



FACULTAD DE FARMACIA
ESCUELA DE QUÍMICA Y FARMACIA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE ALIMENTOS FUNCIONALES

**EFFECTO DEL CONSUMO DE PIÑÓN DE PINO (*Pinus pinea L*) EN LA
GANANCIA DE PESO Y METABOLISMO LIPÍDICO DE RATAS
ALIMENTADAS CON DIETA ALTA EN GRASA**

Tesis para optar al Título de Químico Farmacéutico

RENATO ANDRÉS AVARIA CAÑETE

Directora de Tesis: Prof. MARIANE LUTZ RIQUELME

Co-directora de Tesis: Prof. LETICIA LUNA

2017

ÍNDICE

Sección	Página
Abreviaturas	2
Resumen	3
Abstract	4
Introducción	5
Hipótesis	16
Objetivos	17
Materiales y Métodos	18
Resultados	24
Discusión	30
Conclusiones	40
Referencias	41
Anexos	50

Abreviaturas

AACC: Asociación Americana de Químicos de Cereales.

AG: Ácidos grasos.

AGMI: Ácidos grasos monoinsaturados.

AGPI: Ácidos grasos poliinsaturados.

AGS: Ácidos grasos saturados.

ANOVA: Análisis de varianza.

C: Control.

CF: Compuestos fenólicos.

CIDAF: Centro de Investigación y Desarrollo de Alimentos Funcionales.

DE: Densidad energética.

EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria.

FDA: Administración de alimentos y medicamentos de Estados Unidos.

FE: Fitoesteroles.

HF: Alta en grasa.

HFP: Alta en grasa con piñón de pino.

LDL: Lipoproteína de baja densidad.

MINSAL: Ministerio de Salud.

NO: Oxido nítrico.

TG: Triglicéridos.

USDA: Departamento de Agricultura de los Estados Unidos.

VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad.

RESUMEN

El piñón de pino es un fruto seco proveniente del pino *Pinus pinea L*, originario del área mediterránea y presente en Chile entre la región de Coquimbo y Los Lagos. Su composición nutricional es interesante debido a su alto contenido de lípidos (principalmente insaturados), proteínas, fibra, además de poseer fitoesteroles, tocoferoles y polifenoles. En este estudio se trabajó con 24 ratas macho Sprague Dawley adultas, separadas en tres grupos, alimentadas con una dieta control normograsa (C), o una dieta alta en grasa (HF) o alta en grasa adicionada de 2% de piñón de pino (HFP), durante cuatro semanas. El consumo de dietas altas en grasa fue menor respecto a C ($p < 0,05$). Asimismo, las ratas C presentaron menor ganancia ponderal que HF y HFP ($p < 0,05$). La ganancia ponderal del grupo HFP fue mayor al C ($p < 0,05$), en cambio esta fue similar en los animales que consumieron las dietas HF y HFP. En consecuencia, la dieta C tiene una menor eficiencia que las dietas HF y HFP ($p < 0,05$). La glicemia fue más alta en el grupo HF comparado con C ($p < 0,05$). La colesterolemia fue más elevada en el grupo HFP ($p < 0,05$), y más baja en el grupo C ($p < 0,05$). La trigliceridemia, el peso relativo de testículos, hígado, corazón, riñón y de grasa epididimal, retroperitoneal e inguinal fueron similares tras el consumo de dietas altas en grasa con o sin adición de piñón de pino. Los resultados indican que la adición de 2% de piñón de pino no indujo cambios significativos a nivel de los parámetros antes señalados.

ABSTRACT

Pine nut is the seed from *Pinus pinea L*, a pine tree native to the Mediterranean area and present in Chile between Coquimbo and Los Lagos. Its nutritional composition is interesting due to its high content of lipids (mainly unsaturated), proteins, and fiber. It also contains phytosterols, tocopherols, and polyphenols. In this study, 24 male Sprague Dawley rats, divided into three groups, were fed a control diet (C), or a high-fat diet without (HF) or with 2% pine nut (HFP), for four weeks. Consumption of high-fat diets was lower than C ($p < 0.05$). Likewise, rats from group C showed lower weight gain than HF and HFP animals ($p < 0.05$). Weight gain of the HFP group was higher than C ($p < 0.05$), whereas it was similar in HF and HFP groups. Consequently, C diet had lower efficiency than HF and HFP diets ($p < 0.05$). Glycemia was higher in HF rats compared to C ($p < 0.05$). Cholesterolemia was higher in group HPF ($p < 0.05$) and lower in group C ($p < 0.05$). Triglyceridemia, as well as relative weight of testes, liver, heart, kidney, epididymal fat, retroperitoneal fat and inguinal fat were similar after the intake of high fat diets with or without pine nuts. The results indicate that the addition of 2% of pine nuts did not induce significant changes at the abovementioned parameters.

INTRODUCCIÓN

Frutos secos

Los frutos secos son semillas comestibles envueltas en una cáscara dura, con un bajo contenido de agua (5 a 50%), que provienen de árboles, donde la pared del ovario se endurece al madurar formando una semilla comestible. Los más consumidos a nivel mundial son almendra (*Prunus amigdalís*), nuez de Brasil (*Bertholletia excelsa*), cajú (*Anacardium occidentale*), avellana (*Corylus avellana*), macadamia (*Macadamia integrifolia*), pecana (*Carya illinoensis*), piñón de pino (*Pinus pinea*), pistacho (*Pistachia vera*) y nuez (*Juglans regia*).

Estos alimentos se caracterizan por poseer un alto contenido de lípidos (43 – 66%), y se consideran beneficiosos debido a su alto contenido de ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) y poliinsaturados (AGPI). El contenido de proteínas es elevado (8 – 34%), además son una buena fuente de fibra (Salas-Salvadó y cols 2006; Venkatachalam y Sathe, 2006).

Propiedades saludables

A pesar de que los frutos secos tienen una alta densidad energética (DE), de 550 a 750 kcal/100 g, existen diversos mecanismos por los cuales podrían generar un efecto no promotor de la ganancia de peso corporal (Lutz y Luna 2016), que incluyen su alta relación de AG insaturados/saturados (Crescenzo y cols 2015), la capacidad de inducir saciedad (Brennan y cols 2010; Hull y cols 2015), la promoción de la termogénesis (Sabaté y cols 2005) y que sus lípidos son menos

absorbibles (Cassady y cols 2009). Bes-Rastrollo y cols (2009) observaron, en un estudio epidemiológico prospectivo de 8 años, el efecto de la suplementación de la dieta con frutos secos sobre el peso corporal. En 51.188 mujeres de 20 a 45 años, aquellas que consumían 1 porción (28 g) de frutos secos al menos 2 veces/semana tuvieron una ganancia ponderal inferior que quienes no consumieron frutos secos, además de disminuir levemente el riesgo de obesidad. Posteriormente, Martínez-González y Bes-Rastrollo (2011) analizaron los datos obtenidos de tres estudios epidemiológicos prospectivos, relacionando la frecuencia de consumo de una porción (30 g) de frutos secos y el cambio de peso a lo largo del tiempo de los participantes, concluyendo que el añadir frutos secos a una dieta habitual no aumenta el riesgo de ganar peso a lo largo del tiempo.

Asghari y cols (2017) observaron, en un estudio prospectivo de 2005 a 2014, la relación entre suplementar la dieta con frutos secos y el riesgo de contraer diabetes mellitus tipo 2. En 1.984 sujetos mayores de 20 años, aquellos que consumían más de 4 porciones (28 g) de frutos secos a la semana presentaron menos casos de diabetes mellitus tipo 2 que quienes consumían menos de 1 porción semanal. De igual manera, Pan y cols (2013), en un estudio prospectivo de 10 años, relacionaron la suplementación de la dieta con frutos secos y una disminución del riesgo de contraer diabetes mellitus tipo 2. De un total de 58.063 mujeres entre 52 y 77 años en el primer grupo y un total de 79.893 mujeres entre 35 y 52 años en el segundo grupo, aquellas que consumieron una porción (28 g)

de frutos secos 1 o 2 veces a la semana presentaron menos casos de diabetes mellitus tipo 2 que quienes consumieron raramente o nunca frutos secos.

Aune y cols (2016) relacionaron el consumo de 28 g/día de frutos secos con la disminución del riesgo relativo de una variedad de patologías y causas de muerte. En total analizaron 20 estudios prospectivos, observando que el consumo diario de frutos secos redujo el riesgo relativo de enfermedad cardiovascular y cáncer, así como la mortalidad por enfermedad respiratoria, diabetes e infecciones.

Aspectos regulatorios y mensajes saludables

La administración de alimentos y medicamentos de Estados Unidos (FDA) estableció un mensaje saludable que señala que el consumo diario de 43 g de frutos secos, como parte de una dieta baja en grasas saturadas y colesterol, puede reducir el riesgo de enfermedad cardíaca. Este mensaje es aplicable para almendras, avellanas, nuez pecana, pistachos, nueces y piñón de pino. No se aplica a los frutos secos que contengan más de 4 g de grasa saturada/ 50 g como es el caso de las nueces nuez de macadamia, Brasil y cajú. (FDA 2003)

Recomendación de ingesta

Consumir 1 a 1,5 porciones (30-45 g) de frutos secos diariamente permite reducir el colesterol LDL y disminuir el riesgo de enfermedades cardiometabólicas (Pérez Martínez y cols 2017).

