



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Doctorado en Ciencia de los Alimentos

“Efecto del consumo de pistache (*Pistacia vera* L.)
sobre la actividad locomotora circadiana y la regulación
molecular del reloj circadiano de adultos con sobrepeso”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Doctor en
Ciencia de los Alimentos

Presenta

M. en C. Elisa Dufoo Hurtado

DIRIGIDA POR

Dra. Rocio Campos Vega

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2023.



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Efecto del consumo de pistache (*Pistacia vera* L.) sobre
la actividad locomotora circadiana y la regulación
molecular del reloj circadiano de adultos con
sobrepeso

por

Elisa Dufoo Hurtado

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0
Internacional](#).

Clave RI: FQDCC-157573



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Doctorado en Ciencias de los Alimentos

“Efecto del consumo de pistache (*Pistacia vera* L.) sobre la actividad locomotora circadiana y la regulación molecular del reloj circadiano de adultos con sobrepeso”

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Doctor en Ciencias de los Alimentos

Presenta:

M. en C. Elisa Dufoo Hurtado

Dirigido por:

Dra. Rocio Campos Vega

SINODALES:

Dra. Rocio Campos Vega

Presidente

Dra. Carolina Escobar Briones

Secretario

Dr. Abraham Wall Medrano

Vocal

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña

Suplente

Dr. Andrés Cruz Hernández

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Junio, 2023
México

RESUMEN

Introducción. La cronodisrupción y los cronotipos tardíos aumentan el riesgo de disbiosis intestinal y obesidad, ambas con rasgos epidémicos en México. Afortunadamente, cronobióticos dietarios como la fitomelatonina (PMT), la fibra dietética y los compuestos fenólicos (CF) pueden aliviarla. Los pistaches son una buena fuente de cronobióticos y, hasta la fecha, la mayor fuente de PMT.

Objetivo. Evaluar el efecto del consumo de pistache (*Pistacia vera* L.) sobre la actividad locomotora circadiana, la regulación molecular del ciclo circadiano, y su relación con el sobrepeso mediante un estudio de intervención subcrónico.

Métodos. Se realizó una caracterización fitoquímica de pistaches con (PN+SC) y sin (PN) piel, se evaluó la bioaccesibilidad *in vitro* y permeabilidad aparente (P_{app}) *ex vivo* de PMT y perfil de fermentación colónica (inóculo fecal de persona con cronodisrupción) de ambas muestras para observar el perfil metabólico y modulación de la microbiota colónica. Se evaluó la biodisponibilidad de PMT en humanos y se realizó un estudio de intervención (basal-final, no controlado), en voluntarios sanos (n= 30) que consumieron 28 g de PN+SC por 4 semanas antes de dormir. Se tomaron muestras sanguíneas antes y después de la intervención, se evaluaron parámetros antropométricos y cronobiológicos.

Resultados. La PMT y CF de pistache son bioaccesibles (PN+SC > PN), de moderada P_{app} (muestra/tiempo-especifica) y su fermentación *in vitro* induce cambios en el perfil metabólico [Metabolitos de butirato (PN) y sulfatos/sulfitos (PN+SC)] y microbiota fecal [↓ (Ambas: Bacteroidetes/firmicutes ~13-15%, Ruminococcaceae y Rikenellaceae), ↑ (Ambas: proteobacteria; PN: Lachnospiraceae; PN+SC: Bifidobacteriaceae)]. La PMT de PN+SC es moderadamente biodisponible [55%: T_{max} (40 min), C_{max} (124 pg/mL), AUC_{0-t} (2048 pg./mLmin)] y correlacionó fuertemente con la actividad antioxidante plasmática. Tras la intervención con PN+SC hubo un aumento de los cronotipos matutino (+9.1 %), actividad física alta (+13.6 %), disminuyó la frecuencia de mala calidad del sueño (-18.2 %), esto asociado a una modulación positiva de la actividad locomotora circadiana, posición corporal y sincronización de la temperatura periférica. El consumo de PN+SC moduló positiva (51) o negativamente (37) la expresión de varios genes relacionados al reloj circadiano.

Por último, se observó una disminución significativa de la circunferencia de cintura (-1.59 cm), colesterol total (-10.21 mg/dL) y LDL (-6.57 mg/dL) al final de la intervención **Conclusión.** La evidencia indica que el consumo regular de pistache ayuda a la sincronización de relojes periféricos, alivia la cronodisrupción y mejora algunas desviaciones metabólicas de personas con sobrepeso y obesidad, constituyendo una herramienta nueva y útil en el tratamiento de estos padecimientos.

Palabras clave: Cronobióticos, Disbiosis intestinal, Fito-melatonina, Pistaches, Relojes circadianos,

ABSTRACT

Introduction. Chronodisruption and late chronotypes increase the risk of intestinal dysbiosis and obesity, both with epidemic features in Mexico. Fortunately, dietary chronobiotics such as phyto-melatonin (PMT), dietary fiber, and phenolics (CF) can alleviate it. Pistachios are a good source of chronobiotics and to date the largest source of PMT. **Objective.** To evaluate the effect of pistachio (*Pistacia vera* L.) consumption on circadian locomotor activity, molecular regulation of the circadian cycle, and its relationship with overweight through a subchronic intervention study. **Methods.** Phytochemical characterization of pistachios with (PN+SC) and without (PN) skin was carried out, and the *in vitro* bioaccessibility and apparent permeability (P_{app}) *ex vivo* of PMT and colonic fermentation profile (fecal inoculum from a person with chronodisruption) of both samples to observe the metabolomic profile and modulation of the colonic microbiota. The bioavailability of PMT in humans was evaluated and an intervention study (baseline-final, uncontrolled) was carried out in healthy volunteers (n= 30) who consumed 28 g of PN+SC for 4 weeks before sleeping. Blood samples were taken before and after the intervention, and anthropometric and chronobiological parameters were evaluated. **Results.** PMT and CF of pistachio are bioaccessible (PN+SC> PN), with moderate P_{app}

(sample/time-specific) and their in vitro fermentation induces changes in the metabolomic profile [Butyrate (PN) and sulfate/sulfite (PN) metabolites +SC] and fecal microbiota [\downarrow (Both: Bacteroidetes/Firmicutes ~13-15%, *Ruminococcaceae* and *Rikenellaceae*), \uparrow (Both: Proteobacteria; PN: *Lachnospiraceae*; PN+SC: *Bifidobacteriaceae*)]. The PMT of PN+SC is moderately bioavailable [55%: Tmax (40 min), Cmax (124 pg/mL), AUC_{0-t} (2048 pg/mLmin)] and strongly correlated with plasmatic antioxidant activity. After the intervention with PN+SC, there was an increase in the morning chronotypes (+9.1%), high physical activity (+13.6%), and the frequency of poor sleep quality decreased (-18.2%), this is associated with a positive modulation of circadian locomotor activity, body position, and peripheral temperature synchronization. The consumption of PN+SC positively (51) or negatively (37) modulated the expression of several genes related to the circadian clock. Finally, a significant decrease in waist circumference (-1.59 cm), total cholesterol (-10.21 mg/dL), and LDL (-6.57 mg/dL) was observed at the end of the intervention Conclusion. Evidence indicates that regular pistachio consumption helps to synchronize peripheral clocks, alleviates chronodisruption, and improves some metabolic deviations in overweight and obese people, constituting a new and useful tool in the treatment of these conditions.

Key words: Chronobiotics, Circadian clocks, Intestinal dysbiosis, Phytomelatonin, Pistachios.

DEDICATORIAS

A Karol, mi motor, mi mayor tesoro, mi fortaleza y el regalo más bonito de la vida.

A mis padres, los seres humanos más valiosos del universo, mi apoyo incondicional y mi refugio.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado durante la realización de este proyecto.

A mi alma mater, la Universidad Autónoma de Querétaro por abrirme las puertas de nuevo para la realización de este sueño.

Al laboratorio de Neurofisiología de los ritmos circadianos de la Universidad de las Islas Baleares, Mallorca, España por abrirme las puertas para la realización de una estancia académica.

Al laboratorio Internacional de investigación sobre el genoma humano de la Universidad Autónoma de México, campus Juriquilla y a las técnicas de laboratorio Carina Uribe y Alejandra Castillo por el apoyo brindado para la realización de la última parte de mi proyecto de tesis.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN

I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
II.1. Sobrepeso y obesidad	2
II.2. Cronobiología	2
II.2.1. Ritmos circadianos	3
II.2.2. Fisiología del ritmo circadiano	3
II.2.3. Alteraciones circadianas en el sobrepeso y la obesidad	4
II.2.4. Herramientas para la evaluación del ritmo circadiano	5
II.2.4.1. Tipología circadiana	5
II.2.4.2. Ritmo locomotor circadiano	5
II.2.5. Regulación del ciclo circadiano	6
II.2.5.1. Genes CLOCK	6
II.2.5.1.1. Alteraciones moleculares de genes RELOJ en el sobre peso y obesidad	7
II.2.5.1.2. Modificaciones epigenéticas	8
II.2.6. <i>Zeitgebers</i>	9
II.2.7. Crononutrición	9
II.2.8. Fuentes dietarias de melatonina	10
II.2.8.1. Nueces	10
II.2.8.1.1. Pistache (<i>Pistacia vera</i> L.)	11
II.2.8.1.1.1. Compuestos bioactivos	12
II.2.8.1.1.2. Fito-melatonina	13
II.2.8.1.1.3. Capacidad Antioxidante	14
III. JUSTIFICACIÓN	15
IV. HIPÓTESIS	16
V. OBJETIVOS	16
V.1. Objetivo general	16
V.2. Objetivos particulares	16
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	17
VI.1. Materiales	
VI.1.1. Material biológico	17
VI.1.2. Reactivos	17
VI.2. Métodos	18

VI.2.1. Caracterización química	18
VI.2.1.1. Humedad	18
VI.2.1.2. Lípidos	18
VI.2.1.3. Proteína	19
VI.2.1.4. Cenizas	20
VI.2.1.5. Carbohidratos	20
VI.2.2. Caracterización nutracéutica	20
VI.2.2.1. Fibra dietética	20
VI.2.2.1.1. Fibra insoluble	21
VI.2.2.1.2. Fibra soluble	22
VI.2.2.2. Extracción de compuestos fenólicos	22
VI.2.2.3. Cuantificación de compuestos fenólicos totales	23
VI.2.2.4. Cuantificación de flavonoides totales	23
VI.2.2.5. Compuestos fenólicos por HPLC-DAD	23
VI.2.2.6. Capacidad antioxidante	24
VI.2.2.6.1. DPPH	24
VI.2.2.7 Fito-melatonina	24
VI.2.2.7.1. Extracción de fito-melatonina	24
VI.2.2.7.2. Cuantificación de fito-melatonina	25
VI.2.3. Digestión gastrointestinal <i>in vitro</i>	25
VI.2.3.1. Simulación boca	26
VI.2.3.2. Simulación estómago	26
VI.2.3.3. Simulación intestino delgado	26
VI.2.3.3.1. Técnica del saco intestinal invertido	27
VI.2.3.3.1.1. Manejo de los animales	27
VI.2.3.3.1.2. Sacrificio de los animales y	27
preparación del saco intestinal invertido	
VI.2.3.4. Simulación de la fermentación colónica <i>in vitro</i> de la FND	28
VI.2.3.4.1. Análisis de AGCC y metabólico	29
VI.2.3.4.2. Análisis de la microbiota	30
VI.2.3.4.2.1. Extracción ADN	30
VI.2.3.4.2.2. Secuenciación ADN	30
VI.2.4. Biodisponibilidad de fito-melatonina	31
VI.2.4.1. Extracción de melatonina en plasma	32
VI.2.4.2. Actividad antioxidante	32

VI.2.5. Estudio de intervención	33
VI. 2.5.1. Diseño del estudio	34
VI.2.5.2. Criterios de inclusión	35
VI.2.5.3. Criterios de exclusión	36
VI.2.5.4. Criterios de eliminación	36
VI.2.5.5. Reclutamiento	36
VI.2.5.6. Selección de participantes	37
VI.2.5.7. Composición corporal	37
VI.2.5.8. Cuestionarios	38
VI.2.5.9. Determinaciones bioquímicas	39
VI.2.5.10. Obtención de plasma y leucocitos	40
VI.2.5.10.1. Melatonina	40
VI.2.5.10.2. Actividad Antioxidante	40
VI.2.5.11. Sensores para medir la actividad locomotora circadiana	40
VI.2.5.11.1. Análisis de los datos recolectados de los sensores	41
VI.2.6. Análisis de la expresión de genes CLOCK	43
VI.2.6.1. Extracción de RNA	43
VI.2.6.2. qRT-PCR	43
VI.3. Análisis estadístico	45
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
VII.1. Caracterización química	46
VII.2. Caracterización nutracéutica	48
VII.3. Determinación de compuestos fenólicos por HPLC	50
VII.4. Bioaccesibilidad <i>in vitro</i> de fito-melatonina del pistache	53
VII.4.1. Permeabilidad de fito-melatonina del pistache	57
VII.5. Fermentación colónica	64
VII.5.1. Evaluación del pH durante la fermentación colónica <i>in vitro</i>	64
VII.5.2. Producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC)	65
VII.5.3. Índice de fermentabilidad colónica del pistache	68
VII.5.4. Análisis metabolómico no dirigido del extracto de fermentación colónica <i>in vitro</i> del pistache con y sin piel	69
VII.5.5. Análisis metagenómico de la fermentación <i>in vitro</i> de pistache	76
VII.5.6. Análisis del microbioma intestinal	76
VII.5.7.1. Cambios a nivel de Filo	78

VII.5.7.2. Cambios a nivel de Familia	81
VII.5.7.3. Cambios a nivel de género	83
VII.5.7.4. α y β diversidad	86
VII.5.8. Biodisponibilidad de fito-melatonina	88
VII.5.8.1. Actividad antioxidante	92
VII.5.9. Efecto del consume de pistache mediante un estudio de intervención	95
VII.5.9.1. Características bioquímicas y antropométricas	96
VII.5.9.2. Efecto de la intervención con pistache sobre la melatonina plasmática y la capacidad antioxidante	103
VII.5.9.3. Efecto de la intervención con pistache sobre la actividad locomotora circadiana	104
VII.5.9.3.1. Efecto sobre la temperatura corporal	106
VII.5.9.3.2. Efecto sobre la actividad locomotora	109
VII.5.9.3.3. Efecto sobre la posición corporal	111
VII.5.9.3.4. Efecto sobre la exposición a la luz	114
VII.5.9.4. Efecto de la intervención con pistache sobre la calidad del sueño, cronotipo y actividad física	116
VII.5.9.5. Efecto de la intervención sobre la regulación molecular de genes del reloj circadiano	121
VIII. CONCLUSIONES	131
IX. REFERENCIAS	132
X. ANEXOS	159

