



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATÍA  
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA EN RED

**“CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y EFECTO DEL ACEITE DE LA NUEZ**

***Carya illinoensis* PARA LA PREVENCIÓN DE DISLIPIDEMIAS Y  
ESTRÉS OXIDANTE EN UN MODELO MURINO”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORADO EN  
CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA EN RED

**PRESENTA:**

**DOMÍNGUEZ AVILA JESÚS ABRAHAM**

**DIRECTORES DE TESIS:**

**DRA. MARÍA DEL CONSUELO GÓMEZ GARCÍA**

**DR. IGNACIO EDUARDO MALDONADO MENDOZA**



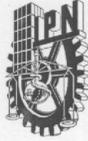
MÉXICO D.F. A 5 DE AGOSTO DE 2014

**COMITÉ TUTORIAL**

**DRA. LAURA ALEJANDRA DE LA ROSA CARRILLO**

**DR. DAVID GUILLERMO PÉREZ ISHIWARA**

**DRA. NURY PÉREZ HERNÁNDEZ**



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

*ACTA DE REVISIÓN DE TESIS*

En la Ciudad de México D. F. siendo las 12:00 horas del día 5 del mes de Junio del 2014 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la ENMH para examinar la tesis titulada:  
Caracterización química y efecto del aceite de la nuez *Carya illinoensis* para la prevención de dislipidemias y estrés oxidante en un modelo murino

Presentada por el alumno:

Domínguez Avila Jesús Abraham  
Apellido paterno Apellido materno Nombre(s)  
Con registro: 

B	1	0	2	4	0	2
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Doctorado en Ciencias en Biotecnología en Red

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

**LA COMISIÓN REVISORA**

Directores de tesis

Dra. María del Consuelo Gómez García

Dr. Ignacio Eduardo Maldonado Mendoza

Dra. Laura Alejandra de la Rosa Carrillo

Dr. David Guillermo Pérez Ishiwara

Dra. Nury Pérez Hernández

**PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES**

Dr. César Augusto Sánchez Reyes López  
SECRETARÍA DE  
ESTADOS UNIDOS MEXICANOS  
PÚBLICA  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA  
Y HOMEOPATIA  
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
E INVESTIGACION



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de México, D.F. el día 5 del mes de Junio del año 2014, el que suscribe Jesús Abraham Domínguez Avila alumno del Programa de Doctorado en Ciencias en Biotecnología en Red, con número de registro B102402, adscrito a la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, manifiesto que es el autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. María del Consuelo Gómez García y el Dr. Ignacio Eduardo Maldonado Mendoza y cede los derechos del trabajo titulado *CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y EFECTO DEL ACEITE DE LA NUEZ *Carya illinoensis* PARA LA PREVENCIÓN DE DISLIPIDEMIAS Y ESTRÉS OXIDANTE EN UN MODELO MURINO*, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones [abrahamdominguez9@yahoo.com](mailto:abrahamdominguez9@yahoo.com), [consuelogg22@yahoo.com.mx](mailto:consuelogg22@yahoo.com.mx). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Jesús Abraham Domínguez Avila

**Durante el desarrollo de esta tesis se contó con el apoyo de beca CONACYT (301905), así como beca PIFI del IPN como parte de los proyectos 20113658, 20120468, 20131836 y 20140313. También se contó con financiamiento de CONACYT a través del proyecto CB 2011-01-167164 y CONACYT Salud 114028. Los experimentos descritos se realizaron en el Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, en el Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa y en el Laboratorio I de Biomedicina Molecular de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del Instituto Politécnico Nacional. También se trabajó en colaboración con el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. Unidad Cuauhtémoc y Unidad Hermosillo.**

## RESUMEN

La nuez pecana (*Carya illinoensis*) es una especie endémica del Norte del país en donde es cultivada con fines comerciales principalmente en el estado de Chihuahua. La porción comestible de la nuez está compuesta en su mayoría por aceite, pero la composición del aceite se ve afectada por factores como la localización geográfica y otras más, y que en conjunto hacen que la concentración de fitoquímicos presente variaciones. Entre los fitoquímicos en el aceite de la nuez se encuentran ácidos grasos mono y poliinsaturados, fitoesteroles, vitamina E y polifenoles, los cuales se consideran compuestos bioactivos con capacidad de ejercer diversos efectos sobre la salud. Entre estos efectos destacan la disminución de colesterol sérico y la prevención del estrés oxidante. De acuerdo a esto se caracterizó el aceite nueces cultivadas en tres diferentes regiones del estado de Chihuahua (Ricardo Flores Magón, Delicias y Jiménez). Se encontró que la composición de ácidos grasos presenta diferencias estadísticas entre región, al igual que los fitoesteroles y tocoferoles; mientras que no hubo diferencia entre los compuestos polifenólicos. La capacidad antioxidante también se vio afectada y la estabilidad oxidativa se relaciona con la presencia de ácidos grasos insaturados.

Se evaluó también la actividad biológica del aceite de la nuez, polifenoles de nuez y la nuez completa en ratas que consumieron dietas altas en grasa por un periodo de nueve semanas. Se encontró que la nuez completa disminuyó la concentración de lípidos séricos (principalmente LDL), lo cual fue probablemente mediado por el aumento en la expresión del mRNA de la apolipoproteína B y el receptor de LDL en el hígado. La nuez completa también previno la hiperleptinemia, estimuló el sistema antioxidante endógeno en el hígado y redujo la peroxidación lipídica en ese mismo órgano. Los polifenoles de la nuez impidieron que los lípidos séricos se elevaran. También ejercieron una protección al tejido hepático y cardíaco al estimular al sistema antioxidante endógeno y disminuir la peroxidación lipídica. El aceite de la nuez disminuyó la concentración de triacilglicerolos séricos. Los mayores efectos se presentaron cuando la nuez se administró completa.

## **ABSTRACT**

Pecan nuts (*Carya illinoensis*) are an important crop endemic to the north of Mexico where it is cultivated mainly in the state of Chihuahua. The edible portion of the nut is mostly oil, but the composition of the oil is affected by factors such as geographic location and others which will produce variations in the phytochemical compounds present therein. The phytochemicals in pecan oil are mono and polyunsaturated fatty acids, phytosterols, vitamin E and polyphenols, all of which are considered bioactive because they are able to exert a number of effects on the health of the organism that consumes them. Some of those effects are a reduction in serum cholesterol and preventing oxidative stress. Because of this we characterized the oil extracted from pecans cultivated in three different regions of the state of Chihuahua (Ricardo Flores Magón, Delicias and Jiménez). We found that the fatty acid composition was different within growing location as were phytosterols and tocopherols. There was no difference in the concentration of polyphenolic compounds. Antioxidant capacity was affected, the oxidative stability was related to the presence of unsaturated fatty acids.

Pecan oil, pecan polyphenols and whole pecan bioactivity was also analyzed in rats that were fed high fat diets during a nine week period. It was found that whole pecan lowered serum cholesterol (mainly LDL), which was probably mediated through an increase in the mRNA expression of apolipoprotein B and the LDL receptor in the liver. The endogenous antioxidant system was stimulated by the whole pecan while also decreasing lipid peroxidation and preventing hyperleptinemia. Pecan polyphenols prevented an increase in serum lipids. Pecan polyphenols also were also hepatoprotective and cardioprotective by producing an increase in the endogenous antioxidant system and preventing lipid peroxidation. Pecan oil decreased serum triacylglycerol concentration. The strongest effects were seen when pecan was administered whole.

## ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN.....	9
1.1 Nueces y sus compuestos bioactivos.....	9
1.1.1 Ácidos grasos.....	11
1.1.2 Fitoesteroles.....	11
1.1.3 Tocoferoles y tocotrienoles.....	12
1.1.4 Polifenoles.....	13
1.2 Alimentación y obesidad.....	14
1.3 Dislipidemia .....	15
1.4 Estrés oxidante.....	18
2 JUSTIFICACIÓN .....	21
3 HIPÓTESIS .....	22
4 OBJETIVO GENERAL.....	23
5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
6 MATERIALES Y MÉTODOS .....	24
6.1 Caracterización química.....	24
6.1.1 Muestras de nueces .....	24
6.1.2 Ácidos grasos.....	24
6.1.3 Fitoesteroles.....	25
6.1.4 Tocoferoles.....	25
6.1.5 Cuantificación de polifenoles totales .....	26
6.1.6 Capacidad antioxidante.....	27
6.1.7 Estabilidad oxidativa.....	28
6.1.8 Extracción de polifenoles .....	29
6.2 Actividad biológica.....	29
6.2.1 Animales y dietas .....	29
6.2.2 Bioquímica sanguínea y eutanasia.....	31
6.2.3 Lípidos corporales y hepáticos .....	33

6.2.4	Expresión relativa de mRNA de genes de metabolismo de lípidos y respuesta antioxidante .....	33
6.2.5	Actividad enzimática y peroxidación lipídica.....	35
6.2.6	Análisis estadístico.....	39
7	RESULTADOS .....	40
7.1	Caracterización química.....	40
7.1.1	Ácidos grasos.....	40
7.1.2	Fitoesteroles.....	41
7.1.3	Tocoferoles.....	41
7.1.4	Polifenoles totales y capacidad antioxidante.....	42
7.1.5	Estabilidad oxidativa.....	43
7.2	Actividad biológica.....	43
7.2.1	Alimento, energía y lípidos corporales totales y hepáticos.....	43
7.2.2	Bioquímica sanguínea.....	44
7.2.3	Expresión relativa de mRNA de genes de metabolismo de lípidos y respuesta antioxidante .....	46
7.2.4	Actividad enzimática y peroxidación lipídica.....	49
8	DISCUSIÓN .....	53
8.1	Caracterización del aceite .....	53
8.2	Actividad biológica.....	59
9	CONCLUSIÓN .....	69
10	ANEXOS .....	70
11	BIBLIOGRAFÍA .....	76

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 Nueces y sus compuestos bioactivos

Los compuestos energéticos y no energéticos obtenidos a partir de la dieta tienen un papel importante sobre la salud y bienestar del organismo que los consume, ya sea positivo o negativo. Existe por lo tanto la rama de los alimentos funcionales, la cual tiene como objetivo utilizar a los alimentos no solamente para saciar el hambre y proporcionar energía metabólica, sino que promuevan un estado de salud, prevengan la aparición de algunas enfermedades y mejoren la calidad de vida (Roberfroid, 2000). Entre los posibles alimentos funcionales se encuentran las nueces, las cuales son alimentos que aportan una gran variedad de compuestos a la dieta del ser humano, incluso a algunas de ellas se les ha atribuido un efecto benéfico sobre la salud (St-Onge, 2005). Se ha establecido de manera clara la relación entre el consumo de frutas y vegetales con una disminución en el riesgo de padecer diversas enfermedades (Maynard, Gunnell, Emmett, Frankel, & Davey Smith, 2003), sin embargo el consumo de nueces no han sido resaltado sino hasta épocas más recientes en países como Estados Unidos, Canadá y España en donde se han establecido guías de alimentación que incluyen nueces. Más aún la FDA (del inglés *Food and Drug Administration*) de Estados Unidos permite a fabricantes de alimentos etiquetar en ciertos productos que el consumo diario de una onza (28.3 gr) de nuez es capaz de reducir el riesgo de enfermedades cardíacas en la población general (FDA, 2003).

El consumo de diversos tipos de nueces parece estar relacionado con una disminución en el riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 (Casas-Agustench *et al.*, 2009; Kris-Etherton, Hu, Ros, & Sabate, 2008) y enfermedades cardiovasculares (Cortes *et al.*, 2006) posiblemente debido a su capacidad de impactar sobre el estado oxidante de las células y modificar vías inflamatorias, las cuales pueden ser consideradas como un factor clave para el desarrollo de estos padecimientos (Jiang *et al.*, 2006). El efecto de las nueces también puede ser agudo, ya que su consumo en seres humanos tiene un efecto inmediato después de su ingesta cuando se administra una

comida en donde el 75 % de las calorías provienen de nueces, observándose un aumento en la concentración sérica de polifenoles y una disminución en la peroxidación lipídica plasmática (Torabian, Haddad, Rajaram, Banta, & Sabate, 2009).

La nuez *C. illinoensis* es conocida como nuez pecan o pecanera, pertenece a la familia *Juglandaceae* y es nativa del Sur de los Estados Unidos y Norte de México (Prado, Aragão, Fett, & Block, 2009a). Actualmente se han extendido las regiones en donde se cultiva debido a intereses comerciales, llegándose a encontrar en Australia, Sudáfrica, Israel y Sudamérica (Prado, Aragão, Fett, & Block, 2009b). El nombre de pecan proviene de *pacaan*, una palabra del idioma Indio Algonquino que se refiere a “todas las nueces que se necesita una piedra para quebrarlas” (Venkatachalam *et al.*, 2007). En nuestro país la nuez es un producto comercial de alta importancia nutritiva así como económica, en particular para el estado de Chihuahua ya que es ahí en donde se produce la mayor parte de la nuez del país. La estadística más reciente indica que en el año de 2008 se produjeron aproximadamente 79,000 toneladas en todo el país; 54,000 de las cuales fueron producto del estado de Chihuahua, lo cual se tradujo en un valor comercial de \$2,922,000,000 (SAGARPA, 2010, 2011). En la Figura 1 se presenta una imagen ilustrativa de la nuez *C. illinoensis* con y sin cáscara.



**Figura 1. La nuez *C. illinoensis* con y sin cáscara**

Dentro de los compuestos presentes en la nuez con posible actividad biológica se encuentran los ácidos grasos, fitoesteroles, vitamina E (tocoferoles y tocotrienoles) y polifenoles. Sin embargo la concentración de estas moléculas se puede afectar por diversos factores en donde crece el árbol (clima, prácticas de cultivo, características del suelo, edad del árbol, entre otras) las cuales en conjunto afectarán la calidad alimenticia de la nuez (Ronald & Ronald, 2008).

### **1.1.1 Ácidos grasos**

El contenido de lípidos de las nueces fluctúa entre aproximadamente 50 y 75 g/100 g según el tipo de nuez, siendo la mayoría lípidos monoinsaturados o MUFAs (del inglés, *Mono Unsaturated Fatty Acids*) y poliinsaturados o PUFAs (del inglés, *PolyUnsaturated Fatty Acids*). En la mayoría de los casos se suelen atribuir los efectos benéficos del consumo de nueces a los ácidos grasos insaturados ahí presentes, ya que existe abundante literatura que relaciona el consumo de MUFAs y PUFAs con una gama de efectos a la salud. Entre estos efectos se encuentran estudios que relacionan al consumo de PUFAs con una eliminación de las lipoproteínas de baja densidad o LDL (del inglés, *Low Density Lipoprotein*), a través de un proceso receptor-dependiente en el hígado, así como en la reducción en la producción de colesterol LDL entre otros (Woollett, Spady, & Dietschy, 1992).

### **1.1.2 Fitoesteroles**

La nuez *C. illinoensis* contiene esteroides y estanoles vegetales a los que se les nombra de forma colectiva como fitoesteroides. Estos son compuestos bioactivos presentes en aceites no refinados, legumbres, semillas y nueces (Awad & Fink, 2000). Se conocen aproximadamente 200 tipos de fitoesteroides, siendo el  $\beta$ -sitosterol (90 %), campesterol y estigmasterol los más abundantes (Delgado-Zamarreno, Bustamante-Rangel, Martínez-Pelarda, & Carabias-Martínez, 2009). Cabe mencionar también que aunque el colesterol es predominantemente animal, puede formar de un 1 a un 2 % de los esteroides vegetales totales, y hasta un 5 % o más en algunas plantas, especies, órganos o tejidos. A pesar de esto la cantidad de colesterol vegetal en la dieta es despreciable cuando se compara con las cantidades

ingeridas a través del consumo de productos de origen animal (Moreau, Whitaker, & Hicks, 2002). Su estructura molecular es similar a la del colesterol, es decir, la mayoría de ellos contienen un núcleo esteroideo y un grupo hidroxilo en posición  $3\beta$ , mientras que las diferencias están dadas por sustituciones en la cadena lateral en el carbono 24, dobles enlaces entre los carbonos 22 y 23 y/o saturaciones en el núcleo esteroideo (Hovenkamp *et al.*, 2008). El  $\beta$ -sitosterol difiere del colesterol solamente por la presencia de un grupo etilo en la cadena lateral, el cual está ausente en el colesterol.

Se sabe que algunos tipos de esteroides son capaces de inhibir la descomposición de aceites (Abidi, 2001), reducir la concentración sérica de LDL (Rochfort & Panozzo, 2007) y aumentar su resistencia a la oxidación (Jenkins *et al.*, 2002). Los esteroides y estanoles vegetales son capaces de disminuir la absorción intestinal de colesterol desplazándolo de las micelas intestinales y reduciendo su migración transluminal, mecanismo por el cual se puede producir un efecto de hipocolesterolemia (Devaraj & Jialal, 2006). Se ha mencionado también que los fitoesteroides presentan una ventaja frente a los fármacos reductores de colesterol debido a que carecen de toxicidad para el hombre (De Graaf *et al.*, 2002). Se ha reportado que un consumo diario de 2 a 3 g de fitoesteroides es capaz de disminuir el colesterol LDL de un 7 a un 11 % en seres humanos, mientras que un consumo elevado de 8.6 g/día no representa un riesgo a la salud al no haber evidencia de toxicidad, genotoxicidad o teratogenicidad (Lugasi, 2009). Debido a esto en la Unión Europea se permite que los alimentos enriquecidos con fitoesteroides muestren en su empaque la leyenda “se ha demostrado que los esteroides/estanoles vegetales bajan/disminuyen colesterol sanguíneo. La disminución de colesterol sanguíneo puede reducir el riesgo de enfermedades coronarias” (Jean-Louis Bresson, 2008).

### **1.1.3 Tocoferoles y tocotrienoles**

La vitamina E es esencial para la dieta humana y de mamíferos; ésta se compone por el conjunto de 4 isómeros de tocoferoles ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  tocoferoles) y 4 isómeros de

tocotrienoles ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  tocotrienoles) (Atkinson, Epan, & Epan, 2008; Halliwell, Rafter, & Jenner, 2005). La estructura molecular de los tocoferoles consiste de un núcleo cromanol y una cola de 15 carbonos, por lo que tienen carácter lipídico. Su síntesis está limitada a organismos fotosintéticos, es decir, plantas, algas y la mayoría de las cianobacterias (Maeda & DellaPenna, 2007). Ya que como el  $\alpha$ -tocoferol es el más abundante en plasma y en tejidos es la molécula que ha sido más investigada tanto *in vivo* como *in vitro* (Dietrich *et al.*, 2006). Resulta importante aclarar que el  $\alpha$ -tocoferol no es necesariamente el compuesto con mayor actividad, ya que algunos estudios reportan efectos debidos a la vitamina E cuando ésta es adquirida de alimentos y no de suplementos alimenticios ya que estos generalmente contienen sólo  $\alpha$ -tocoferol; por lo tanto sus efectos pueden deberse a otro isómero del tocoferol, o bien a una sinergia entre ellos (Morris *et al.*, 2005).

Existe una abundante literatura acerca de la vitamina E en donde para el año de 2006 solamente existían alrededor de 200 artículos indexados en PubMed que describían específicamente a los tocotrienoles (Sen, Khanna, & Roy, 2006), por lo tanto estos han sido menos estudiados en comparación con los tocoferoles. Entre la evidencia reportada se menciona que los tocotrienoles son capaces de inhibir a la HMG-CoA reductasa, la cual regula la síntesis de colesterol (Pearce, Parker, Deason, Qureshi, & Wright, 1992). Sin embargo la actividad predominante de estas moléculas son las de tipo antioxidante; función que desempeña a través de su capacidad de reducir radicales libres, y ya que los tocotrienoles son de carácter lipídico, estos se incorporan en las membranas biológicas protegiendo a los lípidos insaturados de oxidación (Rimbach *et al.*, 2002).

#### **1.1.4 Polifenoles**

La estructura general de los polifenoles se caracteriza por tener un anillo aromático y uno o más sustituyentes hidroxilo, aunque pueden ir desde estructuras simples hasta compuestos altamente polimerizados (Balasundram, Sundram, & Samman, 2006). Se ha reportado un contenido importante en alimentos de origen vegetal como la

manzana, cebolla y té verde, así como en el vino tinto (Manach, Scalbert, Morand, Remesy, & Jimenez, 2004). En las nueces se pueden encontrar polifenoles en la fracción lipídica o aceite, sin embargo la mayor concentración de éstos se presenta en la fracción no lipídica. Su principal y más estudiada función es la antioxidante, aunque se han reportado también una amplia gama de efectos sobre los organismos que los consumen, por ejemplo producen saciedad (Molan, Lila, & Mawson, 2008), estimulan genes de excreción de colesterol (Farras *et al.*, 2013) y ejercen efectos sobre la homeostasis de glucosa (de Bock, Derraik, & Cutfield, 2012). Debido a estos efectos se les han atribuido a los polifenoles habilidades como la protección frente a enfermedades coronarias (Reiterer, Toborek, & Hennig, 2004). Las nueces y almendras pueden ser fuentes de polifenoles para el humano, ya que su consumo en una comida es capaz de elevar la concentración de polifenoles en circulación y por lo tanto elevar la capacidad antioxidante del plasma y reducir su peroxidación lipídica (Torabian *et al.*, 2009).

## **1.2 Alimentación y obesidad**

Actualmente uno de los problemas de salud más prominentes a nivel nacional y mundial es la obesidad. Este fenómeno está ligado a diversos factores como son el consumo de alimentos calóricamente densos, bajos en fibra y altos en azúcares, esto combinado con un estilo de vida de baja actividad física o sedentario (Doak, Visscher, Renders, & Seidell, 2006). La OMS ha estimado que el para el año de 2005 habían 1,600 millones de personas en el mundo mayores de 15 años con sobrepeso y por lo menos 400 millones de ellos son obesos, estas cifras indican que la obesidad es una epidemia a nivel mundial (Low, Chin, & Deurenberg-Yap, 2009). La obesidad se define por presentar un índice de masa corporal (IMC)  $\geq 30 \text{ kg/m}^2$  (Ogden *et al.*, 2006), aunque otros investigadores consideran a un individuo como obeso cuando presenta un IMC  $\geq 25 \text{ kg/m}^2$  (Saito *et al.*, 2010). En los Estados Unidos se ha demostrado que en los últimos 30 años la obesidad se ha convertido en un problema de salud pública, en donde se reporta que más de 2 terceras partes de los adultos y aproximadamente una tercera parte de los niños y adolescentes

padecen de sobrepeso u obesidad, atribuyéndose como ya se mencionó anteriormente a una ingesta calórica excesiva combinada con una baja actividad física (Y. Wang & Beydoun, 2007). La esperanza de vida del ser humano ha ido aumentando de forma gradual en los últimos 1,000 años, aunque se estima que en los Estados Unidos este aumento se verá interrumpido a causa de la obesidad, mientras que puede revertirse si la población en general es capaz de disminuir su IMC a 24 kg/m<sup>2</sup> o menos, con lo cual pudiera alcanzarse una esperanza de vida de 100 años para el 2060 en éste y en otros países desarrollados (Olshansky *et al.*, 2005). En nuestro país no estamos ajenos a este problema, y de hecho se observa un fenómeno que Rivera *et al.* (2002) nombran polarización, en donde se distingue que los estados más desarrollados e industrializados en el Norte presentan un comportamiento epidemiológico similar a países industrializados, mientras que los estados menos desarrollados localizados en el Sur presentan perfiles que reflejan más un periodo de pre-transición epidemiológica.