Piñón de pino

El piñón de pino es un fruto seco producido por el pino mediterráneo o piñonero (*Pinus pinea L.*) (Fig 1a), propio de la zona Mediterránea. Ha formado parte de la alimentación humana desde tiempos remotos, previo a las culturas greco-romanas (Loewe 2011). Este pino fue introducido en Chile por los inmigrantes europeos alrededor de 100 años atrás, principalmente con fines ornamentales, y actualmente se cultiva exitosamente en el país, desde Coquimbo hasta La Araucanía, con mayor producción en la zona sur (Loewe y Delard 2016).

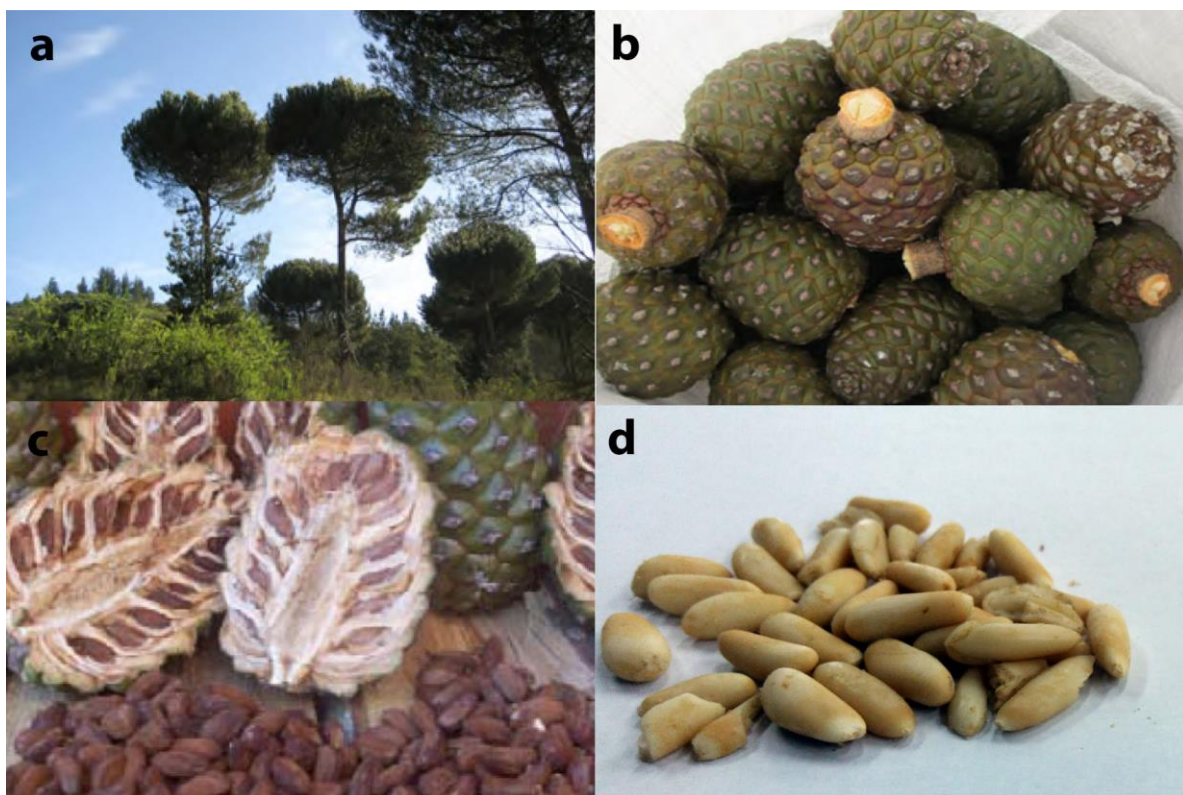


Figura 1: Descripción de: a) Pino piñonero adulto, b) cono o piña madura, c) semillas de *Pinus pinea L* dentro y fuera de la piña, d) Semilla pelada. Adaptada de Loewe y Delard (2016).

La semilla del pino mediterráneo se encuentra dentro de la piña (Fig 1b) mide de 17 a 18 mm de largo, posee una cubierta leñosa muy dura y pesa alrededor de 1 g (Fig 1c). La parte comestible es la semilla pelada, es decir, aquella que se encuentra al interior de la cáscara (Fig 1d). Este piñón es muy blando y pesa alrededor de 0,2 g (Loewe y Delard 2016).

La Tabla 1 muestra la composición química de frutos secos consumidos en Chile, incluyendo el piñón de pino cosechado en Chile.

Tabla 1: Composición química de frutos secos (g/100 g)

	Piñón de pino ¹	Nuez	Almendra	Avellana	Castaña
Proteínas	34,1	12,8 ²	18,0 ²	12,4 ²	3,7 ²
Grasa total	44,3	50,1 ²	43,3 ²	49,3 ²	1,8 ²
Fibra	11,6	7,1 ³	12,5 ³	9,7 ³	10,6 ³

¹Lutz y cols 2016. ²Schmidt-Hebel y cols 1990. ³USDA.

El piñón de pino destaca por su alto contenido de proteínas, comparado con otros frutos secos. Tiene un alto contenido de potasio (0,4 – 0,9 g/100 g), un contenido moderado calcio (30 – 40 mg/100 g), hierro (5 – 15 mg/100 g) y zinc (8 – 13 mg/100 g), además posee una baja cantidad de sodio (5 – 11 mg/100 g) (Lutz y cols 2016). Nergiz y Dönmez (2004) determinaron un alto contenido de fósforo (0,5 g/100 g) y magnesio (0,3 g/100 g) en el piñón de pino europeo. Además, el piñón contiene vitaminas como riboflavina (0,28 mg/100 g), tiamina (1,5 mg/100 g) y

vitamina K (33 – 73 µg/100 g), y una baja cantidad de vitamina C (2,5 mg/100 g) (Dismore y cols 2003; Nergiz y Dönmez 2004).

Componentes saludables del piñón de pino

- **Ácidos grasos insaturados:** El aceite de piñón de pino destaca por su alto contenido de AGPI, predominando con un 48,8% el linoleico (C18:2n-6), y de AGMI, predominando con un 39,4% el oleico (C18:1n-9), en tanto que el contenido de ácidos grasos saturados (AGS) es bajo (Lutz y cols 2016). Contiene una baja proporción de ácido α -linolénico (C18:3n-3) y, a diferencia de lo descrito en algunos otros países, en los piñones de pino cultivados en Chile no se ha identificado la presencia de ácido pinolénico, descrito en algunas zonas de Europa en niveles de 1,6 – 3,7 mg/100 g aceite (Nasri y cols 2005). El consumo de ácidos grasos insaturados, en vez de AGS, se asocia a la modulación del perfil lipídico, al promover la disminución de los niveles plasmáticos de colesterol total y colesterol LDL (Ros 2010), además de disminuir la presencia de marcadores periféricos de inflamación y función endotelial (Ros y Mataix 2006) y tienen propiedades cardioprotectoras (Kris-Etherton y cols 2001). Los AGPI n-3 presentan efectos antitrombóticos, antiaterogénicos, antiinflamatorios y antiarrítmicos (Calder 2004; Ros y Mataix 2006).

- **Fibra dietética (FD):** El contenido de fibra del piñón de pino es elevado comparado con otros frutos secos, salvo aquellos que se consumen con la delgada piel que los recubre, como es el caso de la almendra y la nuez. En el piñón predomina la fracción de fibra insoluble (9,6 g/100 g) por sobre la soluble (2 g/100 g) (Lintas y Cappelloni 1992; Lutz y cols 2016). La FD corresponde a la parte comestible de las plantas y carbohidratos análogos resistentes a la digestión y absorción en el intestino delgado humano con una fermentación parcial o completa en el intestino grueso (AACC 2001). Su consumo ejerce una diversidad de efectos saludables, por lo que se recomienda una ingesta de 28 a 36 g/día (Anderson y cols 2009). Entre los efectos descritos se encuentra la reducción de niveles de colesterol total y colesterol LDL por la fibra soluble, que produce una solución muy viscosa y retarda la absorción de nutrientes, y la fibra insoluble que produce la aceleración del tránsito gastrointestinal aumentando la eliminación de ácidos biliares (Spiller 1994); su consumo atenúa la glicemia e insulinemia postprandial (Jenkins y cols 2000), acelera el tránsito gastrointestinal (Eswaran y cols 2013), y produce ácidos grasos de cadena corta al fermentar en el colon (Cummings y Macfarlane 1991). Estos 4 efectos son los más aceptados por la comunidad científica (Howlett y cols 2010), aunque hay otros efectos posibles, como disminuir el riesgo de diabetes y enfermedad coronaria (Weickert y cols 2008), disminuir la presión sistólica y diastólica en pacientes hipertensos (Streppel y cols 2005), disminuir el

riesgo de cáncer de colon (Bingham y cols 2003), un efecto protector ante la aterosclerosis y enfermedad cardiovascular (Steffen y cols 2003).

- **Fitoesteroles (FE) y fitoestanoles:** Los FE son moléculas similares al colesterol, con ligeras modificaciones en su cadena alifática (Moreau y cols 2002). Debido a su alta hidrofobia, los FE y el colesterol deben formar micelas para ser posteriormente absorbidos por las microvellosidades de los enterocitos. Los FE desplazan una parte del colesterol desde la micela, lo que lleva a su eliminación por las heces (Ikeda y cols 1988). La parte de FE que pasa al enterocito es esterificada para ingresar a los quilomicrones, pero los FE no son sustratos adecuados para la acyl-CoA colesterol acetil transferasa, por lo cual solo una pequeña porción es esterificada e ingresa a la circulación y, en consecuencia, la porción sin esterificar regresa al lumen y es eliminada por las heces (Plat y Mensink 2005). Se ha descrito que los FE son capaces de regular los transportadores ATP-binding cassette (ABC) G5 y G8, que promueven la eliminación de esteroides al lumen intestinal y desde los hepatocitos al espacio biliar (Sabeva y cols 2009). Todas estas acciones permiten disminuir los niveles de colesterol total y LDL en suero (Katan y cols 2003).