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición química del pistache con y sin piel	48
Cuadro 2. Composición nutracéutica del pistache con y sin piel	49
Cuadro 3. Compuestos indentificados por HPLC	52
Cuadro 4. Coeficientes de permeabilidad aparente <i>ex vivo</i> (P_{app}) de compuestos bioactivos de pistache	58
Cuadro 5. Quimio informática molecular y bioactividad potencial de fitoquímicos de pistache	62
Cuadro 6. Cambio de pH durante la fermentación colónica	68
Cuadro 7. Índice de fermentabilidad durante la fermentación colónica <i>in vitro</i>	67
Cuadro 8. Concentración y pureza de ADN	77
Cuadro 9. Características de los participantes del estudio biodisponibilidad	90
Cuadro 10. Parámetros farmacocinéticos de fito-melatonina de pistache	92
Cuadro 11. Características bioquímicas y antropométricas basales y finales	97
Cuadro 12. Melatonina plasmática y actividad antioxidante basal y final	105
Cuadro 13. Análisis paramétrico y no paramétrico de la temperatura periférica	108
Cuadro 14. Análisis paramétrico y no paramétrico de la actividad motora basal y final	111
Cuadro 15. Puntaje de los componentes de la escala Pittsburgh	120
Cuadro 16. Regulación de genes reloj después de la intervención con pistache	127
Cuadro 17. Regulación de receptores asociados a genes reloj después de la intervención con pistache	127
Cuadro 18. Regulación de protein ligasas asociadas a genes reloj después de la intervención con pistache	128
Cuadro 19. Regulación de del ciclo celular asociados a genes reloj después de la intervención con pistache	128
Cuadro 20. Regulación de cinasas asociadas a genes reloj después de la intervención con pistache	129
Cuadro 21. Regulación de genes de la vía CREB asociados a genes reloj después de la intervención con pistache	129
Cuadro 22. Regulación de factores de transcripción asociados a genes reloj después de la intervención con pistache	130
Cuadro 23. Regulación de genes de diversos procesos celulares asociados a genes reloj después de la intervención con pistache	130

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Regulación molecular del reloj circadiano	6
Figura 2. Compuestos bioactivos presentes en muestras de pistache	51
Figura 3. Bioaccesibilidad de fito-melatonina de pistache	54
Figura 4. Comportamiento de fito-melatonina en el intestino delgado	63
Figura 5. Producción de AGCC producidos durante la fermentación <i>in vitro</i> de pistache con y sin piel	65
Figura 6. Mapa de calor del perfil metabolómico no dirigido para los extractos de pistache a diferentes tiempos de fermentación	71
Figura 7. Análisis de enriquecimiento para los metabolitos y su asociación con vías metabólicas	73
Figura 8. Puntajes VIP y metabolitos con mayor puntaje	74
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa 1 % de muestra de ADN extraído de las muestras de fermentación de pistache <i>in vitro</i>	77
Figura 10. Cambios en la composición de la microbiota a nivel de filo y abundancia relativa de Firmicutes y bacteroidetes	80
Figura 11. Mapa de calor de la microbiota intestinal a nivel familia	82
Figura 12. Cambios en la composición de la microbiota a nivel de género	84
Figura 13. Índices de α diversidad	87
Figura 14. Índice Bray-Curtis de β diversidad	88
Figura 15. Biodisponibilidad de fito-melatonina de pistache	91
Figura 16. Actividad antioxidante medida por ORAC y FRAP	93
Figura 17. Correlación de Pearson para la actividad antioxidante y el contenido de fito-melatonina plasmática	95
Figura 18. Diagrama de flujo del estudio de intervención	96
Figura 19. Mapa de calor de correlaciones entre variables antropométricas, bioquímicas y cronobiológicas	102
Figura 20. Análisis de componentes principales de las variables antropométricas, bioquímicas y cronobiológicas	102

Figura 21. Flujo para el análisis del efecto de la intervención sobre la actividad locomotora circadiana	105
Figura 22. Onda media de temperatura periférica basal y final	107
Figura 23. Representación polar de las oscilaciones de temperatura distal de la piel a lo largo de un ciclo de 24 h antes y después del consumo de pistache	109
Figura 24. Onda media de la actividad motora basal y final	110
Figura 25. Onda media de la posición corporal basal y final	112
Figura 26. Análisis de la calidad del sueño a partir de la posición corporal	113
Figura 27. Onda media de la exposición a la luz	115
Figura 28. Promedio de la intensidad de la luz de la mañana, luz de la noche y el contraste mañana-noche	116
Figura 29. Porcentaje (%) de participantes clasificados de acuerdo a su cronotipo antes y después de la intervención	117
Figura 30. Porcentaje (%) de participantes clasificados de acuerdo a su actividad física antes y después de la intervención	118
Figura 31. Porcentaje (%) de participantes clasificados de acuerdo a su calidad del sueño antes y después de la intervención	119
Figura 32. Expresión relativa de genes asociados al reloj circadiano	125
Figura 33. Cambios en la expresión génica de genes del reloj circadiano y genes controlados por reloj (GCR)	126

I. INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2019) define el sobrepeso y la obesidad, como una enfermedad caracterizada por la acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud. Datos epidemiológicos recientes sostienen que el número de personas con estos padecimientos aumenta exponencialmente (Cecchini y Sassi, 2012; Magrone y Jirillo, 2015), y en México estos padecimientos representan una carga importante para el sistema de salud (ENSANUT, 2018). Además del desequilibrio entre la ingesta y el gasto de energía, las personas con exceso de peso corporal presentan horarios irregulares sueño/vigilia, consumo más frecuente de meriendas hipercalóricas, disbiosis intestinal, el jet lag (desfase de horario) social, inflamación crónica, diversas alteraciones circadianas, estrés oxidativo, entre otras consecuencias fisiológicas (Foster *et al.*, 2013; Szewczyk-Golec *et al.*, 2015). Cabe señalar que algunos alimentos contienen compuestos capaces de modular el biorritmo de relojes periféricos conocidos como “cronobióticos”, contribuyen al manejo del sobrepeso y la obesidad y sus comorbilidades; sin embargo, la evidencia es aún limitada (Oseguera *et al.*, 2019; Dufoo-Hurtado *et al.*, 2020).

El objetivo de este trabajo fue el evaluar el efecto del consumo de pistache (*Pistacia vera* L.) sobre la regulación molecular del ciclo circadiano, la actividad locomotora circadiana y su relación con el sobrepeso, como una herramienta dietaria para contribuir a disminuirlo, debido a que representa uno de los principales problemas de salud en la población.

II. ANTECEDENTES

II.1. Sobrepeso y obesidad

El sobrepeso (25 a 29.9 kg/m²) y la obesidad (> o igual a 30 kg/m²) constituyen uno de los problemas más importantes de salud pública en México. El exceso de peso (≥ 25 kg/m²) es considerado una alteración metabólica crónica, caracterizada por el aumento de la grasa corporal (> 25 % del peso corporal) y asociado a un mayor riesgo de enfermedades crónicas no transmisibles (Moreno, 2012). Cabe señalar que el número de personas con estos padecimientos aumenta exponencialmente (Cecchini y Sassi, 2012; Magrone y Jirillo, 2015), teniendo México uno de los crecimientos más rápidos a nivel mundial, lo que constituye un serio problema de salud pública al generar altos costos para la nación (ENSANUT, 2018).

Por definición, el sobrepeso y la obesidad se generan cuando el ingreso (alimentación) es superior al gasto (actividad física) energético durante un periodo suficientemente largo, este desequilibrio se ve influenciado por la compleja interacción de factores genéticos, conductuales y de ambiente físico y social (Peña y Bacallao, 2001). También ha sido demostrado que las alteraciones circadianas y la disbiosis colónica juegan un papel importante en el desarrollo de estos padecimientos, siendo importante considerar este enfoque dentro de las estrategias implementadas para combatir el sobrepeso y la obesidad (Castro *et al.*, 2017; Kiehn *et al.*, 2017).

II.2. Cronobiología

La cronobiología es una parte de la ciencia que se dedica a investigar y cuantificar los fenómenos y mecanismos de la estructura del tiempo biológico en los seres vivos, en pocas palabras se dice que la cronobiología es el estudio de los ritmos circadianos en los seres vivos (Volk, Lowe y Barnes, 2022).

II.2.1. Ritmos circadianos

Como consecuencia de la rotación cíclica de la Tierra alrededor de su eje (aproximadamente cada 24 horas), la mayoría de los seres vivos están sujetos a fluctuaciones predecibles de luz y temperatura (Dufoo-Hurtado *et al.*, 2020). Los seres vivos desarrollaron un cronometro interno o comúnmente conocido como reloj circadiano, el cual tiene como objetivo final, el ajuste óptimo del comportamiento, metabolismo y fisiología de los seres vivos a los cambios ambientales que ocurren durante un día (Barandas *et al.*, 2015).

Los relojes circadianos son ciclos fisiológicos y conductuales con una periodicidad estable (aproximadamente 24 horas). Estos proporcionan un mecanismo de adaptación para coordinar la fisiología y el comportamiento con cambios diarios predecibles en el entorno. El reloj circadiano se puede dividir en 2 partes: el reloj central, que reside en el núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo, que recibe señales de luz, y los relojes periféricos que residen en varios tejidos del cuerpo (Froy, 2010; Kiehn *et al.*, 2017). Estos ritmos son los responsables de controlar diversos procesos fisiológicos como los ciclos de sueño/vigilia, la temperatura corporal, actividad cardiovascular, alimentación, sistema endocrino mediante la secreción de hormonas, actividad renal, fisiología del tracto gastrointestinal, entre otros (Zee *et al.*, 2013).

II.2.2. Fisiología del ritmo circadiano

Los ritmos circadianos son sincronizados con la rotación de la Tierra mediante ajustes diarios del tiempo, posterior a la exposición a estímulos o sincronizadores ambientales los cuales señalan la hora del día “*Zeitgebers*” (Van Someren y Riemersma-Van Der Lek, 2007). Dentro de los sincronizadores más destacados están los ciclos de luz/obscuridad, horario de comidas, ejercicio o actividad física, los sincronizadores sociales, los compuestos asociados a los alimentos, entre otros. Sin embargo, se considera que la luz es el sincronizador circadiano más potente del NSQ (Zee *et al.*, 2013).

II.2.3. Alteraciones circadianas en el sobrepeso y la obesidad

Como se mencionó anteriormente, los ritmos circadianos proporcionan un mecanismo de adaptación para coordinar la fisiología y el comportamiento con cambios diarios predecibles en el entorno (Herzorg, 2007); por lo tanto, una desincronización de estos puede tener consecuencias negativas en los ciclos de actividad de descanso y otras funciones, llevando a diversos problemas de salud incluyendo el desarrollo de trastornos psiquiátricos y metabólicos (Zee *et al.*, 2013; Barandas *et al.*, 2015).

De acuerdo con la dinámica de los ritmos circadianos se reconocen 5 cronotipos, distinguiéndose dos cronotipos: las personas que prefieren acostarse temprano y levantarse temprano (cronotipo matutino) y, las personas que prefieren acostarse tarde y levantarse tarde que pertenecen (cronotipo vespertino) (Horne y Ostberg, 1976; Roenneberg *et al.*, 2007). Existe evidencia de que el cronotipo vespertino se encuentra asociado a menos horas de sueño, bajo rendimiento académico y hábitos dietarios poco saludables, incluyendo que tienden a saltarse el desayuno con mayor frecuencia. Los datos también sugieren que quedarse despierto hasta altas horas de la noche puede llevar a los individuos a comer en exceso, por lo que este cronotipo presenta un mayor riesgo de desarrollar alteraciones metabólicas como la obesidad (Fleig y Randler, 2009; Sato-Mito *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2015).

Aunado a todo esto, se ha reportado que las personas con sobrepeso y obesidad presentan alteraciones en la microbiota colónica. La disbiosis intestinal es una alteración en la microbiota colónica, en la cual se presenta un desbalance en el equilibrio microbiano de la microbiota normal, así como de sus metabolitos, debido a un cambio en la distribución de las poblaciones (De Cosío-Barrón *et al.*, 2020). Aunado a esto, se ha reportado que las poblaciones de microorganismos presentes en el colon presentan una dinámica circadiana dependiendo de la hora del día (Frazier y Chang, 2020), sugiriéndose que existen diferencias en las

poblaciones de microorganismos de personas con cronotipos extremos como el matutino y el vespertino (Carasso *et al.*, 2021).

II.2.4. Herramientas para la evaluación del ritmo circadiano

II.2.4.1. Tipología circadiana

La expresión rítmica circadiana es diferente entre individuos y puede clasificarse según su tipología, la cual depende de la preferencia de las personas para realizar sus actividades diarias reconociéndose 5 tipologías: matutina moderada, matutina extrema, intermedia, vespertina moderada y vespertina extrema. La tipología circadiana se determina mediante una serie de cuestionarios de auto evaluación validados en varios países (Adan *et al.*, 2012).

De manera general, los sujetos que presentan una tipología circadiana matutina se levantan y acuestan temprano, teniendo sus máximos de actividad en la primera mitad del día, mientras que los vespertinos se levantan y acuestan tarde presentando sus máximos de actividad hacia la tarde e incluso las primeras horas de la noche (Adan, 2006). Independientemente de la tipología circadiana el ritmo circadiano puede estar alterado por trastornos del sueño y la alimentación (Mongrain *et al.*, 2006; Sack *et al.*, 2007).

II.2.4.2. Ritmo locomotor circadiano

Una herramienta útil para evaluar el funcionamiento de los ritmos circadianos es a través de la evaluación del ritmo locomotor. Esta herramienta nos permite evaluar el ritmo en los procesos de actividad/reposo, sueño/vigilia, el ritmo de la temperatura corporal y la exposición a la luz, como respuesta a los cambios en el ambiente. Esto nos proporciona una forma práctica, no invasiva y simple de conocer las alteraciones del sistema circadiano en condiciones normales de vida (Ortiz-Tudela *et al.*, 2010).