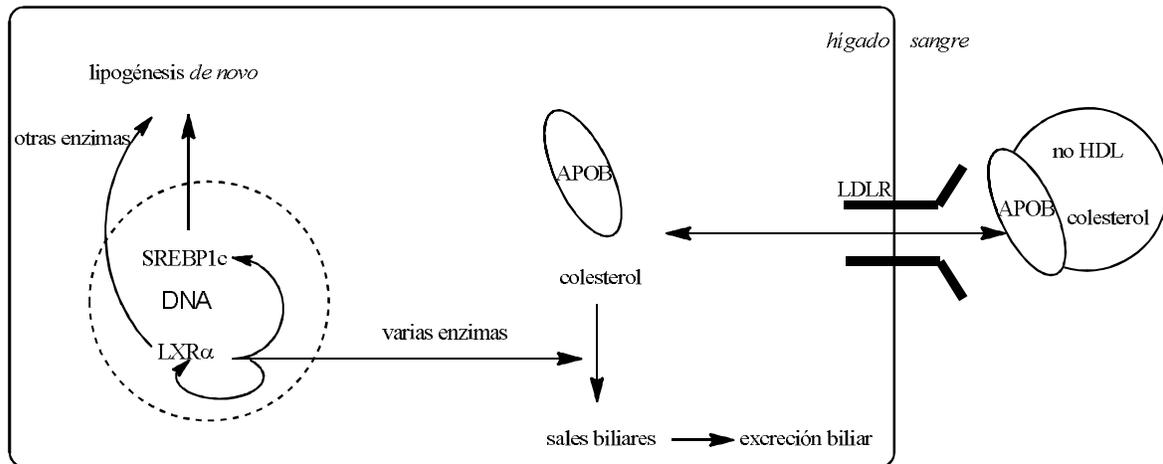
En general se considera que una dieta rica en grasas contribuye al desarrollo de obesidad. En un estudio epidemiológico se demuestra que el consumo de grasas saturadas se correlaciona con una alta concentración de insulina en el ayuno, lo cual se considera un marcador de resistencia a la insulina, hiperlipidemia y otros (Marshall, Bessesen, & Hamman, 1997). A pesar de esto no todos los lípidos contribuyen al desarrollo de obesidad; por ejemplo la ingesta de aceite de pescado y de aceite vegetal de *Argania spinosa* (los cuales son ricos en ácidos grasos mono y poliinsaturados) son capaces de ejercer un efecto benéfico sobre el metabolismo de ratas sometidas a una dieta rica en grasas y sacarosa, normalizando la respuesta a la insulina y disminuyendo la concentración de glucosa sérica, entre otros efectos (Samane *et al.*, 2009).

### **1.3 Dislipidemia**

Algunos de los efectos del alto consumo de lípidos son el incremento en la concentración sérica de colesterol total (hipercolesterolemia), colesterol LDL y triacilglicérols (hipertriacilglicérols), así como una disminución en la

concentración de HDL, lo cual se conoce en conjunto como dislipidemia. La síntesis de las lipoproteínas involucradas en la dislipidemia involucra varias proteínas y factores de transcripción de origen hepático, por lo tanto resulta importante describir aquellos que pueden ser blancos importantes para disminuir o prevenir el desarrollo de la dislipidemia.

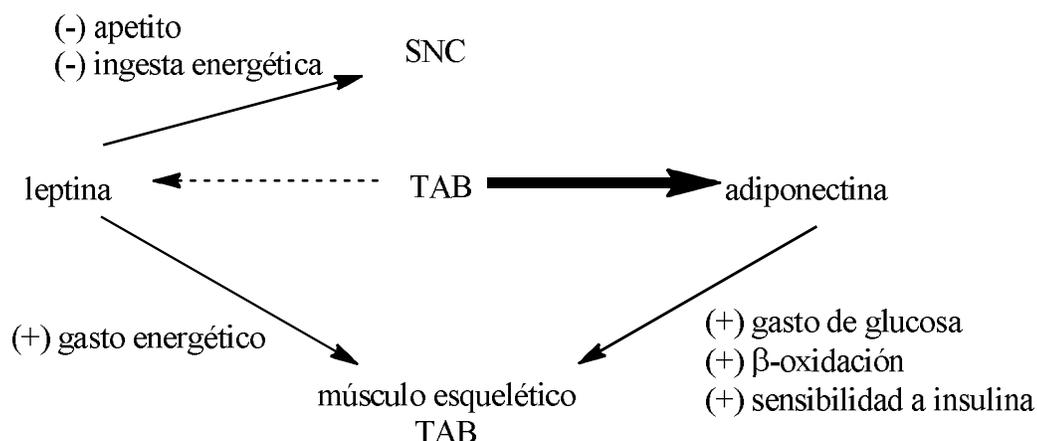
Las lipoproteínas de colesterol no HDL contienen en su estructura una copia de la apolipoproteína B como principal componente estructural (Sundaram & Yao, 2010). La secreción y catabolismo de estas partículas, y por lo tanto su concentración en circulación, se regula por diversas proteínas como el receptor de LDL (LDLR). El LDLR hepático regula el ensamblaje de la partícula de LDL antes de ser excretada, además de reconocer a las partículas que contienen APOB ya en circulación para internalizarlas y eliminarlas. Al haber mutaciones en este gen se presenta hipercolesterolemia familiar, la cual se caracteriza por una concentración elevada de partículas que contienen APOB (Twisk *et al.*, 2000). En conjunto con el LDLR el receptor X del hígado alfa ( $LXR\alpha$ , del inglés *Liver X Receptor  $\alpha$* ) es un factor de transcripción que se encarga de favorecer el transporte reverso de colesterol y la síntesis de sales biliares, contribuyendo así a la excreción de colesterol. Esta actividad se realiza al dimerizarse con el receptor X de retinoides (RXR, del inglés *Retinoid X Receptor*) y estimular la transcripción de los genes apropiados para estos procesos (Zhao & Dahlman-Wright, 2010). La proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides 1c (SREBP1c, del inglés *Steroid Regulatory Element Binding Protein 1c*) es un factor de transcripción que estimula la síntesis *de novo* de ácidos grasos en respuesta a insulina. Éste es regulado por el  $LXR\alpha$  y por lo tanto se ve también involucrado en la síntesis de lipoproteínas hepáticas (Cagen *et al.*, 2005). La Figura 2 muestra una relación simplificada entre las proteínas mencionadas.



**Figura 2. Relación simplificada de los factores de transcripción y proteínas hepáticas que regulan la concentración de lipoproteínas y colesterol en sangre. El receptor de LDL (LDLR) regula la secreción e internalización de las partículas que contienen apolipoproteína B (APOB). La excreción de colesterol por vía biliar es favorecida por el receptor X del hígado  $\alpha$  (LXR $\alpha$ ); éste a su vez estimula su propia transcripción, la de la proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides 1c (SREBP1c) y a otras enzimas que pueden llevar a cabo lipogénesis *de novo*.**

En conjunto estas proteínas de origen hepático regulan directamente la síntesis, secreción y catabolismo de las partículas circulantes de colesterol no HDL, sin embargo se encuentran también hormonas que se ven involucradas de manera indirecta sobre estos procesos. La adiponectina es una hormona peptídica secretada por el tejido adiposo blanco (TAB) y cuya concentración en sangre es inversamente proporcional a la masa de este tejido. Entre sus funciones se encuentra que favorece la sensibilidad a la insulina en tejidos periféricos y es por lo tanto considerada una hormona antidiabética (Kadowaki *et al.*, 2006). La leptina es otra hormona peptídica secretada por el TAB. Ésta inhibe el apetito e ingesta energética a nivel de sistema nervioso central, además de favorecer el gasto de energía en los tejidos periféricos (Sweeney, 2002). La concentración de leptina es proporcional a la adiposidad del organismo, por lo tanto al presentarse obesidad se incrementará su concentración

(hiperleptinemia) y a su vez se disminuirá la concentración de adiponectina (hipoadiponectinemia). Ambas hormonas y la proporción entre ellas se consideran marcadores importantes de obesidad. En la Figura 3 se esquematiza la acción de ambas hormonas.



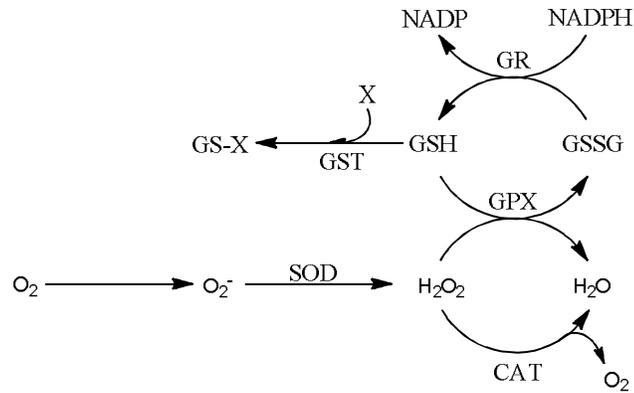
**Figura 3. El tejido adiposo blanco (TAB) secreta leptina y adiponectina. La leptina inhibe el apetito e ingesta calórica desde el sistema nervioso central (SNC), mientras que favorece su gasto en tejidos periféricos. La adiponectina favorece el gasto de glucosa y ácidos grasos (por β-oxidación) en los tejidos periféricos, favoreciendo así la sensibilidad a la insulina. En un organismo no obeso se secreta adiponectina en mayor proporción que leptina, esto se invierte cuando existe obesidad. Figura modificada de (Ukkola & Santaniemi, 2002) y de (Wolf, 2012).**

#### 1.4 Estrés oxidante

El estrés oxidante es una condición que también ha sido ligado a la obesidad (Okada *et al.*, 2010) y que puede ocurrir de forma paralela a ésta. Éste se refiere a la generación de pequeñas moléculas conocidas en forma general como especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*) como son el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radicales hidroxilo ( $OH\cdot$ ), radicales alcoxilo ( $RO\cdot$ ) y peroxiradicales ( $ROO\cdot$ ) (Bouayed & Bohn, 2010; Halliwell, 1992); también se han documentado especies reactivas de nitrógeno (RNS, del inglés

*reactive nitrogen species*). La producción de estas moléculas ocurre de manera normal dentro de la célula, principalmente en las mitocondrias debido al metabolismo celular aerobio que ahí ocurre (Apel & Hirt, 2004) y tiene repercusiones sobre el estado redox de la célula (Murphy, 2009). Se pueden producir también por efecto del metabolismo de células del sistema inmunológico, ejercicio, radiación ionizante, consumo de etanol, entre otros. Se ha reportado que el estrés oxidante se correlaciona con el IMC y la circunferencia abdominal en seres humanos y con la obesidad en ratones (Furukawa *et al.*, 2004), así como con aterosclerosis, hipertensión y diabetes mellitus tipo II (Okada *et al.*, 2010).

Ya que la generación de moléculas oxidantes ocurre aún en condiciones de salud a partir de la mitocondria, la célula cuenta con mecanismos de defensa tanto enzimáticos, como no enzimáticos que le permiten mantener la concentración de estos compuestos dentro de un rango tolerable. Dentro de los sistemas no enzimáticos se encuentran moléculas de origen endógeno como el glutatión, así como moléculas de origen exógeno como las vitaminas C y E, carotenoides y polifenoles (Bouayed & Bohn, 2010; van Duynhoven *et al.*, 2010). Dentro del sistema enzimático se encuentran la catalasa (CAT; E.C. 1.11.1.6), superóxido dismutasa (SOD; E.C. 1.15.1.1), glutatión peroxidasa (GPX; E.C. 1.11.1.9) y glutatión tiotransferasa (GST; E.C. 2.5.1.18) entre otras. La SOD se encarga de dismutar al anión superóxido para transformarlo en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el cual es convertido a agua y oxígeno molecular por la acción de la CAT, o bien la GPX lo convierte igualmente en agua consumiendo glutatión reducido (GSH) y convirtiendo a este último en glutatión oxidado (GSSG), el cual es reducido nuevamente por medio de la glutatión reductasa (Turkseven *et al.*, 2005). La GST consta de una superfamilia ( $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\omega$ ,  $\pi$ ,  $\theta$ , y  $\zeta$ ) de enzimas consideradas parte del metabolismo de fase II; ésta añade una molécula de GSH a compuestos electrofílicos potencialmente tóxicos (algunos de ellos productos del estrés oxidante), para así transformarlos en conjugados xenobiótico-glutatión y así excretarlos con mayor facilidad (Burmeister *et al.*, 2008; Townsend & Tew, 2003). En la Figura 4 se presenta un esquema simplificado del sistema antioxidante endógeno.



**Figura 4. Esquema de la acci6n de las enzimas antioxidantes. SOD: super6xido dismutasa; CAT: catalasa; GPX: glutati6n peroxidasa; GSH: glutati6n reducido; GSSG: glutati6n oxidado; GR: glutati6n reductasa; GST: glutati6n tiotransferasa; X: xenobi6tico.**

Uno de los mecanismos a trav6s de los cuales se puede regular la expresi6n y actividad del sistema antioxidante es el factor de transcripci6n Nrf2. 6ste se encarga de mediar la respuesta antioxidante y de supervivencia celular en respuesta a diferentes tipos de estr6s como son las ROS y algunos otros (Kensler, Wakabayashi, & Biswal, 2007). Al haber mol6culas oxidantes en la c6lula el factor Nrf2 se transloca al n6cleo en donde estimula la expresi6n de varias enzimas antioxidantes como las anteriormente mencionadas, por lo tanto suele ser de inter6s cuando se valora el estado antioxidante de la c6lula. Cabe mencionar tambi6n que Nrf2 no act6a 6nicamente sobre respuesta antioxidante sino sobre otras v6as de se6alizacion con efectos diversos.

## 2 JUSTIFICACIÓN

La obesidad es un problema de salud nacional y mundial, la cual se desarrolla en parte por un consumo excesivo de alimentos ricos en lípidos, bajos en fibra y en compuestos fitoquímicos. Al haber obesidad se suele presentar también dislipidemia y estrés oxidante, las cuales se caracterizan por un incremento en la concentración de lípidos séricos y moléculas oxidantes. Las nueces son alimentos funcionales que se distinguen por un alto contenido de aceite cuya composición está sujeta a las características en donde se cultiva el árbol. El consumo de nueces ha sido ligado a la prevención o reducción de la dislipidemia y el estrés oxidante. Además de los lípidos de la nuez también se encuentran fitoquímicos en la fracción no lipídica (principalmente polifenoles) con potencial bioactivo, sin embargo no existe información acerca del efecto del consumo del aceite y los polifenoles por separado. Por lo tanto en el presente estudio se caracterizará la composición de fitoquímicos presentes en el aceite de la nuez *C. illinoensis* cultivada en tres diferentes regiones del estado de Chihuahua y se determinará qué fracción de la nuez es la que tiene la mayor actividad biológica sobre parámetros de dislipidemia y estrés oxidante, o bien si sus efectos son evidentes únicamente cuando se ingiere la nuez completa. En la literatura se encuentran artículos que reportan estudios de intervención y de tipo epidemiológicos, aunque pocos utilizan a la nuez *C. illinoensis*, la mayor parte se centran sobre otros tipos de nueces como almendras, avellanas y otras. Tampoco se ha descrito claramente cuáles son los mecanismos bioquímicos a través de los cuales se producen estos efectos.

### **3 HIPÓTESIS**

La nuez *C. illinoensis* contiene compuestos en su aceite y en su fracción no lipídica que pueden mitigar la dislipidemia y el estrés oxidante producido por una dieta alta en grasa en un modelo animal.

#### **4 OBJETIVO GENERAL**

Identificar y cuantificar los fitoquímicos presentes en el aceite de nuez *C. illinoensis* y valorar su contribución en la dislipidemia y el estrés oxidante en ratas sometidas a dietas altas en grasa .

#### **5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

5.1 Cuantificar los fitoquímicos (ácidos grasos, fitoesteroles, tocoferoles y polifenoles totales) presentes en el aceite de la nuez *C. illinoensis* obtenida de tres diferentes regiones del estado de Chihuahua, así como la capacidad antioxidante de los mismos.

5.2 Evaluar marcadores de dislipidemia y estrés oxidante en ratas sometidas a una dieta alta en grasa con y sin la adición de diferentes fracciones de la nuez *C. illinoensis*.

5.3 Evaluar la modulación de la expresión génica hepática ejercida por la nuez *C. illinoensis*, así como fracciones de la misma, en ratas sometidas a dietas altas en grasa.

## **6 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 Caracterización química**

#### **6.1.1 Muestras de nueces**

Las muestras fueron donadas por productores de tres diferentes ciudades del estado de Chihuahua: Ricardo Flores Magón en el Norte (muestra N), Delicias en el Centro (muestra C) y Jiménez en el Sur (muestra S), todas de variedad Western aún con cáscara. Se almacenaron a 4 °C hasta su uso. Para la extracción del aceite se removió la cáscara de las muestras de forma manual hasta obtener 25 g de nuez, esta cantidad se mezcló con 250 mL de hexano (relación 1:10 p/v) y se homogenizó en una licuadora comercial durante 3 min. Las nueces molidas se filtraron y se repitió el proceso de extracción por triplicado juntando el aceite después de cada extracción. La materia sólida fue guardada al vacío a -20 °C para realizar una posterior extracción de polifenoles. La fracción lipídica fue rotoevaporada a 50 °C hasta eliminar el hexano. El aceite libre de hexano fue secado con sulfato de sodio y filtrado para eliminar restos de agua contaminante. Por último se guardaron las muestras en contenedores ámbar bajo una atmósfera inerte de nitrógeno y se almacenaron a -20 °C hasta que fueron procesadas (L. A. de la Rosa, Alvarez-Parrilla, & Shahidi, 2011).

#### **6.1.2 Ácidos grasos**

El perfil de ésteres de metilo de ácidos grasos o FAMES (del inglés *fatty acid methyl esters*) del aceite de la nuez se determinó por cromatografía de gases masas (Villarreal-Lozoya, Lombardini, & Cisneros-Zevallos, 2007) realizando inicialmente una derivatización de los ácidos grasos (Misir, Laarveld, & Blair, 1985). Se diluyeron 200 µL de aceite en 3 mL de dietil éter y 200 µL de hidróxido de tetrametil amonio al 25 % en agua y se dejó reaccionar por 5 min, después se añadieron 500 µL de metanol y se mezcló en vórtex por 1 min. Luego de la separación de fases se tomó una alícuota de la fase orgánica superior y se diluyó 1:100 en hexano para su posterior inyección al cromatógrafo de gases. El volumen de inyección fue de 1 µL. El equipo utilizado fue un cromatógrafo de gases Saturn 2100D acoplado a un

detector de masas, la columna fue Varian CP Select FAME (100 m x 0.25 mm). La temperatura del horno se estableció a 185 °C de 0 a 30 min, con una temperatura del inyector de 250 °C. Se utilizó helio como gas acarreador con un flujo de 1.0 mL/min. La identificación y cuantificación de FAMEs se realizó comparando los tiempos de retención y pesos moleculares de la muestra con los de los estándares apropiados (Supelco GLC-10 FAME Mix).

### **6.1.3 Fitoesteroles**

Estos compuestos se determinaron basándose en la metodología propuesta por Toivo (Toivo, Phillips, Lampi, & Piironen, 2001). Se adicionaron 500 µL de HCl-etanol 6 M a 100 mg de aceite de nuez para después colocar la mezcla en baño de agua durante 60 min a 80 °C. Posteriormente se enfriaron y se añadieron 5 mL de KOH 1.3 % en etanol, luego se colocaron en baño de agua a la misma temperatura durante 30 min. Las muestras se enfriaron y se les adicionaron 2 mL de agua y 5 mL de hexano para extraer la fase orgánica, realizando este procedimiento por duplicado. Los extractos se mezclaron, se concentraron por rotoevaporación a 40 °C y se reconstituyeron en 0.5 mL de hexano para su análisis por cromatografía de gases. El volumen de inyección fue de 1 µL. La temperatura del inyector fue 280 °C, el gradiente de temperatura de la columna se programó a 75 °C por 1 min incrementando 30 °C/min hasta llegar a 275 °C, manteniéndose 25 min a esta temperatura. Se compararon las muestras contra los estándares apropiados de cada fitoesterol para identificarlos y con las curvas de calibración para cuantificarlos.

### **6.1.4 Tocoferoles**

La concentración de tocoferoles se determinó de acuerdo a la metodología propuesta por Rodas (Rodas Mendoza, Morera Pons, Castellote Bargallo, & Lopez-Sabater, 2003) y modificada por Villarreal (Villarreal-Lozoya *et al.*, 2007). Se pesaron 0.5 g de aceite y se les añadieron 2 mL de metanol, la mezcla se agitó por vórtex durante 1 min, se agregaron 500 µL de hexano y se agitó por vórtex nuevamente durante 1 min. Se centrifugó brevemente para separar la mezcla en dos fases y se tomó 1 mL

de la fase superior, la cual fue filtrada utilizando un filtro de nylon de 0.2  $\mu$  (Fisherbrand). Una vez filtrada la muestra se inyectaron 10  $\mu$ L en un equipo de HPLC Perkin Elmer Series 200 con un detector de fluorescencia ( $\lambda_{\text{ex}}$  295 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  330 nm), la elución fue isocrática con metanol absoluto a un flujo de 1 mL/min durante 20 min utilizando una columna Phenomenex Luna C18 de 250 mm x 4.6 mm con un tamaño de partícula de 5  $\mu$ m. La identificación de los compuestos se realizó comparando con los estándares apropiados ( $\delta$ -tocoferol y  $\gamma$ -tocoferol, Sigma Aldrich), mientras que la cuantificación se hizo realizando rectas de calibración con los compuestos previamente identificados.

### **6.1.5 Cuantificación de polifenoles totales**

La concentración total de polifenoles presentes en el aceite se determinó utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu (L. A. de la Rosa *et al.*, 2011). Inicialmente se hizo una extracción de los polifenoles del aceite, pesando 1.5 g del mismo y añadiendo 500  $\mu$ L de hexano y 1 mL de metanol:H<sub>2</sub>O (6:4), la mezcla se agitó en vórtex durante 2 min y se centrifugó brevemente para separar la fase orgánica y acuosa. A la fase orgánica recuperada se le repitió el mismo procedimiento por triplicado para después obtener 2 extractos distintos, uno de metanol y otro de hexano, determinándose las concentraciones de polifenoles en la fracción alcohólica. Para ello se colocaron 250  $\mu$ L de muestra, agua (blanco) y diluciones de  $6.25 \times 10^{-3}$  mg/mL hasta 0.2 mg/mL de ácido gálico (como estándares) en tubos de ensayo y se les añadió 1 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 7.5 %, se mezcló y se incubó a temperatura ambiente por 2 min, luego se agregaron 1.25 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu previamente disuelto 1:10 en agua destilada. Las reacciones se mezclaron e incubaron 15 min en baño de agua a 50 °C, luego se enfriaron 5 min a temperatura ambiente y cargaron 200  $\mu$ L de cada reacción en un pozo de microplaca para realizar una lectura a 760 nm. Con las absorbancias de los estándares se construyeron curvas de calibración con la absorbancia en el eje Y, y la concentración de ácido gálico en el eje X, las absorbancias de las muestras se convirtieron a equivalentes de ácido gálico

utilizando la ecuación de la recta. Los resultados se expresan como equivalentes de ácido gálico (GAE)/100 g de aceite.

### 6.1.6 Capacidad antioxidante

Para determinar la capacidad antioxidante de los aceites se realizó un extracto previo de forma similar al realizado para la determinación de polifenoles, sustituyendo la mezcla de metanol:H<sub>2</sub>O (6:4) por metanol absoluto. Con este extracto se realizaron las técnicas de ABTS (también conocida como TEAC, del inglés *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) y la de DPPH. La técnica de ABTS (ácido 2,2'-azinobis-[3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico]) se realizó de acuerdo con lo propuesto por Arts (Arts, Dallinga, Voss, Haenen, & Bast, 2004). Inicialmente se prepara el radical ABTS 7 mM con persulfato de potasio 2.45 mM en PBS 0.1 M pH 7.4 (en condiciones de oscuridad), los compuestos se mezclan y se dejan incubar a temperatura ambiente en oscuridad durante 16 h previo a realizar las mediciones. Transcurrido el tiempo se tomó una alícuota del radical y su absorbancia fue ajustada a 0.70 a una longitud de onda de 734 nm utilizando PBS. Para las mediciones se colocaron en una microplaca de 96 pozos: 31 µL de la muestra, de PBS (como blanco) o de trolox (ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcroman-2-carboxílico) a concentración de 25 hasta 400 µM para la curva estándar. Para iniciar la reacción se añadieron 285 µL del radical ABTS cuya absorbancia fue previamente ajustada y las absorbancias se comienzan a medir inmediatamente en el lector de microplaca a 734 nm. Se realizaron 20 lecturas cada 30 s con agitación de 5 s, transcurrido el tiempo se tomaron los valores de absorbancia a los 6 min y con ellos se calculó la capacidad antioxidante de las muestras. La absorbancia de cada muestra se convirtió en porcentaje de inhibición del radical de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = \left( \frac{\text{Abs blanco} - \text{Abs muestra}}{\text{Abs blanco}} \right) \times 100$$

Se elabora una recta de calibración con los porcentajes de inhibición de los estándares de trolox graficando este valor en el eje Y contra concentración de trolox

en el eje X, con la ecuación de la recta se convirtieron los porcentajes de inhibición de las muestras a equivalentes de trolox (TE) y los resultados se expresaron como TE/100 g de aceite. La reacción se basa en que el radical ABTS oxidado tiene una coloración azul con una  $\lambda_{\max}$  a 734 nm, cuando se agregan moléculas antioxidantes éste se reduce y pierde su coloración, por lo tanto el decremento en absorbancia a esta longitud de onda indica la capacidad antioxidante de la muestra, la reacción termina después de transcurridos 6 min.