El aceite de piñón de pino contiene diversos FE, entre los cuales predominan estigmasterol (207,9 – 356,5 $\mu\text{g}/100\text{ g}$) y β -sitosterol (1.576,5 – 1.948,8 $\mu\text{g}/100\text{ g}$) (Lutz y cols 2016). Nasri y cols (2007) describen además la presencia de Δ^5 -avenasterol (17,2 – 39,0 $\mu\text{g}/100\text{ g}$) y concentraciones

inferiores a 3 $\mu\text{g}/100$ g de aceite de colesterol, campestanol, $\Delta 7$ -campesterol, clerosterol, sitostanol, $\Delta 7$ -avenasterol y $\Delta 7$ -estigmasterol.

Racette y cols (2010), en un estudio de alimentación controlada durante cuatro semanas con 18 participantes, compararon el efecto del consumo de 59, 459 o 2.059 mg de FE/día con la excreción de colesterol, absorción intestinal de colesterol y colesterol LDL plasmático. El consumo de una cantidad moderada o alta de FE aumentó la excreción de colesterol y redujo su absorción intestinal, comparado con el grupo bajo en FE. El colesterol LDL disminuyó solo en el grupo con alta ingesta de FE. Ras y cols (2014) realizaron un metaanálisis a partir de 124 estudios relacionando el consumo de FE con la disminución de colesterol LDL plasmático, concluyendo que existe una relación de dosis respuesta, logrando disminuir entre 6 – 12% la concentración de colesterol plasmático al consumir 0,6 a 3,3 g/día de FE.

Existen mensajes saludables para el consumo de FE: la FDA, señala para frutos secos que contengan 0,4 g de esteroides por porción, consumidas dos veces al día como parte de una dieta baja en ácidos grasos y colesterol, pueden reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares (FDA 2017). Por su parte, la European Food Safety Authority (EFSA) permite el uso del mensaje saludable: “Se ha demostrado que los FE y ésteres de fitoestanoles disminuyen el colesterol sanguíneo. Una tasa elevada de colesterol constituye un factor de riesgo en el desarrollo de cardiopatías coronarias”, pero solo es aplicable en grasas para untar, productos lácteos, mayonesas y aliños para ensaladas, informándose que el efecto beneficioso se obtiene con una ingesta diaria de 1,5 a 3 g de FE y el

periodo a partir del cual se obtiene el efecto beneficioso es de dos a tres semanas (EFSA 2014). Por su parte, el Ministerio de Salud (MINSAL) tiene un mensaje saludable para el consumo de FE, debiendo cumplir el alimento con aportar un mínimo de 0,65 g de FE, ser bajo en grasa saturada, colesterol y libre de ácidos grasos trans, pudiendo contribuir a reducir los niveles de colesterol y el riesgo de enfermedades cardiovasculares (MINSAL 2009a). El piñón de pino, aunque no cumple con el mínimo de FE por porción, es capaz de aportar una cantidad importante de FE a la ingesta diaria.

- **Tocoferoles:** El aceite de piñón de pino tiene un alto contenido de tocoferoles (113 $\mu\text{g}/100\text{ g}$), entre los cuales predomina el γ -tocoferol (107 $\mu\text{g}/100\text{ g}$) y una cantidad menor de α -tocoferol (6 $\mu\text{g}/100\text{ g}$) (Lutz y cols 2016). La molécula de mayor actividad antioxidante de esta familia es α -tocoferol (Kanno y cols 1970). Frente a la acción de especies reactivas de oxígeno, los tocoferoles actúan como donadores de hidrógeno, frenando las reacciones en cadena que propagan la oxidación de lípidos en las membranas celulares y del colesterol LDL (Nikki y cols 1995), tienen efectos antiinflamatorios (Mocchegiani y cols 2014), vasodilatadores, por medio de la activación la óxido nítrico sintasa, que aumenta la síntesis óxido nítrico (NO) en las células endoteliales (Mol y cols 1997). El NO, junto a su capacidad de mantener una función endotelial normalizada e inhibir la adhesión de monocitos, es capaz de reducir los procesos aterogénicos

(Kirmizis y Chatzidimitriou 2009). Por otra parte, la vitamina C actúa sinérgicamente con el α -tocoferol y es capaz de regenerar la forma oxidada de la vitamina E por vía no enzimática (Chepda y cols 2001).

- **Compuestos fenólicos (CF):** Corresponden a una variedad de metabolitos secundarios cuyo rol es otorgar resistencia ante agentes patógenos e insectos y protección contra la radiación solar (Quideau y cols 2011). Entre los efectos de los CF destaca su capacidad antioxidante, al actuar como receptores de electrones y ser capaces de quelar metales, como hierro y cobre, implicados en la síntesis de especies reactivas de oxígeno (Pietta 2000; Quideau y cols 2011), son capaces de regular de manera negativa kinasas oncogénicas como PI3K y Akt, inhibir cascadas de señalización oncogénicas, disminuir factores angiogénicos y elevar la expresión de supresores tumorales, pudiendo disminuir el riesgo de padecer cáncer (Anantharaju 2016), pueden estimular la enzima NO sintasa en el tejido endotelial, generando una acción vasodilatadora, disminuyendo el riesgo cardíaco, además logran reducir la expresión de NADPH oxidasa, una de las mayores fuentes de especies reactivas de oxígeno en el sistema circulatorio (Andriantsitohaina y cols 2012) y son potentes inhibidores de la oxidación de las LDL disminuyendo el riesgo de aterosclerosis (Pandey y Rizvi 2009).

HIPÓTESIS

La ingestión de una dieta alta en grasa en ratas Sprague Dawley por un período de cuatro semanas afecta el consumo de alimento, ganancia ponderal, glicemia, colesterolemia, trigliceridemia, peso de órganos y depósito de grasa corporal de los animales en relación a una dieta control normograsa. Estos efectos serán diferentes si la dieta alta en grasas contiene 2% de piñón de pino (*Pinus pinea* L.).

Objetivo general:

Investigar el efecto del consumo de 2% piñón de pino (*Pinus pinea* L.), como parte de una dieta alta en grasas, sobre la ingesta de dieta, la ganancia ponderal, la glicemia, la trigliceridemia y la colesterolemia, el peso de órganos y el depósito de grasa corporal en ratas.

Objetivos específicos:

- 1) Estandarizar tres dietas diferenciadas (una control, normograsa) y dos altas en grasa (sin y con piñón de pino) para aplicar al modelo *in vivo* de ratas alimentadas por un período establecido en condiciones controladas.
- 2) Comparar la ingesta alimentaria, ganancia ponderal y eficiencia de las dietas control, dieta alta en grasa y alta en grasa con piñones de pino.
- 3) Comparar los niveles sanguíneos de lípidos y glucosa en los grupos de animales experimentales.
- 4) Comparar los pesos de depósitos de grasa inguinal, epididimal y retroperitoneal en animales experimentales.
- 5) Comparar los pesos de órganos (corazón, testículo, riñón e hígado) en animales experimentales.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental se llevó a cabo en el Centro de Investigación y Desarrollo de Alimentos Funcionales (CIDAF), en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valparaíso, haciendo uso del Bioterio de Animales institucional.

Materiales y Reactivos:

Dietas experimentales

Las dietas utilizadas se basan en la dieta estándar semipurificada para ratas adultas AIN-93 (Reeves et al 1993). Fueron modificadas de acuerdo a las necesidades experimentales y confeccionadas en la empresa Research Diets Inc., New Brunswick, Estados Unidos.

Las tres dietas diseñadas, entregadas en forma de un polvo homogéneo, son:

- Control (C) (Research Diets Inc.).
- Alta en grasa (HF) (Research Diets Inc.).
- Alta en grasa (HFP) (Research Diets Inc.), adicionada de 2% de harina de piñón de pino (*Pinus pinea L.*).

La harina de piñón de pino se obtuvo por molienda de piñones sin su testa en un molino analítico (IKA A11 basic). Una vez obtenido un polvo fino, se pesó en balanza digital (Sartorius PT 600) 369 g de dieta experimental y 4 g de piñón molido, se mezcló en una batidora de pedestal (Kitchen Aid ARTISAN) durante 10

min a 58 rpm y guardó en frasco hermético a 4°C. Este procedimiento se repitió en forma semanal.

Las dietas fueron almacenadas en una zona con humedad relativa baja, al abrigo de la luz y a temperatura inferior a 20°C. Semanalmente se retiraron alrededor de 800 g de cada dieta para entregar a los animales, la que era almacenada en frascos herméticos bajo refrigeración.

Animales

Se trabajó con ratas macho de la cepa Sprague Dawley de 10 a 11 semanas de edad, con un peso inicial de 260 – 305 g, obtenidos en el Bioterio de la Universidad de Valparaíso.