II.2.5. Regulación del ciclo circadiano

II.2.5.1. Genes CLOCK

Estudios en numerosos organismos han demostrado que los ritmos circadianos se controlan a nivel celular, a través de un conjunto central de genes altamente conservados denominados CLOCK (*Ciclos de salida del aparato locomotor circadiano Kaput, por sus siglas en inglés*). El control se da mediante un proceso de retroalimentación negativa basado en una auto regulación transcripcional/traslacional, tanto en el NSQ como en tejidos periféricos, proporcionando la base molecular del ritmo circadiano (Dibner *et al.*, 2010; Barandas *et al.*, 2015).

A nivel molecular se conocen 2 factores de transcripción CLOCK y BMAL1 (receptor nuclear translocador de aril hidrocarburos en cerebro y músculo 1, por sus siglas en inglés), los cuales heterodimerizan y regulan la expresión de varios genes reloj tales como los genes periodo (*Per1*, *Per2* y *Per3*), regulador circadiano criptocromo 1/2 (*Cry1* y *Cry2*), receptores huérfanos relacionados con el receptor de ácido retinoico (RORa, RORb y RORc) y los receptores nucleares REV-ERB (REV-ERVa y REV-ERBb, **Figura 1** (Vieira, 2015; Reschke *et al.*, 2018).

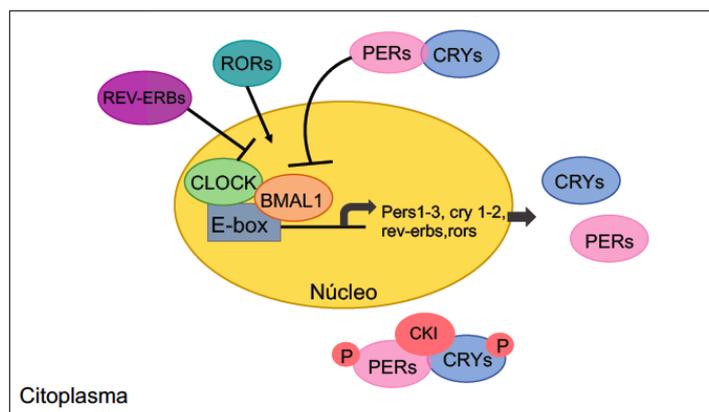


Figura 1. Regulación molecular del reloj circadiano (Vieira, 2015)

Durante el día (en respuesta a la luz) CLOCK interactúa con BMAL1 para activar la transcripción de *Per* y *Cry*, las cuales heterodimerizan, se traslocan al núcleo e inhiben la transcripción mediada por CLOCK/BMAL1 (**Figura 1**). Durante la noche (en respuesta a la disminución/ausencia de luz) el complejo represor *Per/Cry* se degrada y el ciclo comienza de nuevo. La regulación de este complejo también se regula a través de su degradación en el citoplasma, donde es fosforilada por la caseína kinasa 1 (CKI). En un ciclo de retroalimentación secundario, los REV-ERB y los ROR participan en la regulación de la expresión de BMAL1 (Zee et al., 2013; Vieira, 2015; Reschke et al., 2018).

II.2.5.1.1. Alteraciones moleculares de genes RELOJ en el sobrepeso y obesidad

Mure et al. (2018), revelaron la expresión rítmica de diferentes genes a lo largo del día, evidenciando que casi el 82 % de los genes que codifican para proteínas muestran cambios rítmicos en su expresión en diferentes tejidos.

Experimentos *in vivo* revelan el impacto de las alteraciones en genes del sistema RELOJ sobre el metabolismo. Se ha demostrado que la delección en alguno de los factores de transcripción (CLOCK y BMAL1) produce hiperfagia induciendo el desarrollo de obesidad en ratones (Turek et al., 2005; Paschos et al., 2012). También se ha demostrado en experimentos *in vivo* que la delección del gen *per* tiene efectos negativos sobre la modulación de PPAR- γ , pieza clave del metabolismo de lípidos (Preitner et al., 2002). La delección del gen *Rev-erb*, tiene como consecuencia una alteración en la actividad locomotora de roedores; llevando a periodos de actividad más cortos (Feng y Lazar, 2012)

II.2.5.1.2. Modificaciones epigenéticas

Las modificaciones epigenéticas se definen como reordenamientos reversibles de la cromatina en las células normales que modulan la expresión de

genes, sin cambiar la secuencia de ADN (Tume-Farfán, 2014). Estos cambios no son estáticos y pueden estar influenciados por factores ambientales como la dieta, el estrés o un desajuste en el reloj circadiano. Algunas de las modificaciones genéticas son la metilación o acetilación del ADN, la modificación de histonas y los microRNAs (Portela y Esteller, 2010).

Diversos estudios demuestran la existencia de un vínculo entre los cambios epigenéticos (acetilación/metilación del ADN) del sistema circadiano y su asociación con el metabolismo (Pagano *et al.*, 2017). Ha sido demostrada una asociación entre el estado de metilación de los genes del sistema circadiano (CLOCK, BMAL-1 y Per2) con la obesidad, síndrome metabólico y la pérdida de peso, incluso se sugiere que este estado de metilación podría usarse como biomarcador para predecir el éxito de la pérdida de peso (Milagro *et al.*, 2011). En experimentos *in vivo* se ha demostrado que modificaciones epigenéticas en los *Per2* y *Clock* alteran la conducta alimentaria de animales, llevando a un aumento en su ingesta calórica (Garaulet *et al.*, 2011).

En intervenciones con personas se ha demostrado que aquellas que con sobrepeso presenten un perfil de metilación diferente en genes CLOCK, teniendo una hipometilación de clock y una hipermetilación de *Cry2*. En otro estudio Samblas *et al.* (2016) demostraron que la pérdida de peso a través de la dieta mediterránea puede influir en los niveles de metilación de los genes *Bmal1*, *Clock* y *Nr1d1* (*miembro 1 de la subfamilia D de receptores nucleares*), existiendo una asociación entre los niveles de metilación y el perfil de lípidos séricos inducidos por la dieta, además se encontraron correlaciones significativas entre los cambios de los niveles de metilación en la región CpG5 a 9 de *Bmal1*.

II.2.6. *Zeitgebers*

Aunque desde hace mucho tiempo se reconoce que la luz es el *Zeitgeber* principal para el reloj central en el NSQ del cerebro, los estudios en animales han sugerido que los alimentos a través de la hora de consumo y de compuestos

presentes en ellos, también actúan como *Zeitgebers* dominante para relojes periféricos en particular para tejidos como el adiposo y hepático (Pilorz *et al.*, 2018).

II.2.7. Crononutrición

La “crononutrición” es un tema de actualidad en cronobiología (Tahara y Shibata, 2014, 2017); esta es una disciplina emergente que se basa en la relación íntima entre los ritmos circadianos endógenos y el metabolismo (Johnston *et al.*, 2016) la cual abarca dos aspectos principales: la contribución de los componentes presentes en los alimentos al mantenimiento de la salud y, la contribución de los componentes de los alimentos a cambios rápidos o bien el reinicio de nuestros sistemas de reloj internos. Por lo tanto, está corriente se posiciona como una estrategia prometedora para mantener nuestra salud a partir de la regulación del ciclo circadiano (Tahara y Shibata, 2014).

El efecto del metabolismo en los relojes circadianos resulta de los patrones de alimentación, los compuestos bioactivos presentes en los alimentos o el control hormonal asociado a la regulación energética y control de ingesta alimentaria. Al momento, se han identificado diversos nutrientes y xenobióticos dietarios capaces de restablecer o cambiar de fase los ritmos circadianos: Glucosa, aminoácidos, sodio, etanol, la melatonina exógena, cafeína y el ácido retinoico. Algunas de las hormonas involucradas en este proceso son la insulina, glucagón, adiponectina, leptina, entre otras; éstas han demostrado presentar una oscilación circadiana, lo cual se refiere a la expresión de estas durante el día y su supresión durante la noche o viceversa. Varias de las hormonas mencionadas también pueden inducir o restablecer los ritmos circadianos mediante la regulación de la expresión de genes del sistema reloj (Froy, 2010). Pese a todo este conocimiento acumulado, la evidencia del papel de compuestos bioactivos de alimentos, así como el efecto de intervenciones dietarias es casi nulo y las evaluaciones son limitadas; existiendo como única evidencia un artículo dentro de nuestro grupo de trabajo el cual evalúa el efecto de una intervención con fibra

dietaria antioxidante sobre el cronotipo y la actividad locomotora circadiana. Los resultados mostraron un cambio en el cronotipo de los individuos, cambiando del cronotipo vespertino a un cronotipo matutino, trayendo consigo una mejora en la actividad locomotora; sugiriéndose que este efecto se encuentra mediado por la fibra dietaria, la generación de ácidos grasos de cadena corta en colon y otros compuestos bioactivos como la fito-melatonina (Oseguera-Castro *et al.*, 2019).

II.2.8. Fuentes dietarias de melatonina

Después de ser considerada como una hormona producida exclusivamente en la glándula pineal y otros órganos de los animales, se ha identificado que la melatonina existe ampliamente en la naturaleza y es posible encontrarla tanto en alimentos de origen animal como en cereales, frutas y vegetales, nueces, entre otros (Meng *et al.*, 2017; Tindall *et al.*, 2018).

Ha sido reportado que el consumo de alimentos ricos en melatonina puede tener efectos benéficos a la salud al aumentar significativamente la concentración de melatonina y capacidad antioxidante en suero mostrando un potencial nutracéutico (Aguilera *et al.*, 2015).

II.2.8.1. Nueces

Debido a su composición las nueces son un alimento altamente nutritivo, ya que contienen diversos compuestos bioactivos que promueven la salud (Alasalvar y Bolling, 2015). De acuerdo con estudios clínicos y epidemiológicos esto se relaciona principalmente con la disminución en el riesgo de presentar y desarrollar enfermedades cardiovasculares y otras afecciones crónicas como la obesidad. Por esta razón, varias asociaciones internacionales recomiendan su consumo regular, debido a que son consideradas una fuente importante de ácidos grasos insaturados, proteínas, fibra, vitaminas y otros fitoquímicos como compuestos fenólicos, fito-esteroles, carotenoides, entre otros (Bes-Rastrollo *et al.*, 2009; USDA, 2013; Bulló *et al.*, 2015).

De acuerdo con la revisión de Meng *et al.* (2017), Tindall *et al.* (2018) y a lo reportado por Oladi *et al.* (2014), las nueces son el grupo de alimentos reportado con un mayor contenido de fito-melatonina, un potente antioxidante que contribuye en la promoción del sueño y por lo tanto en la regulación del sistema circadiano.

II.2.8.1.1. Pistache (*Pistacia vera* L.)

El pistache es una nuez de árbol, miembro de la familia *Anacardiaceae*, originaria de las zonas áridas de Asia central y occidental. Sin embargo, es altamente consumido en todo el mundo debido a sus características sensoriales y nutricionales (Dreher, 2012). El mayor productor de pistache a nivel mundial es Irán, seguido de Estados Unidos, donde la producción se ubica en California (Grace *et al.*, 2016). En México, la producción se concentra en las zonas del norte del país como Baja California, Chihuahua y Tamaulipas, con un valor total de la producción en 2019 fue de apenas \$3,480.65 por lo que la mayor parte del pistache en nuestro país es importada de Estados Unidos (Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2019).

La nuez de pistache consta de una cáscara, la cual es una cubierta exterior dura y blanquecina que rodea la parte comestible de la nuez y constituye aproximadamente el 50 % de su peso (Dreher, 2012). La parte comestible del fruto es la semilla, la cual tiene adherida a su vez una piel delgada, que de acuerdo con lo reportado también es una fuente rica en compuestos fenólicos (Esteki *et al.*, 2019).

Debido a su alto valor nutricional y larga vida de almacenamiento, el pistache es utilizado principalmente como aperitivo, siendo consumido tanto crudo como tostado y se incorpora como ingrediente a diferentes productos alimenticios como helados, ensaladas, productos de panadería y salsa (Tomaino *et al.*, 2010; Esteki *et al.*, 2019). Este se diferencia de otras nueces debido a que

tiene un menor contenido de grasa y aporte energético, así como niveles más altos de fibra, vitamina K, fitoesteroles, carotenoides y tocoferoles, entre otros. Estos componentes pueden actuar de manera sinérgica ayudando a promover la salud cardiovascular, el control glucémico y el mantenimiento del peso cuando se consumen con moderación y en el contexto de una dieta saludable (Dreher, 2012; Bulló *et al.*, 2015).

II.8.2.1.1.1. Compuestos bioactivos

El pistache es una fuente rica en compuestos fenólicos y otras moléculas lipofílicas, por lo que puede considerarse como un alimento funcional único, el cual ha sido clasificado entre los primeros 50 alimentos con mayor potencial antioxidante (Halvorsen *et al.*, 2006). Este es una rica fuente de compuestos fenólicos, dentro de los que se incluyen ácidos fenólicos, antocianinas, flavonoles, taninos hidrolizables, flavonoides, entre otros, además se ha reportado que es la única nuez que contiene antocianinas y compuestos fenólicos, presentes en la piel que cubre a la semilla (Tomaino *et al.*, 2010; Bolling *et al.*, 2011; Bulló *et al.*, 2011), compuestos que son reconocidos por su alta capacidad antioxidante, así como por sus propiedades quimiopreventivas, cardioprotectivas y vasoprotectivas (Bulló *et al.*, 2015).

También contiene carotenoides como la luteína y la zeaxantina, los cuales son los responsables de la coloración de la semilla. Los pistaches crudos contienen 1405 µg de ambos carotenoides por cada 100 g. Además, tienen el contenido más alto de fitoesterol con 214 mg/100 g, incluyendo el estigmasterol, campesterol y β-sitosterol. También es importante destacar que, de los ácidos grasos presentes en el pistache, el oleico y linoleico representan más del 60% de su contenido total de grasa y que el pistache es una fuente rica en fibra, conteniendo 10% de su peso de fibra insoluble y de 0 a 3% de fibra soluble (Dreher, 2012; Bulló *et al.*, 2015).