La técnica de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) es similar a la de ABTS. Inicialmente se cargaron 25  $\mu\text{L}$  de muestra, metanol (como blanco) o trolox (para la curva estándar) en un pozo de microplaca de 96 pozos, para iniciar la reacción se agregaron 200  $\mu\text{L}$  del radical DPPH a una concentración de 190  $\mu\text{M}$  en metanol (preparado en condiciones de oscuridad). Inmediatamente después se hicieron 24 lecturas cada 30 s a 517 nm con agitación de 5 s, después de este tiempo se tomaron las absorbancias a los 10 min y con ellas se realizaron los cálculos de la misma manera que en ABTS. Los resultados se expresan como TE/100 g de aceite (Schwarz *et al.*, 2001). La reacción se fundamenta en que el radical DPPH pierde su coloración al ser reducido por un compuesto antioxidante, lo cual se puede determinar espectrofotométricamente.

### **6.1.7 Estabilidad oxidativa**

La estabilidad oxidativa de los aceites se determinó por medio de calorimetría diferencial de barrido (DSC, del inglés *differential scanning calorimetry*) utilizando un equipo Netzsch 200 PC DSC (Pereira & Das, 1990). Primero se preparó un blanco utilizando dos crisoles de aluminio vacíos con tapa perforada y se calentaron de 298 a 600 K (25 a 327 °C) a una velocidad de calentamiento (también llamada  $\beta$ ) de 20, 15, 10 y 5 K/min purgando el equipo con 20 mL/min de oxígeno. Después se pesaron 5 mg de aceite en un crisol de aluminio con tapa perforada y se calentaron bajo las mismas condiciones que el blanco y con el mismo flujo de oxígeno. La Te se determinó como la temperatura extrapolada en la cual se comienza a detectar una

reacción exotérmica debido a la liberación de calor por la oxidación térmica del aceite. La energía de activación ( $E_a$ ) se calculó de acuerdo a la metodología propuesta por Ulkowski (Ulkowski, Musialik, & Litwinienko, 2005) en donde se grafica el logaritmo natural de la velocidad de calentamiento ( $\beta$ ) contra  $1/T_e$  de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$E_a = -R \frac{\delta \ln \beta}{\delta \frac{1}{T_e}}$$

En donde:

$E_a$ : energía de activación (kJ/mol)

R: constante de los gases (8.314 J/mol K)

$\beta$ : velocidad de calentamiento

$T_e$ : temperatura extrapolada del inicio de la oxidación térmica o exoterma de oxidación

### **6.1.8 Extracción de polifenoles**

Se extrajeron polifenoles de la materia no lipídica de la nuez que se obtenía después de haber separado el aceite con hexano. Para ello se pesaron 4.5 g de materia sólida libre de lípidos y se diluyeron en 45 mL de acetona al 80 %, la mezcla se sonicó durante 30 min, se centrifugó 10 min a 1200 g y se recuperó el sobrenadante. Este proceso se repitió tres veces y los sobrenadantes fueron combinados. La acetona se eliminó por rotoevaporación a 50 °C y el remanente se congeló y liofilizó durante 48 h para eliminar el agua restante. El producto resultante fue guardado al vacío y protegido de la luz a – 80 °C para su posterior administración en la dieta de las ratas.

## **6.2 Actividad biológica**

### **6.2.1 Animales y dietas**

Una vez que se determinó la composición de fitoquímicos presentes en el aceite de la nuez se utilizaron el aceite, los polifenoles y la nuez completa para determinar su

actividad biológica en ratas. Los experimentos se realizaron siguiendo la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 para el bienestar de animales de laboratorio. Se utilizaron 30 ratas Wistar macho con un peso promedio de 148 g divididas al azar en 5 grupos experimentales (6 ratas por grupo). Se utilizaron jaulas individuales de polipropileno en un ambiente con una temperatura promedio de 23 a 26 °C y ciclos de luz oscuridad de 12 h (07:00 – 19:00). Se prepararon dietas al inicio del experimento y fueron congeladas en porciones de 120 g a -80 °C, descongelándose antes de ser proporcionadas a los animales. Los tratamientos se administraron por un periodo de 63 días (9 semanas), después de una semana inicial de aclimatación.

El primer grupo fue el control cuyo alimento contenía las proporciones adecuadas de macro y micronutrientes (Tabla I). El segundo grupo (llamado AG, alto en grasa) consumió una dieta alta en grasa, en donde la mayoría de la energía provenía de lípidos (manteca y aceite de maíz). La dieta del tercer grupo (llamado AG+AN, alto en grasa + aceite de nuez) se preparó con las mismas condiciones que la del grupo de grasa, excepto que la mitad de los lípidos provenían del aceite de la nuez, y la otra mitad de manteca y aceite de maíz. Al cuarto grupo (llamado AG+PN, alto en grasa + polifenoles de nuez) se le alimentó con una dieta alta en grasa adicionada con polifenoles extraídos de la nuez (1 mg/g de dieta), los cuales se extrajeron de la fracción soluble recuperada de la nuez. Al quinto grupo (llamado AG+NC, alto en grasa + nuez completa) se le alimentó con una dieta alta en grasa que contenía suficiente nuez para proveer el 50 % de lípidos y 1 mg/g de polifenoles (mismas cantidades que los grupos AG+AN y AG+PN respectivamente). Todas las dietas contenían concentraciones adecuadas de micronutrientes (fibra, sales, colina, etc.). Se permitió un libre acceso a alimento y agua durante el transcurso del experimento, la temperatura se mantuvo constante (22 - 25 °C) con ciclos de luz oscuridad de 12 h (7:00 am – 7:00 pm). En la Tabla I se detallan los porcentajes de cada nutriente en las dietas. La metodología está basada en la propuesta por Samane *et al.* (2009).

**Tabla I. Porcentaje energético de las dietas control y tratamientos**

Dieta	% de energía de:				fuente de lípidos (%)				
	carbohidratos	lípidos	proteína	kcal/g	aceite de maíz	manteca	aceite de nuez	polifenoles de nuez	nuez
Control	59.5	25.3	15.1	3.5	50	50			
AG	30.1	54.7	15.0	4.5	50	50			
AG+AN	30.1	54.7	15.0	4.5	25	25	50		
AG+PN	30.1	54.7	15.0	4.5	50	50		1 mg/g	
AG+NC	32.0	51.4	16.4	4.5	25	25			50

**La energía de la dieta del grupo control es mayormente de carbohidratos complejos, mientras que en las dietas restantes la mayoría de la energía proviene de lípidos, aumentándose también la densidad calórica. Además de la cantidad de lípidos, la fuente de éstos también difiere entre grupos, en particular en AG+AN y AG+NC.**

En la Tabla I se observa que en la dieta control el porcentaje de carbohidratos representa la mayor parte de las calorías ingeridas, mientras que para las demás dietas son los lípidos los que predominan. En el anexo A se detallan las cantidades exactas de cada ingrediente utilizado en la elaboración de las dietas.

Los animales fueron pesados diariamente a lo largo del experimento para monitorear su desarrollo. El alimento consumido cada día fue también registrado, lo que no fue consumido de un día al siguiente fue desechado y reemplazado por una nueva porción.

### **6.2.2 Bioquímica sanguínea y eutanasia**

Se extrajo sangre de la vena safena de la rata utilizando agujas Vacutainer® y tubos Microtainer® con gel separador de suero (Becton Dickinson) al día 0 y al final del experimento; la extracción final fue por punción cardíaca. La sangre se centrifugó a 1,000 g a temperatura ambiente durante 10 min para separar el suero, éste fue congelado a -80 °C hasta ser analizado. Las concentraciones de colesterol total (CT), HDL y triacilgliceroles (TAG) fueron determinadas mediante los kits adecuados

de la marca Stanbio (número 1010-430, 0590-040 y 2100-430 respectivamente) escalados para ser leídos en microplaca y realizando las mediciones por triplicado. Se utilizó como referencia de CT, HDL y TAG el estándar SER-T-FY I ® de la marca Stanbio (G427L-005). La concentración de colesterol no HDL se calculó como la diferencia entre el CT y la fracción HDL, el colesterol LDL se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula (Friedewald, Levy, & Fredrickson, 1972):

$$\text{LDL} = \text{CT} - \text{HDL} - (\text{TAG}/5)$$

Se determinaron también las concentraciones séricas de las hormonas insulina, adiponectina y leptina al día final del experimento por medio de kits de ELISA apropiados (insulina: CaymanChemical 589501; adiponectina: Abcam, ab108784; leptina: CaymanChemical 10007609) siguiendo las instrucciones del proveedor.

La glucosa sérica fue medida con un glucómetro comercial (OneTouch Mini™) para utilizar ese valor en la determinación de la “evaluación del modelo homeostático – resistencia a la insulina” (HOMA – IR, del inglés *homeostatic model assessment – insulin resistance*) y del “índice cuantitativo de sensibilidad a la insulina” (QUICKI, del inglés *quantitative insulin sensitivity check index*) en conjunto con los valores de insulina sérica (Muniyappa, Lee, Chen, & Quon, 2008):

$$\text{HOMA-IR} = [\text{insulina } (\mu\text{IU/mL}) \times \text{glucosa (mmol/L)}] \div 22.5$$
$$\text{QUICKI} = 1 \div (\log [\text{insulina } (\mu\text{IU/mL})] + \log [\text{glucosa (mg/dL)}])$$

Al final del experimento (día 63) los animales fueron anestesiados por inyección intramuscular de Zoletil 50 ® (50 mg/mL de zolazepam y tiletamina HCl). Una vez anestesiados se realizó una incisión torácica para la obtención de sangre por punción cardíaca, inmediatamente después se extrajeron y pesaron el hígado y el corazón. Tanto la eutanasia del animal como la extracción inicial de sangre se realizaron después de un ayuno de por lo menos 4 h.

### **6.2.3 Lípidos corporales y hepáticos**

Se extrajeron el estómago e intestinos del cadáver para eliminar interferencia de materia no digerida. La mayor parte del hígado que no se utilizó para otras determinaciones ( $9.0 \pm 0.3$  g) fue extraído y pesado. Tanto el hígado como el cadáver completo fueron secados en un horno de aire seco a  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ , el hígado se secó por un periodo de 24 h mientras que el cadáver completo se secó 72 h. Después del tiempo de secado se pesó nuevamente el hígado y se calculó el porcentaje de agua mediante la diferencia de peso inicial y final. La materia seca fue colocada en un dedal de celulosa previamente pesado y los lípidos se extrajeron por un aparato soxhlet durante 4 h utilizando hexano como solvente. El hexano se eliminó de los lípidos recuperados por rotoevaporación y el matraz fue secado a peso constante en un horno de aire seco a  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La cantidad de lípidos extraídos se cuantificó mediante la diferencia de peso entre el matraz vacío y el matraz después de extraer los lípidos. Para la determinación de lípidos corporales totales se determinó el contenido de agua de forma similar al hígado, sin embargo después de secar el cadáver, éste fue triturado en un molino manual. 2 g (por triplicado) del homogenado total fueron utilizados para calcular el porcentaje de lípidos corporales totales mediante la misma técnica de soxhlet utilizada para el hígado. Los pesos del dedal y la cristalería utilizada en esta metodología se tomaron después de mantenerse a peso constante en un horno de aire seco a  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **6.2.4 Expresión relativa de mRNA de genes de metabolismo de lípidos y respuesta antioxidante**

A partir de una muestra de tejido hepático se extrajo el RNA total utilizando Reactivo TRI (Sigma-Aldrich, T9424) siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente se dio un tratamiento con DNAsa libre de RNAsa (Promega, 9PIM610) para eliminar posibles contaminantes de DNA genómico. Con el RNA libre de DNA se sintetizó cDNA (Promega, A5001) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. A partir del cDNA se evaluó la expresión de transcritos en el tejido hepático por medio de PCR en tiempo real utilizando los oligonucleótidos mencionados en la Tabla II.

**Tabla II. Oligonucleótidos utilizados para evaluar la expresión génica**

Gen	Secuencia (5' – 3')	Amplicón (bp)	Genebank	Referencia
APOB	F GGCTGACTCTGTGGTTGACCTG R CGTGGCTGACTTTGAATTTGGA	143	NM_019287.2	(Zhang <i>et al.</i> , 2013)
LDLR	F CTGGCGGCTGAGGAACATTA R ATCCTCCAGGCTGACCATCT	136	NM_175762.2	Primer3 Plus
LXR $\alpha$	F GACCAGCTCCAAGTAGAGAGACTGC R TCATTAGCATCCGTGGGAACATC	109	NM_031627.2	(Yang <i>et al.</i> , 2010)
SREBP1c	F AGCTGCTCCTGTGTGATCTAC R CTCAGGTCATGTTGGAAACCAC	148	AF286470.2	Primer3 Plus
Nrf2	F TGGCAACGTGTTCCCTTGTTTC R TAGCTCAGAAAAGGCTCCATCC	85	NM_031789.2	Primer3 Plus
rRNA 18S	F GGGAGGTAGTGACGAAAAATAACAAT R TTGCCCTCCAATGGATCCT	101	M11188	(G. P. Wang & Xu, 2010)
Ciclofilina	F TGGATGGCAAGCATGTGGTCTTTG R CTTCTTGCTGGTCTTGCCATTCCT	101	M_017101.1	(Botolin, Wang, Christian, & Jump, 2006)

**Las referencias marcadas como Primer3 Plus fueron diseñadas mediante el uso de esa herramienta: <http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>**

Para cada reacción de PCR se añadieron 5  $\mu$ L de mastermix (Qiagen, 204074), 3  $\mu$ L de agua libre de nucleasas, 1  $\mu$ L de la mezcla de oligonucleótidos F y R para cada gen (10 mM de cada uno para obtener 1 mM en la reacción) y 1  $\mu$ L de cDNA (50 ng/ $\mu$ L) para un volumen final de 10  $\mu$ L en cada reacción de PCR tiempo real. El protocolo consistió en una desnaturalización inicial de 95 °C por 5 min una vez, una desnaturalización a 95 °C por 10 s, alineación por 15 s a 60 °C, una extensión a 72 °C por 20 s; repitiendo los últimos 3 pasos por un total de 40 ciclos. Al final de cada reacción se realizó también una curva de desnaturalización (*melt curve*) de 72 a 95 °C. Cada experimento incluyó también un control sin templado (NTC, del inglés *no template control*) por duplicado. Se utilizó un aparato RotorGene Q series con un rotor de 72 tubos, el software fue RotorGene Q series versión 1.7 (Qiagen). Los resultados se analizaron mediante la ecuación de Pfaffl (Pfaffl, 2001), normalizando contra la expresión del rRNA 18S y la ciclofilina. Las eficiencias de cada par de

oligonucleótidos utilizados fueron calculadas previamente mediante diluciones de cDNA.

### **6.2.5 Actividad enzimática y peroxidación lipídica**

Las actividades de enzimas antioxidantes hepáticas y cardíacas se determinaron a partir de extractos realizados manualmente utilizando PBS 50 mM a pH 7.4. El extracto crudo se centrifugó a 18,000 g a 4 °C durante 5 min. El sobrenadante se recuperó para la determinación de las actividades enzimáticas. La actividad de CAT se determinó utilizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15 mM en PBS 50 mM a pH de 7.4. Se colocaron 600 µL de la solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en una cubeta de cuarzo de espectrofotómetro y la reacción se inició añadiendo 50 µL de extracto a la solución mezclando de forma suave por inversión, inmediatamente después se registró el decremento en la absorbancia a 240 nm durante 1 min registrando los valores cada 0.5 s. El método se basa en la capacidad del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de absorber a 240 nm, por lo que su desaparición debido a la acción de la enzima se puede cuantificar leyendo a esta longitud de onda. Para reportar los resultados se graficó la Abs a 240 nm contra el tiempo (en min). A partir de esa gráfica se calculó el cambio de Abs a 240 nm por unidad de tiempo como la pendiente de la parte lineal de la gráfica, restándole la pendiente del blanco a cada muestra. Con ese valor se utilizó la siguiente fórmula:

$$U \text{ CAT/mL} = [(m_{\text{muestra}} - m_{\text{blanco}})/0.0436] \times [650/50] \times \text{FD}$$

Donde m es la pendiente de la parte lineal de la gráfica, 0.0436 (1/mM cm) es el coeficiente de extinción molar de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 240 nm y FD es el factor de dilución del extracto. Para determinar las unidades por mg de proteína se dividió el resultado de la fórmula anterior sobre mg/mL de proteína determinada previamente por medio de la técnica de Bradford (1976). Una unidad de CAT se define como la cantidad de enzima que reduce 1 µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min (Aebi, 1984).

La actividad de SOD se determinó por medio de la técnica de autooxidación del pirogalol (Gao, Yuan, Zhao, & Gao, 1998). Inicialmente se preparó un buffer de tris 50 mM y dietilen-triamino-pentaacetato (DTPA) 1 mM a pH 8.2 y una solución de

pirogalol 3.6 mM (preparada nueva el día del ensayo). La medición se hizo colocando 1 mL del buffer de tris y 60  $\mu$ L de muestra en una cubeta para espectrofotómetro. La reacción se inició añadiendo 40  $\mu$ L de pirogalol a la cubeta para que éste quede a concentración final de 0.2 mM. Inmediatamente después se mezcló por inversión y se midió en el espectrofotómetro a 420 nm durante 1 min cada 0.5 s. El método se fundamenta en que la autooxidación del pirogalol ocurre debido al radical superóxido que se generó a pH alcalino en el buffer de tris, lo cual forma un producto coloreado cuya aparición puede ser medida a 420 nm. En ausencia de la enzima el anión se genera sin impedimentos y oxida al pirogalol, mientras que en presencia de la enzima la molécula es dismutada antes de que oxide al pirogalol, por lo que la aparición del compuesto colorido será inhibida. Posteriormente se grafica Abs a 420 nm contra tiempo (en min) y se obtiene la pendiente de la recta, con la cual se calcula el porcentaje de autooxidación. Una unidad de SOD se define como la cantidad de enzima que inhibe la reacción de autooxidación del pirogalol en un 50 %. Este valor se divide sobre la cantidad de proteína total para obtener U/mg de proteína. Lo anterior se resume en la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{U SOD}}{\text{mL}} = \frac{100 * \frac{\text{pendiente del blanco} - \text{pendiente de la muestra}}{\text{pendiente del blanco}}}{50}$$

La actividad de GPX se determinó de acuerdo a la metodología descrita por Terevinto (Terevinto, Ramos, Castroman, Cabrera, & Saadoun, 2010). Se colocaron en cada pozo de microplaca de 96 pozos: 50  $\mu$ L de EDTA 2.5 mM (concentración final: 0.5 mM), azida de sodio 5 mM (concentración final: 1.0 mM), glutatión reducido 5 mM (concentración final: 1.0 mM), NADPH 0.75 mM (concentración final: 0.15 mM), 0.3 U de glutatión reductasa (concentración final: 1.5 U/mL) y 25  $\mu$ L de muestra o PBS como blanco. La reacción se inicia añadiendo 25  $\mu$ L de peróxido de hidrógeno 1.5 mM (concentración final: 0.15 mM) e inmediatamente después se leyó la Abs a 340 nm cada 15 s con 2 s de agitación entre lecturas por un tiempo total de 3 min; la

temperatura de reacción fue de 25 °C. La actividad se calculó graficando Abs contra tiempo (en min), y obteniendo la parte lineal de la curva se resta la pendiente del blanco a cada una de las muestras. Con este valor se calcula la actividad mediante la siguiente fórmula:

$$U \text{ GPX/mL} = [(m_{\text{muestra}} - m_{\text{blanco}})/6.22 \times 10^{-3}] \times (250/25) \times \text{FD}$$

Donde m es la pendiente del blanco o de la muestra,  $6.22 \times 10^{-3}$  es el coeficiente de extinción molar del NADPH ( $1/\mu\text{M cm}$ ) y FD es el factor de dilución de la muestra. Este resultado es dividido sobre la concentración proteica para obtener U GPX/mg de proteína. La técnica se basa en que la GPX convierte al peróxido de hidrógeno en agua oxidando para ello al glutati6n, el cual es reducido por la glutati6n reductasa (GR) oxidando a su vez NADPH, cuya desaparici6n es monitoreada a 340 nm. Una unidad de GPX se define como la cantidad de enzima que cataliza 1 nmol de NADPH/min.

La actividad de GST se cuantific6 mediante el m6todo propuesto por Habig (Habig & Jakoby, 1981). Para ello se prepar6 una soluci6n de 1-cloro 2,4-dinitro benceno (CDNB, Aldrich 237329) 0.1 M en etanol, se diluye 1 mL de esta soluci6n en 43.3 mL de buffer de  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  a pH de 6.5 para obtener una soluci6n de 2.25 mM de CDNB. Se prepar6 tambi6n una soluci6n 2.25 mM de GSH (preparada nueva el d6a del experimento) en el mismo buffer de fosfatos que se utiliz6 para el CDNB. Se tomaron vol6menes iguales de las soluciones antes mencionadas y se mezclaron ligeramente, lo cual da como resultado una soluci6n de sustratos 1.125 mM, 6sta se prepar6 antes de iniciar la reacci6n y se mantuvo a 37 °C debido a que es estable solamente por 20 min. En un pozo de microplaca de 96 pozos se agregaron 25  $\mu\text{L}$  del extracto proteico preparado previamente (o de buffer de fosfatos pH 6.5 para el blanco) y 200  $\mu\text{L}$  de la soluci6n de sustratos de CDNB y GSH, obteni6ndose as6 una concentraci6n final en el pozo de 1 mM de CDNB y GSH. El lector de microplaca se mantuvo a 37 °C durante las mediciones de la reacci6n, las cuales se realizaron a 340 nm cada 15 s (90 en total) agit6ndose 5 s previamente a cada lectura. La reacci6n se fundamenta en la aparici6n del complejo tio6ter glutati6n-dinitrobenceno

que puede registrarse a 340 nm al conjugarse el GSH con el CDNB. Para obtener la actividad se graficó la Abs a 340 nm contra el tiempo (en min) para tomar la pendiente de la recta  $m$ , el valor de  $m$  del blanco se sustraerá del valor de cada una de las muestras y ese valor se introduce en la siguiente fórmula:

$$U \text{ GST/mL} = [(m_{\text{muestra}} - m_{\text{blanco}}) \times 0.82549] \times [225/25] \times \text{FD}$$

Donde 0.82549 es el recíproco del coeficiente de extinción molar del GS-CDNB (mM cm) y FD es el factor de dilución de cada muestra. Por último se dividió este resultado entre la concentración de proteína de cada muestra (en mg/mL) previamente calculada, obteniendo así U GST/mg de proteína. Una U de GST es la cantidad de enzima que cataliza la unión de 1  $\mu\text{mol}$  de CDNB con GSH/min.

Se evaluó en el índice de peroxidación lipídica por medio de la técnica de las sustancias reactivas al ácido barbitúrico (TBARS, del inglés *thiobarbituric acid reactive substances*) por medio de la metodología descrita por Lee (Lee *et al.*, 2009). Para ello se tomaron 200  $\mu\text{L}$  del homogenado utilizado para la determinación de actividad enzimática y se les agregaron 400  $\mu\text{L}$  de una solución de ácido tricloroacético (15 %), ácido tiobarbitúrico (0.4 %) y HCl (2.5 %). La mezcla fue calentada a 100 °C durante 60 min. Después de ese tiempo los tubos se dejaron enfriar al ambiente y se centrifugaron a 12,000 g a temperatura ambiente durante 5 min. La Abs del sobrenadante fue leída a 534 nm en un espectrofotómetro de microplaca (xMark, BioRad) y este valor fue convertido a nmol de malondialdehído (MDA) por medio de una recta de calibración elaborada con 1,1,3,3 tetrametoxipropano bajo las mismas condiciones que las muestras problema. Los resultados se expresan en nmol MDA/mg de proteína. La reacción se basa en que los productos de peroxidación lipídica (como el MDA) pueden reaccionar con el ácido tiobarbitúrico para generar un compuesto colorido cuya absorbancia puede registrarse a 534 nm.

### **6.2.6 Análisis estadístico**

Se realizaron análisis estadísticos en el programa Minitab 16.0. La normalidad de los datos se comprobó mediante la prueba de Anderson-Darling, de acuerdo con esto se analizaron diferencias entre grupos utilizando ANOVA y pruebas de Tukey (datos con comportamiento normal) o pruebas de Kruskal-Wallis (datos con comportamiento no normal). Se determinaron correlaciones entre variables por análisis de correlación de Pearson. Las diferencias se consideraron significativas cuando el valor de  $p < 0.05$ .