Aspectos éticos: el trabajo con animales se realizó de acuerdo a la normativa vigente, según la Ley N° 20.380 “Sobre protección de animales” (03 de octubre 2009), que establece que los animales deben recibir un trato digno, evitar que sean sometidos a sufrimiento innecesario, buscando la verificación de una hipótesis científica y utilizando personal calificado (Ministerio de Salud, 2009b). Se utilizó el principio de Rusell (1959), reduciendo el número de animales al máximo posible sin perder significancia estadística, y las técnicas utilizadas disminuyeron al máximo el sufrimiento del animal.

El trabajo forma parte del proyecto DIUV 05/13, cuyo protocolo aprobado por el Comité de Bioética para la Investigación con Animales de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valparaíso.

Diseño experimental

Se seleccionaron ratas macho Sprague Dawley seleccionadas, provenientes de 4 camadas, de 10 – 11 semanas de vida, con un peso inicial entre 260 a 305 g. Se dividieron aleatoriamente en tres grupos experimentales (n=8 por grupo). Los animales iniciaron simultáneamente el tratamiento con las tres dietas experimentales en grupos de n=6 (2 por cada grupo experimental). Se mantuvieron en jaulas individuales, con alimentación y agua *ad libitum*. Se realizó control diario de ingesta alimentaria, y control de peso corporal dos veces/semana a lo largo del estudio. El tratamiento se realizó en el Bioterio institucional, en condiciones estándar de ciclos de 12 h luz/oscuridad, temperatura $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ y HR 60%.

El consumo diario de dieta se determinó por la diferencia de peso del comedero cada dos días con una balanza digital (Shimadzu UX 2200H).

La ganancia ponderal de los animales se determinó por la diferencia de peso acumulada en 28 días.

La eficiencia de la dieta se calculó mediante la relación entre el incremento ponderal de cada animal y la cantidad de alimento que éste ingirió en el período de tiempo que duró la alimentación.

Eutanasia y obtención de muestras

Luego de 28 días de tratamiento con las dietas experimentales, los animales se pesaron para posteriormente realizar la eutanasia mediante dislocación cervical, procediendo a decapitarlas, obteniendo sangre. Esta se centrifugó a 2500 rpm por 25 min (Centrífuge 5810 R, Eppendorf), para obtener el suero, separando 200 µL y congelando a -80°C.

De cada animal se extrajo y pesó hígado, riñones, corazón, testículos, grasa epididimal, grasa inguinal y grasa retroperitoneal en balanza analítica (Shimadzu AUX 220). Una porción de hígado, grasa epididimal, grasa retroperitoneal y grasa inguinal se congelaron a -80°C; parte de los órganos y grasas fueron fijados en paraformaldehído al 4% y fijador de Bouin para estudios posteriores. Para ello, se apoyó el animal de espaldas y las extremidades fueron fijadas con elásticos. La disección se inició en la parte media del abdomen cortando la piel hacia los costados, dejando expuesta la grasa inguinal, que se retiró y pesó; se cortó el músculo hasta encontrar el peritoneo visceral exponiendo los órganos, se retiraron los testículos por la zona abdominal y se separó la grasa epididimal, se sacaron y limpiaron los riñones de restos de grasa, la grasa retroperitoneal se separó de la perirenal, se cortó el diafragma para poder extraer el hígado en una pieza completa, y al retirar el corazón se eliminó la sangre antes de pesarlo.

Análisis bioquímicos

Las muestras de suero almacenadas a -80°C fueron llevadas a temperatura ambiente y homogeneizadas en vortex (Vortex mixer KMC-1300V, Vision Scientific). Posterior a la estabilización de las reacciones se leyó la absorbancia de las muestras en un lector de placa a 505 nm (DNM-9062 microplate reader).

- Determinación de glucosa: kit enzimático Glicemia líquida (Wiener lab., Rosario Argentina). Método modificado de Trinder (Trinder, 1969), la glucosa es oxidada por medio de la enzima glucosa oxidasa a ácido glucurónico y genera además H_2O_2 incoloro, luego el H_2O_2 es cuantificado por una reacción cromogénica por medio de una peroxidasa.

- Determinación de triglicéridos: kit enzimático Triglycerides liquicolor ^{mono} (Human. Wiesbaden, Alemania). Método de McGowan (McGowan y cols, 1983), los TG son hidrolizados por lipasas liberando los ácidos grasos y glicerol, el glicerol es fosforilado en presencia de glicerol kinasa generando glicerol-3-fosfato, este último es oxidado por medio de una Glicerol 3-fosfato oxidasa generando H_2O_2 , finalmente el H_2O_2 es cuantificado por una reacción cromogénica por medio de una peroxidasa.

- Determinación de colesterol total: kit enzimático CHOLESTEROL liquicolor, (Human. Wiesbaden, Alemania). Método de Allain (Allain y cols, 1974), los esteres de colesterol son hidrolizados por la colesterolesferasa generando colesterol, este es oxidado a colestene-3-ona y H_2O_2 por medio de la colesterolesferasa,

finalmente el H_2O_2 es cuantificado por una reacción cromogénica por medio de una peroxidasa.

Análisis estadístico

Los resultados se muestran como $X \pm \text{EE}$ (promedio \pm error estándar). Para el análisis de datos se utilizó análisis de varianza (ANOVA) para comparar los resultados obtenidos con cada tratamiento dietético, con una significancia de $p < 0,05$ (95% de confianza) utilizando Microsoft Excel[®]. Las diferencias entre los resultados obtenidos se determinaron utilizando el test de Tukey.

RESULTADOS

La composición de las dietas experimentales diseñadas se presenta en la Tabla 2. En ella se observa que la dieta C contiene 11,8% kcal grasas entregadas en la forma de aceite de soya, en tanto que la dieta HF contiene 42,4% kcal grasas a partir del mismo aceite. En la dieta HFP se incorporó 2% de harina de piñón de pino, llevándola a 42,4% kcal grasas provenientes de la mezcla de aceite de soya y los lípidos provenientes del piñón de pino. Todas las dietas mantienen un P% de 21,2%. La dieta C aporta 382 kcal/100 g y las dietas HF y HFP aportan 456 kcal/100 g.

Tabla 2: Composición de las dietas experimentales.

Ingrediente	C (g)	HF (g)	HFP (g)
Caseína	200	238,8	230,8
L-Cisteína	3	3,6	3,6
Almidón de maíz	590	355,2	354,5
Dextrosa	50	59,7	59,6
Celulosa	50	59,7	57,5
Aceite de soya	50	214,9	206
Mix de minerales*	10	11,9	11,9
Fosfato dicálcico	13	15,5	15,5
Carbonato de calcio	5,5	6,6	6,6
Citrato de potasio	16,5	19,7	19,7
Mix de vitaminas**	10	11,9	11,9
Bitartrato de colina	2	2,4	2,4
Piñón	0	0	20
Total	1000	999,9	1000
DE (kcal/g)	3,82	4,56	4,56

*Por cada kg: 500 g CaHPO₄; 220 g C₆H₅K₃O₇·H₂O; 74 g NaCl; 52 g K₂SO₄; 24 g MgO; 3,5 g Mn (48%); 6,0 g Fe (17%); 1,6 g Zn (70%); 0,3 g Cu (53%); 0,01 g KIO₃; 0,55 g CrK(SO₄)₂·12H₂O; 118 g sacarosa.

** Por cada kg: 600 mg tiamina HCl; 600 mg riboflavina; 700 mg piridoxina-HCl; 1,6 g vit B5; 3 g ácido nicotínico; 0,2 g ácido fólico, 1 g cianocobalamina (1%); 2 g biotina (1%); 80 mg menadiona (63%); 5.000 UI Vitamina E; 100.000 UI vitamina D3; 400.000 UI vitamina A; 978 g sacarosa.
DE: Densidad energética.

La Tabla 3 muestra el peso inicial, el consumo de dieta, la ganancia ponderal y la eficiencia de la dieta en las ratas alimentadas durante 28 días con las dietas tres experimentales.

Tabla 3. Consumo de dietas, peso inicial, ganancia ponderal y eficiencia de la dieta según grupo experimental.

	C	HF	HFP
N	8	8	8
Peso inicial (g)	282 ± 4 ^a	285 ± 5 ^a	290 ± 5 ^a
Consumo (g)	545,0 ± 13,2 ^a	495,5 ± 7,4 ^b	494,1 ± 9,9 ^b
Ganancia ponderal (g)	52,1 ± 4,8 ^a	65,3 ± 5,5 ^{ab}	71,8 ± 4,4 ^b
Eficiencia de la dieta (%)	10 ± 1 ^a	13 ± 1 ^b	14 ± 1 ^b

N: número de animales. Datos expresados como promedio ± error estándar. C: dieta control, HF: dieta alta en grasa, HFP: dieta alta en grasa con piñón de pino. Diferente superíndice indica diferencia significativa ($p < 0,05$) según ANOVA y test de Tukey.

El peso al iniciar el tratamiento fue similar en todos los grupos. El consumo de alimento fue similar en las dietas HF y HFP, la ingestión de dieta C fue mayor que la de las otras dos dietas ($p < 0,05$). La ganancia ponderal de los animales que ingirieron HFP fue mayor a la dieta C ($p < 0,05$), en tanto que entre las dietas restantes este incremento fue similar. La eficiencia de la dieta de las dos dietas altas en grasa fue similar, y superior a la dieta C ($p < 0,05$).

Parámetros bioquímicos

La Tabla 4 muestra los valores de glicemia, trigliceridemia y colesterol total sérico observados en las ratas experimentales según dieta.