II.2.8.1.1.2. Fito-melatonina

Dentro del grupo de las nueces, el pistache es considerado la fuente dietaria más rica en fito-melatonina reportada, con un contenido de hasta 233,000 ng de melatonina por gramo, dependiendo de la variedad. Esta cantidad se correlaciona con aproximadamente 12.7-13 mg de melatonina en 57 g de pistache, mientras que el contenido de melatonina en los suplementos de venta libre varía de 1-20 mg, posicionando al pistache como un alimento con alto potencial nutracéutico (Meng *et al.*, 2017; Tindall *et al.*, 2018).

La melatonina es producida de manera endógena en los organismos (Touitou *et al.*, 2017), sin embargo, su producción disminuye con la edad (Brzezinski, 1997) y de manera importante, se ha reportado que niveles bajos de melatonina se asocian con padecimientos como la obesidad (Pivonello *et al.*, 2021), haciendo necesaria en la edad adulta su administración exógena, la cual puede ser a través de fuentes naturales como los alimentos, ayudando así a la regulación del sueño y el control de diversas enfermedades crónicas (Meng *et al.*, 2017; Tindall *et al.*, 2018).

Arnao y Hernández-Ruiz, (2018a) mencionan que el término melatonina es utilizado para la molécula obtenida por síntesis química o de origen animal, mientras que la melatonina de origen vegetal es denominada como fito-melatonina; es importante destacar que presentan la misma estructura y que ambas son sintetizadas a partir del aminoácido triptófano. La posibilidad de reemplazar el consumo de melatonina a través de suplementos por la fito-melatonina de fuentes naturales, se sugiere debido a que durante la síntesis química de melatonina se generan diversos sub-productos derivados del triptófano, los cuales se han asociado con el síndrome de eosinofilia-mialgia (EMS) (Arnao y Hernández-Ruiz, 2018b).

II.2.8.1.1.3. Capacidad antioxidante

Tanto los compuestos fenólicos, así como la fito-melatonina presente en la piel y en la semilla del pistache, le proporcionan una alta capacidad antioxidante. Tomaino *et al.* (2010) evaluaron la capacidad antioxidante de semillas y piel de pistache variedad Bronte proveniente de Italia. Mediante la técnica de DPPH, la cantidad de piel y semillas necesarias para tener actividad anti radical contra 50 μ moles del radical DPPH fueron 14.99 mg y 0.019 mg, respectivamente. Estos resultados demuestran la capacidad antioxidante del pistache; los mayores valores de capacidad antioxidante se presentan en la piel, lo que concuerda con su contenido de compuestos fenólicos presentes, ya que son más y de mayor diversidad, observándose que es la responsable de la capacidad antioxidante de la nuez entera y sugiriéndose que su consumo sea sin pelar (Tomaino *et al.*, 2010; Bolling *et al.*, 2011; Bulló *et al.*, 2011).

III. JUSTIFICACIÓN

Debido a que el sobrepeso ha sido declarado una epidemia a nivel mundial, en la que las estrategias implementadas para combatirlo no han sido suficientes, es importante considerar otras áreas para coadyuvar en el tratamiento de este padecimiento. Se ha demostrado que factores como los horarios irregulares sueño/vigilia, la alta frecuencia de meriendas abundantes, la disbiosis colónica, el jet lag social, la inflamación crónica, las alteraciones circadianas, el estrés oxidativo y la falta de sueño llevan a un estado de cronodisrupción en el organismo contribuyendo al desarrollo de sobrepeso y obesidad. Debido a que la dieta es un componente importante del estilo de vida y a que se ha comprobado que los horarios de comida y compuestos presentes en los alimentos desempeñan un papel fundamental en la prevención de la cronodisrupción, es necesario mejorar la alimentación desde la perspectiva de la crononutrición.

Esto se evaluará a través de una intervención dietaria con pistache dado que es uno de los alimentos que componen la dieta mediterránea, y se asocia a una gran variedad de efectos positivos a la salud. Además, es la fuente dietaria con mayor contenido de fito-melatonina reportada hasta el momento y presenta un alto contenido de fibra dietaria. Por lo tanto, sugerimos que su consumo puede contribuir a la sincronización de relojes periféricos, como el del tejido adiposo, teniendo un efecto benéfico como coadyuvante en el tratamiento del sobrepeso a través de la regulación de los ritmos circadianos.

IV. HIPÓTESIS

El pistache, por su contenido de compuestos bioactivos, como la fito-melatonina, modula positivamente la actividad locomotora circadiana, mejora la calidad del sueño y la cronodisrupción en adultos con sobrepeso. La modulación estará influenciada por un cambio en la microbiota colónica, sus metabolitos y la expresión de genes del reloj circadiano y genes controlados por reloj.

V. OBJETIVOS

V.1. Objetivo general

Evaluar el efecto del consumo de pistache (*Pistacia vera* L.) sobre la actividad locomotora circadiana, la regulación molecular del ciclo circadiano, y su relación con el sobrepeso mediante un estudio de intervención.

V.2. Objetivos particulares

1. Determinar la composición proximal, nutracéutica, contenido de fito-melatonina de pistache (*Pistacia vera* L.), su bioaccesibilidad gastrointestinal *in vitro* y permeabilidad aparente *ex vitro*.
2. Analizar los cambios en el microbioma y metaboloma fecal en un modelo de fermentación colónica *ex vivo* de pistache.
3. Evaluar la biodisponibilidad de fito-melatonina de pistache y la capacidad antioxidante en plasma en un estudio de intervención.
4. Evaluar el efecto del consumo de pistache sobre parámetros bioquímicos, antropométricos, cronobiológicos y la modulación de genes reloj en un estudio de intervención.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VII.1. Caracterización química

El componente mayoritario de ambas muestras de pistache son los lípidos, representando hasta un 50% de su composición (**Cuadro 1**). Comparado con otros frutos secos como las nueces de macadamia, la nuez pecana o las avellanas, el pistache tiene un menor contenido de lípidos (Bulló *et al.*, 2015). Además, es una fuente rica de lípidos insaturados, donde la fracción lipídica está compuesta principalmente por ácidos grasos mono y poliinsaturados; de manera particular aproximadamente el 60 % del contenido total de grasa en los pistaches corresponde a los ácidos linoleico y oleico los cuales tienen efectos benéficos a la salud, siendo reconocidos por sus propiedades en la prevención cardiovascular (Gillingham *et al.*, 2011).

El contenido de proteína en los pistaches representa aproximadamente un 20% de su composición, por lo cual se le ha considerado como una buena fuente de proteína vegetal (Hernández-Alonso *et al.*, 2016). Se ha reportado que, incluyendo a las almendras y nueces de la india, los pistaches son reconocidos como los frutos secos con mayor contenido de proteína (Sathe *et al.*, 2009); contienen aminoácidos esenciales y un alto porcentaje de aminoácidos ramificados como la leucina, isoleucina y valina (Bulló *et al.*, 2015).

El total de carbohidratos (calculado por diferencia) fue significativamente mayor en el pistache con piel, encontrándose un valor de 24.8 g de carbohidratos por cada 100 g de muestra; mientras que para el pistache sin piel (PN) fue de 16.4 g por cada 100 g de pistache. Como parte de los carbohidratos se cuantificó el contenido de fibra dietaria, en donde se encontró que el pistache tiene un mayor contenido de fibra insoluble que de soluble; siendo el pistache con piel (PN+SC) el que presenta el mayor contenido de fibra total y sus fracciones

(**Cuadro 1**). Ha sido reportado que la almendra y el pistache son las nueces con un mayor contenido de fibra (Ros, 2010), la cual tiene efectos benéficos a la salud encontrándose que su ingesta está inversamente asociada con el aumento de peso, diabetes, algunos tipos de cáncer (Kaczmarczyk *et al.*, 2012; Ye *et al.*, 2012). Además, como resultado de su fermentación por parte de la microbiota colónica, la fibra favorece la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), los cuales han demostrado *in vitro* tener un efecto benéfico en la prevención del cáncer colorrectal (García-Gutiérrez *et al.*, 2017; Hernández-Arriaga *et al.*, 2017). También se ha demostrado, mediante un ensayo *in vivo*, que los AGCC pueden sincronizar relojes periféricos como los presentes en órganos como el hígado, riñón y la glándula submandibular (Tahara *et al.*, 2018).

Cuadro 1. Composición química del pistache (*Pistacia vera* L.) con y sin piel

Los resultados se expresan en base seca y se presentan como la media \pm la desviación estándar de dos ensayos independientes por duplicado. * Indica diferencia significativa entre muestras por la prueba t de Student para datos no pareados $p < 0.05$.

VII.2. Caracterización nutracéutica

Respecto a la evaluación nutracéutica, es posible observar que en todos los parámetros evaluados el pistache con piel presentó los mejores resultados, con un mayor contenido de compuestos fenólicos libres: fenoles y flavonoides totales, así como una mayor capacidad antioxidante y contenido de fito-melatonina (**Cuadro 2**).

Parámetro	PN+SC	PN
Lípidos	45.4 \pm 0.45	53.3 \pm 0.20*
Proteínas	23.9 \pm 0.21	25.0 \pm 0.06*
Carbohidratos	24.8 \pm 0.51*	16.4 \pm 0.19
Fibra total	13.2 \pm 0.23*	8.40 \pm 0.30
<i>Fibra insoluble</i>	12.6 \pm 0.23*	6.30 \pm 0.23
<i>Fibra soluble</i>	0.60 \pm 0.03*	0.27 \pm 0.01
Cenizas	4.30 \pm 0.09*	3.21 \pm 0.03
Humedad	1.57 \pm 0.07	2.15 \pm 0.05*

Cuadro 2. Composición nutracéutica del pistache (*Pistacia vera* L.) con y sin piel.

Parámetro	PN+SC	PN
Fenoles totales libres (mg EAG/ g)	3.43 ± 0.43*	2.43 ± 0.16
Flavonoides totales libres (mg ER/ g)	1.71 ± 0.27*	1.08 ± 0.10
Tocoferoles totales (mg ET/ 100 g)	11.8 ± 1.3	13.1 ± 2.3
Carotenoides totales (mg EβC/ 100g)	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.02
Capacidad antioxidante		
DPPH (μM eq Trolox/ g)	638.15 ± 62.31*	155.62 ± 26.52
Fito-melatonina (μg EM/g)	215.6 ± 3.56*	172.3 ± 2.12

Los resultados se presentan como la media ± la desviación estándar de dos ensayos independientes por triplicado.

EAG: Equivalentes de ácido gálico; ER: Equivalentes de rutina, EM: Equivalentes de melatonina, ET: Equivalentes de tocoferol, EβC: Equivalentes de beta caroteno *Indica diferencia significativa entre muestras por la prueba t de Student para datos no pareados p < 0.05

Los pistaches son una fuente de compuestos fenólicos, incluyendo ácidos fenólicos, flavonoides, proantocianidinas, flavonoles, isoflavonas y taninos hidrolizables. Además de esto, ha sido reportado que los pistaches son la única nuez que contiene antocianinas, las cuales se encuentran presentes en la piel; todas estas familias son compuestos antioxidantes con importantes efectos benéficos a la salud como quimiopreención, cardio y vasoprotección (Bolling *et al.*, 2011; Bulló *et al.*, 2011). La cantidad de fenoles totales libres fue de 3.43 mg EAG/ g muestra para el pistache con piel y de 2.43 mg EAG/ g muestra para el pistache sin piel; de acuerdo con lo previamente reportado por Tomaino *et al.* (2010), a diferencia de la semilla, la piel del pistache presenta un mayor contenido de compuestos fenólicos de todas las familias. Como parte de la caracterización nutracéutica se evaluó la capacidad antioxidante por el método de DPPH, observándose una mayor capacidad antioxidante en la muestra de pistache con piel (**Cuadro 2**).

Las muestras de pistache también incluyen fitoquímicos liposolubles como los tocoferoles y carotenoides (**Cuadro 2**), los cuales han demostrado tener un efecto positivo sobre el ritmo circadiano (Aalsavar *et al.*, 2020). Los carotenoides totales (~ 0.025 mg / kg) fueron detectados sin diferencias significativas entre muestras (PN y PN+SC).

La melatonina, comúnmente conocida como "la hormona de la oscuridad" (N-Acetil-5-metoxitriptamina, circadina; C₁₃H₁₆N₂O₂, Pubchem CID: 896) es una hormona que se produce del aminoácido esencial triptófano (Trp) en el cerebro de los seres humanos, específicamente en la glándula pineal. Su función es esencial en alteraciones relacionadas con la edad, incluida la cronodisrupción y la senescencia celular (Cardinali, 2019). Esta hormona es producida por varios tejidos corporales. Sin embargo, la cantidad de melatonina producida fisiológicamente disminuye con la edad y puede estar relacionado con el desarrollo de condiciones patológicas, en estos casos se puede melatonina de alimentos vegetales para aumentar la cantidad de melatonina sistémica (Dufoo-Hurtado *et al.*, 2020).

Una molécula de gran interés es la fito-melatonina ya que se ha reportado que el consumo de alimentos ricos en este compuesto pueden tener efectos benéficos a la salud; además de esto, ha sido reportado que el pistache es uno de los alimentos con el mayor contenido de fito-melatonina (233,000 ng / g), por encima de otros alimentos como los granos tostados de café (6500 ng/g), los hongos (6400 ng / g), las lentejas (1089 ng / g) y las fresas (11.26 ng / g) (Meng *et al.*, 2017; Arnao y Hernández-Ruiz, 2018b).