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Caracterización química

#### 7.1.1 Ácidos grasos

Se determinó que las nueces cultivadas en el estado de Chihuahua contienen un promedio de 72 % de aceite con un rango de 70 a 73 %. Los ácidos grasos detectados y cuantificados en el aceite fueron 2 saturados y 3 insaturados; palmítico (16:0), esteárico (18:0), oleico (18:1  $\omega$ -9), linoléico (18:2  $\omega$ -6) y linolénico (18:3  $\omega$ -3). En la Tabla III se presentan los porcentajes de los ácidos grasos cuantificados, así como la suma de saturados e insaturados.

En la Tabla III se puede observar que el ácido palmítico fue estadísticamente superior en la región Centro e inferior en el Sur, mientras que el Norte fue similar a las otras regiones. Las concentraciones de ácido oleico y ácido linoléico también se modificaron. Por otra parte se observa que aunque se presentaron variaciones en los compuestos individuales, estas no impactaron de forma estadísticamente significativa la suma de ácidos grasos saturados ni insaturados.

**Tabla III. Porcentaje de ácidos grasos presentes en el aceite de la nuez cuantificados por GC-MS**

Ácido graso	Norte	Centro	Sur
Palmítico (16:0)	8.31±0.17 <sup>ab</sup>	8.47±0.06 <sup>a</sup>	8.02±0.02 <sup>b</sup>
Esteárico (18:0)	5.22±0.27	4.53±0.65	4.35±0.17
<i>Total de saturados</i>	<i>13.53±0.12</i>	<i>12.63±2.08</i>	<i>12.37±0.21</i>
Oleico (18:1 $\omega$ -9)	57.18±0.55 <sup>a</sup>	47.43±0.90 <sup>c</sup>	50.34±0.21 <sup>b</sup>
Linoléico (18:2 $\omega$ -6)	24.28±0.16 <sup>c</sup>	34.79±0.78 <sup>a</sup>	32.47±0.25 <sup>b</sup>
Linolénico (18:3 $\omega$ -3)	5.00±0.28	4.76±0.97	4.81±0.23
<i>Total de insaturados</i>	<i>86.47±0.12</i>	<i>86.70±18.63</i>	<i>87.63±0.21</i>

Una letra diferente en la misma fila indica diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) por ANOVA y prueba de Tukey, filas sin letras no fueron estadísticamente diferentes.

### 7.1.2 Fitoesteroles

Se cuantificaron 3 fitoesteroles en los aceites de la nuez:  $\beta$ -sitoesterol, campesterol y Estigmasterol, siendo el  $\beta$ -sitoesterol el principal ya que constituye aproximadamente el 94 % del total de los fitoesteroles. En la Tabla IV se muestran las concentraciones detectadas en los aceites de la nuez.

**Tabla IV. Concentraciones de fitoesteroles presentes en el aceite de la nuez cuantificados por cromatografía de gases**

Fitoesterol	Norte	Centro	Sur	Promedio
$\beta$ -sitoesterol	50.37 $\pm$ 3.30 <sup>a</sup>	44.73 $\pm$ 2.20 <sup>a</sup>	32.61 $\pm$ 2.90 <sup>b</sup>	42.57 $\pm$ 2.36
Campesterol	1.51 $\pm$ 0.07 <sup>c</sup>	2.12 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	1.82 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	1.81 $\pm$ 0.07
Estigmasterol	0.44 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	0.67 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.29 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	0.46 $\pm$ 0.04
Total	52.31 $\pm$ 3.38 <sup>a</sup>	47.51 $\pm$ 2.21 <sup>a</sup>	34.73 $\pm$ 2.91 <sup>b</sup>	44.85 $\pm$ 2.38

**Todas en mg/100 g de aceite, cuantificados por cromatografía de gases. Una letra diferente en la misma fila indica diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) por ANOVA y prueba de Tukey.**

La concentración de fitoesteroles totales varió significativamente entre regiones, siendo las regiones del Norte y del Centro superiores al Sur. En el Centro se encontraron concentraciones superiores de los fitoesteroles minoritarios (campesterol y estigmasterol).

### 7.1.3 Tocoferoles

Se identificaron y cuantificaron 2 tocoferoles en el aceite por medio de HPLC-fluorescencia;  $\delta$ -tocoferol y  $\gamma$ -tocoferol. En la Tabla V se presentan las concentraciones medidas en las muestras.

**Tabla V. Concentraciones de tocoferoles presentes en los aceites de nuez obtenidos por HPLC-fluorescencia**

Tocoferol	Norte	Centro	Sur	Promedio
$\delta$ tocoferol	$0.48 \pm 0.018^b$	$0.54 \pm 0.037^{ab}$	$0.62 \pm 0.002^a$	$0.55 \pm 0.024$
$\gamma$ tocoferol	$8.26 \pm 0.032^c$	$10.95 \pm 0.064^a$	$9.30 \pm 0.074^b$	$9.50 \pm 0.392$
Total	$8.74 \pm 0.047^c$	$11.54 \pm 0.099^a$	$9.93 \pm 0.075^b$	$10.06 \pm 0.400$

Todas en mg/100 g de aceite.  $\lambda_{ex}$  295 nm,  $\lambda_{em}$  330 nm. Una letra diferente en cada fila indica diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) por ANOVA y prueba de Tukey.

Se detectaron dos tocoferoles diferentes,  $\delta$  y  $\gamma$ , siendo el  $\delta$ -tocoferol el que se encontró en mayor abundancia con aproximadamente un 94 % del total y el  $\delta$ -tocoferol el 6 % restante. En la Tabla V se observa que la región Centro presenta la mayor concentración de  $\gamma$ -tocoferol y de tocoferoles totales, siendo estadísticamente diferente a las otras 2. Mientras que el  $\delta$ -tocoferol fue similar únicamente en el Centro y en el Sur.

#### 7.1.4 Polifenoles totales y capacidad antioxidante

En la Tabla VI se presentan las concentraciones de polifenoles totales así como la capacidad antioxidante de los aceites determinadas por los métodos de ABTS y DPPH.

**Tabla VI. Concentraciones de polifenoles totales y capacidad antioxidante de los aceites de nuez determinadas por dos diferentes técnicas**

Variable	Norte	Centro	Sur	Promedio
Polifenoles totales <sup>1</sup>	$11.63 \pm 0.28^a$	$11.92 \pm 0.11^a$	$11.33 \pm 0.16^a$	$11.63 \pm 0.13$
ABTS <sup>2</sup>	$20.03 \pm 2.31^a$	$17.65 \pm 2.16^a$	$8.22 \pm 1.74^b$	$13.30 \pm 1.60$
DPPH <sup>2</sup>	$21.50 \pm 1.02^b$	$27.73 \pm 2.35^a$	$18.49 \pm 1.40^b$	$22.57 \pm 1.30$

<sup>1</sup> mg GAE/100 g de aceite, <sup>2</sup> mmol equivalentes de trolox (TE). Una letra diferente en cada fila indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) por ANOVA y prueba de Tukey, la ausencia de letra en cada fila indica que no hubo diferencia estadísticamente significativa.

En la Tabla VI se observa que no hubo diferencia significativa entre las concentraciones de polifenoles totales en las diferentes regiones analizadas. Sin embargo la capacidad antioxidante de los aceites sí fue diferente; la técnica de ABTS muestra que la región Norte y Centro presentan valores estadísticamente similares, mientras que el Sur es inferior a ellos. La metodología de DPPH señala que el Centro es superior al Norte y al Sur, los cuales son similares entre sí. Aunque la diferencia en polifenoles totales no es estadísticamente significativa se observa que la región Sur presentó la menor concentración de estos compuestos y a su vez la menor capacidad antioxidante determinada por ambos métodos.

### 7.1.5 Estabilidad oxidativa

En la Tabla VII se presenta la  $T_e$  de los aceites, se observa que ésta disminuye conforme la velocidad de calentamiento ( $\beta$ ) también disminuye, de acuerdo a esto, es posible calcular la  $E_a$  del aceite de cada región.

**Tabla VII.  $T_e$  y  $E_a$  de los aceites de nuez obtenida por DSC**

		Norte	Centro	Sur	Promedio
$T_e$ (°C)	$\beta = 20$ K/min	201.40	199.50	201.8	$200.9 \pm 0.71$
	$\beta = 15$ K/min	195	194.7	195.6	$195.1 \pm 0.3$
	$\beta = 10$ K/min	188.3	186.5	188.1	$187.6 \pm 0.6$
	$\beta = 5$ K/min	176.7	174.5	174.9	$175.4 \pm 0.7$
$E_a$ (kJ/mol)		100.76	96.43	91.61	$96.27 \pm 2.64$

## 7.2 Actividad biológica

### 7.2.1 Alimento, energía y lípidos corporales totales y hepáticos

Cuando se utilizó el aceite de nuez, los polifenoles de nuez y la nuez completa para evaluar su actividad biológica se encontró que el consumo de alimento (evaluado diario y transformado a kcal/día) difirió entre grupos. Los resultados mostraron que el grupo control ingirió la mayor cantidad de alimento, mientras que el grupo AG+PN

presentó el menor consumo. La ingesta de energía fue estadísticamente menor en los grupos AG+AN y AG+PN con respecto al control. A pesar de la diferente ingesta energética el peso final de las ratas no fue estadísticamente diferente entre grupos. No obstante el % de LCT fue diferente entre el grupo control y los grupos AG, AG+AN y AG+PN, mientras que el grupo AG+NC se mantuvo similar al del grupo control. El % de LH se incrementó en todos los grupos AG con respecto al control. Estos datos se presentan en la Tabla VIII.

**Tabla VIII. Consumo de alimento y energía de las ratas a lo largo del experimento, así como su peso final y lípidos corporales totales y hepáticos**

Grupo	Al (g/día) **	EC (kcal/día) *	PF (g) *	LCT (%) **	LH (%) **
Control	21.8 ± 0.2 <sup>a</sup>	77.9 ± 0.6 <sup>a</sup>	421.3 ± 14.7 <sup>a</sup>	16.4 ± 1.0 <sup>b</sup>	1.7 ± 0.2 <sup>b</sup>
AG	17.2 ± 0.2 <sup>b</sup>	77.6 ± 0.8 <sup>a</sup>	419.6 ± 15.2 <sup>a</sup>	22.9 ± 2.9 <sup>a</sup>	4.1 ± 0.5 <sup>a</sup>
AG+AN	16.5 ± 0.2 <sup>cd</sup>	74.4 ± 0.9 <sup>b</sup>	431.1 ± 15.3 <sup>a</sup>	20.8 ± 2.0 <sup>a</sup>	4.0 ± 0.7 <sup>a</sup>
AG+PN	16.1 ± 0.2 <sup>d</sup>	72.7 ± 0.8 <sup>b</sup>	429.4 ± 3.5 <sup>a</sup>	21.2 ± 1.3 <sup>a</sup>	6.6 ± 2.0 <sup>a</sup>
AG+NC	17.1 ± 0.1 <sup>b</sup>	77.7 ± 0.4 <sup>a</sup>	426.8 ± 16.5 <sup>a</sup>	19.2 ± 1.7 <sup>b</sup>	4.9 ± 1.2 <sup>a</sup>

**Al: alimento ingerido (g/día); EC: energía consumida (kcal/día); PF: peso final (g) de las ratas después de 9 semanas de tratamiento; LCT: lípidos corporales totales (%); LH: lípidos hepáticos (%). Promedio ± SEM. Valores con una letra diferente en cada columna indica diferencia estadísticamente significativa (p < 0.05) por \* ANOVA y prueba de Tukey o \*\* prueba de Kruskal-Wallis.**

### 7.2.2 Bioquímica sanguínea

Con la finalidad de determinar si las diferentes dietas y tratamientos generaban cambios en la concentración de lípidos sanguíneos se midieron estas variables a las ratas de cada grupo en estudio. Los resultados mostraron variaciones estadísticamente significativas, lo cual se detalla en la Tabla IX.

**Tabla IX. Bioquímica sanguínea de las ratas después de 9 semanas de tratamiento**

Grupo	CT <sup>1</sup>	No HDL <sup>1</sup>	LDL <sup>1</sup>	HDL <sup>1</sup>	TAG <sup>1</sup>
Control	96.2 ± 3.4 <sup>b</sup>	73.7 ± 2.4 <sup>abc</sup>	50.1 ± 1.2 <sup>ab</sup>	22.5 ± 3.0 <sup>ab</sup>	186.0 ± 13.0 <sup>a</sup>
AG	110.9 ± 5.0 <sup>a</sup>	82.4 ± 4.8 <sup>a</sup>	60.9 ± 4.8 <sup>a</sup>	28.4 ± 1.4 <sup>a</sup>	169.6 ± 6.9 <sup>ab</sup>
AG+AN	108.6 ± 4.3 <sup>a</sup>	80.4 ± 2.2 <sup>ab</sup>	59.6 ± 2.8 <sup>a</sup>	28.2 ± 2.8 <sup>a</sup>	163.8 ± 10.8 <sup>b</sup>
AN+PN	96.1 ± 4.8 <sup>b</sup>	69.6 ± 5.2 <sup>bc</sup>	48.3 ± 4.8 <sup>b</sup>	26.4 ± 3.0 <sup>ab</sup>	168.3 ± 6.3 <sup>ab</sup>
AG+NC	83.7 ± 4.7 <sup>c</sup>	63.6 ± 3.7 <sup>c</sup>	44.6 ± 2.8 <sup>b</sup>	20.2 ± 1.7 <sup>b</sup>	149.2 ± 9.0 <sup>b</sup>

<sup>1</sup> unidades en mg/dL. Promedio ± SEM. Valores con una letra diferente en cada columna indica diferencia estadísticamente significativa (p < 0.05) por ANOVA y prueba de Tukey.

El grupo AG presentó los valores más altos en la mayoría de las variables cuantificadas (excepto TAG). Por otra parte el grupo AG+NC presentó una tendencia hacia la disminución de la mayoría de los lípidos sanguíneos. El grupo AG+PN mitigó el aumento de los lípidos sanguíneos al presentar concentraciones de CT, no HDL y LDL similares a las del grupo control. El grupo AG+AN presentó valores similares a los del grupo AG, excepto en TAG los cuales fueron estadísticamente inferiores al grupo control. La menor concentración de TAG se presentó en el grupo AG+NC. El colesterol HDL fue similar entre la dieta control y las dietas restantes.

Asimismo se evaluaron los niveles séricos de diferentes hormonas implicadas en la síntesis, secreción y catabolismo de lípidos como el CT, HDL y LDL entre otros (Tabla X). Interesantemente no se presentaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de insulina ni en la sensibilidad a la misma, lo cual se demuestra con los parámetros HOMA-IR y QUICKI. Por otro lado la concentración de adiponectina en el grupo AG fue estadísticamente similar al grupo control y a los demás grupos, mientras que los grupos AG+AN, AG+PN y AG+NC fueron similares entre ellos y estadísticamente menores al grupo control. La concentración de leptina también mostró diferencias significativas al aumentar en los grupos AG y AG+AN con respecto al grupo control, el grupo AG+PN no fue diferente a ningún otro y en el grupo AG+NC los valores fueron similares a los del control. Ahora bien al disminuir la

concentración de adiponectina y aumentar la de leptina se modificó también la proporción adiponectina/leptina (Ad/Lp) en todos los grupos AG con respecto al grupo control.

**Tabla X. Concentración sérica de hormonas y parámetros de resistencia a insulina en ratas después de 9 semanas de tratamiento**

Grupo	Insulina <sup>1**</sup>	HOMA-IR <sup>*</sup>	QUICKI <sup>*</sup>	Adiponectina <sup>2*</sup>	Leptina <sup>1**</sup>	Ad/Lp <sup>3**</sup>
Control	3.2 ± 0.6 <sup>a</sup>	38.0 ± 7.8 <sup>a</sup>	0.243 ± 0.007 <sup>a</sup>	26.7 ± 1.9 <sup>a</sup>	7.1 ± 0.9 <sup>b</sup>	4.2 ± 0.5 <sup>a</sup>
AG	3.2 ± 0.5 <sup>a</sup>	41.8 ± 4.5 <sup>a</sup>	0.238 ± 0.003 <sup>a</sup>	20.8 ± 1.5 <sup>ab</sup>	14.5 ± 2.2 <sup>a</sup>	1.7 ± 0.2 <sup>b</sup>
AG+AN	3.0 ± 0.4 <sup>a</sup>	42.0 ± 6.7 <sup>a</sup>	0.239 ± 0.005 <sup>a</sup>	19.3 ± 1.2 <sup>b</sup>	13.0 ± 1.9 <sup>a</sup>	1.6 ± 0.1 <sup>b</sup>
AG+PN	3.6 ± 0.7 <sup>a</sup>	47.1 ± 11.4 <sup>a</sup>	0.237 ± 0.005 <sup>a</sup>	19.8 ± 2.1 <sup>b</sup>	10.5 ± 1.9 <sup>ab</sup>	2.2 ± 0.3 <sup>b</sup>
AG+NC	2.7 ± 0.3 <sup>a</sup>	39.4 ± 6.6 <sup>a</sup>	0.240 ± 0.004 <sup>a</sup>	14.6 ± 1.3 <sup>b</sup>	8.6 ± 1.8 <sup>b</sup>	2.1 ± 0.3 <sup>b</sup>

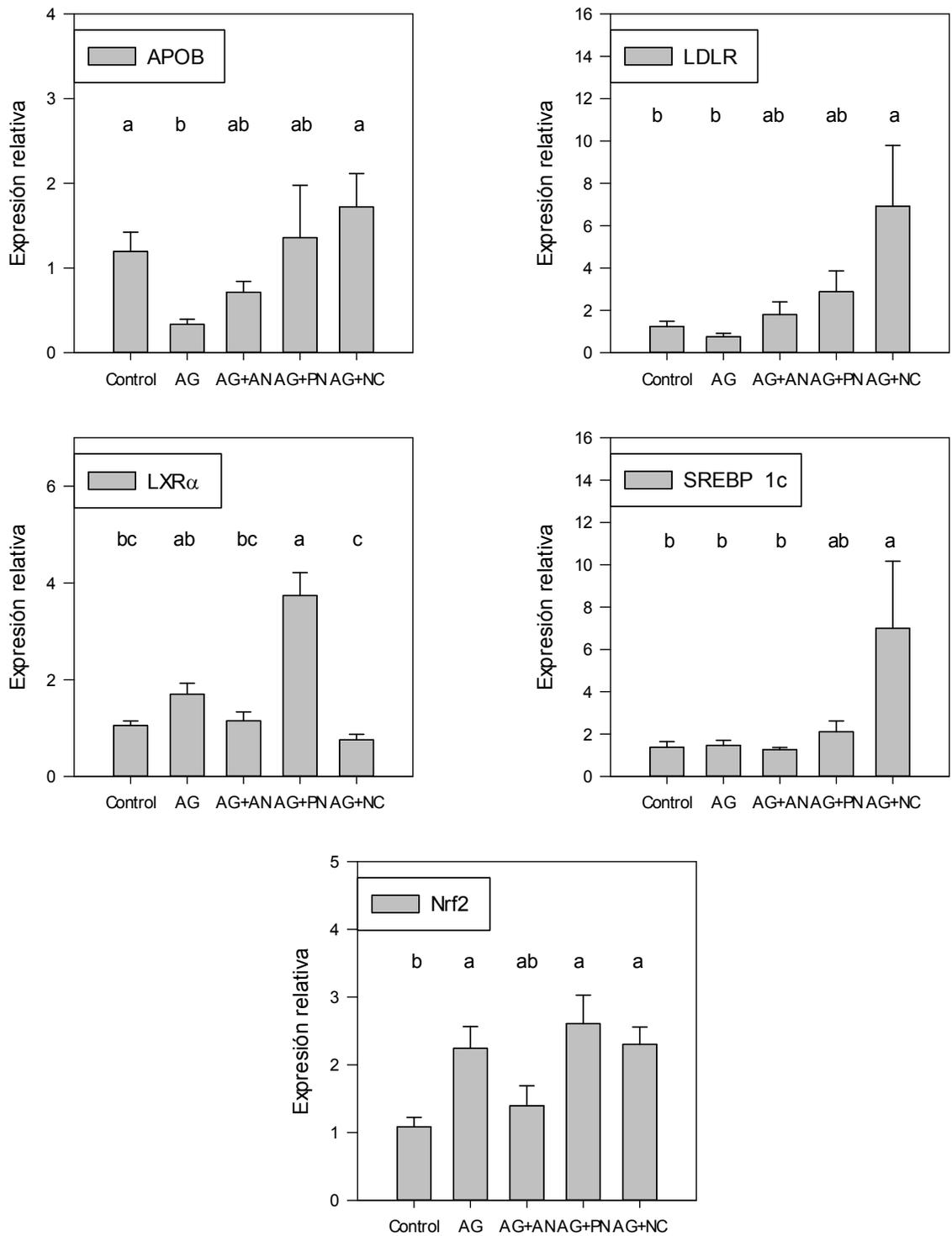
<sup>1</sup> unidades en ng/mL, <sup>2</sup> unidades µg/mL, <sup>3</sup> proporción adiponectina/leptina. Promedio ± SEM. Valores con una letra diferente en cada columna indica diferencia estadísticamente significativa (p < 0.05) por \* ANOVA y prueba de Tukey o \*\* prueba de Kruskal-Wallis.

### 7.2.3 Expresión relativa de mRNA de genes de metabolismo de lípidos y respuesta antioxidante

Con la finalidad de evaluar si los diferentes tratamientos en la dieta de las ratas inducían cambios en los niveles de expresión del mRNA de genes involucrados en el metabolismo lipídico y estrés oxidante, se obtuvieron los hígados de las ratas y se procesaron para aislar el RNA total, con el cual posteriormente se sintetizó el cDNA y se realizaron los ensayos de RT-PCR en tiempo real correspondientes para cada gen. Los resultados se presentan en la Figura 6.

Los resultados mostraron que la expresión de APOB en el grupo AG disminuyó significativamente con respecto al control, mientras que el grupo AG+NC aumentó significativamente con respecto al control. Los grupos AG+AN y AG+PN presentaron valores de expresión intermedio y fueron similares a todos los demás grupos. Al analizar la expresión del LDLR en los diferentes grupos experimentales se observó

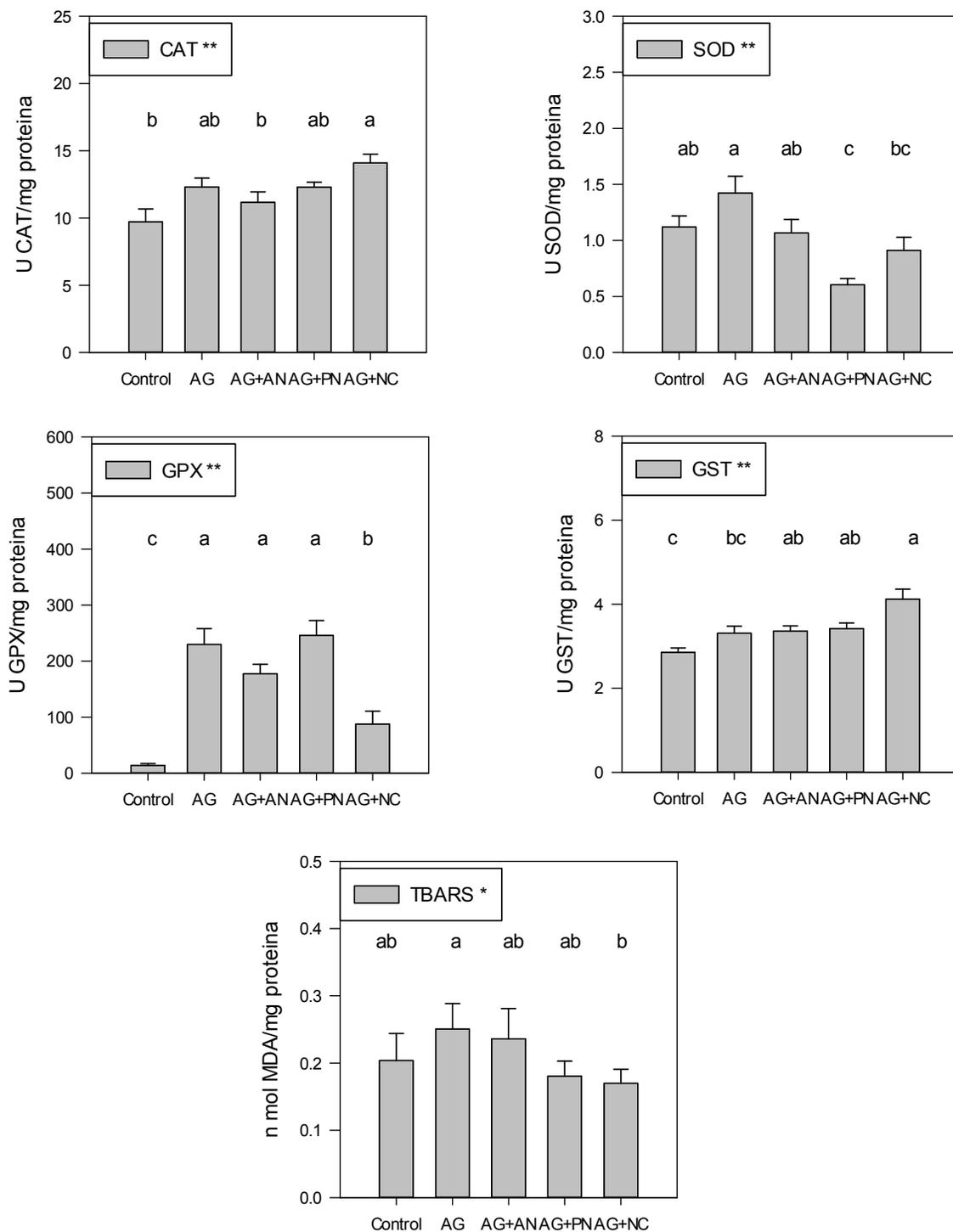
que ésta fue menor en el grupo AG y estadísticamente similar al grupo control, los grupos AG+AN y AG+PN fueron similares entre ellos y a todos los demás grupos, mientras que la mayor expresión se presentó en el grupo AG+NC. La expresión de LXR $\alpha$  fue estadísticamente superior en el grupo AG+PN, en donde se presentó un aumento significativo de aproximadamente 4 veces con respecto al grupo control; los restantes grupos fueron similares al control. La expresión de SREBP1c aumentó significativamente en el grupo AG+NC con respecto al control, mientras que los demás grupos fueron similares al control. El último gen analizado fue Nrf2, encontrándose que los niveles más bajos de expresión se presentaron en el grupo control y ésta se incrementó de forma significativa en aproximadamente 2.5 veces en los grupos AG, AG+PN y AG+NC. El grupo AG+AN fue similar a todos los demás grupos.