Tabla 4: Concentración sérica de glucosa, triglicéridos y colesterol total de ratas según grupo experimental

	C	HF	HFP
N	8	8	7
Glicemia (mg/dL)	109 ± 3 ^a	125 ± 4 ^b	121 ± 3 ^{ab}
Trigliceridemia (mg/dL)	70 ± 9 ^a	59 ± 5 ^a	83 ± 10 ^a
Colesterol total (mg/dL)	64 ± 8 ^a	84 ± 6 ^{ab}	111 ± 8 ^b

N: número de muestras. Datos expresados como promedio ± error estándar. C: dieta control, HF: dieta alta en grasa, HFP: dieta alta en grasa con piñón de pino. Diferente superíndice indica diferencia significativa ($p < 0,05$) según ANOVA y test de Tukey.

Se observó una glicemia más elevada en el grupo HF respecto al grupo C ($p < 0,05$). El valor de referencia para ratas Sprague Dawley macho con ayuno de 6 h es de 122 mg/dL, el cual es cercano a los obtenidos por las dietas HF y HFP, en tanto que con dieta control la glicemia observada en las ratas fue inferior (Nowland, 2011). La concentración promedio de TG fue similar en todos los grupos experimentales. Se observó que el colesterol sérico total tuvo una concentración más elevada en el grupo HFP comparado con el grupo C ($p < 0,05$).

Peso de órganos

La Tabla 5 muestra el peso relativo de los testículos, hígado, corazón y riñones de los animales según dieta experimental.

Tabla 5: Peso relativo de testículos, hígado, corazón y riñón en relación al peso corporal.

	C	HF	HFP
N	8	8	8
Testículos (%)	0,94±0,02 ^a	0,88±0,01* ^b	0,87±0,01 ^b
Hígado (%)	3,49±0,11 ^a	3,61±0,13 ^a	3,55±0,09 ^a
Corazón (%)	0,34±0,01 ^a	0,33±0,01 ^a	0,33±0,02 ^a
Riñones (%)	0,73±0,01 ^a	0,73±0,02 ^a	0,75±0,01 ^a

N: número de muestras. * N = 7. Datos expresados como promedio ± error estándar. C: dieta control, HF: dieta alta en grasa, HFP: dieta alta en grasa con piñón de pino. Diferente superíndice indica diferencia significativa ($p < 0,05$) según ANOVA y test de Tukey.

Se observó mayor peso relativo de testículo en el grupo alimentado con la dieta C ($p < 0,05$). El peso relativo de hígado, corazón y riñones fue similar al tratarlos con dieta C, HF o HFP.

Tejido graso

En la Tabla 6 se presenta el peso relativo de la grasa inguinal, epididimal y retroperitoneal en relación al peso corporal de cada animal.

Tabla 6: Peso relativo de la grasa inguinal, epididimal y retroperitoneal en animales experimentales.

	C	HF	HFP
N	8	8	8
Grasa inguinal (%)	0,20±0,02 ^a	0,23±0,01 ^a	0,22±0,03 ^a
Grasa epididimal (%)	1,12±0,04 ^a	1,28±0,03 ^{*a}	1,27±0,07 ^a
Grasa retroperitoneal (%)	1,60±0,14 ^a	1,87±0,07 ^a	1,80±0,18 ^a

N: número de muestras. * N = 7. Datos expresados como promedio ± error estándar. C: dieta control, HF: dieta alta en grasa, HFP: dieta alta en grasa con piñón de pino. Diferente superíndice indica diferencia significativa ($p < 0,05$) según ANOVA y test de Tukey.

El peso relativo de los tejidos grasos no fue afectado por la dieta consumida.

DISCUSIÓN

En este trabajo se estudian algunos efectos generados por la ingestión de dos dietas altas en grasa, isocalóricas, una de las cuales fue adicionada de 2% de piñón de pino, comparándolos con los efectos de una dieta control, con el objetivo de obtener información sobre los efectos del consumo de este fruto seco en el metabolismo de ratas.

Dieta, ingesta diaria, ganancia ponderal y eficiencia de la dieta.

Las dietas semipurificadas basadas en AIN-93 (Reeves y cols 1993) se caracterizan por ser producidas a partir de nutrientes derivados de un ingrediente específico (por ejemplo, aceite de soya o caseína): Debido a que se conocen los componentes, la procedencia y las cantidades de cada uno de estos en la dieta, se logra obtener información uniforme y repetible. También permite al investigador cambiar de manera precisa la composición de las dietas y comparar resultados entre distintos laboratorios.

Las dietas experimentales utilizadas contenían aceite de soya como fuente lipídica, la cual se compone principalmente de AGPI (57%) y AGMI (23%), con una baja proporción de AGS (15%). Este aceite contiene tocoferoles (8,18 mg/100 g) y vitamina K (183,9 µg/100 g) (USDA 2017). Como fuente de proteína se utilizó caseína, suplementada con L-cisteína; como fuente de carbohidratos se utilizó principalmente almidón de maíz y una fracción de dextrosa, y se incorporó

celulosa como fuente de fibra. La mezcla se suplementó con las vitaminas y minerales requeridos para la óptima salud de los animales.

La DE de las dietas altas en grasa HF y HFP era de 4,56 kcal/g, en tanto que la dieta C tenía una DE de 3,82 kcal/g. Todas las dietas tenían un P% de 21,2% para generar crecimiento y mantención óptima de los animales (Reeves y cols 1993). El 2% de piñón de pino añadido a la dieta alta en grasa representa aproximadamente un consumo de 10 g (1/3 de porción) diarios de piñón de pino en una dieta de 2000 Kcal/día.

Como se aprecia en la Tabla 3, la ingesta de alimento fue mayor en el grupo C, en relación a las dietas altas en grasa. Ello podría relacionarse con su menor aporte de energía. El grupo C consumió en promedio 19,5 g de alimento diario, equivalente a 74 kcal, en tanto que la ingesta en los grupos alimentados con dieta alta en grasa (HF y HFP) fue similar, con un promedio de 17,7 g/día, equivalente a 80 kcal. Marques y cols (2016) compararon el consumo de alimento *ad libitum* en un grupo de ratas control y un grupo con dieta alta en grasa, observando que las ratas control consumieron 54 kcal/día y las ratas con dieta alta en grasa consumieron 67 kcal/día, obteniendo un resultado similar al de este estudio en cuanto al consumo de kcal/día. Soares y cols (2010) utilizó ratas Wistar *ad libitum* con una dieta control y una alta en grasas, consumiendo 21,9 g (72 kcal) y 17,0 g (76,5 kcal) por día, respectivamente, resultado similar al de este estudio. La semejanza en el consumo observado en ambas dietas altas en grasa refleja que la incorporación de 2% de piñón de pino en la formulación de la dieta HFP no afectó

la ingesta dietética. Amr y Abeer (2011) incorporaron niveles de 5, 10 y 15% de piñón de pino en la dieta experimental, administrada por un período de 6 semanas, concluyendo que a mayor consumo de este fruto seco los animales ingerían una menor cantidad de alimento. Por otra parte, en el presente estudio se descarta el efecto saciante del consumo de piñones de pino, reportado en otros trabajos, el cual se atribuye en gran parte a la masticación, ya que estos se incorporaron en la dieta como harina (Cassady y cols 2009).

La Tabla 3 muestra aumento en la ganancia ponderal en el grupo HFP comparado con el grupo C ($p < 0,05$), en cambio esta fue similar en los animales que consumieron las dietas HF y HFP. Como cabía esperar, la mayor ganancia ponderal se observó en las ratas alimentadas con dietas con alto contenido lipídico, lo cual es consecuente con los experimentos de Amr y Abeer (2011) y Marques y cols (2016). De igual manera, estudios previos, como el de Woods y cols (2003) ya habían mostrado un incremento en la ganancia ponderal en los animales con dieta de $G\%=40$, por sobre grupos con un adieta de $G\%=8$. Pancani y cols (2013) obtuvieron resultados similares en ratas adultas jóvenes y de edad mediana al alimentarlas con dietas control de $G\%=13$ y alta en grasa de $G\%=42$. La dieta HFP fue la que generó una mayor ganancia ponderal. No se encontró registro en la literatura de estudios en los que se alimentara ratas con dietas que incluyeran frutos secos en las que se generara mayor ganancia ponderal, pero los resultados obtenidos por Amr y Abeer (2011) muestran que al incorporar 0, 5, 10 o 15% de piñón de pino a una dieta alta en grasa, la ganancia ponderal es similar

para todos los grupos. Entre los mecanismos por los cuales se podría explicar al menos en parte la mayor ganancia ponderal en el grupo HFP incluyen la variabilidad interindividual, una disminución del metabolismo basal, una reducción de la termogénesis y/o una menor actividad física (Spiegelman y Flier 2001).

La eficiencia de la dieta relaciona la ganancia ponderal y el consumo de alimento. Las ratas con la dieta C presentaron menor ganancia ponderal ($p < 0,05$), asociada a su menor DE, y estos animales consumieron más alimento ($p < 0,05$), comparada con las dietas HF y HFP, que mostraron resultados similares. En consecuencia, la dieta C tiene una menor eficiencia que las dietas HF y HFP ($p < 0,05$). Resultado similar al obtenido por Soares y cols (2010) en ratas Wistar alimentadas *ad libitum* con dieta C y HF. La adición de piñón de pino al 2% no generó diferencias significativas en las dietas altas en grasa.