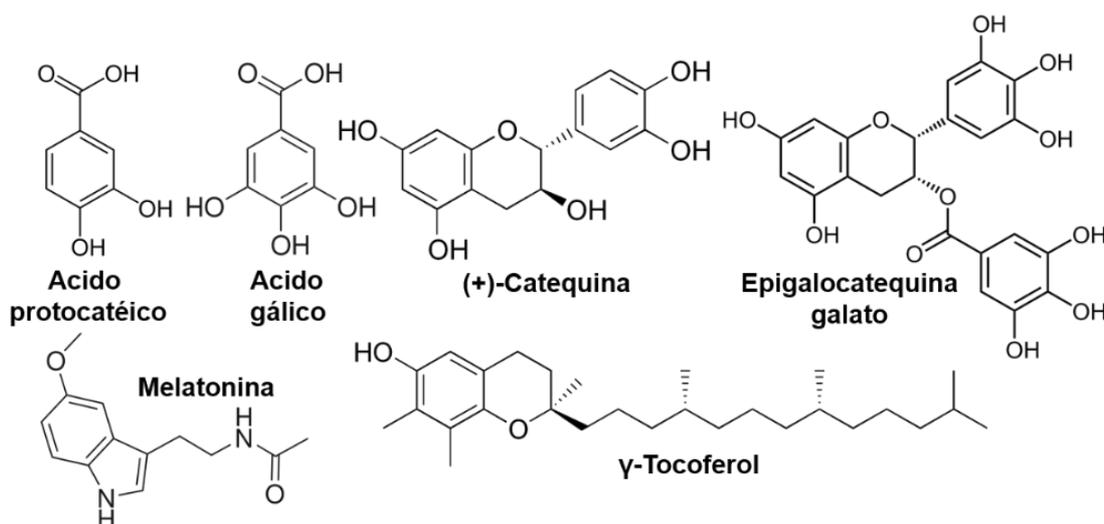
El pistache con piel (PN+SC) tuvo más fito-melatonina (+21 %) que la muestra sin piel ($p \leq 0.05$) (**Cuadro 2**). Los resultados muestran que la cubierta de la semilla de pistache contribuye con casi el 20 % (43.3 mg equivalentes de melatonina (ME) / g muestra) del contenido total de fito-melatonina presente en

la nuez (215.6 mg ME / g PN+SC), resultados que sugieren la ingesta del pistache con la piel.

VII.3. Determinación de compuestos fenólicos por HPLC-DAD

Los pistaches son una importante fuente dietaria de compuestos fenólicos, dentro de los que se destacan ácidos fenólicos, flavonoides y proantocianidinas. Son considerados como la única nuez de árbol que contiene antocianinas, las cuales se concentran en la piel de color morado adherida a la nuez. Todas estas familias de compuestos fenólicos son antioxidantes con importantes efectos benéficos a la salud quimio-prevención y cardio/vaso-protección (Bolling *et al.*, 2011; Bulló *et al.*, 2011). Las muestras de pistache analizadas en este estudio presentan diversos compuestos bioactivos con un margen amplio de solubilidad en agua y solventes no polares, algunos de los cuales pudieron ser identificados y cuantificados por HPLC-DAD (**Figura 2**). El pistache con piel presentó un mayor contenido de fenoles totales (+42 %), flavonoides totales (+54 %), ácido gálico (GA) y protocatecuico (PCA> 350 %), catequina (CAT, +50 %) en comparación con la muestra sin piel ($p \leq 0.05$).

Figura 2. Compuestos bioactivos presentes en muestras de pistache



Los resultados de compuestos fenólicos individuales, identificados por HPLC-DAD (**Cuadro 3**), concuerdan con lo previamente reportado por Tomaino

et al. (2010) para pistaches cultivados en Italia de la variedad Bronte. El compuesto fenólico mayoritario para ambas muestras fue el ácido gálico, el cual se encontró en mayor cantidad en el pistache con piel (432.8 $\mu\text{g} / \text{g}$). Este compuesto pertenece a la familia de los ácidos fenólicos, los cuáles tienen un efecto sobre la regulación del reloj circadiano y guarda una estrecha relación con el metabolismo de los lípidos, mediado por el factor de transcripción circadiano BMAL1 en un modelo *in vitro* de células hepáticas con un desajuste del reloj periférico en el hígado (Guo *et al.*, 2018), sugiriéndose que el consumo de alimentos ricos en ácidos fenólicos podrían modular reloj circadiano presente en el hígado (Dufoo-Hurtado *et al.*, 2020).

Cuadro 3. Compuestos identificados por HPLC

Compuesto	PNP+SC ($\mu\text{g} / \text{g}$)	PNP ($\mu\text{g} / \text{g}$)
Ácido gálico	432.8 \pm 8.13*	92.86 \pm 6.63
Catequina	3.81 \pm 0.12	5.58 \pm 0.19*
EGCG	3.14 \pm 0.01*	2.05 \pm 0.36
Ácido protocatecuico	0.69 \pm 0.02	3.46 \pm 0.02*
Ácido elágico	0.22 \pm 0.02*	N.D.
α-Tocoferol (mg/ 100g)	1.8 \pm 0.1	2.0 \pm 0.3
β-Tocoferol (mg/ 100g)	1.5 \pm 0.0	1.5 \pm 0.2
γ-Tocoferol (mg/ 100g)	8.2 \pm 1.0	9.3 \pm 2.0
γ-Tocotrienol (mg/ 100g)	0.3 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1

Los resultados se presentan como la media \pm la desviación estándar de dos ensayos independientes por duplicado.

*Indica diferencia significativa entre muestras por la prueba t de Student para datos no pareados $p < 0.05$.

Otro de los compuestos identificados en ambas muestras de pistache fue el epigallocatequina galato (EGCG), un potente antioxidante encontrado de forma abundante en el té verde. En un estudio realizado por Mi *et al.* (2017), se demostró que la suplementación con EGCG mejora la resistencia a la insulina, previenen la adiposidad y mantienen la homeostasis lipídica causada por una desincronización circadiana en un modelo animal alimentado con dietas ricas en fructosa y grasa, lo que simula una dieta humana moderna.

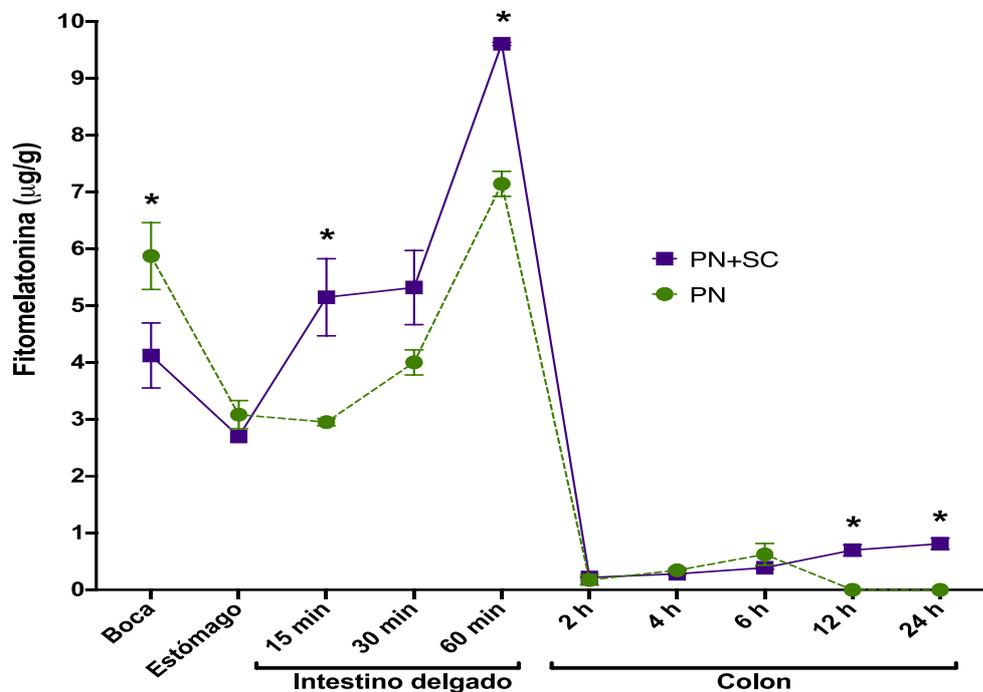
Las muestras de pistache también incluyen fitoquímicos liposolubles como tocoferoles y tocotrienoles. En este estudio su abundancia se encontró en el siguiente orden: $\mu\text{T} > \alpha\text{T} > \beta\text{T} > \gamma\text{T}3$ (12-13 mg / kg) (**Cuadro 3**), lo que concuerda con resultados previamente reportados para pistaches variedad Kerman (Garcia-Moreno *et al.*, 2020). Khuzhakhmetova *et al.* (2019) recientemente demostraron que αT regula el proceso de apoptosis en células de la glándula pineal (epífisis) y NSQ (núcleo supraquiasmático), ambos involucrados en la regulación de ciclos circadianos (Svetlana *et al.*, 2019). Además, los niveles plasmáticos elevados de γT se han asociado positivamente con un riesgo reducido de cáncer por todas las causas y mortalidad por enfermedades cardiovasculares (Mi *et al.*, 2017).

VII.4. Bioaccesibilidad *in vitro* de fito-melatonina del pistache

Como se mencionó y demostró, el pistache es rico en diversos nutrientes y fitoquímicos con efectos benéficos en la salud de quien los consume (Saitta *et al.*, 2011; Alasalvar y Bolling, 2015). Por ejemplo, el consumo habitual de entre 44-56 g / día de pistaches mejora la adecuación dietaria de varios macro y micronutrientes, promueve saciedad y no afecta la composición corporal del consumidor (Carughi *et al.*, 2019; Fantino *et al.*, 2020). Sin embargo, tales efectos metabólicos están parcialmente determinados por la bioaccesibilidad y metabolismo gastrointestinal (GI) de cada uno de sus fitoquímicos, aspecto ya señalado en diversos estudios (Mandalari *et al.*, 2013; Stevens-Barrón *et al.*, 2019). A continuación, se reporta y analiza bioaccesibilidad *in vitro* de fito-melatonina.

Fito-melatonina. Es importante destacar que no existen reportes previos acerca de la bioaccesibilidad de fito-melatonina. De acuerdo con la **Figura 3**, la bioaccesibilidad [% , $\mu\text{g} / \text{g}$ de materia seca (MS)] de fito-melatonina en condición oral simulada fue baja a partir del pistache sin piel (PN; 3.4 %, $\sim 6.0 \mu\text{g}$) y con piel (PN+SC; 1.9 %, $\sim 4.0 \mu\text{g}$) y en la etapa gástrica lo fue aún más (1.79 %, $\sim 3.2 \mu\text{g}$ y 1.26 %, $\sim 3.2 \mu\text{g}$, respectivamente).

Figura 3. Bioaccesibilidad de fito-melatonina del pistache (PN, pistache sin piel; PN+SC, pistache con piel). Los resultados se presentan como la media \pm la desviación estándar de dos experimentos independientes por duplicado. * Indica diferencia significativa entre



muestras, por etapa de evaluación, por la prueba t de Student para datos no pareados $p < 0.05$.

Sin embargo, en una condición intestinal simulada ambas muestras de pistache mostraron su mayor bioaccesibilidad, acentuándose con el paso del tiempo [5.7 % (PN+SC) > 3.3 % (PN) a los 60 minutos de incubación]. En la etapa correspondiente al colon es posible observar una baja bioaccesibilidad en todos los tiempos evaluados para el pistache con y sin piel, sugiriéndose que la fito-melatonina que pudo llegar hasta colon está siendo utilizada y metabolizada por la microbiota colónica, como se ha reportado previamente para melatonina (Tan *et al.*, 2015).

Varios factores podrían estar determinando este comportamiento tales como una masticación ineficiente de la nuez, características fisicoquímicas de la molécula, su absorción concurrente en condición oral, su secuestro e interacción temporal con otros compuestos presentes tanto en la matriz alimentaria como en el tracto gastrointestinal (TGI), así como posibles interferencias analíticas, las cuales serán discutidas a continuación:

1. *Masticación y permeabilidad celular.* Varios estudios han señalado que la degradación mecánica de nueces de árbol durante la masticación es determinante en la digestibilidad de sus lípidos (y otros macronutrientes) y en el efecto en el apetito y otras respuestas fisiológicas de estos alimentos (Mandalari *et al.*, 2013). Además, la melatonina (endógena) y fito-melatonina (dietaria) interactúan con diversas proteínas del TGI (receptores, transportadores y enzimas) incluyendo a dos receptores de melatonina asociados a proteínas G (MT1 y MT2) que se encuentran presentes en las glándulas salivales, páncreas y epitelio intestinal, lugares donde pueden internalizar a la fito-melatonina (Söderquist *et al.*, 2015; Carpentieri *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2019; Pal *et al.*, 2019). También se ha reportado una unión termodinámicamente favorable de la melatonina con el transportador GLUT1 y la posible participación de PEPT1 (Mayo *et al.*, 2018). Más adelante se describirá y analizará el efecto conjunto de todos estos posibles mecanismos en la permeabilidad aparente de fito-melatonina.
2. *Biosíntesis y catabolismo.* DeMuro *et al.* (2000) demostraron una baja biodisponibilidad plasmática de melatonina tras administrar (2 y 4 mg) vía oral, hecho que asociaron a una baja bioaccesibilidad oral y/o larga biotransformación a nivel enteral. De forma similar, Andersen *et al.* (2016) estimaron que la biodisponibilidad absoluta de melatonina administrada de forma oral fue de 2.5 % (1.7–4.7 %), aun cuando su $t_{1/2}$ de absorción fue de tan solo 6 minutos. Contrario a esto y previendo que en el modelo

de digestión/permeabilidad aparente utilizado en este estudio se utilizó la técnica del saco intestinal invertido (murino), la producción *ex vivo* de melatonina también pudo tener efecto. Se ha demostrado que las células entero-cromafines presentes en el epitelio que cubre el TGI producen melatonina, la cual se sugiere tiene una acción autocrina y paracrina en las células del intestino; teniendo una acción protectora de los tejidos GI contra el daño causado por el estrés oxidativo y la inflamación (Chojnacki *et al.*, 2013).