**Figura 5. Expresión relativa de mRNA en hígado de ratas. Promedio  $\pm$  SEM. Valores con una letra diferente indica diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) por prueba de Kruskal-Wallis.**

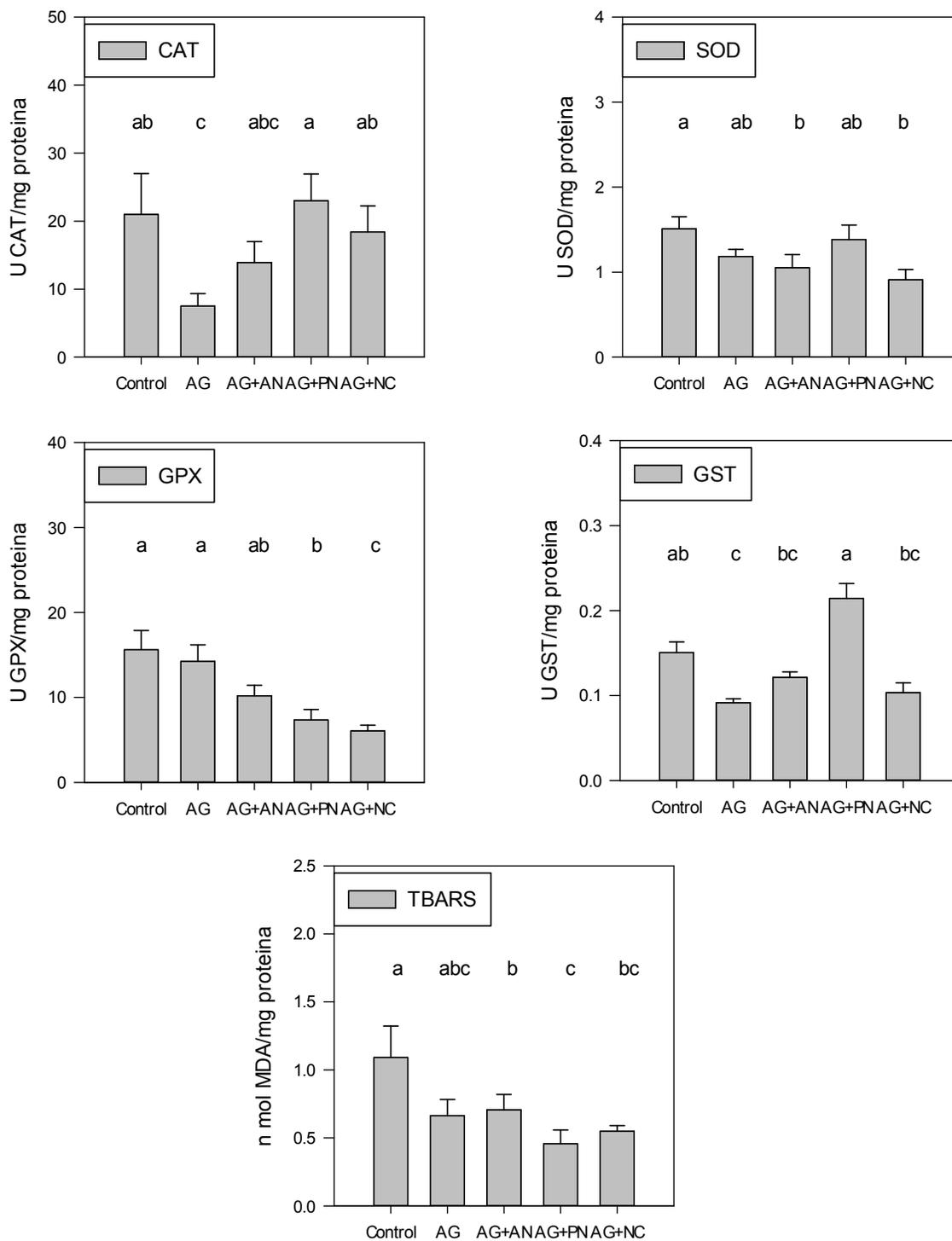
#### **7.2.4 Actividad enzimática y peroxidación lipídica**

Se cuantificó la actividad de las enzimas antioxidantes y peroxidación lipídica en el hígado y corazón de las ratas con el fin de analizar el impacto de la dieta AG y los tratamientos sobre el estado redox de ambos órganos. Los resultados se muestran en la Figuras 6 y 7. En el hígado la actividad de CAT fue superior en grupo AG+NC con respecto al control, mientras que los demás grupos fueron similares entre sí y con respecto al control. La actividad de SOD fue significativamente menor en el grupo AG+PN con respecto al grupo control. La actividad de GPX aumentó de forma significativa en los grupos AG, AG+AN y AG+PN con respecto al grupo control, el grupo AG+NC también aumentó de forma significativa con respecto al control, pero fue menor a los grupos AG, AG+AN y AG+PN. La actividad de GST fue menor en el grupo control y similar a la del grupo AG, los grupos AG+AN, AG+PN y AG+NC fueron significativamente superiores al control. La peroxidación lipídica no fue diferente entre ningún grupo con respecto al control, la única diferencia significativa se presentó entre el grupo AG y el grupo AG+NC, siendo el primero superior al segundo.



**Figura 6. Actividad de las enzimas antioxidantes y peroxidación lipídica en el hígado de ratas. Promedio  $\pm$  SEM. Valores con una letra diferente indica diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) por \* ANOVA y prueba de Tukey o \*\* prueba de Kruskal-Wallis.**

En el corazón se presentó una disminución significativa en la actividad de CAT en el grupo AG con respecto al control, mientras que los grupos AG+AN, AG+PN y AG+NC fueron similares al control. La actividad de SOD disminuyó de forma significativa (aproximadamente 0.5 U) en los grupos AG+AN y AG+NC, mientras que los grupos AG y AG+PN presentaron valores intermedios similares a los demás grupos. Por otro lado la actividad de GPX fue similar en los grupos control y AG, mientras que los grupos AG+PN y AG+NC disminuyeron significativamente la actividad de esta enzima con respecto al grupo control (aproximadamente 8 U); el grupo AG+AN no presentó diferencias significativas. La actividad de GST disminuyó de forma significativa en aproximadamente 0.5 U en el grupo AG con respecto al control, los demás grupos fueron similares al control, aunque el grupo AG+PN fue estadísticamente superior a AG+AN y AG+NC. Se presentó una disminución en la peroxidación lipídica en todos los grupos que contenían fracciones de nuez con respecto al control, mientras que el grupo AG fue similar a todos los demás grupos.



**Figura 7. Actividad de las enzimas antioxidantes y peroxidación lipídica en el corazón de ratas. Promedio  $\pm$  SEM. Valores con una letra diferente indica diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) por prueba de Kruskal-Wallis.**

## 8 DISCUSIÓN

Como ya se mencionó anteriormente existen diferentes factores que pueden afectar la composición del aceite de la nuez, lo cual produce variabilidad entre nueces cultivadas en diferentes regiones geográficas. Debido a esto se caracterizaron los fitoquímicos presentes en nueces cultivadas en tres regiones geográficas del estado de Chihuahua. A su vez la presencia de estos compuestos influenciará la bioactividad del aceite de nuez cuando éste se consume como alimento funcional para prevenir dislipidemia y/o estrés oxidante.

### 8.1 Caracterización del aceite

A partir del peso seco de la nuez se extrajeron entre 70 y 73 % de lípidos, por lo tanto se considera a la nuez como un alimento rico en lípidos tal como previamente lo han reportado otros autores. Toro y Pérez han estudiado la nuez *C. illinoensis* de estados de México Central (Querétaro, Guanajuato y San Luis Potosí) y reportan que las muestras de esta región presentan entre 70 y 79 % de aceite (Toro-Vazquez & Pérez-Briceño, 1998). Al comparar la nuez *C. illinoensis* con otros tipos de nuez se encuentra que el marañón (*Anacardium occidentale*) y los pistachos (*Pistacia vera*) contienen 47.1 y 58.8 % de lípidos respectivamente, mientras que la nuez pecana y la macadamia se ha reportado que contienen 71.8 y 76.2 %; siendo estas dos últimas las nueces con mayor contenido de lípidos (Kornsteiner, Wagner, & Elmadfa, 2006). Son varios los factores que pueden estar implicados en estas variaciones en el contenido de lípidos, por ejemplo al aumentar la cantidad de nitrógeno en los fertilizantes utilizados en el sembrado de la nuez de castilla (*Juglans regia*) se aumenta la concentración de ácido linoléico y se disminuye la de linolénico, lo cual a su vez afecta la concentración de otros fitoquímicos y la estabilidad oxidativa del aceite (Verardo *et al.*, 2013). El método y solvente con el que se extrae el aceite también son factores importantes que influyen en el rendimiento de la extracción del mismo. Miraliakbari reporta que una extracción de aceite de este mismo tipo de nuez es más eficiente cuando el solvente es una mezcla de cloroformo:metanol que cuando se utiliza hexano, ya que la mezcla de solventes rinde un 73.4 % de aceite,

mientras que el hexano solamente 71.5 %; de igual manera los compuestos antioxidantes minoritarios se ven también afectados, lo cual se refleja al determinar la capacidad antioxidante del aceite (Miraliakbari & Shahidi, 2008).

Los ácidos grasos encontrados fueron en su mayoría insaturados, específicamente monoinsaturados ya que el ácido oleico (18:1  $\omega$ -9) es el más abundante. El segundo en abundancia es linoléico (18:2  $\omega$ -6) que es poliinsaturado. Además de estos dos ácidos grasos, se encontró también linolénico (18:3  $\omega$ -3 poliinsaturado) y dos saturados, palmítico y esteárico (16:0 y 18:0 respectivamente). El perfil de ácidos grasos de la nuez se considera saludable debido a que la mayoría de ellos son insaturados y contienen compuestos esenciales como el ácido linolénico. Cuando se consume ácido linolénico en el humano se pueden sintetizar a partir de él ácidos grasos más largos como el ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5  $\omega$ -3), docosapentaenóico (DPA, 22:5  $\omega$ -3) y docosahexaenóico (DHA, 22:6  $\omega$ -3). Se ha establecido también que los ácidos grasos mono y poliinsaturados del aceite de la nuez presentan efectos cardioprotectores (Ros & Mataix, 2006), considerándose por lo tanto al aceite de la nuez como un elemento nutricional con capacidad bioactiva importante. Como ya se mencionó previamente algunos ácidos grasos individuales presentan diferencias estadísticas mínimas (por ejemplo el palmítico, oleico y linoléico), sin embargo cuando se considera la suma total de ácidos grasos saturados se encuentra que son estadísticamente similares, sucediendo lo mismo con los ácidos grasos insaturados.

Además de ácidos grasos los fitoesteroles fueron otra clase de fitoquímicos detectados y cuantificados en el aceite de nuez. Éstos son compuestos de origen vegetal de estructura similar al colesterol, y debido a su naturaleza apolar se concentran en la fracción lipídica de la nuez. El principal fitoesterol fue el  $\beta$ -sitosterol que representa aproximadamente el 94 % de los fitoesteroles presentes en el aceite de la nuez, seguido del campesterol y estigmasterol. Lugasi reporta que los tres fitoesteroles previamente mencionados son los principales obtenidos a partir de los alimentos de origen vegetal, conteniendo la nuez *C. illinoensis* entre 114 y

157 mg de fitoesteroles totales por cada 100 g de nuez (Lugasi, 2009). Otra publicación menciona que las nueces contienen entre 102 y 157 mg de fitoesteroles/100 g de nuez (Segura, Javierre, Lizarraga, & Ros, 2006). En el presente estudio los fitoesteroles fueron afectados por la zona de cultivo, lo cual se ha observado previamente en otros organismos. Plumb reporta que la síntesis de fitoesteroles en el organismo vegetal es afectada por el tipo de suelo, variaciones climáticas y la exposición a diferentes tipos de estrés como microorganismos (Plumb, Rhodes, Lampi, Buchgraber, & Kroon, 2011). Más aún se reporta que los fitoesteroles en el aceite de canola, girasol y soya varían entre cultivos y dentro de los mismos cultivos debido a diferencias genéticas y diferencias en el lugar de plantado (Vlahakis & Hazebroek, 2000). Con los datos obtenidos en este proyecto se demuestra que la región Norte del estado de Chihuahua tiene condiciones más aptas para la síntesis de fitoesteroles, ya que la concentración de estos disminuyó en las nueces del Sur del estado. Diversos estudios han reportado que los fitoesteroles tienen efectos positivos sobre la salud humana por ejemplo inhibir la absorción de colesterol exógeno e influenciar el metabolismo global del mismo (Chen & Blumberg, 2008; Hovenkamp *et al.*, 2008; Moreau *et al.*, 2002; Woyengo, Ramprasath, & Jones, 2009). Estos estudios demuestran que la inclusión de fitoesteroles en la dieta puede impactar en la salud del individuo ayudando a mantener o alcanzar niveles normales de colesterol total y LDL lo cual impactaría de manera positiva a la salud cardiovascular.

Posteriormente al análisis de los fitoesteroles se prosiguió al de los tocoferoles (conocidos también como vitamina E), encontrándose y cuantificándose el  $\delta$ - y el  $\gamma$ -tocoferol, siendo el  $\gamma$ -tocoferol el componente mayoritario. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Villarreal y colaboradores, en donde se menciona que el tocoferol mayoritario presente en nueces *C. illinoensis* cultivadas en Texas, E.U.A. es el  $\gamma$ -tocoferol, mientras que el  $\delta$ -tocoferol y el  $\alpha$ -tocoferol se encuentran también en menor proporción (Villarreal-Lozoya *et al.*, 2007). Asimismo reportan que el  $\gamma$ -tocoferol se encuentra en concentraciones que van desde los 7.2 hasta los 13.5 mg/100 g de aceite, lo cual indica que el promedio cuantificado en nuestro trabajo

(10.4 mg/100 g de aceite) se encuentran en el rango reportado por Villarreal, sin embargo mencionan que el aceite contiene también (aunque en bajas concentraciones)  $\alpha$ -tocoferol, el cual no fue detectado en este proyecto. Wyatt reportó que el  $\gamma$ -tocoferol predomina sobre el  $\alpha$ -tocoferol en nueces pecanas, sin embargo no reportan  $\delta$ -tocoferol, el cual sí fue detectado y cuantificado en el presente trabajo (Wyatt, Carballido, & Méndez, 1998). En un estudio similar realizado se reporta el contenido de tocoferoles en nueces pecanas cultivadas en Georgia, Arizona y Texas, E.U.A.; se menciona que las cuatro isoformas se encuentran presentes, siendo el  $\gamma$ -tocoferol el compuesto mayoritario (> 90 %) y los otros tres completando el resto del total de tocoferoles (Chun, Lee, Ye, & Eitenmiller, 2002). También se ha mencionado que las nueces pecanas se consideran ricas en  $\gamma$ -tocoferol mientras que son pobres en  $\alpha$ -tocoferol ya que sólo contienen 1.4 mg/100 g de nuez (Haddad, Jambazian, Karunia, Tanzman, & Sabaté, 2006). De acuerdo con las publicaciones antes mencionadas se observa que el principal tocoferol presente en la nuez *C. illinoensis* es el  $\gamma$ -tocoferol, mientras que el  $\alpha$ -tocoferol y el  $\delta$ -tocoferol se encuentran ausentes o solamente en bajas concentraciones, lo cual se atribuye a factores ambientales y otras condiciones de crecimiento, las cuales ejercen un efecto sobre los tocoferoles así como otros fitoquímicos presentes en la nuez. El  $\beta$ -tocoferol también puede estar presente sin embargo no puede ser resuelto del  $\gamma$ -tocoferol por medio de HPLC de fase reversa debido a la similitud en la estructura de ambos compuestos (Gliszczynska-Swiglo & Sikorska, 2004).

En el aceite de la nuez existen compuestos antioxidantes de la familia de los polifenoles. Éstos son moléculas consideradas antioxidantes *in vitro* así como también presentan otras funciones como aumentar la resistencia del LDL a ser oxidado y aumentar la capacidad antioxidante del plasma (Halliwell *et al.*, 2005). Se determinó que las muestras analizadas en el presente estudio contienen entre 11.33 y 11.92 mg GAE/100 g de aceite. Estudios previos mencionan que el aceite de la nuez pecana contiene aproximadamente 19.6 mg GAE/100 g de aceite cuando se utiliza hexano para extraerlo (Miraliakbari & Shahidi, 2008); la concentración de estas

moléculas en otras nueces varía considerablemente de acuerdo con la nuez y con el método de extracción desde 8 hasta 78 mg GAE/100 g de aceite (Arranz, Cert, Perez-Jimenez, Cert, & Saura-Calixto, 2008; Shahidi & Miraliakbari, 2008). Uno de los aceites que ha recibido considerable atención es el aceite de oliva el cual se ha reportado que contiene entre 5 y 100 mg GAE/100 g de aceite, y como en el caso de los fitoesteroles este valor es afectado por factores geográficos y por la metodología empleada para extraer el aceite (Owen *et al.*, 2000). De acuerdo con las concentraciones aquí obtenidas se puede decir que las nueces presentan valores similares a los del aceite de oliva, sin embargo se ha mencionado que en los extractos metanólicos utilizados para cuantificar fenoles contienen también fosfolípidos y algunos otros compuestos que tienen efecto sobre la metodología de Folin-Ciocalteu (Arranz *et al.*, 2008). De igual manera los fosfolípidos son capaces de ejercer actividad antioxidante y consecuentemente afectar la capacidad antioxidante de las muestras. No se encontró una correlación entre la capacidad antioxidante y la concentración de polifenoles lo cual sugiere que estos no son los únicos compuestos que ejercen capacidad antioxidante en las muestras, no obstante se debe mencionar que en nuestro estudio los polifenoles se cuantificaron en extractos de metanol:H<sub>2</sub>O 6:4 y la capacidad antioxidante en extractos de metanol al 100 %.

Los fitoquímicos anteriormente mencionados tendrán un impacto sobre la estabilidad térmica de los aceites de nuez, propiedad que refleja la susceptibilidad de éstos a ser oxidados. Usualmente se relaciona este valor con la proporción de ácidos grasos saturados/insaturados así como con la presencia de antioxidantes naturales o adicionados de forma artificial. La técnica utilizada para esta evaluación fue DSC y presentó un promedio de  $96.27 \pm 2.64$  kJ/mol, con un rango de 91.61 para la muestra del Sur a 100.76 kJ/mol para la muestra del Norte. Al comparar la Ea del aceite de la nuez con la de otros aceites vegetales se observa que las muestras analizadas son similares a las de aceite de oliva, para el cual se ha reportado una Ea de 72 a 104 kJ/mol (Kowalski *et al.*, 2010). Resulta interesante destacar que la muestra del Sur presentó el valor más bajo de Ea así como también la menor concentración de polifenoles totales y capacidad antioxidante. Se ha reportado que existe una

correlación entre la capacidad antioxidante de aceites y su estabilidad oxidativa evaluada por el método de Rancimat así como también entre la capacidad antioxidante de la fracción no polar y la concentración de tocoferoles (Arranz *et al.*, 2008). Ya que esta propiedad del aceite se debe a la presencia y concentración de fitoquímicos, y éstas a su vez están influenciadas por la región de cultivo, la estabilidad térmica del aceite depende de la región en donde se cultiva la nuez.

Con el fin de comprender la interrelación que hay entre las diferentes variables analizadas se buscaron correlaciones entre estas. En la Tabla XI se muestran algunas de las correlaciones identificadas; aquellas cuyo valor R fue inferior a 0.900 se omitieron.

En la Tabla XI se observa que ABTS correlaciona con el porcentaje de ácidos grasos insaturados ( $p = 0.002$ ) y con fitoesteroles ( $p = 0.047$ ), mientras que el porcentaje de ácidos grasos insaturados correlaciona con los fitoesteroles ( $p = 0.050$ ). De acuerdo a lo anterior se observa una interesante correlación entre estas tres variables, ABTS, fitoesteroles y porcentaje de ácidos grasos insaturados. La Ea también correlacionó de forma interesante con fitoesteroles ( $p = 0.143$ ), ABTS ( $p = 0.190$ ) y porcentaje de ácidos grasos insaturados ( $p = 0.194$ ), lo cual señala que la Ea está determinada (al menos en parte) por los ácidos grasos y el contenido de fitoesteroles, aunque estos últimos generalmente no son considerados antioxidantes. El hecho de que los compuestos polifenólicos totales sólo correlacionen con DPPH y que los tocoferoles estén ausentes de la tabla puede ser indicio de que los principales contribuidores a la capacidad antioxidante sean los ácidos grasos. Aunque los tocoferoles y los compuestos polifenólicos son normalmente considerados buenos compuestos antioxidantes es probable que su concentración no haya sido la suficiente para ejercer un efecto notable. También es congruente que los compuestos polifenólicos no se correlacionaran con otra variable (como Ea por ejemplo) ya que no presentaron diferencia estadísticamente significativa y por lo tanto su efecto antioxidante será el mismo en todas las muestras.

**Tabla XI. Correlaciones entre las diferentes variables analizadas en la caracterización del aceite**

Correlación	Valor R	Significancia
ABTS		
% de insaturados	0.999	0.002
Fitoesteroles	0.997	0.047
Fitoesteroles		
% de insaturados	0.996	0.050
DPPH		
Polifenólicos totales	0.980	0.126
Ea		
Fitoesteroles	0.974	0.143
ABTS	0.955	0.190
% de insaturados	0.953	0.194

**Ordenados por valor R; aquellas con un valor R inferior a 0.900 fueron omitidas.**

## 8.2 Actividad biológica

Una vez que se determinó la composición de los fitoquímicos en el aceite de nuez se diseñaron dietas altas en grasa (AG) para administrar a ratas Wistar macho durante 9 semanas. Estas dietas se adicionaron con aceite de nuez (AG+AN), polifenoles de nuez (AG+PN) y nuez completa (AG+NC) para valorar el efecto de la nuez y sus fracciones.

