado el 2 de Ene. de 2017];8(11):734. Disponible desde: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27869712>
136. Lee YJ, Ahn Y, Kwon O, Lee MY, Lee CH, Lee S, et al. A dietary wolfberry extract modifies oxidative stress by controlling the expression of inflammatory mRNAs in

- overweight and hypercholesterolemic subjects: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2016, Dic. [citado el 2 de Ene. de 2017]; In Press:acs.jafc.6b04701. Disponible desde: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28027641>
137. Lin Y, Kazlova V, Ramakrishnan S, Murray MA, Fast D, Chandra A, et al. Bone health nutraceuticals alter microarray mRNA gene expression: A randomized, parallel, open-label clinical study. *Phytomedicine*. 2016;23(1):18–26.
138. Pellatt AJ, Slattery ML, Mullany LE, Wolff RK, Pellatt DF. Dietary intake alters gene expression in colon tissue: possible underlying mechanism for the influence of diet on disease. *Pharmacogenet Genomics* [Internet]. 2016;26(6):294–306. Disponible desde: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4853256/>
139. Leder L, Kolehmainen M, Narverud I, Dahlman I, Myhrstad MCW, de Mello VD, et al. Effects of a healthy Nordic diet on gene expression changes in peripheral blood mononuclear cells in response to an oral glucose tolerance test in subjects with metabolic syndrome: a SYSDIET sub-study. *Genes Nutr* [Internet]. 2016, Dic. [citado el 3 de Ene. de 2017];11(1):3. Disponible desde: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27482295>
140. Marques-Rocha JL, Milagro FI, Mansego ML, Zulet MA, Bressan J, Martínez JA. Expression of inflammation-related miRNAs in white blood cells from subjects with metabolic syndrome after 8 wk of following a Mediterranean diet-based weight loss program. *Nutrition*. 2016;32(1):48–55.
141. Tabet F, Cuesta Torres LF, Ong KL, Shrestha S, Choteau SA, Barter PJ, et al. High-Density Lipoprotein-Associated miR-223 Is Altered after Diet-Induced Weight Loss in Overweight and Obese Males. Hribal ML, editor. *PLoS One* [Internet]. 2016, Mar. [citado el 2 de Ene. de 2017];11(3):e0151061. Disponible desde: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26962854>
142. Parr EB, Camera DM, Burke LM, Phillips SM, Coffey VG, Hawley JA. Circulating MicroRNA Responses between “High” and “Low” Responders to a 16-Wk Diet and Exercise Weight Loss Intervention. Song Y, editor. *PLoS One* [Internet]. 2016, Abr. [citado el 3 de Ene. de 2016];11(4):e0152545. Disponible desde: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27101373>
143. University of Florida. Nutrition Questionnaire [Internet]. [citado el 18 de Oct. de 2016]. Disponible desde: http://shcc.ufl.edu/files/2011/09/NS-001_2015.pdf
144. Indiana University Northwest. Nutrition History Questionnaire [Internet]. [citado el 18

- de Oct. de 2016]. Disponible desde: <http://www.iun.edu/chhs/docs/nutrition-history-questionnaire-new.pdf>
145. University of Nebraska. Assessment Questionnaire [Internet]. [citado el 18 de Oct. de 2016]. Disponible desde:
<https://health.unl.edu/forms/Nutrition.ServicesAssessmentQuestionnaire-04.13.pdf>
146. Monsalve JM, Zapata LIG. Diseño de un cuestionario de frecuencia para evaluar ingesta alimentaria en la Universidad de Antioquia , Colombia. *Nutr Hosp.* 2011;26(6):1333–44.
147. Ministerio de Salud. Guías alimentarias para la población colombiana mayor de 2 años: bases técnicas. Bogotá; 1999.
148. Ministerio de Salud y Protección Social. Perfil nacional de producción y consumo de frutas y verduras en Colombia [Internet]. DaVinci Publicidad y Medios, editor. Bogotá; 2013. Disponible desde:
http://www.osancolombia.gov.co/doc/Perfil_Nacional_Consumo_FyV_Colombia_2012.pdf
149. Instituto Colombiano de Bienestar Familiar. Encuesta nacional de la situación nutricional en Colombia 2005 - ENSIN [Internet]. Primera. Borda Villegas C, editor. Bogotá: Panamerica Firma e Impresos S.A.; 2006. Disponible desde:
http://www.icbf.gov.co/portal/page/portal/PortalICBF/bienestar/nutricion/ensin/LIBRO_2005.pdf
150. Instituto Colombiano de Bienestar Familiar (ICBF). Tabla de composición de alimentos colombianos. Séptima. Santafé de Bogotá; 1996.
151. Presidencia de la Republica. Diciembrereto 3075 [Internet]. Bogotá; 1997. Disponible desde:
https://www.invima.gov.co/images/stories/aliementos/Diciembrereto_3075_1997.pdf
152. Ministerio de Salud y Protección Social. Resolución 2674 [Internet]. Bogotá; 2013. Disponible desde:
<https://www.invima.gov.co/images/pdf/normatividad/alimentos/resoluciones/resoluciones/2013/2674.pdf>
153. Instituto Colombiano de Bienestar Familiar. Tabla de Composición de Alimentos Colombianos [Internet]. 2005 [citado el 8 de Nov. de 2016]. Disponible desde:
http://alimentoscolombianos.icbf.gov.co/alimentos_colombianos/consulta_alimento.asp