3. *Interacciones químicas.* La fito-melatonina también establece relaciones estructurales con diversos componentes dietarios a lo largo del TGI. Ejemplos de estos son algunos compuestos fenólicos, ácidos grasos poliinsaturados y esfingolípidos, todos presentes en cantidad importante en el pistache (Johns y Johns, 2016; Paroni *et al.*, 2019). Durante la etapa gástrica, PN+SC mostró una menor bioaccesibilidad de melatonina, lo cual pudo deberse a una posible interacción de la celulosa (fibra dietaria presente en la piel del pistache) con la melatonina (Kozaki *et al.*, 2011; Grundy *et al.*, 2016). Además, a nivel gástrico, se forman complejos espontáneos melatonina-pepsina (1:1) en el sitio catalítico de esta última con afinidad alta ($K_d = 10 \mu\text{M}$) mediante enlaces no covalentes (Li y Ni, 2016). Se sabe que cuanto menor sea este valor mayor será la afinidad de unión al ligando (Liu *et al.*, 2019). Sin embargo, hasta la fecha se desconoce si los niveles de melatonina en el TGI son suficientes para unirse a la enzima en el estómago.
4. *Estructura química.* Por otra parte, la melatonina y el triptófano (aminoácido) estructuralmente son indolaminas que a pH ácido polimerizan a través del nitrógeno del anillo indol de la molécula (Shin *et al.*, 2017); esto podría explicar la disminución de la concentración de fito-melatonina durante la etapa gástrica, ya que se tienen condiciones de pH ácidas debidas a la adición de HCl al medio; a pH ácido, los grupos funcionales amida de la melatonina se oxidan en solución acuosa (Pranil

et al., 2020). Además, la melatonina posee un coeficiente de reparto octanol-agua (Log P o/w) de 1.86 indicando una buena solubilidad en agua y también posee una estructura anfipática al tener un extremo hidrofílico soluble en agua y uno hidrofóbico, permitiendo a la molécula una distribución en entornos hidrófobos como las membranas lipídicas y también en entornos hidrofílicos como el suero (Johns, 2011; Johns y Platts, 2014); estas características le confieren a la melatonina la capacidad de atravesar fácilmente las bicapas fosfolipídicas (Yu *et al.*, 2016), protegiendo del estrés oxidativo y mejorando la fluidez de membranas celulares (García *et al.*, 2014), en particular a la membrana hematoencefálica (Alluri *et al.*, 2016) y membranas mitocondriales (Costa *et al.*, 1995). Su amplia presencia en el interior / exterior de las células y su variedad de receptores hacen que esta molécula tenga efectos pleiotrópicos fisiológicos y farmacológicos en el TGI. Sin embargo, el que este mecanismo haya ocurrido a nivel oral no es posible evidenciarlo.

5. *Interferencias analíticas.* Aunado a todo lo anterior, es posible que el proceso de cuantificación de fito-melatonina tenga algunas limitantes que impiden la excitación de la molécula llevando a una menor cuantificación de esta. Dentro de estas limitantes es importante destacar el fenómeno de “quenching” en el cual la intensidad de la fluorescencia disminuye debido a interacciones de la fito-melatonina con moléculas como los ácidos grasos o sales de calcio presentes en el medio. En este sentido, es importante resaltar que el cambio de sustitución de grupo funcional en el anillo bencénico de la molécula puede cambiar la longitud máxima de emisión y excitación de esta (Yan *et al.*, 2012).

VII.4.1. Permeabilidad de fito-melatonina del pistache

La permeabilidad aparente (P_{app}) se define como la tasa de acumulación de un compuesto en las cámaras apical y basolateral del intestino delgado, normalizada por el área de tejido superficial, donde el lado basolateral se

considera el lado del flujo sanguíneo y el lumen intestinal es el lado apical. En el **Cuadro 4** se muestran los cambios en la tendencia temporal (15-60 min) de los coeficientes de permeabilidad aparente (P_{app}) para los compuestos bioactivos evaluados (Compuestos fenólicos totales, flavonoides totales y fito-melatonina). Los valores de P_{app} simulan muy de cerca el proceso de absorción *in vivo* en la etapa del intestino delgado y son un acercamiento a la biodisponibilidad de los compuestos.

Cuadro 4. Coeficientes de permeabilidad aparente *ex vivo* (P_{app}) de compuestos bioactivos de pistache

Compuesto	t (min)	PN+SC			PN		
		A→B	B→A	ER	A→B	B→A	ER
Fito-melatonina	15	2.8 ^{a*}	3.7 ^{b*}	1.3 ^b	2.0 ^y	2.1 ^z	1.1 ^z
	30	3.5 ^a	3.8 ^b	1.1 ^b	1.3 ^z	2.9 ^y	2.2 ^{x*}
	60	3.2 ^a	6.9 ^{a*}	2.2 ^a	2.8 ^x	5.2 ^x	1.9 ^y
Fenoles totales	15	--	41.7 ^{a*}	--	27.6 ^{x*}	27.4 ^x	1.0 ^{y*}
	30	2.5 ^b	9.1 ^{b*}	3.7 ^{a*}	6.3 ^{y*}	14 ^y	2.2 ^x
	60	17.6 ^{a*}	41.6 ^{a*}	2.4 ^{b*}	10 ^y	--	--
Flavonoides	15	0.9 ^b	0.7 ^{b*}	0.9 ^b	0.34 ^y	2.2 ^z	6.4 ^{y*}
	30	0.5 ^c	1.1 ^b	2.2 ^a	0.42 ^y	7.6 ^{x*}	18.6 ^{x*}
	60	1.7 ^a	1.8 ^a	1.2 ^b	2.0 ^x	3.6 ^{y*}	1.9 ^z

P_{app} se expresa como la media ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1} \times 10^{-3}$) \pm desviación estándar ($n \geq 4$). Transporte de apical (A) a basolateral (B) (A→B) y hacia el lado contrario (B→A), Radio de eflujo [ER= (B→A).(A→B)⁻¹]; Debajo del límite de detección (--). * Diferencias estadísticas (*t*-test, $p < 0.05$) entre muestras (PN vs. PN+SC) y entre tiempos de incubación (letras superíndices) para el mismo componente y muestra.

Los resultados muestran que los valores de P_{app} (A→B y B→A) cambian con el tiempo de manera específica al tipo de muestra (PN o PN+SC) y del bioactivo que se esté evaluando: P_{app} A→B para los compuestos fenólicos parecen aumentar para PN+SC o disminuir para PN, los valores correspondientes a flavonoides parecen aumentar en ambas muestras; mientras

que para fito-melatonina su correspondiente $P_{app} B \rightarrow A$ permaneció prácticamente sin cambios, lo que dio como resultado proporciones de eflujo [$ER = (B \rightarrow A)/(A \rightarrow B) = 1$] lo que favorece el eflujo de este compuesto en el intestino delgado.

Los datos cinéticos reportados en el **Cuadro 4** apoyan la idea de que la fito-melatonina es eficientemente absorbida en el intestino delgado con una mayor posibilidad de que éste paso se dé por medio de un proceso de difusión pasiva. Para ambas muestras de pistache es posible observar que el comportamiento dinámico de P_{app} es mayor conforme avanza el tiempo de incubación, esto coincide con los datos de bioaccesibilidad obtenidos, en donde se observa una mayor liberación de fito-melatonina con el paso del tiempo de incubación (**Figura 3**). Es importante destacar que el flujo $B \rightarrow A$ es mayor que el $A \rightarrow B$ a los 60 minutos, por lo que este compuesto se espera se concentre en mayor cantidad en el lado apical. Sin embargo, es posible observar que los valores de ER son entre 1 y 2, lo que sugiere un equilibrio intra / extracelular, particularmente en los primeros 30 min de incubación.

La evaluación de la bioaccesibilidad gastrointestinal y el metabolismo de primer paso de fitoquímicos presentes en los alimentos es esencial para conocer su farmacocinética y posible bioactividad luminal y sistémica. El conocimiento sobre las características fisicoquímicas de fitoquímicos evaluado experimentalmente (*in vivo e in vitro*), ha llevado al desarrollo de estrategias de modelamiento computacionales *in silico* (quimioinformática molecular) que ayudan a predecir no solo el destino metabólico de moléculas pequeñas sino también sus propiedades de absorción, distribución, excreción, toxicidad (ADMET) y potencial bioactividad a partir de su estructura molecular (Cheng *et al.*, 2016; Ferreira y Andricopulo, 2019).

Esta herramienta *in silico* ha sido utilizada para el análisis de otros productos naturales. Recientemente se reportaron las propiedades ADMET de compuestos fitoquímicos (ácidos fenólicos, procianidinas y teobromina)

presentes en la vaina de cacao, un subproducto importante durante el procesamiento de este fruto. Esta predicción fue complementaria a los experimentos *in vitro* para determinar su bioaccesibilidad en el TGI. Como resultado del modelado *in silico* se sugiere que los compuestos bioactivos presentes en el subproducto pueden atravesar fácilmente el epitelio intestinal. Además, algunos de los fitoquímicos evaluados (ácido clorogénico, catequina y epicatequina) presentan actividad como ligando de receptores acoplados a la proteína G (GPCR) y receptores nucleares, así como actividad de inhibición enzimática y proteasa, lo que sugiere beneficios a salud (Nieto-Figueroa *et al.*, 2020).

Se evaluaron las propiedades ADMET de la fito-melatonina y los principales compuestos fenólicos presentes en el pistache (**Cuadro 5**).

La catequina (CAT), pero no otros compuestos fenólicos, es sustrato para P-gp, asociado con la dinámica de entrada / salida de flavonoides (**Cuadro 5**). P-gp es una bomba de eflujo intestinal ubicada en el epitelio intestinal (apical) que conserva la homeostasis intestinal, particularmente de compuestos xenobióticos ionizables como algunos compuestos fenólicos (Campos-Vega *et al.*, 2015). Por otra parte, el GA, la CAT y el PCA presentan 0 violaciones a la regla de Lipinski por lo que tienen una mayor posibilidad de ser permeables por medio de un sistema de transporte pasivo; contrario a esto, el EGCG y gamma tocoferol (GTOC) presentan 2 y 1 violaciones a la regla de Lipinski, además de presentar una baja absorción en el TGI, sugiriéndose que esta molécula es poco permeable en el intestino delgado y lo hace a través de mecanismos de transporte activo, lo cual se sustenta con su valor de TPSA > a 140, limitando su efecto como cronobióticos en el organismo, sin embargo esto aún no ha sido evaluado. La predicción PAINS (Ensayo Pan de compuestos de interferencia) de los compuestos fenólicos (GA, PCA, EGCG y CAT) indican la presencia de moléculas Catecol-A, estas moléculas tienden a reaccionar de manera inespecífica con numerosos objetivos biológicos en lugar de afectar específicamente a un objetivo deseado dando resultados falsos positivos.

De acuerdo con lo reportado en el **Cuadro 5**, la melatonina (MEL) es biodisponible por la vía oral, altamente absorbible en el TGI y presenta una característica interesante que es su permeabilidad a la barrera hematoencefálica (BHE). Además, durante su paso en el tracto gastrointestinal, MEL puede inhibir los polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (OATS) y ser ligando de receptores nucleares que regulan la expresión de genes, los cuales al activarse pueden tener efectos benéficos en el organismo. Además, pueden actuar como sensores de xenobióticos y activar la expresión de las enzimas del citocromo P450 importantes en el metabolismo de compuestos xenobióticos. Por otra parte, la predicción de MEL fue negativa como sustrato o inhibidor de la glicoproteína G (P-gp), un transportador de eflujo ubicado en el epitelio intestinal (Campos-Vega et al., 2015). Tanto los datos cinéticos de P_{app} (**Cuadro 4**) como la información quimio informática y un análisis *in silico* de la fito-melatonina (**Cuadro 5**) apoyan la idea de que este compuesto es eficientemente absorbido en el intestino delgado con una mayor posibilidad de que este paso se dé a través de un proceso de difusión pasiva llegando a circulación sistémica.

Con información de la literatura, en la **Figura 4** se propone un modelo de biotransformación intestinal para la fito-melatonina. Varios autores sugieren que que existe un metabolismo microbiano donde la melatonina funciona como sustrato de algunos microorganismos presentes en el duodeno intestinal, como *E. Coli* y *Clostridium*, metabolizando moléculas tipo indol generando productos como la 6-sulfatoximelatonina (Angelakis et al., 2015; Fiorucci y Distrutti, 2015). Además, existe un metabolismo intestinal en el intestino delgado, donde la melatonina puede ser biotransformada por citocromos intestinales que son parte del metabolismo de primer paso de xenobióticos (Ma et al., 2005). La información obtenida sugiere que la melatonina puede interactuar temporalmente con sus receptores (MT1 y MT2) los cuales están presentes en el intestino delgado, impidiendo su cuantificación durante la etapa intestinal. De acuerdo con el modelo de biotransformación propuesto, es posible que desde la perspectiva analítica los metabolitos de la melatonina estén siendo cuantificados como

melatonina y por lo tanto se tenga una mayor cuantificación de melatonina en la cámara basolateral.

Cuadro 5. Quimio informática molecular y bioactividad potencial de fitoquímicos de pistache

	GA	PCA	EGCG	CAT	MEL	GTOC
Pubchem CID	370	72	65064	9064	896	92729
Fisicoquímica						
Peso molecular (g/mol)	170.1	154.1	458.4	290.3	232.3	416.7
TPSA (Å ²)	98	77.8	197	110	54.1	29.5
XLogP3	0.7	1.1	1.2	0.4	1.6	10.3
Solubilidad en agua	Alta	Alta	Alta	Alta	Mod	Baja
Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción, Toxicidad						
Biodisponibilidad oral	Si	Si	No	No	Si	Si
Absorción GI/BHE	Alto/No	Alto/No	Bajo/No	Alto/No	Alto/Si	Bajo/No
Inhibidor de OATP1,2	Si	Si	Si	Si	Si	Si
Inhibidor de CYPs	No	No	No	No	Si	No
Inhibidor OCT2	No	No	No	No	Si	No
P-gp (Substrato/inhibidor)	No	No	No	No	No	Si
Biodisponibilidad (puntaje)	0.56	0.56	0.17	0.55	0.55	0.55
Violaciones LROF	0	0	2	0	0	1
Bioactividad						
PAINS	CTC-A	CTC-A	CTC-A	CTC-A	0	0
Comportamiento como droga	CTC	CTC	CTC	CTC	0	0
Ligando-GPCR	No	No	No	Si	No	Si

Ligando-Receptor nuclear	No	No	Si	Si	Si	Si
Inhibidor proteasas/enzimas	No	No	Si	Si	No	Si

Datos calculados con AdmetSAR 2.0 (<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar2/>), swissADME (<http://www.swissadme.ch/>) y Moliinspiration (<https://www.molinspiration.com/>), usando descriptores canónicos SMILES obtenidos de PubChem CIDs: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Barrera hematoencefálica (BHE), catequina (CAT), catecol (CTC) A (CTC-A), epigallocatequina galato (EGCG), ácido gálico (GA), gastrointestinal (GI), gamma tocoferol (GTOC), Receptor acoplado a proteína G (GPCR), Coeficiente de particion octanol-agua (LogP/XLogP3), Reglas de Lipinsky (LROF), melatonina (MEL), Polipéptidos transportadores orgánicos anicónicos intestinales (OATPs; OATP1B1 and/or OATP1B3), Estructuras de interferencia de ensayo panorámico (PAINS), ácido protocateico (PCA). Datos no disponibles (--).