El mayor consumo de alimento se llevó a cabo en el grupo control ya que esta dieta presentó la menor densidad energética, por lo tanto los animales consumieron una mayor cantidad para satisfacer sus requerimientos energéticos. Por otra parte el menor consumo se presentó en el grupo AG+PN. Al evaluar la ingesta calórica los resultados nos muestran que los grupos AG+AN y AG+PN tuvieron un consumo

estadísticamente menor a los restantes y fueron similares entre ellos, lo cual puede deberse a que en ambos grupos se produjo una sensación de saciedad. Se ha demostrado que los ácidos grasos insaturados (Jones, Jew, & AbuMweis, 2008), polifenoles y otros fitoquímicos (Molan *et al.*, 2008) pueden producir una sensación de saciedad en modelos humanos y animales. Sin embargo el efecto de saciedad no se observó cuando se administraron los compuestos como parte de la misma dieta, es decir, en el grupo AG+NC. A pesar de haberse encontrado efectos significativos en la ingesta calórica no se observaron diferencias en el peso final de las ratas aunque sí en el % de LCT. Esto demuestra que una ingesta calórica similar a partir de diferentes fuentes como carbohidratos complejos en el grupo control y lípidos en el grupo AG no es equivalente, ya que los lípidos se dirigirán preferentemente hacia el tejido adiposo mientras que los carbohidratos serán más fácilmente oxidados. A pesar de esto el origen de los lípidos y los compuestos bioactivos ahí presentes (por ejemplo los polifenoles) afectarán las rutas metabólicas de los macronutrientes ingeridos.

Con el fin de detallar las vías metabólicas involucradas en el metabolismo hepático de los lípidos se analizó la expresión de diferentes proteínas y factores de transcripción. El % de LH aumentó significativamente en el grupo AG+PN con respecto al control, lo cual correlacionó con la expresión del LXR $\alpha$  en el hígado ( $p = 0.01$ ). LXR $\alpha$  protege al hígado del exceso de colesterol mediante varios mecanismos como son la estimulación del transporte reverso de colesterol y la excreción del mismo por vía biliar (Calkin & Tontonoz, 2012). La estimulación de LXR $\alpha$  mediante agonistas como GW3965 (Donkin *et al.*, 2010) y T0901317 (Houck *et al.*, 2004) han sido considerados como una estrategia terapéutica frente a la aterosclerosis, sin embargo esta estimulación puede inducir hipertriacilglicerolemia, favorecer la lipogénesis hepática y producir hepatoesteatosis como consecuencia (Fievet & Staels, 2009). En este estudio no se encontró un aumento en la concentración de TAG en sangre en ninguno de los grupos tratamiento, ni una correlación significativa entre la expresión de LXR $\alpha$  y la concentración de TAG ( $p = 0.25$ ), lo cual sugiere que

el estímulo observado en la expresión de LXR $\alpha$  no impactó la concentración de éstas moléculas. Estos resultados sugieren que los polifenoles de la nuez pueden estimular al LXR $\alpha$  y por lo tanto producir un efecto anti-ateroesclerótico, no obstante su efecto sobre la acumulación de lípidos hepáticos debe estudiarse. Resulta importante remarcar que el estímulo sobre LXR $\alpha$  no se presentó en el grupo AG+NC lo cual sugiere la presencia de algún otro compuesto o compuestos que puedan modificar el efecto que presentan los polifenoles sobre LXR $\alpha$  o bien que su metabolismo es diferente cuando se administran por separado o formando parte de la nuez.

Interesantemente la reducción de lípidos sanguíneos comúnmente ligada al consumo de nueces fue observada en este estudio (Mukuddem-Petersen, Oosthuizen, & Jerling, 2005). El mayor efecto de reducción se presentó en el grupo AG+NC en comparación con AG+PN y el AG+AN. Diferentes estudios han sugerido que este efecto puede deberse a los ácidos grasos. En una revisión de diferentes estudios del consumo de almendras se sugiere que pueden éstas disminuir la concentración de LDL debido al perfil de ácidos grasos de la almendra y “posiblemente a otros compuestos” (Berryman, Preston, Karmally, Deckelbaum, & Kris-Etherton, 2011). En el caso de *C. illinoensis* estos otros compuestos con capacidad de reducción de colesterol pueden ser los polifenoles y de hecho pueden no ser secundarios sino primarios ya que la fracción lipídica presentó un efecto mínimo en la reducción de lípidos, mientras que los polifenoles mitigaron el aumento de CT y LDL. El mecanismo de acción de los polifenoles puede involucrar la estimulación del LXR $\alpha$  o algunas otras rutas. En una investigación reciente se demostró que los polifenoles del té negro reducen la solubilidad micelar del colesterol *in vitro* así como su absorción intestinal en ratas (Ikeda, Yamahira, Kato, & Ishikawa, 2010). Ya que el efecto de disminución en la concentración de CT y sus fracciones se observó primordialmente en el grupo AG+NC se sugiere que otros componentes de la nuez (fibra, proteínas u otros micronutrientes) pueden contribuir al efecto, así como presentarse una sinergia entre ellos. El efecto sobre la reducción en la concentración

de CT y sus fracciones puede estar relacionado a cambios en el metabolismo de APOB, la cual es la principal proteína en las partículas de colesterol no HDL. La expresión del mRNA de APOB se correlacionó de manera inversa a la concentración de CT ( $p = -0.03$ ), LDL ( $p = -0.03$ ) y no HDL ( $p = -0.02$ ). El aumento en la expresión del LDLR parece ser clave en la reducción de CT ya que la expresión del mRNA del LDLR correlaciona de manera positiva con la expresión de APOB ( $p = 0.007$ ). Estos resultados sugieren que un aumento en la expresión del mRNA de APOB y LDLR está ligado a un catabolismo aumentado de las partículas de colesterol no HDL. Se ha demostrado que la secreción de APOB está regulada por el LDLR en la fase intracelular y después de su secreción (Twisk *et al.*, 2000) incluso otros autores se han referido al LDLR como un “guardián” de las partículas que contienen APOB (Larsson, Skogsberg, & Bjorkegren, 2004). La mayor inducción sobre la expresión de LDLR se presentó en el grupo AG+NC que a su vez presentó la menor concentración de CT y LDL en circulación, sin embargo el HDL también disminuyó en este grupo, sugiriéndose mecanismos de regulación adicionales; entre estos la modificación en la proporción de ácidos grasos intracelulares, actividad de la MTP (proteína microsomal de transferencia de triglicéridos) entre otros, ya que la producción de lipoproteínas está regulada en diversos pasos desde la traducción de la proteína hasta la secreción de la partícula (Olofsson, Stillemark-Billton, & Asp, 2000; Sundaram & Yao, 2010).

El mayor efecto del grupo AG+AN fue sobre la concentración sérica de TAG. Ésta concentración fue estadísticamente menor en los grupos AG+AN y AG+NC con respecto al control. Los mecanismos a través de los cuales un aceite comestible puede reducir la concentración de TAG se han estudiado principalmente utilizando aceites de pescado, demostrándose que éstos actúan sobre SREBP1c al reducir la expresión del mRNA e inhibir la maduración de la proteína (Shearer, Savinova, & Harris, 2012). En este estudio no se modificó la expresión de SREBP1c en el grupo AG+AN pero sí en el grupo AG+NC, lo cual sugiere que el efecto de reducción de TAG observado en el grupo AG+AN no está mediado por SREBP1c sino por otros mecanismos hepáticos o extra-hepáticos. Una opción es modificaciones a nivel de

tejido adiposo o muscular, ya que estos tejidos también son capaces de impactar sobre la concentración de TAG a través de la  $\beta$ -oxidación o el almacenamiento de lípidos.

Las hormonas adiponectina y leptina son secretadas por el TAB; se ha demostrado que la concentración de adiponectina correlaciona de manera inversa con la masa de este tejido. Ya que en este estudio se incrementó el % de LCT la concentración de adiponectina disminuyó, lo cual se confirma mediante la correlación entre LCT y la concentración de adiponectina ( $p = -0.02$ ). La concentración de adiponectina también correlacionó de manera negativa con la expresión del mRNA del LDLR ( $p = -0.03$ ). La concentración de leptina también presentó una correlación significativa positiva con el % de LCT ( $p < 0.001$ ). Como ya se mencionó la leptina es capaz de prevenir obesidad al disminuir la ingesta calórica y favorecer su gasto; estos efectos se pueden producir al actuar sobre el sistema nervioso central en los centros del cerebro responsables de estos comportamientos en donde el receptor de leptina es ampliamente expresado (Sweeney, 2002). Al presentarse hiperleptinemia pueden ocurrir una serie de efectos negativos como obesidad y resistencia a la leptina, lo cual puede contribuir al desarrollo de aterosclerosis por diferentes mecanismos (Scarpace & Zhang, 2009). Por lo tanto la hiperleptinemia y el aumento en el % de LCT son indicadores de aterogénesis en nuestros grupos. Ya que el grupo AG+NC fue capaz de mitigar la hiperleptinemia se demuestra que la nuez *C. illinoensis* es capaz de mitigar la hiperleptinemia provocada por una dieta AG. Una disminución en la concentración de adiponectina en conjunto con un aumento en la concentración de leptina produjo una disminución en la proporción Ad/Lp en los grupos AG, a pesar de que el grupo AG+NC mitigó la hiperleptinemia. Esta proporción se ha documentado como un marcador de síndrome metabólico que disminuye conforme aumentan los riesgos de padecer esta condición (Vega & Grundy, 2013). En la Figura 8 se presenta un esquema que resume los efectos más importantes aquí observados.

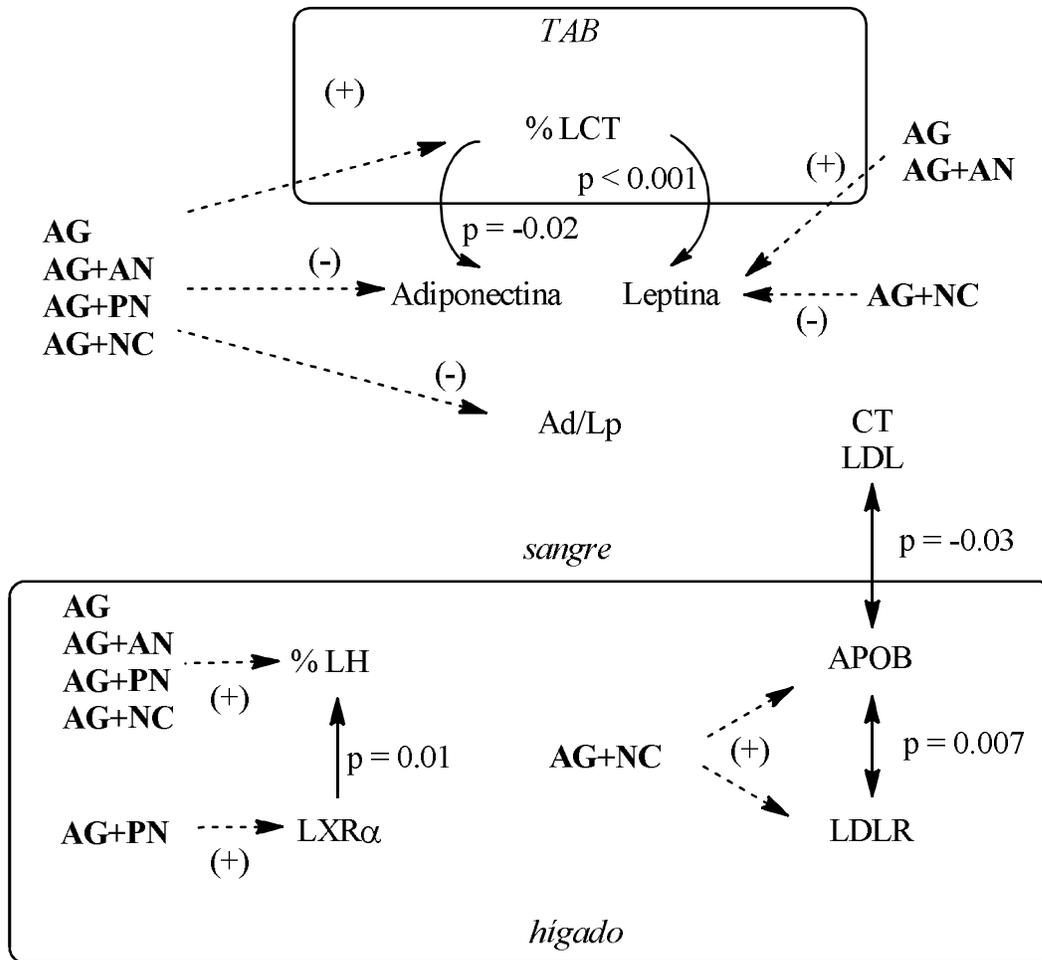


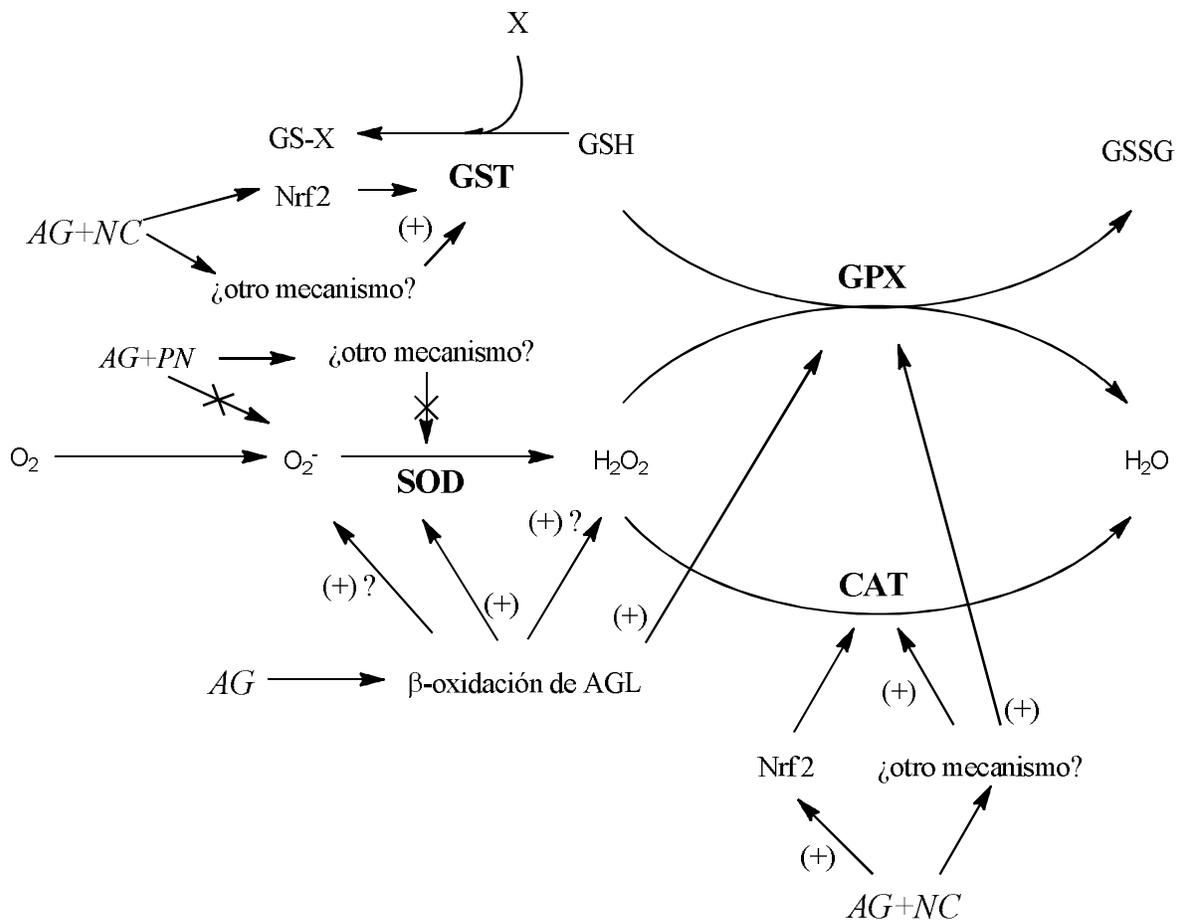
Figura 8. Resumen de los principales efectos y correlaciones observadas. El grupo AG+PN estimuló la expresión hepática relativa del mRNA del factor de transcripción LXR $\alpha$ , lo cual correlacionó ( $p = 0.01$ ) con el % de LH que fue estimulado por todos los grupos AG. También en el hígado se estimuló la expresión relativa del mRNA del LDLR y la APOB en el grupo AG+NC, ambas variables correlacionaron de forma significativa ( $p = 0.007$ ). La expresión relativa de APOB hepática correlacionó de forma negativa con la concentración de CT y LDL circulante ( $p = -0.03$ ). El % LCT se vio aumentado en los grupos AG, lo cual a su vez inhibió la secreción de adiponectina. Los grupos AG y AG+AN produjeron hiperleptinemia, la cual fue mitigada en el grupo AG+NC. Los grupos AG disminuyeron la proporción Ad/Lp. Las concentraciones de adiponectina y leptina correlacionaron con el % LCT ( $p = -0.02$  y  $p < 0.001$  respectivamente).

Además de alterar el metabolismo de lípidos una dieta AG también afecta el equilibrio redox de diferentes maneras. Primero, una dieta en donde se limita la ingesta de carbohidratos y se favorece la de lípidos dirigirá al metabolismo hacia la oxidación de lípidos, lo cual generará una concentración aumentada de ROS (Vial *et al.*, 2011). Segundo, ya que se incrementa la producción de ROS un organismo sano aumentará su respuesta antioxidante endógena como consecuencia. Un estudio realizado en ratones alimentados con dietas AG durante 24 semanas sugiere que el hígado aumenta su sistema antioxidante como una respuesta de adaptación (Do *et al.*, 2011). Esta respuesta involucra al menos de forma parcial al factor Nrf2, ya que éste regula la respuesta antioxidante y la expresión de las enzimas antioxidantes así como otros procesos celulares relacionados a la supervivencia celular (Kensler *et al.*, 2007).

En el hígado se presentó un estímulo en la actividad de CAT en el grupo AG+NC, así como un aumento en la actividad de GPX superior al control pero menor a los grupos restantes. De acuerdo con esto se sugiere que hubo una generación importante de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en este grupo que fue neutralizado por acción de la CAT. GPX también se encarga de la eliminación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y ya que la regulación de GPX es multifactorial, siendo los compuestos oxidantes uno de sus principales reguladores así como Nrf2 (Reisman, Yeager, Yamamoto, & Klaassen, 2009), es probable que el efecto sobre esta enzima haya sido menor que el ejercido sobre CAT. Resulta también de importancia remarcar que se presentó un comportamiento opuesto en la actividad de GPX con respecto a lo reportado en otras investigaciones en donde dietas AG inhiben la actividad de GPX hepática (Noeman, Hamooda, & Baalash, 2011) mientras que aquí se determinó un incremento. A pesar de este estímulo en la actividad de GPX en el grupo AG se presentó un mayor valor de peroxidación lipídica en este grupo con respecto a AG+NC. Este efecto sobre la peroxidación lipídica en AG+NC pudo deberse al estímulo del sistema antioxidante, o bien por la neutralización directa de los compuestos oxidantes antes que estos produjeran peroxidación lipídica. Los grupos AG+NC y AG+PN redujeron la actividad de SOD con respecto al grupo AG, y el grupo AG+PN lo hizo también con respecto al control.

Este comportamiento sugiere que los compuestos polifenólicos actuaron directamente para neutralizar los ROS generados y por lo tanto la actividad de SOD fue baja. Se ha reportado previamente que extractos que contienen polifenoles de diferentes fuentes (100 mg de resveratrol de *Polygonum cuspidatum* y 75 mg de polifenoles extraídos de uva muscadina) son capaces de mitigar la generación del anión superóxido *in vivo* después de una comida alta en grasa y carbohidratos en humanos sanos (Ghanim *et al.*, 2011), lo cual permite explicar por qué el grupo AG+PN presentó una baja actividad de SOD. La actividad de GST se vio aumentada en el grupo AG+NC, lo cual pudo también contribuir a la disminución en la peroxidación lipídica ya que esta enzima se ha considerado como protectora en estudios donde se alimentan roedores con dietas AG (Hsu & Yen, 2007; Kirpich *et al.*, 2011).

Los grupos AG, AG+PN y AG+NC estimularon la expresión de Nrf2. En el caso del grupo AG es posible que el aumento sea debido a una mayor generación de ROS como producto de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos. En el caso de AG+PN y AG+NC el efecto fue probablemente mediado por los compuestos polifenólicos, lo cual concuerda con la literatura que demuestra que estas moléculas son capaces de modular la expresión de diversas enzimas a través de la vía de señalización de Nrf2 (Scapagnini *et al.*, 2011). La activación de Nrf2 no se vio reflejada en la actividad de ninguna de las enzimas antioxidantes en este estudio, lo cual puede indicar que la actividad de las enzimas fue regulada por mecanismos diferentes o adicionales a Nrf2, o bien que la activación de Nrf2 tuvo un efecto más prominente sobre otras enzimas como se ha reportado anteriormente (Kensler *et al.*, 2007). El grupo AG+AN no mostró efectos significativos sobre la actividad de ninguna de las enzimas analizadas. En la Figura 9 se presenta un resumen de los principales efectos observados sobre la actividad enzimática y peroxidación lipídica hepática así como la interrelación entre ellos.



**Figura 9. Efectos observados sobre la actividad enzimática en el hígado de rata debido a las dietas experimentales; en negrita las enzimas analizadas, en cursiva los grupos experimentales que presentaron un efecto más prominente. El grupo AG presentó un incremento en la actividad de SOD y GPX, lo cual pudo haber sido mediado por un incremento en la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos libres, lo cual genera anión superóxido ( $O_2^-$ ) y  $H_2O_2$ , los cuales son los sustratos de la SOD y GPX respectivamente. La actividad de SOD fue suprimida en el grupo AG+PN, lo cual se puede deber a la neutralización directa del  $O_2^-$  por medio de los polifenoles, o bien, otro mecanismo adicional. El aumento en la actividad de CAT por en el grupo AG+NC puede haber ocurrido por la activación del factor Nrf2 o por otro mecanismo adicional, este grupo también tuvo un aumento menor sobre GPX, ya sea por el aumento en CAT que elimina el sustrato de GPX ( $H_2O_2$ ) o por mecanismos adicionales. El grupo AG+NC aumentó la actividad de GST a través del factor Nrf2 o por otros mecanismos adicionales. Estos efectos sobre el sistema antioxidante permitieron distinguir que la peroxidación lipídica fuera superior en el grupo AG e inferior en el grupo AG+NC (no incluido en la figura).**

Las actividades de las enzimas antioxidantes en el corazón presentaron un comportamiento diferente a lo observado en el hígado, lo cual resulta interesante ya que se demuestra que el efecto de una molécula en un órgano será diferente al que se ejerza en otro debido a diferencias inherentes entre cada uno. La actividad de CAT fue menor en el grupo AG, mientras que AG+PN y AG+NC mantuvieron la actividad de CAT en valores similares a los del control. Esto sugiere que los compuestos polifenólicos y otros presentes en la nuez fueron capaces de prevenir la inhibición que la dieta AG ejerció sobre esta enzima. En la actividad de las demás enzimas se mantuvo una tendencia diferente a la de CAT; en SOD se disminuyó la actividad en el grupo AG+AN y AG+NC, sugiriéndose que en el corazón fue el aceite de nuez y no los polifenoles los que ejercieron un mayor efecto sobre SOD y posiblemente sobre las ROS. La actividad de GPX mostró una clara tendencia hacia la disminución con las fracciones de nuez y aún mayor con la nuez completa, lo cual es indicio de una neutralización de ROS en estas dietas. La actividad de GST fue superior en el grupo AG+PN y menor en AG, destacándose así el papel importante de los compuestos polifenólicos sobre la actividad de esta enzima. Se ha demostrado que los polifenoles catequina y proantocianidina B4 extraídos de la semilla de uva son capaces de estimular la actividad de GST (y sin modificar la de GPX) en cardiomiocitos ejerciendo así un efecto cardioprotector (Du, Guo, & Lou, 2007). Es posible que en este estudio haya ocurrido un efecto similar incluso debido a los mismos compuestos, ya que en la nuez también se encuentran catequina y proantocianidinas (Laura A. de la Rosa *et al.*, 2014). Otro estudio señala que en particular el resveratrol es capaz de inducir la actividad no sólo de GST sino también de CAT y algunas otras, igualmente ejerciendo un efecto cardioprotector (Li, Cao, & Zhu, 2006). De acuerdo con esta información se puede apreciar que los compuestos presentes en la nuez, y en particular los polifenoles, son capaces de ejercer un efecto cardioprotector al estimular la actividad de GST y evitar la generación de ROS. La peroxidación lipídica se vio disminuida en los grupos AG+AN, AG+PN y AG+NC, lo cual señala que la nuez y sus fracciones, y en particular los polifenoles, fueron capaces de neutralizar moléculas oxidantes antes de que estas llevaran a cabo reacciones de peroxidación en los lípidos cardiacos. Estos resultados en

conjunto con reportes previos destacan el papel de los polifenoles al ejercer un efecto cardioprotector a través de la estimulación de la actividad de GST y la disminución en la peroxidación lipídica.