Niveles plasmáticos de glucosa, triglicéridos y colesterol

La glicemia fue más elevada en el grupo de animales alimentado con dieta HF comparado con la dieta C ($p < 0,05$). Nowland y cols (2011) estudiaron el efecto del ayuno sobre la glicemia en ratas Sprague Dawley, observando 122 mg/dL en machos adultos con 6 h de ayuno. En este estudio, la glicemia observada tras el consumo de dieta C (109 mg/dL) fue menor al valor señalado siendo más cercana a la que presentaban los animales luego de 16 h de (104 mg/dL). En ratas, una ingesta prolongada de dieta alta en grasa es capaz de aumentar la glicemia (Ghibaudi y cols 2002; Handjieva-Darlenska y Boyadjieva 2009) debido a que genera una menor tolerancia a la glucosa (Davidson y cols 2010; Peng y cols

2012; Marques y cols 2016). Lovejoy y cols (2002) estudiaron en humanos sanos el efecto de una dieta enriquecida con almendras (100 g/día durante 4 semanas), en la glicemia en ayuno, obteniendo como resultado que el consumo de almendras no fue capaz de modificar este parámetro. En contraste, en humanos el estudio PREDIMED con 772 participantes concluyó que el consumo de frutos secos (30 g/día) era capaz de disminuir la glicemia en ayunas (Estruch y cols 2006). No se encontraron otros estudios que relacionen el consumo de frutos secos en ratas y la glicemia en ayunas, con fines comparativos.

La concentración sérica de triglicéridos fue similar en todos los grupos, probablemente debido a la alta variabilidad intragrupo observada, evidenciada por el elevado valor del error estándar en relación al promedio. Este resultado no sería mediado por el consumo de una dieta normograsa o alta en grasa, sin o con piñones de pino, contrariamente a lo observado por Amr y Abeer (2011), en el cual a medida que aumentaba la ingesta de piñón de pino se observó una menor trigliceridemia. Se debe tener en cuenta que el tiempo de alimentación fue mayor (6 semanas) al utilizado en este estudio (4 semanas).

Como se aprecia en la Tabla 4, la colesterolemia fue mayor en el grupo que consumió dieta HFP ($p < 0.05$), y menor en el grupo con dieta C ($p < 0,05$). Debido a que el colesterol puede obtenerse a través de dos vías, la endógena y la exógena, y teniendo en cuenta que la dieta no contenía colesterol, el aumento de la colesterolemia en el grupo HFP se podría deber al aumento en la síntesis de colesterol, el aumento en la reabsorción intestinal del colesterol endógeno

secretado por la vía biliar y/o una disminución en la síntesis de moléculas que tienen como precursor el colesterol. Los resultados obtenidos no se pueden comparar con los de Amr y Abeer (2011), debido a que en ese estudio se utilizó una dieta alta en grasa suplementada con colesterol, observando una colesterolemia inferior a la que se midió en las ratas del grupo C (52 mg/dL). Ichimura y cols (2014) utilizaron ratas macho de 8 semanas alimentadas con dieta alta en grasa, con y sin suplemento de colesterol, durante 9 semanas, obteniendo una colesterolemia de 53 mg/dL en el grupo control y 77 mg/dL en el grupo alto en grasa sin suplemento de colesterol, mostrando que un aumento en el consumo de grasas produce un aumento en la colesterolemia, aunque de inferior magnitud a la observada en el presente estudio en los grupos C y HF. Al no existir diferencia significativa entre el grupo HF y el grupo HFP, no se puede evidenciar un efecto de la incorporación de 2% de piñón de pino en la dieta alta en grasa sobre la colesterolemia. En este trabajo no se midieron las concentraciones de colesterol HDL y LDL y se recomienda realizar el análisis, debido a que ambas tienen un impacto sobre el riesgo cardiovascular, pudiendo así relacionar la razón de riesgo cardíaco y el coeficiente aterogénico producido por el consumo de las dietas experimentales (Millán y cols 2009).

Peso de órganos

El aumento de peso corporal causado por la ingesta de dietas altas en grasa está asociado a un aumento de tejido adiposo, el cual se deposita en diferentes órganos, pudiendo generar daño o disminución de su función (Montani y cols 2004).

En la Tabla 5 se observa una correlación negativa entre el consumo de dieta alta en grasa y el peso relativo de los testículos. La dieta C produjo un mayor peso relativo de estos órganos, probablemente asociado al mayor peso de las ratas que consumieron este tipo de dieta, ya que el peso absoluto de los testículos fue similar en todos los grupos. Este resultado es similar al obtenido por Chambers y cols (2016) en ratas alimentadas con dieta control normograsa (10%) y dieta alta en grasa (45%). La incorporación de 2% de piñón de pino a la dieta HFP no ejerció un efecto sobre el peso relativo de los testículos.

Los ácidos grasos y el colesterol son absorbidos por el enterocito, esterificados y forman quilomicrones que ingresan al torrente sanguíneo a través de los vasos linfáticos. Aproximadamente un 20% de los TG del quilomicron llegan al hígado para ser almacenados, posteriormente pueden volver a circulación en VLDL o acumularse si la ingesta es muy alta (Cohen y cols 2011). El consumo de dietas altas en grasa genera un aumento significativo del peso relativo del hígado en ratas, principalmente debido a la acumulación de TG provenientes desde la dieta (Handjieva-Darlenska y Boyadjieva 2009; Pancani y cols 2011; Ichimura y cols 2014). Los resultados de Amr y Abeer (2011) muestran que las dietas altas en

grasa generan un aumento del peso relativo de hígado, comparado con su dieta control, pero no existen diferencias significativas al añadir 0, 5, 10 o 15 % de piñón de pino. Los resultados de este estudio difieren de estos hallazgos, debido a que las ratas alimentadas con las dietas C, HF y HFP mostraron peso relativo de hígado similar, posiblemente debido al tiempo de alimentación, ya que los otros estudios tuvieron un período de alimentación de 6 a 15 semanas, en cambio en este trabajo se utilizó un periodo de 4 semanas de tratamiento con dieta experimental.

El peso relativo del corazón fue similar en los animales que ingirieron todas las dietas. Esto es coincidente con lo observado por Soares y cols (2010) en ratas Wistar utilizando una dieta control normograsa (G%=11,2) y una dieta obesogénica sin colesterol (G%=45,2). Estos resultados difieren de los que obtuvieron Amr y Abeer (2011), quienes observaron un aumento del peso relativo de corazón con dietas altas en grasa con y sin piñón, y de los obtenidos por Ouwens y cols (2005) en ratas Wistar macho, en que se observó un aumento del peso relativo de corazón en ratas con dieta alta en grasa sin colesterol.

El peso relativo de riñones fue similar en todas las dietas, resultado que difiere del obtenido por Amr y Abeer (2011), quienes observaron que la dieta alta en grasa con 15% de piñón de pino generó un menor peso relativo comparado con la dieta alta en grasa sin piñón. Esto posiblemente se deba al mayor contenido de piñón de pino utilizado.

Peso de tejido graso

El peso relativo de todos los tejidos grasos (inguinal, retroperitoneal y epididimal) fue similar en los animales que ingirieron todas las dietas. Mendes de Castro y cols (2013) utilizaron ratas machos Fischer adultas, alimentadas durante 13 semanas con dieta alta en grasa (G%=68) y comparado con un control normograso (G%=12), obteniendo como resultado que el peso relativo de la grasa retroperitoneal fue mayor en el grupo con dieta alta en grasa, pero la grasa inguinal se mantuvo similar en ambos grupos. Pancani y cols (2013) utilizaron ratas F344, alimentadas por 18 semanas con dieta alta en grasa (G%=42) y normograsa (G%=13), observando un aumento del peso relativo de grasa retroperitoneal y epididimal con la dieta alta en grasa. Fernandez y cols (2011) trabajaron con ratas Wistar, comparando el efecto de alimentarlas durante 15 semanas con dieta alta en grasa (20 g/100 g alimento) y una dieta normograsa (4 g/100 g alimento), observando que los depósitos de grasa epididimal, visceral y retroperitoneal fueron mayores al utilizar una dieta alta en grasa. En este trabajo no se observó diferencia en el peso absoluto de los tejidos grasos con las dietas C, HF y HFP. Esta diferencia con los resultados de otros estudios puede deberse al tiempo de alimentación utilizado, que varía entre 13 y 18 semanas, a diferencia de las 4 semanas aplicadas en el presente estudio.

La adición de 2% de piñón de pino en la dieta HFP no generó una diferencia con el consumo de la dieta HF, posiblemente debido a la baja concentración de piñón utilizada, ya que Amr y Abeer (2011) lograron obtener diferencias significativas al

utilizar concentraciones más altas de piñón de pino. Por otra parte, el período de tratamiento con las dietas experimentales pudo no ser suficiente para poner en evidencia diferencias en la acumulación de grasas en tejido adiposo y órganos.

CONCLUSIONES

Considerando que

- el consumo de una dieta alta en grasa (G%=42,4), en comparación a una dieta control normograsa (G%=11,8) ocasionó en las ratas experimentales: aumento de la ganancia ponderal, mantención de la glicemia e incremento de la colesterolemia,
- la incorporación de 2% de piñón de pino en una dieta alta en grasa ocasionó en estos animales la mantención de la ganancia ponderal, la trigliceridemia y la colesterolemia, el peso relativo de hígado, corazón y riñones y el peso relativo de los depósitos de grasa inguinal, epididimal y retroperitoneal,
- la dieta alta en grasa sin piñón de pino generó en los animales un aumento de la glicemia comparado con la dieta control,

se concluye que el consumo de 2% de piñón de pino como parte de una dieta alta en grasas no afectó la ganancia ponderal, los lípidos séricos ni la colesterolemia, como tampoco el depósito de lípidos corporales en el modelo animal utilizado.