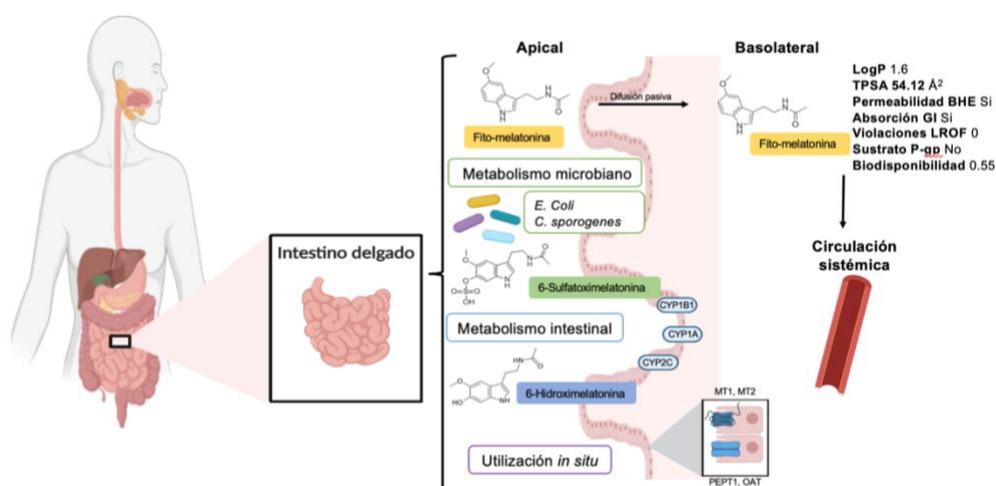


Figura 4. Comportamiento de la fito-melatonina en el intestino delgado

VII.5. Fermentación colónica

VII.5.1. Evaluación del pH durante la fermentación colónica *in vitro*

Uno de los principales indicadores de la utilización de la fibra dietaria por la microbiota colónica es la generación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y metabolitos ácidos en la fermentación, lo que provoca una disminución en el pH (Lux *et al.*, 2011). Mientras que posterior a las 6 horas de fermentación, un aumento en el pH indica generación de productos alcalinos como el amoníaco (Mikkelsen *et al.*, 2004; Campos-Vega *et al.*, 2009).

Los cambios de pH en las muestras (PN, PN+SC), el blanco (ausencia de muestra) y control (inulina) se midió directamente durante la fermentación colónica (0, 2, 4, 6, 12 y 24 horas) (**Cuadro 6**).

Tanto el control positivo como las muestras de pistache indujeron la reducción del pH en comparación del blanco, que carece de una fuente fermentable (**Cuadro 6**). La mayor disminución de pH para las muestras de pistache se observó a las 6 h, lo que sugiere que a ese tiempo existe una activa utilización del sustrato y, por lo tanto, una mayor producción de AGCC, entre otros metabolitos, como ha sido reportado previamente (Mikkelsen *et al.*, 2004; Campos-Vega *et al.*, 2009).

Cuadro 6. Cambio de pH durante la fermentación colónica

	BCO	CTR+	PN+SC	PN
0 h	7.45 ± 0.03 ^{aA}	7.45 ± 0.04 ^{aA}	7.41 ± 0.01 ^{aA}	7.52 ± 0.09 ^{aA}
2 h	7.43 ± 0.04 ^{aA}	6.75 ± 0.07 ^{bB}	7.38 ± 0.01 ^{abA}	7.36 ± 0.04 ^{abA}
4 h	7.29 ± 0.05 ^{aA}	5.60 ± 0.14 ^{cB}	7.35 ± 0.01 ^{abcA}	7.29 ± 0.04 ^{bcA}
6 h	7.40 ± 0.06 ^{aA}	5.39 ± 0.16 ^{cB}	7.12 ± 0.01 ^{dA}	7.09 ± 0.02 ^{dA}
12 h	7.41 ± 0.04 ^{aA}	4.65 ± 0.21 ^{dB}	7.25 ± 0.02 ^{cdA}	7.18 ± 0.08 ^{cdA}
24 h	7.28 ± 0.10 ^{aA}	4.39 ± 0.13 ^{dB}	7.25 ± 0.07 ^{bcA}	7.25 ± 0.06 ^{bcA}

BCO: Blanco, Ctr +: Control+ (Inulina), PNP+SC: Pistache con piel, PN: Pistache sin piel. Los resultados se presentan como la media ± la desviación estándar de dos experimentos independientes por duplicado. Letras diferentes por renglón indican diferencia estadística significativa entre tiempos por la prueba de Tukey $p < 0.05$. Letras mayúsculas indican diferencia estadística significativa por columna mediante la prueba de Tukey $p < 0.05$.

VII.5.2. Producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC)

La producción de AGCC difiere un poco a lo observado con la disminución de pH, en donde la mayor disminución se dio a las 6 h esperando que a este tiempo se tuviera la mayor producción; sin embargo, esta se presentó a las 12 h para ambas muestras de pistache, donde PN+SC mostró la mayor producción

($p \leq 0.05$) (51 mmol / L) (**Figura 5**), seguido de PN (25.9 mmol / L) y el control (2.06 mmol / L). Los AGCC son el producto principal de la fermentación bacteriana de las fibras dietéticas, que fue mayor para PN+ SC (13.2 %).

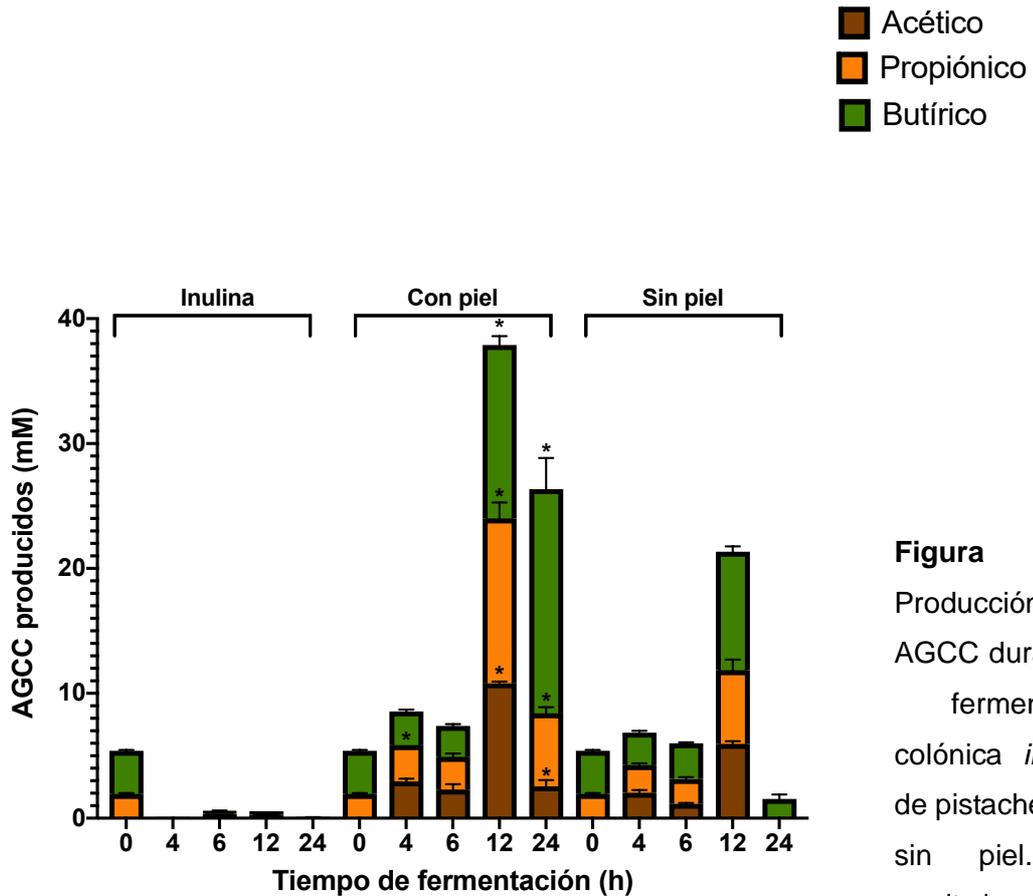


Figura 5. Producción de AGCC durante la fermentación colónica *in vitro* de pistache con y sin piel. Los resultados se

presentan como la media \pm la desviación estándar de dos experimentos independientes por duplicado. * indica diferencia significativa entre muestras por la prueba t de Student para datos no pareados $p < 0.05$.

Las muestras de pistache fueron altamente efectivas en la producción de AGCC, además de cambiar su proporción molar, especialmente a la producción de ácido butírico (**Figura 5**). La proporción neta de producción de AGCC a las 6 h fue (Ac: But: Prop): inulina (1: 9.2: 4.7), PN (1: 0.2: 1) y PN+SC (1: 1.5: 1.3). La

producción de AGCC de PN+SC a las 12 h fue 1 (ácido acético), 0.7 (ácido butírico) y 1.5 (ácido propiónico) veces mayor que la de PN. El aumento significativo de AGCC en las muestras de pistache, especialmente de ácido butírico, puede indicar su potencial para mejorar la salud en sujetos obesos a través del aumento en el número de bacterias productoras de butirato, como se vio en un estudio cruzado aleatorio de alimentación humana (Ukhanova *et al.*, 2014).

De 4 a 12 h de fermentación, la relación molar de AGCC permaneció casi constante para el control positivo y ambas muestras de pistache: butírico > propiónico > acético (**Figura 5**). La producción de ácido butírico puede atribuirse a las características del donante; la obesidad causa disbiosis en la microbiota colónica, lo que conduce a una mayor producción de ácido butírico (Rahat-Rozenbloom *et al.*, 2014; Muniz y Martin, 2017; De Cosío-Barrón *et al.*, 2020). Asimismo, el consumo regular de pistaches modifica positivamente la composición de la microbiota colónica en ratones obesos, disminuyendo géneros asociados a la inflamación como *Desulfovibrio*, responsable de la producción de sulfuro de hidrógeno (H₂S) en el colon (Terzo *et al.*, 2020). La mayor producción de ácido butírico a las 24 h puede estar asociada con una disminución de H₂S, también es un marcador indirecto de la mejora de la salud intestinal y la inflamación en individuos obesos, como se informó anteriormente en ratones (Guo *et al.*, 2018).

Los cambios más significativos (PN > PN+SC > control) en la proporción molar de AGCC se observaron entre 12 y 24 h, siendo el ácido butírico el único AGCC producido a partir de PN a las 24 h (**Figura 5**). La relación molar observada a las 24 h de PN y PN+SC sugiere que los ácidos acético y propiónico se producen principalmente a partir de la piel y el ácido butírico a partir de la semilla. Aunque PN tenía un contenido de fibra dietética más bajo, así como sus fracciones, sus estructuras individuales pueden ser utilizadas por poblaciones de degradación primaria que principalmente establecen reacciones de alimentación cruzada con poblaciones butirogénicas. Los productos de la degradación

primaria de la piel podrían ser: a) ácido acético y propiónico directamente, b) utilizados por poblaciones de degradación primaria que establecen reacciones de alimentación cruzada con poblaciones acetogénicas, propiogénicas y butirógenas (Baxter *et al.*, 2019). La producción de AGCC es el vínculo entre la nutrición del huésped y mantenimiento de la homeostasis intestinal (Martin-Gallausiaux *et al.*, 2020). Además, se ha informado que la administración de una fibra dietética (celobiosa) durante la fermentación produce AGCC, los cuales modulan relojes periféricos presentes en el hígado, el riñón y la glándula submandibular en un modelo *in vivo* (Tahara *et al.*, 2018), sugiriendo el potencial de los pistaches para mejorar la crono-disrupción en individuos obesos debido a su contenido de fibra dietaria y producción de AGCC.

En las primeras horas de fermentación, esto puede ser atribuido a que se ha reportado que existe una disbiosis en la microbiota colónica de personas con sobrepeso y obesidadm las cuales presentan una mayor proporción de ácido butírico producido en la relación molar de estos 3 ácidos (Rahat-Rozenbloom *et al.*, 2014; Cosío-Barrón *et al.*, 2020), debido a un aumento del filo Firmicutes, principalmente los géneros *Staphylococcus* y *Clostridium*, incluyendo especies como *Eubacterium rectale*, *Clostridium coccoides*, *Lactobacillus reuteri*, *Akkermansia muciniphila*, *Clostridium histolyticum* y especies de *Staphylococcus aureus*, alterando el metabolismo de compuestos no digeribles y la diversidad bioquímica (Gomes, Hoffmann y Mota, 2018).

En las últimas horas de fermentación esto puede ser por efecto de la matriz alimentaria, ya que se ha reportado que la fermentación de nueces induce un cambio en la relación molar de los ácidos grasos producidos hacia una mayor producción de ácido butírico (Lux *et al.*, 2011; Schlörmann *et al.*, 2016). La producción de ácido butírico ha sido asociada a una contribución en el aumento de la respuesta inmune mediante una mayor producción de IL-4, principalmente debido a la fermentación de fibras insolubles (Zhou *et al.*, 2014), siendo importante destacar que ambas muestras de pistache presentaron un mayor contenido de este tipo de fibra; además se ha demostrado que una mayor

producción de ácido butírico tiene efectos protectores contra la formación de criptas aberrantes en el cáncer de colon y mejora potencialmente los resultados en pacientes con trastornos cerebrales resultando positivo para los tratamientos de salud mental (Bourassa *et al.*, 2016). Se ha sugerido también que estimular la producción de ácido butírico podría ayudar a mantener la salud y tratar enfermedades como diabetes y obesidad (Baxter *et al.*, 2019).

VII.5.3. Índice de fermentabilidad colónica del pistache con y sin piel.