En general los efectos sobre la actividad de las enzimas antioxidantes y peroxidación lipídica indican que la respuesta antioxidante de las ratas fue estimulada por la generación aumentada de moléculas oxidantes cuando consumieron dietas AG, mientras que los compuestos presentes en la nuez (polifenólicos en particular) ejercieron una protección al hígado y al corazón. El grupo AG+NC tuvo mayor actividad sobre el hígado, mientras que el grupo AG+PN la tuvo en el corazón.

## **9 CONCLUSIÓN**

Se caracterizaron compuestos fitoquímicos presentes en el aceite de nuez *C. illinoensis* de tres regiones del Norte de México, encontrándose diferencias estadísticas entre región. Esta caracterización permitió determinar la actividad biológica del aceite y compararla con la de los polifenoles de nuez y la nuez completa. En general los efectos de la nuez completa no pueden ser duplicados por ninguna de sus fracciones administradas de forma independiente.

## **10 ANEXOS**

**A.** Ingredientes utilizados para la elaboración de las dietas experimentales. Como fuente de almidón se utilizó maizena (Unilever), de sacarosa se utilizó azúcar glas (Great Value), de grasa animal se utilizó manteca (Inca), de aceite de maíz se utilizó aceite marca Dorasol; estos ingredientes fueron comprados en tiendas locales de autoservicio. La caseína (1100), mezcla de vitaminas AIN-76A (F8000), mezcla de minerales AIN-76 (F8505), celulosa (3425) y cloruro de colina (6105) fueron de marca Bio-Serv y de grado alimenticio. Los contenidos de proteína, lípidos, carbohidratos, humedad y ceniza de los ingredientes fueron previamente determinados y utilizados aquí para una mayor exactitud en la determinación del aporte energético de proteína, lípidos y carbohidratos.

A1. Ingredientes utilizados para la elaboración de la dieta consumida por el grupo control

Ingrediente	% Ingrediente	Proteína (g)	Lípidos (g)	Carbohidratos (g)	Humedad (g)	Cenizas (g)	Calorías
Almidón	52.00	1.30		464.05	53.77	0.88	1861.39
Sacarosa	5.00			49.91	0.09		199.64
Grasa animal	5.00		50.00				450.00
Aceite de maíz	5.00		50.00				450.00
Caseína	17.00	134.16	0.71	19.45	13.46	2.21	620.87
Vitaminas	1.80				0.08	0.16	
Minerales	6.00				0.18	41.73	
Celulosa	6.00				3.22	0.07	
Colina	0.20						
Agua	2.00				20.00		
Total	100.00	135.46	100.71	533.41	90.80	45.06	3581.91
% peso		13.55	10.07	53.34	9.08	4.51	
% calorías		15.13	25.31	59.57			
kcal/g							3.58

A2. Ingredientes utilizados para la elaboración de la dieta consumida por el grupo AG

Ingrediente	% Ingrediente	Proteína (g)	Lípidos (g)	Carbohidratos (g)	Humedad (g)	Cenizas (g)	Calorías
Almidón	30.00	0.75		267.72	31.02	0.51	1073.88
Sacarosa	5.00			49.91	0.09		199.64
Grasa animal	13.75		137.50				1237.50
Aceite de maíz	13.75		137.50				1237.50
Caseína	21.50	169.68	0.90	24.60	17.03	2.80	785.22
Vitaminas	1.80				0.08	0.16	
Minerales	6.00				0.18	41.73	
Celulosa	6.00				3.22	0.07	
Colina	0.20						
Agua	2.00				20.00		
Total	100.00	170.43	275.90	342.23	71.61	45.27	4533.74
% peso		17.04	27.59	34.22	7.16	4.53	
% calorías		15.04	54.77	30.19			
kcal/g							4.53

A3. Ingredientes utilizados para la elaboración de la dieta consumida por el grupo AG+AN

Ingrediente	% Ingrediente	Proteína (g)	Lípidos (g)	Carbohidratos (g)	Humedad (g)	Cenizas (g)	Calorías
Almidón	30.00	0.75		267.72	31.02	0.51	1073.88
Sacarosa	5.00			49.91	0.09		199.64
Grasa animal	6.88		68.75				618.75
Aceite de maíz	6.88		68.75				618.75
Aceite de nuez	13.75		137.50				1237.50
Caseína	21.50	169.68	0.90	24.60	17.03	2.80	785.22
Vitaminas	1.80				0.08	0.16	
Minerales	6.00				0.18	41.73	
Celulosa	6.00				3.22	0.07	
Colina	0.20						
Agua	2.00				20.00		
Total	100.00	170.43	275.90	342.23	71.61	45.27	4533.74
% peso		17.04	27.59	34.22	7.16	4.53	
% calorías		15.04	54.77	30.19			
kcal/g							4.53

A4. Ingredientes utilizados para la elaboración de la dieta consumida por el grupo AG+PN

Ingrediente	% Ingrediente	Proteína (g)	Lípidos (g)	Carbohidratos (g)	Humedad (g)	Cenizas (g)	Calorías
Almidón	30.00	0.75		267.72	31.02	0.51	1073.88
Sacarosa	5.00			49.91	0.09		199.64
Grasa animal	13.75		137.50				1237.50
Aceite de maíz	13.75		137.50				1237.50
Polifenoles	0.10						
Caseína	21.50	169.68	0.90	24.60	17.03	2.80	785.22
Vitaminas	1.80				0.08	0.16	
Minerales	6.00				0.18	41.73	
Celulosa	6.00				3.22	0.07	
Colina	0.20						
Agua	1.90				19.00		
Total	100.00	170.43	275.90	342.23	70.61	45.27	4533.74
% peso		17.04	27.59	34.22	7.06	4.53	
% calorías		15.04	54.77	30.19			
kcal/g							4.53

A5. Ingredientes utilizados para la elaboración de la dieta consumida por el grupo AG+NC

Ingrediente	% Ingrediente	Proteína (g)	Lípidos (g)	Carbohidratos (g)	Humedad (g)	Cenizas (g)	Calorías
Almidón	30.00	0.75		267.72	31.02	0.51	1073.88
Sacarosa	5.00			49.91	0.09		199.64
Grasa animal	6.30		63.00				567.00
Aceite de maíz	6.30		63.00				567.00
Nuez	18.00	17.33	133.76	22.79	3.37	2.56	1364.31
Caseína	21.50	169.68	0.90	24.60	17.03	2.80	785.22
Vitaminas	1.80				0.08	0.16	
Minerales	6.00				0.18	41.73	
Celulosa	4.00				2.14	0.05	
Colina	0.20						
Agua	0.90				9.00		
Total	100.00	187.76	260.66	365.01	62.91	47.80	4557.05
% peso		18.78	26.07	36.50	6.29	4.78	
% calorías		16.48	51.48	32.04			
kcal/g							4.56

## 11 BIBLIOGRAFÍA

- Abidi, S. L. (2001). Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils. *Journal of Chromatography A*, 935(1-2), 173-201. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)00946-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00946-3)
- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121-126. [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Apel, K., & Hirt, H. (2004). REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Physiology*, 55(1), 373-399. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>
- Arranz, S., Cert, R., Perez-Jimenez, J., Cert, A., & Saura-Calixto, F. (2008). Comparison between free radical scavenging capacity and oxidative stability of nut oils. *Food Chemistry*, 110(4), 985-990. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.03.021>
- Arts, M. J. T. J., Dallinga, J. S., Voss, H. P., Haenen, G. R. M. M., & Bast, A. (2004). A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay. *Food Chemistry*, 88(4), 567-570. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.02.008>
- Atkinson, J., Epand, R. F., & Epand, R. M. (2008). Tocopherols and tocotrienols in membranes: a critical review. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(5), 739-764. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.11.010>
- Awad, A. B., & Fink, C. S. (2000). Phytosterols as anticancer dietary components: evidence and mechanism of action. *Journal of Nutrition*, 130(9), 2127-2130.
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191-203. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>
- Berryman, C. E., Preston, A. G., Karmally, W., Deckelbaum, R. J., & Kris-Etherton, P. M. (2011). Effects of almond consumption on the reduction of LDL-cholesterol: a discussion of potential mechanisms and future research directions. *Nutrition Reviews*, 69(4), 171-185. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1753-4887.2011.00383.x>
- Botolin, D., Wang, Y., Christian, B., & Jump, D. B. (2006). Docosahexaenoic acid (22:6,n-3) regulates rat hepatocyte SREBP-1 nuclear abundance by Erk- and 26S proteasome-dependent pathways. *Journal of Lipid Research*, 47(1), 181-192. <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.M500365-JLR200>
- Bouayed, J., & Bohn, T. (2010). Exogenous antioxidants - Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3(4), 228-237. <http://dx.doi.org/10.4161/oxim.3.4.12858>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Burmeister, C., Luersen, K., Heinick, A., Hussein, A., Domagalski, M., Walter, R. D., & Liebau, E. (2008). Oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*:

- protective effects of the Omega class glutathione transferase (GSTO-1). *FASEB Journal*, 22(2), 343-354. <http://dx.doi.org/10.1096/fj.06-7426com>
- Cagen, L. M., Deng, X., Wilcox, H. G., Park, E. A., Raghov, R., & Elam, M. B. (2005). Insulin activates the rat sterol-regulatory-element-binding protein 1c (SREBP-1c) promoter through the combinatorial actions of SREBP, LXR, Sp-1 and NF-Y cis-acting elements. *Biochemical Journal*, 385(1), 207-216. <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20040162>
- Calkin, A. C., & Tontonoz, P. (2012). Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 13(4), 213-224. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3312>
- Casas-Agustench, P., Lopez-Uriarte, P., Bullo, M., Ros, E., Cabre-Vila, J. J., & Salas-Salvado, J. (2009). Effects of one serving of mixed nuts on serum lipids, insulin resistance and inflammatory markers in patients with the metabolic syndrome. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.numecd.2009.08.005>
- Chen, C. Y., & Blumberg, J. B. (2008). Phytochemical composition of nuts. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 17 Suppl 1, 329-332.
- Chun, J., Lee, J., Ye, L., & Eitenmiller, R. R. (2002). Effects of Variety and Crop Year on Tocopherols in Pecans. *Journal Of Food Science*, 67(4), 1356-1359. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb10288.x>
- Cortes, B., Nunez, I., Cofan, M., Gilabert, R., Perez-Heras, A., Casals, E., . . . Ros, E. (2006). Acute effects of high-fat meals enriched with walnuts or olive oil on postprandial endothelial function. *Journal of The American College of Cardiology*, 48(8), 1666-1671. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2006.06.057>
- de Bock, M., Derraik, J. G. B., & Cutfield, W. S. (2012). Polyphenols and Glucose Homeostasis in Humans. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 112(6), 808-815. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jand.2012.01.018>
- De Graaf, J., De Sauvage Nolting, P. R., Van Dam, M., Belsey, E. M., Kastelein, J. J., Haydn Pritchard, P., & Stalenhoef, A. F. (2002). Consumption of tall oil-derived phytosterols in a chocolate matrix significantly decreases plasma total and low-density lipoprotein-cholesterol levels. *British Journal of Nutrition*, 88(5), 479-488. <http://dx.doi.org/10.1079/bjn2002690>
- de la Rosa, L. A., Alvarez-Parrilla, E., & Shahidi, F. (2011). Phenolic compounds and antioxidant activity of kernels and shells of Mexican pecan (*Carya illinoensis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(1), 152-162. <http://dx.doi.org/10.1021/jf1034306>
- de la Rosa, L. A., Vazquez-Flores, A. A., Alvarez-Parrilla, E., Rodrigo-García, J., Medina-Campos, O. N., Ávila-Nava, A., . . . Pedraza-Chaverri, J. (2014). Content of major classes of polyphenolic compounds, antioxidant, antiproliferative, and cell protective activity of pecan crude extracts and their fractions. *Journal of Functional Foods*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2014.02.008>
- Delgado-Zamarreno, M. M., Bustamante-Rangel, M., Martinez-Pelarda, D., & Carabias-Martinez, R. (2009). Analysis of beta-sitosterol in seeds and nuts using pressurized liquid extraction and liquid chromatography. *Analytical Sciences*, 25(6), 765-768. <http://dx.doi.org/10.2116/analsci.25.765>

- Devaraj, S., & Jialal, I. (2006). The role of dietary supplementation with plant sterols and stanols in the prevention of cardiovascular disease. *Nutrition Reviews*, 64(7 Pt 1), 348-354. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1753-4887.2006.tb00219.x>
- Dietrich, M., Traber, M. G., Jacques, P. F., Cross, C. E., Hu, Y., & Block, G. (2006). Does gamma-tocopherol play a role in the primary prevention of heart disease and cancer? A review. *Journal of The American College of Nutrition*, 25(4), 292-299.
- Do, G. M., Oh, H. Y., Kwon, E. Y., Cho, Y. Y., Shin, S. K., Park, H. J., . . . Choi, M. S. (2011). Long-term adaptation of global transcription and metabolism in the liver of high-fat diet-fed C57BL/6J mice. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55, S173-S185. <http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.201100064>
- Doak, C. M., Visscher, T. L., Renders, C. M., & Seidell, J. C. (2006). The prevention of overweight and obesity in children and adolescents: a review of interventions and programmes. *Obesity Reviews*, 7(1), 111-136. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1467-789X.2006.00234.x>
- Donkin, J. J., Stukas, S., Hirsch-Reinshagen, V., Namjoshi, D., Wilkinson, A., May, S., . . . Wellington, C. L. (2010). ATP-binding Cassette Transporter A1 Mediates the Beneficial Effects of the Liver X Receptor Agonist GW3965 on Object Recognition Memory and Amyloid Burden in Amyloid Precursor Protein/Presenilin 1 Mice. *Journal of Biological Chemistry*, 285(44), 34144-34154. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.108100>
- Du, Y., Guo, H. F., & Lou, H. X. (2007). Grape seed polyphenols protect cardiac cells from apoptosis via induction of endogenous antioxidant enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(5), 1695-1701. <http://dx.doi.org/10.1021/Jf063071b>
- Farras, M., Valls, R. M., Fernandez-Castillejo, S., Giralt, M., Sola, R., Subirana, I., . . . Fito, M. (2013). Olive oil polyphenols enhance the expression of cholesterol efflux related genes in vivo in humans. A randomized controlled trial. *Journal of Nutrition Biochemistry*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.10.008>
- FDA. (2003, April 18 2013). Qualified Health Claims: Letter of Enforcement Discretion - Nuts and Coronary Heart Disease (Docket No 02P-0505). 2014, from <http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/LabelingNutrition/ucm072926.htm>
- Fievet, C., & Staels, B. (2009). Liver X receptor modulators: Effects on lipid metabolism and potential use in the treatment of atherosclerosis. *Biochemical Pharmacology*, 77(8), 1316-1327. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2008.11.026>
- Friedewald, W. T., Levy, R. I., & Fredrickson, D. S. (1972). Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry*, 18(6), 499-502.
- Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., . . . Shimomura, I. (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact

- on metabolic syndrome. *Journal of Clinical Investigation*, 114(12), 1752-1761. <http://dx.doi.org/10.1172/jci21625>
- Gao, R., Yuan, Z., Zhao, Z., & Gao, X. (1998). Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 45(1), 41-45. [http://dx.doi.org/10.1016/s0302-4598\(98\)00072-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0302-4598(98)00072-5)
- Ghanim, H., Sia, C. L., Korzeniewski, K., Lohano, T., Abuaysheh, S., Marumganti, A., . . . Dandona, P. (2011). A Resveratrol and Polyphenol Preparation Suppresses Oxidative and Inflammatory Stress Response to a High-Fat, High-Carbohydrate Meal. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 96(5), 1409-1414. <http://dx.doi.org/10.1210/Jc.2010-1812>
- Gliszczynska-Swiglo, A., & Sikorska, E. (2004). Simple reversed-phase liquid chromatography method for determination of tocopherols in edible plant oils. *Journal of Chromatography A*, 1048(2), 195-198. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2004.07.051>
- Habig, W. H., & Jakoby, W. B. (1981). Glutathione S-transferases (rat and human). *Methods in Enzymology*, 77, 218-231. [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(81\)77029-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(81)77029-0)
- Haddad, E., Jambazian, P., Karunia, M., Tanzman, J., & Sabaté, J. (2006). A pecan-enriched diet increases  $\gamma$ -tocopherol/cholesterol and decreases thiobarbituric acid reactive substances in plasma of adults. *Nutrition Research*, 26(8), 397-402. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nutres.2006.06.022>
- Halliwell, B. (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. *Journal of Neurochemistry*, 59(5), 1609-1623. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.1992.tb10990.x>
- Halliwell, B., Rafter, J., & Jenner, A. (2005). Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? *American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1 Suppl), 268S-276S.
- Houck, K. A., Borchert, K. M., Hepler, C. D., Thomas, J. S., Bramlett, K. S., Michael, L. F., & Burris, T. P. (2004). T0901317 is a dual LXR/FXR agonist. *Molecular Genetics and Metabolism*, 83(1-2), 184-187. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2004.07.007>
- Hovenkamp, E., Demonty, I., Plat, J., Lutjohann, D., Mensink, R. P., & Trautwein, E. A. (2008). Biological effects of oxidized phytosterols: a review of the current knowledge. *Progress in Lipid Research*, 47(1), 37-49. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plipres.2007.10.001>
- Hsu, C. L., & Yen, G. C. (2007). Effect of gallic acid on high fat diet-induced dyslipidaemia, hepatosteatosis and oxidative stress in rats. *British Journal of Nutrition*, 98(4), 727-735. <http://dx.doi.org/10.1017/S000711450774686x>
- Ikeda, I., Yamahira, T., Kato, M., & Ishikawa, A. (2010). Black-tea polyphenols decrease micellar solubility of cholesterol in vitro and intestinal absorption of cholesterol in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(15), 8591-8595. <http://dx.doi.org/10.1021/jf1015285>
- Jean-Louis Bresson, A. F., Marina Heinonen, Karin Hulshof, Hannu Korhonen, Pagona Lagiou, Martinus Løvik, Rosangela Marchelli, Ambroise Martin,

- Bevan Moseley, Andreu Palou, Hildegard Przyrembel, Seppo Salminen, Sean (J.J.) Strain, Stephan Strobel, Inge Tetens, Henk van den Berg, Hendrik van Loveren and Hans Verhagen. (2008). Scientific Opinion of the Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies on a request from Unilever PLC/NV on Plant Sterols and lower/reduced blood cholesterol, reduced the risk of (coronary) heart disease. *European Food Safety Authority Journal*, 6(8), 1-12.
- Jenkins, D. J., Kendall, C. W., Marchie, A., Parker, T. L., Connelly, P. W., Qian, W., . . . Spiller, G. A. (2002). Dose response of almonds on coronary heart disease risk factors: blood lipids, oxidized low-density lipoproteins, lipoprotein(a), homocysteine, and pulmonary nitric oxide: a randomized, controlled, crossover trial. *Circulation*, 106(11), 1327-1332. <http://dx.doi.org/10.1161/01.CIR.0000028421.91733.20>
- Jiang, R., Jacobs, D. R., Jr., Mayer-Davis, E., Szklo, M., Herrington, D., Jenny, N. S., . . . Barr, R. G. (2006). Nut and seed consumption and inflammatory markers in the multi-ethnic study of atherosclerosis. *American Journal of Epidemiology*, 163(3), 222-231. <http://dx.doi.org/10.1093/aje/kwj033>
- Jones, P. J. H., Jew, S., & AbuMweis, S. (2008). The effect of dietary oleic, linoleic, and linolenic acids on fat oxidation and energy expenditure in healthy men. *Metabolism*, 57(9), 1198-1203. <http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2008.04.012>
- Kadowaki, T., Yamauchi, T., Kubota, N., Hara, K., Ueki, K., & Tobe, K. (2006). Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *Journal of Clinical Investigation*, 116(7), 1784-1792. <http://dx.doi.org/10.1172/Jci29126>
- Kensler, T. W., Wakabayashi, N., & Biswal, S. (2007). Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 47, 89-116. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141046>
- Kirpich, I. A., Gobejishvili, L. N., Bon Homme, M., Waigel, S., Cave, M., Arteel, G., . . . Deaciuc, I. V. (2011). Integrated hepatic transcriptome and proteome analysis of mice with high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 22(1), 38-45. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.11.009>
- Kornsteiner, M., Wagner, K.-H., & Elmadfa, I. (2006). Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types. *Food Chemistry*, 98(2), 381-387. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.033>
- Kowalski, B., Ostrowska-Ligeza, E., Bekas, W., Kowalska, D., Lobacz, M., & Wroniak, M. (2010). Kinetics of commercial olive oil oxidation: Dynamic differential scanning calorimetry and Rancimat studies. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(2), 268-274. <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.200900064>
- Kris-Etherton, P. M., Hu, F. B., Ros, E., & Sabate, J. (2008). The role of tree nuts and peanuts in the prevention of coronary heart disease: multiple potential mechanisms. *Journal of Nutrition*, 138(9), 1746S-1751S.