154. Sigma-Aldrich. Histopaque-1077 [Internet]. 2011 [citado el 18 de Oct. de 2016]. Disponible desde: http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/10771pis.pdf
155. Thermo Fische Scientific. PureLink RNA Mini Kit [Internet]. 2012 [citado el 15 de Oct. de 2016]. p. 34–6. Disponible desde: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/purelink_rna_mini_kit_man.pdf
156. Thermo Fische Scientific. High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit [Internet]. 2010 [citado el 15 de Oct. de 2016]. p. 6–9. Disponible desde: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_042557.pdf
157. National Center for Biotechnology Information (NCBI). Primer-Blast [Internet]. [citado el 3 de Nov. de 2016]. Disponible desde: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>
158. University of Tartu & Estonian Biocentre. Primer 3 Input [Internet]. [citado el 3 de Nov. de 2016]. Disponible desde: <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>
159. Roche Life Sciences. Chapter A. En: LightCycler®96System, Operator's Guide V20 [Internet]. 2013. p. 65–80. Disponible desde: <https://lifescience.roche.com/webapp/wcs/stores/servlet/CategoryDisplay?catalogId=10001&tab=Software&identifier=Real-Time+PCR+Overview&langId=-1>
160. Roche. FastStart Essential DNA Green Master [Internet]. 2013 [citado el 15 de Oct. de 2016]. p. 6–10. Disponible desde: <https://pim-eservices.roche.com/LifeScience/Document/6e009ae3-75f1-e311-98a1-00215a9b0ba8>
161. R Consortium. RStudio [Internet]. 2016 [citado el 3 de Nov. de 2016]. Disponible desde: <https://www.rstudio.com/products/rstudio/>
162. Bulla FB, Villate GP, Zarate MV. Estado nutricional y consumo de alimentos de estudiantes universitarios admitidos a la carrera de medicina. Bogotá 2010-2011. *Investig Orig.* 2011;60(1):3–12.
163. Vargas ME, Becerra F. Estado nutricional y consumo de alimentos de estudiantes universitarios admitidos a nutrición y dietética en la Universidad Nacional De Colombia. *Rev Salud Pública* [Internet]. 2016;17(5):762–75. Disponible desde: <http://revistas.unal.edu.co/index.php/revsaludpublica/article/view/43570>
164. Galvis Y, Barona J, Cardona JA. Intervalos biológicos de referencia del perfil lipídico. *Acta Médica Colomb* [Internet]. 2016;41(1):29–35. Disponible desde: <http://www.scielo.org.co/pdf/amc/v41n1/v41n1a07.pdf>