BIBLIOGRAFÍA

- Allain C, Poon L, Chan C, Richmond W, Fu P. 1974. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 20:470-475.
- American Academy of Cereal Chemist (AACC). The definition of dietary fiber. Publicación n: W-2001-0222-01O. Disponible en: <<http://www.aaccnet.org>>. Visitado el de agosto de 2017.
- Amr A, Abeer E. 2011. Hypolipideimic and hypocholestermic effect of pine nuts in rats fed high fat, cholesterol-diet. *World Appl Sci J* 15:1667-1677.
- Anantharaju P, Gowda P, Vimalambike M, Madhunapantula S. 2016. An overview on the role of dietary phenolics for the treatment of cancers. *J Nutr* 15:99-105.
- Anderson J, Baird P, Davis R J, Ferreri S, Knudtson M, Koraym A, Waters V, Williams C. 2009. Health benefits of dietary fiber. *Nutr Rev* 67:188-205.
- Andriantsitohaina R, Auger C, Chataigneau T, Étienne-Selloum N, Li H, Martínez M, Schini-Kerth V, Laher I. 2012. Molecular mechanism of the cardiovascular protective effects of polyphenols. *Br J Nutr* 108:1532-1549.
- Asghari G, Ghorbani Z, Mirmiran P, Azizi F. 2017. Nut consumption is associated with lower incidence of type 2 diabetes: the Tehran lipid and glucose study. *Diabetes Metab* 43:18-24.
- Aune D, Keum N, Giovannucci E, Fadnes L, Boffetta P, Greenwood D, Tonstad S, Vatten L, Riboli E, Norat T. 2016. Nut consumption and risk of cardiovascular disease, total cancer, all-cause and cause-specific mortality: a systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *BMC Med*. 14:207-220.
- Bes-Rastrollo M, Wedick N, Martinez-Gonzalez M, Li T, Sampson L, Hu F. 2009. Prospective study of nut consumption, long-term weight change, and obesity risk in women. *Am J Clin Nutr* 89:1913-1919.

- Bingham S, Day N, Luben R, Ferrari P, Slimani N, Norat T, Clavel-chapelon F, Kesse E, Nieters A, Boeing H, Tjønneland A, Overvad K, Martinez C, Dorransoro M, Gonzales C, Key T, Trichopoulou A, Naska A, Vineis P, Tumino R, Krogh V, Bas H, Peeters P, Berglund G, Hallmans G, Lund E, Skeie G, Kaas R, Riboli E. 2003. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet* 361:1496-1501.
- Brennan A, Sweeney L, Liu X, Mantzoros S. 2010. Walnut consumption increases satiation but has no effect on insulin resistance or metabolic profile over a 4-day period. *Obesity* 18:1176-1182.
- Calder P. 2004. N-3 Fatty acids and cardiovascular disease: evidence explained and mechanisms explored. *Clin Sci* 107:1-11.
- Cassady B, Hollis J, Fulford A, Considine R, Mattes R. 2009. Mastication of almonds: effects of lipid bioaccessibility, appetite, and hormone response. *Am J Clin Nutr* 89:794-800.
- Chambers T, Morgan M, Heger A, Sharpe R, Drake A. 2016. High-fat diet disrupts metabolism in two generations of rats in a parent-of-origin specific manner. *Sci Rep* 6,31857:1-11.
- Chepda T, Cadau M, Lassabliere F, Reynaud E, Perier C, Chamson F. 2001. Synergy between ascorbate and α -tocopherol on fibroblasts in culture. *Life Sci* 69:1587-1596.
- Cohen J, Horton J, Hobbs H. 2011. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science* 332:1519-1523.
- Crescenzo R, Bianco F, MAzzoli A, Giacco A, Cancelliere R, di Fabio G, Zarrelli A, Liverini G, Iossa S. 2015. Fat quality influences the obesogenic effect of high fat diets. *Nutrients* 7:9475-9491.
- Cummings J, Macfarlane G. 1991. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J Appl Microbiol* 70:443-459.
- Davidson E, Coppey L, Calcutt, Oltman C, Yorek M. 2010. Diet induced obesity in Sprague Dawley rats causes microvascular and neural dysfunction. *Diabetes Metab Res Rev* 26:306-318.

- Dismore M, Haytowitz D, Gebhardt S, Perterson J, Booth S. 2003. Vitamin K content of nuts and fruits in the US diet J Am Diet Assoc 103: 1650-1652.
- Estruch R, Marínez-González M, Corella D, Salas-Salvadó J, Ruiz-Gutiérrez A, Covas M, Fiol M, Gómez-Gracia E, López-Sabater M, Vinyoles E, Arós F, Conde M, Lahoz C, Lapetra J, Sáez G, Ros E. 2006. Effects of a Mediterranean-style diet on cardiovascular risk factors. Ann Intern Med 145:1-11.
- European Food Safety Authority (EFSA). 2014. Reglamento UE N° 686/2014. Condiciones de uso de determinadas declaraciones de propiedades saludables relativas al efecto de fitoesteroles y fitoesteranos en la reducción del colesterol LDL en la sangre. Disponible en: <<http://eur-lex.europa.eu>> (visitado el 15 agosto de 2017).
- Eswaran S, Muir J, Chey W. 2013. Fiber and functional gastrointestinal disorders. Am J Gastroenterol 108:718-727.
- Fernandez C, Bellentani F, Fernandes G, Perobelli J, Favareto A, Nascimento A, Cicogna A, Kempinas W. 2011. Diet-induced obesity in rats leads to a decrease in sperm motility. Reprod Biol Endocrinol. 9:32-41.
- Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. Food labeling: health claims: nuts & heart disease. Docket No. 02P-0505. Disponible en: <<https://www.fda.gov>> (visitado el 20 de agosto de 2017).
- Food and Drug Administration. 2017. Food labeling. Specific requirements for Health Claims. Disponible en: <www.accessdata.fda.gov> (visitado el 10 de julio de 2017).
- Ghibaudi L, Cook J, Farley C, van Heek M, Hwa J. 2002. Fat intake affects adiposity, comorbidity factors, and energy metabolism of Sprague-Dawley rats. Obes Res 10:956-963.
- Handjieva-Darlenska T, Boyadjieva N. 2009. The effect of high-fat diet on plasma ghrelin and leptin levels in rats. J Physiol Biochem 65:157-164.
- Howlett J, Betteridge V, Champ M, Craig S, Meheust A, Miller J. 2010. The definition of dietary fiber - discussions at the ninth Vahouny fiber symposium: building scientific agreement. Food Nutr Res 54:1-11.

- Hull S, Re R, Chambers L, Echaniz A, Wickham M. 2015. A mid-morning snack of almonds generates satiety and appropriate adjustment of subsequent food intake in healthy women. *Eur J Nutr* 54:803-810.
- Ichimura M, Kawase M, Masuzumi M, Sakaki M, Nagata Y, Tanaka K, Suruga K, Tamaru S, Kato S, Tsuneyama K, Omagari K. 2016. High-fat and high-cholesterol diet rapidly induces non-alcoholic steatohepatitis with advanced fibrosis in Sprague–Dawley rats. *Hepato Res* 45:458-469.
- Ikeda I, Tanaka K, Sugano M, Vahouny G, Gallo L. 1988. Inhibition of cholesterol absorption in rats by plant sterols. *J Lipid Res* 29:1573-1582.
- Jenkins D, Kendall C, Axelsen M, Agustin L, Vuksan V. 2000. Viscous and nonviscous fibres, nonabsorbable and low glycaemic index carbohydrates, blood lipids and coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol* 11:49-56.
- Kanno C, Yamauchi K, Tsugo T. 1970. Antioxidant effect of tocopherols on autoxidation of milk fat part II. Antioxidant activity of tocopherols in the churned and the solvent-extracted milk fat. *Agr Biol Chem* 34:886-890.
- Katan M, Grundy S, Jones P, Law M, Miettinen T, Paoletti R. 2003. Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels. *Mayo Clin Proc* 78:965-978.
- Kirmizis D, Chatzidimitriou D. 2009. Antiatherogenic effects of vitamin E: the search for the holy grail. *Vasc Health Risk Manag* 5:767-774.
- Lintas C, Cappelloni M. 1992. Dietary fiber content of Italian fruit and nuts. *J Food Comp Anal* 5:146-151.
- Loewe V. 2011. La producción de piñones de pino, una alternativa atractiva y factible para la Patagonia. *Ciencia e Investigación Forestal - Instituto Forestal de Chile* 17:109-128.
- Loewe V, Delard C. 2016. Producción de piñón mediterráneo (*Pinus pinea* L.). Manual N° 48. Instituto Forestal. Chile. pp 13-29.
- Lovejoy J, Most M, Lefevre M, Greenway F, Rood J. 2002. Effect of diets enriched in almonds on insulin action and serum lipids in adults with normal glucose tolerance or type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr* 76:1000-1006.