- Larsson, S. L., Skogsberg, J., & Bjorkegren, J. (2004). The low density lipoprotein receptor prevents secretion of dense ApoB100-containing lipoproteins from the liver. *Journal of Biological Chemistry*, 279(2), 831-836. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M303057200>
- Lee, Y. M., Gweon, O. C., Seo, Y. J., Im, J., Kang, M. J., Kim, M. J., & Kim, J. I. (2009). Antioxidant effect of garlic and aged black garlic in animal model of type 2 diabetes mellitus. *Nutrition Research and Practice*, 3(2), 156-161. <http://dx.doi.org/10.4162/nrp.2009.3.2.156>
- Li, Y., Cao, Z., & Zhu, H. (2006). Upregulation of endogenous antioxidants and phase 2 enzymes by the red wine polyphenol, resveratrol in cultured aortic smooth muscle cells leads to cytoprotection against oxidative and electrophilic stress. *Pharmacological Research*, 53(1), 6-15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2005.08.002>
- Low, S., Chin, M. C., & Deurenberg-Yap, M. (2009). Review on epidemic of obesity. *Annals Academy of Medicine Singapore*, 38(1), 57-59.
- Lugasi, A. (2009). [Foods fortified with phytosterins: their role in decreasing serum cholesterol level, their European Community authorization and requirements for placing them on the market]. *Orvosi Hetilap*, 150(11), 483-496. <http://dx.doi.org/10.1556/oh.2009.28572>
- Maeda, H., & DellaPenna, D. (2007). Tocopherol functions in photosynthetic organisms. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(3), 260-265. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2007.04.006>
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., & Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727-747.
- Marshall, J. A., Bessesen, D. H., & Hamman, R. F. (1997). High saturated fat and low starch and fibre are associated with hyperinsulinaemia in a non-diabetic population: the San Luis Valley Diabetes Study. *Diabetologia*, 40(4), 430-438. <http://dx.doi.org/10.1007/s001250050697>
- Maynard, M., Gunnell, D., Emmett, P., Frankel, S., & Davey Smith, G. (2003). Fruit, vegetables, and antioxidants in childhood and risk of adult cancer: the Boyd Orr cohort. *Journal of Epidemiology and Community Health*, 57(3), 218-225. <http://dx.doi.org/10.1136%2Fjech.57.3.218>
- Miraliakbari, H., & Shahidi, F. (2008). Oxidative stability of tree nut oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(12), 4751-4759. <http://dx.doi.org/10.1021/jf8000982>
- Misir, R., Laarveld, B., & Blair, R. (1985). Evaluation of a rapid method for preparation of fatty acid methyl esters for analysis by gas-liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 331(1), 141-148. [http://dx.doi.org/10.1016/0021-9673\(85\)80015-7](http://dx.doi.org/10.1016/0021-9673(85)80015-7)
- Molan, A. L., Lila, M. A., & Mawson, J. (2008). Satiety in rats following blueberry extract consumption induced by appetite-suppressing mechanisms unrelated to in vitro or in vivo antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 107(3), 1039-1044. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.09.018>
- Moreau, R. A., Whitaker, B. D., & Hicks, K. B. (2002). Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and

- health-promoting uses. *Progress in Lipid Research*, 41(6), 457-500. [http://dx.doi.org/10.1016/S0163-7827\(02\)00006-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0163-7827(02)00006-1)
- Morris, M. C., Evans, D. A., Tangney, C. C., Bienias, J. L., Wilson, R. S., Aggarwal, N. T., & Scherr, P. A. (2005). Relation of the tocopherol forms to incident Alzheimer disease and to cognitive change. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81(2), 508-514.
- Mukuddem-Petersen, J., Oosthuizen, W., & Jerling, J. C. (2005). A systematic review of the effects of nuts on blood lipid profiles in humans. *Journal of Nutrition*, 135(9), 2082-2089.
- Muniyappa, R., Lee, S., Chen, H., & Quon, M. J. (2008). Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 294(1), E15-E26. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00645.2007>
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417(1), 1-13. <http://dx.doi.org/10.1042/bj20081386>
- Noeman, S. A., Hamooda, H. E., & Baalash, A. A. (2011). Biochemical study of oxidative stress markers in the liver, kidney and heart of high fat diet induced obesity in rats. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 3(1), 17. <http://dx.doi.org/10.1186/1758-5996-3-17>
- Ogden, C. L., Carroll, M. D., Curtin, L. R., McDowell, M. A., Tabak, C. J., & Flegal, K. M. (2006). Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999-2004. *Journal of The American Medical Association*, 295(13), 1549-1555. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.295.13.1549>
- Okada, S., Kozuka, C., Masuzaki, H., Yasue, S., Ishii-Yonemoto, T., Tanaka, T., . . . Nakao, K. (2010). Adipose tissue-specific dysregulation of angiotensinogen by oxidative stress in obesity. *Metabolism*, 59(9), 1241-1251. <http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2009.11.016>
- Olofsson, S. O., Stillemark-Billton, P., & Asp, L. (2000). Intracellular assembly of VLDL - Two major steps in separate cell compartments. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 10(8), 338-345. [http://dx.doi.org/10.1016/S1050-1738\(01\)00071-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1050-1738(01)00071-8)
- Olshansky, S. J., Passaro, D. J., Hershow, R. C., Layden, J., Carnes, B. A., Brody, J., . . . Ludwig, D. S. (2005). A potential decline in life expectancy in the United States in the 21st century. *New England Journal of Medicine*, 352(11), 1138-1145. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMSr043743>
- Owen, R. W., Giacosa, A., Hull, W. E., Haubner, R., Spiegelhalter, B., & Bartsch, H. (2000). The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *European Journal of Cancer*, 36(10), 1235-1247. [http://dx.doi.org/10.1016/S0959-8049\(00\)00103-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0959-8049(00)00103-9)
- Pearce, B. C., Parker, R. A., Deason, M. E., Qureshi, A. A., & Wright, J. J. (1992). Hypocholesterolemic activity of synthetic and natural tocotrienols. *Journal of Medicinal Chemistry*, 35(20), 3595-3606. <http://dx.doi.org/10.1021/jm00098a002>
- Pereira, T. A., & Das, N. P. (1990). The effects of flavonoids on the thermal autoxidation of palm oil and other vegetable oils determined by differential

- scanning calorimetry. *Thermochimica Acta*, 165(1), 129-137.  
[http://dx.doi.org/10.1016/0040-6031\(90\)80212-h](http://dx.doi.org/10.1016/0040-6031(90)80212-h)
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29(9), e45.  
<http://dx.doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Plumb, J. A., Rhodes, M. J. C., Lampi, A. M., Buchgraber, M., & Kroon, P. A. (2011). Phytosterols in plant foods: Exploring contents, data distribution and aggregated values using an online bioactives database. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(7), 1024-1031.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2010.10.007>
- Prado, A. C. P. d., Aragão, A. M., Fett, R., & Block, J. M. (2009a). Antioxidant Properties of Pecan Nut [ *Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch] Shell Infusion%B 2009. *Grasas y Aceites*, 60(4), 330-335.  
<http://dx.doi.org/10.3989/gya.107708>
- Prado, A. C. P. d., Aragão, A. M., Fett, R., & Block, J. M. (2009b). Phenolic compounds and antioxidant activity of Pecan [ *Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch] kernel cake extracts obtained by sequential extraction%B 2009. *Grasas y Aceites*, 60(5), 458-467.  
<http://dx.doi.org/10.3989/gya.129708>
- Reisman, S. A., Yeager, R. L., Yamamoto, M., & Klaassen, C. D. (2009). Increased Nrf2 Activation in Livers from Keap1-Knockdown Mice Increases Expression of Cytoprotective Genes that Detoxify Electrophiles more than those that Detoxify Reactive Oxygen Species. *Toxicological Sciences*, 108(1), 35-47.  
<http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfn267>
- Reiterer, G., Toborek, M., & Hennig, B. (2004). Quercetin protects against linoleic acid-induced porcine endothelial cell dysfunction. *Journal of Nutrition*, 134(4), 771-775.
- Rimbach, G., Minihane, A. M., Majewicz, J., Fischer, A., Pallauf, J., Virgli, F., & Weinberg, P. D. (2002). Regulation of cell signalling by vitamin E. *Proceedings of the Nutrition Society*, 61(4), 415-425.  
<http://dx.doi.org/10.1079/PNS2002183>
- Rivera, J. A., Barquera, S., Campirano, F., Campos, I., Safdie, M., & Tovar, V. (2002). Epidemiological and nutritional transition in Mexico: rapid increase of non-communicable chronic diseases and obesity. *Public Health Nutrition*, 5(1A), 113-122. <http://dx.doi.org/10.1079/phn2001282>
- Roberfroid, M. B. (2000). Concepts and strategy of functional food science: the European perspective. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71(6 Suppl), 1660S-1664S; discussion 1674S-1665S.
- Rochfort, S., & Panozzo, J. (2007). Phytochemicals for health, the role of pulses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(20), 7981-7994.  
<http://dx.doi.org/10.1021/jf071704w>
- Rodas Mendoza, B., Morera Pons, S., Castellote Bargallo, A. I., & Lopez-Sabater, M. C. (2003). Rapid determination by reversed-phase high-performance liquid chromatography of Vitamins A and E in infant formulas. *Journal of Chromatography A*, 1018(2), 197-202.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2003.08.018>

- Ronald, R. E., & Ronald, B. P. (2008). Compositional Characteristics and Health Effects of Pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] *Tree Nuts*: CRC Press.
- Ros, E., & Mataix, J. (2006). Fatty acid composition of nuts--implications for cardiovascular health. *British Journal of Nutrition*, 96 Suppl 2, S29-35. <http://dx.doi.org/10.1017/BJN20061861>
- SAGARPA. (2010). NUEZ MEXICANA. 2012, from <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/infografias/Paginas/nuez.aspx>
- SAGARPA. (2011). NUEZ. 2012, from <http://www.sagarpa.gob.mx/agricultura/productodetemporada/Paginas/Nuez.aspx>
- Saito, Y., Kita, T., Mabuchi, H., Matsuzaki, M., Matsuzawa, Y., Nakaya, N., . . . Itakura, H. (2010). Obesity as a risk factor for coronary events in Japanese patients with hypercholesterolemia on low-dose simvastatin therapy. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 17(3), 270-277. <http://dx.doi.org/10.5551/jat.2782>
- Samane, S., Christon, R., Dombrowski, L., Turcotte, S., Charrouf, Z., Lavigne, C., . . . Haddad, P. S. (2009). Fish oil and argan oil intake differently modulate insulin resistance and glucose intolerance in a rat model of dietary-induced obesity. *Metabolism*, 58(7), 909-919. <http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2009.02.013>
- Scapagnini, G., Vasto, S., Abraham, N. G., Caruso, C., Zella, D., & Fabio, G. (2011). Modulation of Nrf2/ARE pathway by food polyphenols: a nutritional neuroprotective strategy for cognitive and neurodegenerative disorders. *Molecular Neurobiology*, 44(2), 192-201. <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-011-8181-5>
- Scarpace, P. J., & Zhang, Y. (2009). Leptin resistance: a predisposing factor for diet-induced obesity. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 296(3), R493-R500. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.90669.2008>
- Schwarz, K., Bertelsen, G., Nissen, L. R., Gardner, P. T., Heinonen, M. I., Hopia, A., . . . Tijburg, L. (2001). Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. *European Food Research and Technology*, 212(3), 319-328. <http://dx.doi.org/10.1007/s002170000256>
- Segura, R., Javierre, C., Lizarraga, M. A., & Ros, E. (2006). Other relevant components of nuts: phytosterols, folate and minerals. *British Journal of Nutrition*, 96 Suppl 2, S36-44. <http://dx.doi.org/10.1017/BJN20061862>
- Sen, C. K., Khanna, S., & Roy, S. (2006). Tocotrienols: Vitamin E beyond tocopherols. *Life Sciences*, 78(18), 2088-2098. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2005.12.001>
- Shahidi, F., & Miraliakbari, H. (2008). Antioxidant activity of minor components of tree nut oils. *Food Chemistry*, 111(2), 421-427. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.04.008>

- Shearer, G. C., Savinova, O. V., & Harris, W. S. (2012). Fish oil — How does it reduce plasma triglycerides? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1821(5), 843-851. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2011.10.011>
- St-Onge, M. P. (2005). Dietary fats, teas, dairy, and nuts: potential functional foods for weight control? *American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 7-15.
- Sundaram, M., & Yao, Z. M. (2010). Recent progress in understanding protein and lipid factors affecting hepatic VLDL assembly and secretion. *Nutrition & Metabolism*, 7(35), 1-17. <http://dx.doi.org/10.1186/1743-7075-7-35>
- Sweeney, G. (2002). Leptin signalling. *Cellular Signaling*, 14(8), 655-663. [http://dx.doi.org/10.1016/S0898-6568\(02\)00006-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0898-6568(02)00006-2)
- Terevinto, A., Ramos, A., Castroman, G., Cabrera, M. C., & Saadoun, A. (2010). Oxidative status, in vitro iron-induced lipid oxidation and superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in rhea meat. *Meat Science*, 84(4), 706-710. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.11.007>
- Toivo, J., Phillips, K., Lampi, A.-M., & Piironen, V. (2001). Determination of Sterols in Foods: Recovery of Free, Esterified, and Glycosidic Sterols. *Journal of Food Composition and Analysis*, 14(6), 631-643. <http://dx.doi.org/10.1006/jfca.2001.1019>
- Torabian, S., Haddad, E., Rajaram, S., Banta, J., & Sabate, J. (2009). Acute effect of nut consumption on plasma total polyphenols, antioxidant capacity and lipid peroxidation. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 22(1), 64-71. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-277X.2008.00923.x>
- Toro-Vazquez, J. F., & Pérez-Briceño, F. (1998). CHEMICAL AND PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERISTICS OF PECAN (CARYA ILLINOENSIS) OIL NATIVE OF THE CENTRAL REGION OF MEXICO. *Journal of Food Lipids*, 5(3), 211-231. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4522.1998.tb00121.x>
- Townsend, D. M., & Tew, K. D. (2003). The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*, 22(47), 7369-7375. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1206940>
- Turkseven, S., Kruger, A., Mingone, C. J., Kaminski, P., Inaba, M., Rodella, L. F., . . . Abraham, N. G. (2005). Antioxidant mechanism of heme oxygenase-1 involves an increase in superoxide dismutase and catalase in experimental diabetes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 289(2), H701-707. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00024.2005>
- Twisk, J., Gillian-Daniel, D. L., Tebon, A., Wang, L., Barrett, P. H. R., & Attie, A. D. (2000). The role of the LDL receptor in apolipoprotein B secretion. *Journal of Clinical Investigation*, 105(4), 521-532. <http://dx.doi.org/10.1172/Jci8623>
- Ukkola, O., & Santaniemi, M. (2002). Adiponectin: a link between excess adiposity and associated comorbidities? *Journal of Molecular Medicine*, 80(11), 696-702. <http://dx.doi.org/10.1007/s00109-002-0378-7>
- Ulkowski, M., Musialik, M., & Litwinienko, G. (2005). Use of Differential Scanning Calorimetry To Study Lipid Oxidation. 1. Oxidative Stability of Lecithin and

- Linolenic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(23), 9073-9077. <http://dx.doi.org/10.1021/jf051289c>
- van Duynhoven, J., Vaughan, E. E., D, M. J., R, A. K., van Velzen, E. J., Gross, G., . . . Van de Wiele, T. (2010). Microbes and Health Sackler Colloquium: Metabolic fate of polyphenols in the human superorganism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1000098107>
- Vega, G. L., & Grundy, S. M. (2013). Metabolic Risk Susceptibility in Men Is Partially Related to Adiponectin/Leptin Ratio. *Journal of Obesity*, 2013, 9. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/409679>
- Venkatachalam, M., Kshirsagar, H. H., Seeram, N. P., Heber, D., Thompson, T. E., Roux, K. H., & Sathe, S. K. (2007). Biochemical composition and immunological comparison of select pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(24), 9899-9907. <http://dx.doi.org/10.1021/jf0714721>
- Verardo, V., Riciputi, Y., Sorrenti, G., Ornaghi, P., Marangoni, B., & Caboni, M. F. (2013). Effect of nitrogen fertilisation rates on the content of fatty acids, sterols, tocopherols and phenolic compounds, and on the oxidative stability of walnuts. *Lwt-Food Science and Technology*, 50(2), 732-738. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2012.07.018>
- Vial, G., Dubouchaud, H., Couturier, K., Cottet-Rousselle, C., Taleux, N., Athias, A., . . . Leverve, X. M. (2011). Effects of a high-fat diet on energy metabolism and ROS production in rat liver. *Journal of Hepatology*, 54(2), 348-356. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2010.06.044>
- Villarreal-Lozoya, J. E., Lombardini, L., & Cisneros-Zevallos, L. (2007). Phytochemical constituents and antioxidant capacity of different pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] cultivars. *Food Chemistry*, 102(4), 1241-1249. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.024>
- Vlahakis, C., & Hazebroek, J. (2000). Phytosterol accumulation in canola, sunflower, and soybean oils: Effects of genetics, planting location, and temperature. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77(1), 49-53. <http://dx.doi.org/10.1007/s11746-000-0008-6>
- Wang, G. P., & Xu, C. S. (2010). Reference gene selection for real-time RT-PCR in eight kinds of rat regenerating hepatic cells. *Molecular Biotechnology*, 46(1), 49-57. <http://dx.doi.org/10.1007/s12033-010-9274-5>
- Wang, Y., & Beydoun, M. A. (2007). The obesity epidemic in the United States--gender, age, socioeconomic, racial/ethnic, and geographic characteristics: a systematic review and meta-regression analysis. *Epidemiologic Reviews*, 29, 6-28. <http://dx.doi.org/10.1093/epirev/mxm007>
- Wolf, S. (2012). *Primer on the autonomic nervous system - Robertson, D, Low, PA, Polinsky, RJ* (3rd ed. Vol. 32).
- Woollett, L. A., Spady, D. K., & Dietschy, J. M. (1992). Saturated and unsaturated fatty acids independently regulate low density lipoprotein receptor activity and production rate. *Journal of Lipid Research*, 33(1), 77-88. <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.M200146-JLR200>

- Woyengo, T. A., Ramprasath, V. R., & Jones, P. J. (2009). Anticancer effects of phytosterols. *European Journal of Clinical Investigation*, 63(7), 813-820. <http://dx.doi.org/10.1038/ejcn.2009.29>
- Wyatt, C. J., Carballido, S. P., & Méndez, R. O. (1998).  $\alpha$ - and  $\gamma$ -Tocopherol Content of Selected Foods in the Mexican Diet: Effect of Cooking Losses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(11), 4657-4661. <http://dx.doi.org/10.1021/jf9800716>
- Yang, H., Chen, K., Zhang, X., Wang, L., Li, C., Tao, H., . . . Li, Q. (2010). Vitamin A deficiency results in dysregulation of lipid efflux pathway in rat kidney. *Pediatric Nephrology*, 25(8), 1435-1444. <http://dx.doi.org/10.1007/s00467-010-1532-z>
- Zhang, S., Zheng, L., Dong, D., Xu, L., Yin, L., Qi, Y., . . . Peng, J. (2013). Effects of flavonoids from *Rosa laevigata* Michx fruit against high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in rats. *Food Chemistry*, 141(3), 2108-2116. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.019>
- Zhao, C. Y., & Dahlman-Wright, K. (2010). Liver X receptor in cholesterol metabolism. *Journal of Endocrinology*, 204(3), 233-240. <http://dx.doi.org/10.1677/Joe-09-0271>

## Influence of Growing Location on the Phytochemical Content of Pecan (*Carya illinoensis*) Oil

Jesús Abraham Domínguez-Avila<sup>1,2</sup>, Emilio Alvarez-Parrilla<sup>2</sup>, Gustavo Adolfo González-Aguilar<sup>3</sup>, José Villa-Rodríguez<sup>3</sup>, Guadalupe Isela Olivas-Orozco<sup>4</sup>, Javier Molina-Corral<sup>4</sup>, María del Consuelo Gómez-García<sup>1</sup> & Laura A. de la Rosa<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Programa de Doctorado en Biotecnología. Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, Instituto Politécnico Nacional, México D. F., México

<sup>2</sup> Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Cd. Juárez, México

<sup>3</sup> Coordinación de Alimentos de Origen Vegetal, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C., Hermosillo, México

<sup>4</sup> Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C., Unidad Cuauhtémoc, Cuauhtémoc, México

Correspondence: Laura A. de la Rosa, Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Anillo Envoltante del Pronaf y Estocolmo, s-n Cd. Juárez, Chihuahua, México. Tel: 52-656-688-2100 Ext. 1563. E-mail: ldelaros@uacj.mx

Received: July 17, 2013 Accepted: August 25, 2013 Online Published: September 16, 2013

doi:10.5539/jfr.v2n5p143

URL: <http://dx.doi.org/10.5539/jfr.v2n5p143>

### Abstract

Pecan (*Carya illinoensis*) is a tree nut native to North America with high oil content. Pecan oil is rich in unsaturated fatty acids and other lipid soluble phytochemicals. Many geographical and environmental factors are responsible for the phytochemical content of the oil, and little current information exists on the properties of pecans grown in northern México. We formulated the hypothesis that pecans grown in multiple locations are exposed to different environmental conditions which alter the concentration of the phytochemicals in the oil. We characterized oil from pecans harvested in 2009 and 2010, in three different regions in northern Mexico. The content of individual fatty acids varied significantly within growing location (mainly oleic and linoleic, which were inversely related) and from year to year (mainly linolenic). Phytosterols and tocopherols also showed significant variation among locations; polyphenols were statistically similar in all samples. Oxidative stability of pecan oil, evaluated by differential scanning calorimetry, was similar to other oils with a similar content of unsaturated fatty acids. It may be concluded that the chemical composition of pecan oil is sensitive to the environment in which it is produced, but on average, the studied pecan oils were good sources of phytochemicals.

**Keywords:** nuts, unsaturated fatty acids, phytosterols, polyphenols, tocopherols, vegetable oils

### 1. Introduction

Vegetable oils, such as pecan oil, contain compounds like unsaturated fatty acids, vitamins and other phytochemicals that are considered health-promoting. It has been reported in both human trials and epidemiological studies, that pecans improve serum lipid profile, decrease thiobarbituric acid reactive substances in plasma and reduce fasting insulin levels; all of these effects can be considered cardioprotective (Casas-Agustench et al., 2011; Haddad, Jambazian, Karunia, Tanzman, & Sabaté, 2006; Mukuddem-Petersen, Oosthuizen, & Jerling, 2005; Rajaram, Burke, Connell, Myint, & Sabaté, 2001). However, some authors have pointed out that weather conditions, stress, pathogens and other factors (most of which are geographical) influence the concentration of bioactive compounds present in vegetable oils. For example, concentration of linolenic acid varies according to growing region and climatic conditions (among others) in soybean and canola oil (P. M. Kris-Etherton et al., 2000). In a previous report, we found that concentration of soluble phenolic phytochemicals was affected by the cultivation region of pecans harvested in the north of Mexico, although the effect was mostly noticeable in the nutshells (de la Rosa, Alvarez-Parrilla, & Shahidi, 2010). The concentration of lipid soluble phytochemicals in nuts grown in these regions has, to our knowledge, not been previously reported. In this study, we quantified the fatty acids, tocopherols, phytosterols and polyphenols in pecan oil



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodchem](http://www.elsevier.com/locate/foodchem)

## The pecan nut (*Carya illinoensis*) and its oil and polyphenolic fractions differentially modulate lipid metabolism and the antioxidant enzyme activities in rats fed high-fat diets

Jesús A. Domínguez-Avila<sup>a</sup>, Emilio Alvarez-Parrilla<sup>b</sup>, José A. López-Díaz<sup>b</sup>,  
Ignacio E. Maldonado-Mendoza<sup>c</sup>, María del Consuelo Gómez-García<sup>a</sup>, Laura A. de la Rosa<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Doctorado en Biotecnología, Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, Guillermo Massieu Helguera No. 239, Fracc. La Escalera, Col. Ticomán, México, DF CP 07320, Mexico

<sup>b</sup> Departamento de Ciencias Químico-Biológicas, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Anillo Envoltente del PRONAF y Estocolmo s/n, Ciudad Juárez, Chihuahua CP 32310, Mexico

<sup>c</sup> Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR)-Instituto Politécnico Nacional – Unidad Sinaloa, Blvd. Juan de Dios Bátiz Paredes No. 250, Guasave, Sinaloa 81101, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 27 March 2014  
Received in revised form 15 July 2014  
Accepted 17 July 2014  
Available online xxx

#### Keywords:

Tree nuts  
Dyslipidemia  
Liver lipids  
Oxidative stress  
Gene expression

### ABSTRACT

Tree nuts such as pecans (*Carya illinoensis*) contain mostly oil but are also a source of polyphenols. Nut consumption has been linked to a reduction in serum lipid levels and oxidative stress. These effects have been attributed to the oil while overlooking the potential contribution of the polyphenols. Because the evidence regarding each fraction's bioactivity is scarce, we administered high-fat (HF) diets to male Wistar rats, supplementing them with pecan oil (HF + PO), pecan polyphenols (HF + PP) or whole pecans (HF + WP), and analysed the effects of each fraction. The HF diet increased the serum leptin and total cholesterol (TC) with respect to the control levels. The HF + WP diet prevented hyperleptinemia and decreased the TC compared with the control. The HF + WP diet upregulated the hepatic expression of apolipoprotein B and LDL receptor mRNAs with respect to the HF levels. The HF + PO diet reduced the level of triacylglycerols compared with the control. The HF + PP diet stimulated the hepatic expression of liver X receptor alpha mRNA. The HF + WP diet increased the activities of hepatic catalase, glutathione peroxidase and glutathione S transferase compared with the control, and decreased the degree of lipid peroxidation compared with the HF diet. The most bioactive diet was the WP diet.

© 2014 Published by Elsevier Ltd.

### 1. Introduction

A high consumption of saturated lipids can exert negative health effects by contributing to the development of obesity and obesity-related conditions, such as dyslipidemia and oxidative stress (Yang, Li, Shi, & Le, 2008). Such diets can induce dyslipidemia by increasing the concentration of circulating LDL cholesterol and decreasing the concentration of HDL cholesterol. LDL has apolipoprotein B (APOB) as its main protein component, and its serum concentration is regulated by the LDL receptor (LDLR) (Twisk et al., 2000). It is therefore possible to modify the LDL cholesterol concentration by altering the expression of APOB and or LDLR. Liver X receptor alpha (LXR $\alpha$ ) is a transcription factor that is related to cholesterol homeostasis that favours the reversal of cholesterol transport that is conducted by the HDL particles (Calkin &

Tontonoz, 2012). One of its target genes is sterol regulatory-element binding protein 1c (SREBP1c), a transcription factor that can stimulate genes related to *de novo* fatty-acid synthesis (Cagen et al., 2005). Both LXR $\alpha$  and SREBP1c have also been found to be intricately related to the serum triacylglycerol (TAG) concentration (Shearer, Savinova, & Harris, 2012), which makes them likely targets of different dietary components that have an impact on serum lipids.

Oxidative stress can also occur in response to diet, in obese individuals and in many diseases (Hybertson, Gao, Bose, & McCord, 2011). The correlation between fat consumption and oxidative stress is not simple because a number of biochemical mechanisms involved in the catabolism of fatty acids yield H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as a byproduct, which in addition to increased oxygen consumption will generate other oxidant molecules, all of which can potentially damage cells if their concentrations are not maintained within a tolerable range (Seifert, Estey, Xuan, & Harper, 2010). The main enzymes responsible for the antioxidant response are catalase (CAT), superoxide

\* Corresponding author. Tel.: +52 656 688 2100x1563.  
E-mail address: [ldelaros@uacj.mx](mailto:ldelaros@uacj.mx) (L.A. de la Rosa).