165. Pérez-Méndez Ó, Pacheco HG, Martínez-Sánchez C, Franco M. HDL-cholesterol in coronary artery disease risk: function or structure? *Clin Chim Acta* [Internet]. 2014;429:111–22. Disponible desde: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24333390>
166. Brunham LR, Hayden MR. Human genetics of HDL: Insight into particle metabolism and function. Vol. 58, *Progress in Lipid Research*. 2015. p. 14–25.
167. Kingwell B a, Chapman MJ, Kontush A, Miller NE. HDL-targeted therapies: progress, failures and future. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 2014;13(6):445–64. Disponible desde: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24854407>
168. Kozera B, Rapacz M. Reference genes in real-time PCR. Vol. 54, *Journal of Applied Genetics*. 2013. p. 391–406.
169. Bustin S a., Benes V, Garson J a., Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: Minimum Information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009;55(4):611–22.
170. Pabinger S, Rödiger S, Kriegner A, Vierlinger K, Weinhäusel A. A survey of tools for the analysis of quantitative PCR (qPCR) data. *Biomol Detect Quantif*. 2014;1(1):23–33.
171. McInnis CM, Wang D, Gianferante D, Hanlin L, Chen X, Thoma M V., et al. Response and habituation of pro- and anti-inflammatory gene expression to repeated acute stress. *Brain Behav Immun*. 2015;46:237–48.
172. U. K, C. Z-H, R. VKK, U. E, P.H. W, A. A, et al. Stress-induced modulation of NF- κ B activation, inflammation-associated gene expression, and cytokine levels in blood of healthy men. *Brain Behav Immun* [Internet]. 2015;77(3):A115. Disponible desde: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L601584029%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2014.12.024%5Cnhttp://sfx.aub.aau.dk/sfxaub?sid=EMBASE&issn=10902139&id=doi:10.1016%2Fj.bbi.2014.12.024&atitle=Stress-induced+modulation>
173. Wolf JM, Rohleder N, Bierhaus A, Nawroth PP, Kirschbaum C. Determinants of the NF- κ B response to acute psychosocial stress in humans. *Brain Behav Immun*. 2009;23(6):742–9.
174. Freedman JE, Larson MG, Tanriverdi K, O'Donnell CJ, Morin K, Hakanson AS, et al. Relation of platelet and leukocyte inflammatory transcripts to body mass index in the framingham heart study. *Circulation*. 2010;122(2):119–29.
175. Pivovarova O, Gögebakan Ö, Sucher S, Groth J, Murahovschi V, Kessler K, et al.

- Regulation of the clock genes expression in human adipose tissue by the weight loss. *Int J Obes (Lond)* [Internet]. 2016;(October 2015):899–906. Disponible desde: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26902807>
176. Shea J, French CR, Bishop J, Martin G, Roebbothan B, Pace D, et al. Changes in the transcriptome of abdominal subcutaneous adipose tissue in response to short-term overfeeding in lean and obese men. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 2009;89(1):407–15. Disponible desde: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19056584>
177. Hermsdorff HHM, Zulet MA, Puchau B, Martínez JA. Fruit and vegetable consumption and proinflammatory gene expression from peripheral blood mononuclear cells in young adults: a translational study. *Nutr Metab (Lond)* [Internet]. 2010;7(1):42. Disponible desde: <http://www.nutritionandmetabolism.com/content/7/1/42>
178. Labonté M-È, Cyr A, Abdullah MM, Lépine M-C, Vohl M-C, Jones P, et al. Dairy product consumption has no impact on biomarkers of inflammation among men and women with low-grade systemic inflammation. *J Nutr* [Internet]. 2014;144(11):1760–7. Disponible desde: <http://jn.nutrition.org/content/144/11/1760.long>
179. Bouchard-Mercier A, Paradis AM, Rudkowska I, Lemieux S, Couture P, Vohl MC. Associations between dietary patterns and gene expression profiles of healthy men and women: a cross-sectional study. *Nutr J* [Internet]. 2013;12(1):24. Disponible desde: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23398686>
180. McEvoy CT, Wallace IR, Hamill LL, Hunter SJ, Neville CE, Patterson CC, et al. Increasing Fruit and Vegetable Intake Has No Dose-Response Effect on Conventional Cardiovascular Risk Factors in Overweight Adults at High Risk of Developing Cardiovascular Disease. *J Nutr* [Internet]. 2015; Disponible desde: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25972532>
181. Lamb M, Griffin SJ, Sharp SJ, Cooper AJM. Fruit and vegetable intake and cardiovascular risk factors in people with newly diagnosed type 2 diabetes. *Eur J Clin Nutr* [Internet]. 2016;1–7. Disponible desde: <http://www.nature.com/ejcn/journal/vaop/ncurrent/full/ejcn2016180a.html>
182. Zasowska-Nowak A, Nowak PJ, Bialasiewicz P, Prymont-Przyminska A, Zwolinska A, Sarniak A, et al. Strawberries Added to the Usual Diet Suppress Fasting Plasma Paraoxonase Activity and Have a Weak Transient Diciebrereasing Effect on Cholesterol Levels in Healthy Nonobese Subjects. *J Am Coll Nutr* [Internet]. 2016;1–14. Disponible desde: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26934671>