- Lutz M, Luna L. 2016. Nuts and body weight – an overview. *J Nutr Health Sci* 3:1-7.
- Lutz M, Álvarez K, Loewe V. 2016. Chemical composition of pine nut (*Pinus pinea* L.) grown in three geographical macrozones in Chile. *CYTA J Food* 15:284-290.
- Marques C, Meireles M, Norberto S, Leite J, Freitas J, Pestana D, Faria A, Calhau C. 2016. High-fat diet-induced obesity rat model: a comparison between Wistar and Sprague-Dawley rat *Adipocyte* 5:11-21.
- Martínez-González M, Bes-Rastrollo. 2011. Nut consumption, weight gain and obesity: epidemiological evidence. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 21:S40-S45.
- McGowan M, Artiss J, Stranderg R, Zak B. 1983. A Peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. *Clin Chem* 29:538-542.
- Mendes de Castro U, Souza R, Silva M, Lima W, Campagnole-Santos M, Carvalho A. 2013. Age-dependent effect of high-fructose and high-fat diets on lipid metabolism and lipid accumulation in liver and kidney of rats. *Lipids Health Dis* 12:136-147.
- Millán J, Pintó X, Muñoz A, Zúñiga M, Rubiés-Prat J, Pallardo L, Masana L, Mangas A, Hernández-Mijares A, González-Santos P, Ascaso J, Pedro-Botet J. 2009. Lipoprotein ratios: Physiological significance and clinical usefulness in cardiovascular prevention. *Vasc Health Risk Manag* 5:757-765.
- Ministerio de Salud (MINSAL). 2009a. Normas técnicas sobre directrices nutricionales que indica, para la declaración propiedades saludables de los alimentos. Resolución Exenta N° 764/09. Diario oficial de la República de Chile, Santiago, Chile.
- Ministerio de Salud (MINSAL). 2009b. sobre protección de animales. Ley N° 20.380. Diario oficial de la República de Chile, Santiago, Chile.

- Mocchegiani E, Costarelli L, Giacconi R, Malavolta M, Basso A, Piacenza F, Ostan R, Cevenini E, Gonos E, Franceschi C, Monti D. 2014. Vitamin E–gene interactions in aging and inflammatory age-related diseases: Implications for treatment. A systematic review. *Ageing Res. Rev* 14:81-101.
- Mol M, Rijke Y, Demacker P, Stalenhoef A. 1997. Plasma levels of lipid and cholesterol oxidation products and cytokines in diabetes mellitus and cigarette smoking: effects of vitamin E treatment. *Atherosclerosis* 129:169-176.
- Montani J, Carroll J, Dwyer T, Antic V, Yang Z, Dulloo A. 2004. Ectopic fat storage in heart, blood vessels and kidneys in the pathogenesis of cardiovascular diseases. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28:S58-S65.
- Moreau R, Whitaker B, Hicks K. 2002. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Prog. Lipid Res* 41:457-500.
- Nasri N, Fady B, Triki S. 2007. Quantification of sterols and aliphatic alcohols in Mediterranean Stone pine (*Pinus pinea L.*) populations. *J Agric Food Chem* 55: 2251-2255.
- Nasri N, Khaldi A, Fady B, Triki S. 2005. Fatty acids from seeds of *Pinus pinea L.*: composition and population profiling. *Phytochemistry* 66:1729-1735.
- Nergiz C, Dönmez I. 2004. Chemical composition and nutritive value of *Pinus pinea L.* seeds. *Food Chem* 86:365-368.
- Niki E, Noguchi N, Tsuchihashi H, Gotoh N. 1995. Interaction among vitamin C, vitamin E, and β -carotene. *Am J Clin Nutr* 62:1322S-1326S.
- Nowland M, Hugunin K, Rogers K. 2011. Effects of short-term fasting in male Sprague Dawley rats. *Comp Med* 61:138-144.
- Ouwens D, Boer C, Fodor M, Galan P, Heine R, Maassen A, Diamant M. 2005. Cardiac dysfunction induced by high-fat diet is associated with altered myocardial insulin signalling in rats. *Diabetologia* 48:1229-1237.
- Pan A, Sun Q, Manson J, Willett W, Hu F. 2013. Walnut consumption is associated with lower risk of type 2 diabetes in women. *J Nutr* 143:512-518.

- Pancani T, Anderson K, Brewer L, Kadish I, DeMoll C, Landfield P, Blalock E, Porter N, Thibault O. 2013. Effect of high-fat diet on metabolic indices, cognition, and neuronal physiology in aging F344 rats. *Neurobiol Aging* 34:1977-1987.
- Pandey K, Rizvi S. 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev* 2:270-278.
- Peng Y, Rideout D, Rakita S, Lee J, Murr M. 2012. Diet-induced obesity associated with steatosis, oxidative stress, and inflammation in liver. *Surg Obes Relat Dis* 8:73-83.
- Pérez-Martínez P, Mikhailidis D, Athyros V, Bullo M, Couture P, Covas M, de Koning L, Delgado-Lista J, Díaz-López A, Drevon C, Estruch R, Esposito K, Fitó M, Garaulet M, Giugliano D, García-Ríos A, Katsiki N, Kolovou G, Lamarche B, Maiorino M, Mena-Sánchez G, Muñoz-Garach A, Nikolic D, Ordovás J, Pérez-Jiménez F, Rizzo M, Salas-Salvadó J, Schröder H, Tinahones F, de la Torre R, van Ommen B, Wopereis S, Ros E, López-Miranda J. 2017. Lifestyle recommendations for the prevention and management of metabolic syndrome: an international panel recommendation. *Nutr Rev* 75:307-326.
- Pietta P. 2000. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* 63:1035-1042.
- Plat J, Mensink R. 2005. Plant stanol and sterol esters in the control of blood cholesterol levels: mechanism and safety aspects. *Am J Cardiol* 96:15D-22D.
- Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouységu L. 2011. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew Chem Int Ed* 50:586-621.
- Racette S, Lin X, Lefevre M, Anderson C, Most M, Ostlund R. 2010. Dose effects of dietary phytosterols on cholesterol metabolism: a controlled feeding study. *Am J Clin Nutr* 91:32-38.
- Ras R, Geleijnse J, Trautwein E. 2014. LDL-cholesterol-lowering effect of plant sterols and stanols across different dose ranges: a meta-analysis of randomised controlled studies. *Br J Nutr* 112:214-219.

- Reeves P, Nielsen F, Fahey G. 1993. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123:1939-1951.
- Ros E. 2010. Health benefits of nut consumption. *Nutrients* 2:652-682.
- Ros E y Mataix J. 2006. Fatty acid composition of nuts – implications for cardiovascular health. *Br J Nutr* 96:S29-S35.
- Russell W, Burch R. 1959. The principles of humane experimental technique. Johns Hopkins Bloomberg school of public health Disponible en: <<http://altweb.jhsph.edu>> (visitado el 20 de Agosto de 2017).
- Sabaté J, Cordero-MacIntyre Z, Siapco G, Torabian S, Haddad E. 2005. Does regular walnut consumption lead to weight gain?. *Br J Nutr* 94:859-864.
- Sabeva N, Liu J, Graf G. 2009. The ABCG5 ABCG8 sterol transporter and phytosterols: implications for cardiometabolic disease. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 16:172-177.
- Salas-Salvadó J, Bulló M, Pérez-Heras A, Ros E. 2006. Dietary fibre, nuts and cardiovascular diseases. *Br J Nutr* 96:S45-S51.
- Schmidt-Hebbel H, Pennacchiotti I, Masson L, Mella M. 1990. Tabla de composición química de alimentos chilenos. 8a ed. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas Universidad de Chile. 22 pp.
- Soares A, Matheus M, Lima P, Ferreira A, Azevedo R, Salomé D, Okoshi K, Pai-Silva M, Padovani C, Cicogna A. 2010. Cardiac remodeling in a rat model of diet-induced obesity. *Can J Cardiol* 26:423-429.
- Spiegelman B, Flier J. 2001. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 104:531-543.
- Spiller R. 1994. Pharmacology of dietary fibre. *Pharmac Ther* 62:407-427.

- Steffen L, Jacobs D, Stevens J, Shahar E, Carithers T, Folsom A. 2003. Associations of whole-grain, refined-grain, and fruit and vegetable consumption with risks of all-cause mortality and incident coronary artery disease and ischemic stroke: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am J Clin Nutr* 78:383-390.
- Streppel M, Arends L, Veer P, Grobbee D, Geleijnse J. 2005. Dietary fiber and blood pressure: a meta-analysis of randomized placebo-control trials. *Arch Intern Med* 165:150-156.
- Trinder P. 1969. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *J Clin Path* 22:158-161.
- U.S. Department of Agriculture (USDA). 2017. National Nutrient Database for Standard Reference. Disponible en: <<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/>> (visitada el 10 julio 2017).
- Venkatachalam M, Sathe S. 2006. Chemical composition of selected edible nut seeds. *J Agric Food Chem*. 54:4705-4714.
- Weickert M, Pfeiffer A. 2008. Metabolic effects of dietary fiber consumption and prevention of diabetes. *J Nutr* 138:439-442.
- Woods S, Seeley R, Rushing P, D'Alessio D, Tso P. 2003. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *J Nutr* 133:1081-1087.

ANEXOS

Anexo 1: Ratas Sprague Dawley macho adultas marcadas previo al inicio del tratamiento con la dieta experimental.



Anexo 2: Instalación del modelo experimental de alimentación *ad libitum*.



Anexo 3: Balanza para ratas.



Anexo 4: Disección de animales

a) Primera observación de depósitos grasos



b) Corte de la musculatura, exponiendo la cavidad abdominal.



c) Hígados obtenidos de ratas tratadas.



d) Testículo rodeado de grasa epididimal obtenido de ratas tratadas.