183. Leelarungrayub J, Yankai A, Pinkaew D, Puntumetakul R, Laskin JJ, Bloomer RJ. A preliminary study on the effects of star fruit consumption on antioxidant and lipid status in elderly Thai individuals. *Clin Interv Aging*. 2016;11:1183–92.
184. Parvaresh Rizi E, Baig S, Shabeer M, Teo Y, Mok SF, Loh TP, et al. Meal rich in carbohydrate, but not protein or fat, reveals adverse immunometabolic responses associated with obesity. *Nutr J* [Internet]. 2016, Dic. [citado el 6 de Dic. de 2016];15(1):100. Disponible desde:
<http://nutritionj.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12937-016-0219-0>
185. Ghanim H, Batra M, Abuaysheh S, Green K, Makdissi A, Kuhadiya N, et al. Anti-inflammatory and ROS Suppressive Effects of the Addition of Fiber to a High Fat High Calorie Meal. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2016, Dic. [citado el 6 de Dic. de 2016];jc.2016-2669. Disponible desde:
<http://press.endocrine.org/doi/10.1210/jc.2016-2669>
186. De Lorenzo A, Bernardini S, Gualtieri P, Cabibbo A, Perrone MA, Giambini I, et al. Mediterranean meal versus Western meal effects on postprandial ox-LDL, oxidative and inflammatory gene expression in healthy subjects: a randomized controlled trial for nutrigenomic approach in cardiometabolic risk. *Acta Diabetol* [Internet]. 2016, Oct. [citado el 6 de Dic. de 2016]; Disponible desde:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27709360>
187. Møller P, Vogel U, Pedersen A, Dragsted LO, Sandström B, Loft S. No Effect of 600 Grams Fruit and Vegetables Per Day on Oxidative DNA Damage and Repair in Healthy Nonsmokers. *Cancer Epidemiol Prev Biomarkers*. 2003;12(10).
188. Almendingen K, Brevik A, Nymo DA, Hilmarsen HT, Andresen PA, Andersen LF, et al. Modulation of COX-2 expression in peripheral blood cells by increased intake of fruit and vegetables? *Eur J Clin Nutr* [Internet]. 2005, Abr. [citado el 12 de Dic. de 2016];59(4):597–602. Disponible desde:
<http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.ejcn.1602110>
189. Pasma WJ, van Erk MJ, Klöpping WAA, Pellis L, Wopereis S, Bijlsma S, et al. Nutrigenomics approach elucidates health-promoting effects of high vegetable intake in lean and obese men. *Genes Nutr* [Internet]. 2013, Sep. [citado el 12 de Dic. de 2016];8(5):507–21. Disponible desde:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23595524>
190. González-Gallego J, García-Mediavilla MV, Sánchez-Campos S, Tuñón MJ, Robards K, Antolovich M, et al. Fruit polyphenols, immunity and inflammation. *Br J*

- Nutr [Internet]. 2010, Oct. [citado el 12 de Dic. de 2016];104(S3):S15–27. Disponible desde: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0007114510003910
191. Barbaresko J, Koch M, Schulze MB, Nöthlings U. Dietary pattern analysis and biomarkers of low-grade inflammation: a systematic literature review. *Nutr Rev* [Internet]. 2013, Ago. [citado el 12 de Dic. de 2016];71(8):511–27. Disponible desde: <http://nutritionreviews.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1111/nure.12035>
 192. Mihara M, Hashizume M, Yoshida H, Suzuki M, Shiina M. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci*. 2012;122(4).
 193. Rose-John S. IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *Int J Biol Sci* [Internet]. 2012 [citado el 12 de Dic. de 2016];8(9):1237–47. Disponible desde: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23136552>
 194. Hunter CA, Jones SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol* [Internet]. 2015, Abr. [citado el 12 de Dic. de 2016];16(5):448–57. Disponible desde: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ni.3153>
 195. Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2009, Dic. [citado el 12 de Dic. de 2016];1(6):a001651. Disponible desde: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20457564>
 196. Baker RG, Hayden MS, Ghosh S. NF- κ B, inflammation, and metabolic disease. *Cell Metab* [Internet]. 2011, Ene. [citado el 12 de Dic. de 2016];13(1):11–22. Disponible desde: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21195345>
 197. Tornatore L, Thotakura AK, Bennett J, Moretti M, Franzoso G. The nuclear factor kappa B signaling pathway: integrating metabolism with inflammation. *Trends Cell Biol*. 2012;22:557–66.
 198. Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer* [Internet]. 2013, Ago. [citado el 12 de Dic. de 2016];12:86. Disponible desde: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23915189>