El índice de fermentabilidad es un parámetro calculado por la cantidad total de AGCC producido a las 0, 2, 4, 6, 12 y 24 h de fermentación colónica en comparación con un carbohidrato fermentable de referencia (Zamora-Gasca *et al.*, 2015). Para calcular el índice de fermentabilidad de ambas muestras de pistache a lo largo de la fermentación colónica se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de fermentabilidad (\%)} = \frac{\text{AGCC Muestra}}{\text{AGCC Inulina}} * 100$$

Cuadro 7. Índice de fermentabilidad durante la fermentación colónica *in vitro*

Muestra	4 h	6 h	12 h	24 h
PN+SC	8.80 ± 0.38	1.20 ± 0.09*	6.30 ± 0.05*	25.33 ± 2.46*
PN	8.68 ± 0.17	0.99 ± 0.03	3.55 ± 0.21	1.54 ± 0.33

Los resultados se presentan como la media ± la desviación estándar de dos experimentos independientes por duplicado. *Indica diferencia significativa entre muestras por columna mediante la prueba t de Student para datos no pareados p < 0.05.

La muestra PN presenta valores más bajos de fermentabilidad, mientras que PN+SC presenta un mayor índice de fermentabilidad, de manera particular a las 24 horas (25.33 %) (**Cuadro 7**). Esta diferencia entre las muestras puede deberse a un mayor contenido de fibra soluble (0.60 %), además de esto el cálculo se realiza en relación con la inulina, una fibra soluble. El mayor índice de fermentabilidad para PN fue a las 4 horas (8.68 %), esto puede atribuirse a diferencias estructurales en la matriz alimentaria, o bien, a la afinidad de la

microbiota por el sustrato (Zamora-Gasca *et al.*, 2015). Estos resultados reflejan la cantidad de materia disponible para fermentar que cada muestra contiene. El pistache con piel (PN+SC) tiene 57 % más fibra dietaria total y el doble de fibra soluble / insoluble que PN, lo que explica una mayor generación de AGCC.

VII.5.4. Análisis metabolómico no dirigido del extracto de la fermentación *in vitro* de pistache.

Mantener una microbiota saludable es clave para combatir la crono-disrupción relacionada con la disbiosis en personas obesas. Las bacterias intestinales pueden influir en la fisiología del huésped a través de varias moléculas y vías de señalización, dentro de las que es importante destacar a los AGCC y metabolitos colónicos. Estos metabolitos colónicos están involucrados en la actividad del reloj circadiano del huésped en diferentes tejidos, siendo importante evaluar la producción de metabolitos colónicos a partir de la fermentación de pistache y evaluar si estos tienen un efecto cronobiótico, lo cual no ha sido evaluado.

Según Rocchetti *et al.* (2018), la información es limitada con respecto al destino metabólico de los bioactivos comestibles derivados de nueces durante su paso por el TGI y la fermentación colónica, afectados por su composición macromolecular particular (matriz alimentaria) y factores luminales que influyen aún más en su biodisponibilidad. En este estudio, se utilizó un enfoque metabolómico no dirigido para evaluar la biotransformación de compuestos durante la fermentación colónica *in vitro* de PN y PN+SC.

Estadística no supervisada. La **Figura 6** presenta un mapa de calor en donde se muestra la agrupación de 50 metabolitos producidos durante la fermentación colónica *in vitro* a los diferentes tiempos evaluados (0, 2, 4, 6, 12 y 24 horas). Los resultados muestran que los metabolitos producidos al iniciar la fermentación (0 h) es igual para todas las muestras. Sin embargo, con el paso del tiempo el perfil encontrado de estos es completamente diferente para ambas muestras,

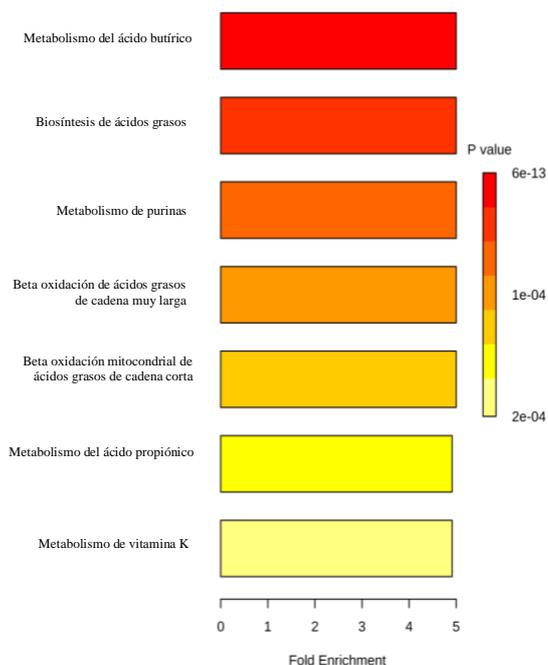
Respecto al PN, al comparar con el perfil basal (0 h), a las 2 y 6 horas se encuentra la mayor diferencia en la abundancia de metabolitos (26 y 28 metabolitos, respectivamente). Mientras que a las 4, 12 y 24 horas, 14, 20 y 15 metabolitos cambiaron en su abundancia. De manera importante el ácido 3-metilbutanoico, o mejormente conocido como ácido isovalérico, aumentó su abundancia de las 0 h a las 12 h, este se ha reportado como un marcador de interés en el diagnóstico de enfermedades gastrointestinales crónicas (Garner *et al.*, 2007; Walton *et al.*, 2013; Ahmed *et al.*, 2016). El 2-decenal aumentó su abundancia de las 0 h a las 6 h; este es un compuesto aldehídico graso, el cual se ha detectado en alimentos como las nueces funcionando como un potencial marcador del consumo de estos alimentos (HMDB0030999); el dodecanal de igual forma aumentó su abundancia de las 0 h a las 6 h, este compuesto es un aldehído que se ha asociado con enfermedades como el asma y el trastorno metabólico de la enfermedad celiaca (HMDB0033933); el 1-trideceno, es un compuesto orgánico que ha sido detectado en alimentos como las nueces funcionando como un potencial marcador del consumo de estos alimentos (HMDB0030930) siendo reportado como uno de los componentes del aceite esencial de hojas del árbol que da las nueces de la india (Mata y Villegas-Castro, 2018).

Mientras que, para PN+SC, el perfil de metabolitos que tiene una mayor diferencia se obtuvo a las 24 h (46 metabolitos), seguido de 2, 4, 12 y 6 horas (45, 45, 45 y 43 metabolitos, respectivamente). De manera importante el 3-metilfenol se encontró con una menor abundancia en todos los tiempos de fermentación comparado con el tiempo 0 h, en donde presentaba una alta abundancia, este compuesto se ha encontrado elevado en enfermedades inflamatorias intestinales como Chron (Ahmed *et al.*, 2016); el 3-metil-1-butanol o mejormente conocido como alcohol isoamílico incrementó su abundancia de las 0 h a las 6 h, este compuesto es producido por *Lactobacillus sakei* CG1 durante la fermentación masa de trigo y centeno y se ha asociado con enfermedades como la colitis ulcerosa (Ravyts y De Vuyst, 2011; HMDB0006007); el eicosano presentó un aumento en su abundancia de las 0 h a las 6 h, posteriormente un decremento a las 12 h y aumento nuevamente a las

24 h, este compuesto es un derivado de la oxidación de ácidos grasos esenciales como el ácido linolénico, presente de manera importante en el pistache (Satil *et al.*, 2003). Se ha reportado que los eicosanos tienen efectos benéficos a la salud, como antiinflamatorios (HMDB0059909). Este resultado se encuentra en concordancia con el análisis de enriquecimiento para los metabolitos producidos, en el cual una de las vías que puede estar asociada a estos metabolitos es la β -oxidación de ácidos grasos de cadena larga (**Figura 7**).

El análisis de enriquecimiento y asociación a vías metabólicas de los productos de fermentación colónica a las 0 y 12 horas (**Figura 7**), indican que, para PN la principal vía metabólica involucrada es el metabolismo del ácido butírico. Esto coincide con el análisis de predicción en donde se identificó con una mayor abundancia de este compuesto a las 12 h con respecto al tiempo 0 ($p= 8.06e^{-14}$). Otra de las vías metabólicas involucradas es de síntesis de ácidos grasos, que coincide con una mayor abundancia de los ácidos butírico y caproico ($p= 8.06e^{-14}$; $p= 7.06e^{-14}$), los cuales presentaron una mayor abundancia a las 12 h con respecto al tiempo 0. En contraste, el perfil de metabolitos de PN+SC se encuentra principalmente asociado al metabolismo de sulfatos / sulfitos, en el cual mediante el análisis de predicción se observó que el compuesto involucrado es el fenol ($p= 3.95e^{-10}$) que tuvo una mayor abundancia a las 0 h y disminuyó a las 12 h. Otra de las vías metabólicas asociadas es la β -oxidación de ácidos grasos de cadena larga; el análisis de predicción sugiere que esto se encuentra asociado a un aumento del ácido caproico ($p= 6.02e^{-10}$) al tiempo 12 h con respecto al tiempo 0 h.

Pistache sin piel



Pistache con piel

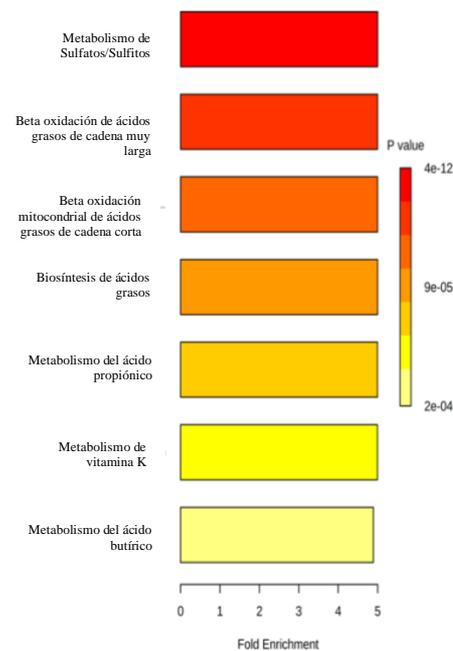


Figura 7. Análisis de enriquecimiento para los metabolitos y su asociación con vías metabólicas.

Estadística supervisada (PLS-DA). La muestra sin piel (PN) mostró mayores cambios significativos (puntuaciones de VIP ≥ 2) (1.5 – 3.0) que la muestra con piel (1.4 – 2.2) (**Figura 8a**). Los metabolitos específicos de ambas muestras con puntuaciones VIP ≥ 2.0 fueron (Pubchem CID): Pistache sin piel (PN) [1,4-benzodioxan-6-amina (89148), indol (798), 2,4-dihidroxibenzaldehído (7213), ácido 4-hidroxi mandélico (328), nonil-ciclopropano (522556), 7-metil-1-undeceno (522554)]. Pistache con piel (PN+SC) [benzaldehído (240), 2,4-dimetil-6-tercbutilfenol (15884), 1,1-dimetil-2-propil-ciclohexano (549978), triclorometano (6212), 10-metilnonadecano (530070), cloroformiato de hexilo (22466), 1-butanol (263)] (**Figura 8b**).

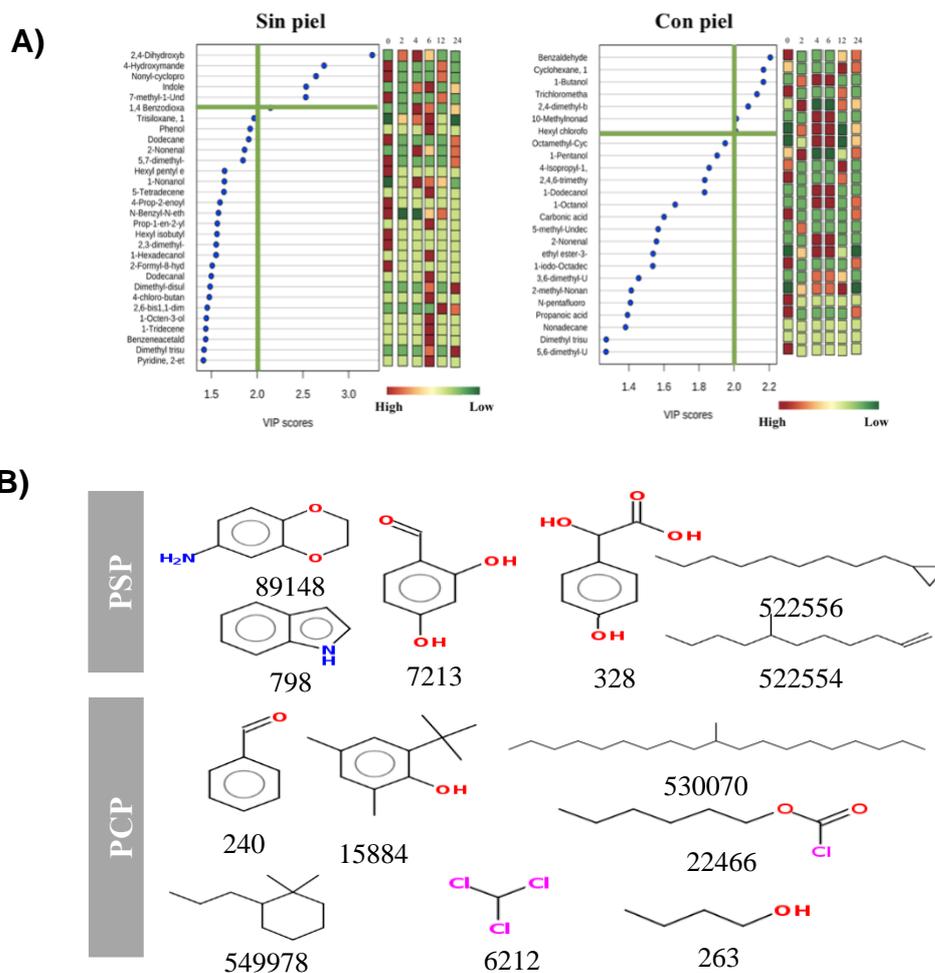


Figura 8. Puntajes VIP y metabolitos con mayor puntaje

Estos compuestos ejercen efectos benéficos para la salud. Por ejemplo, el 2,4-dihydroxybenzaldehyde (PN) es un producto de la degradación colónica de flavonoides como la quercetina y la rutina, ambos presentes en el pistache. Los flavonoides y otros compuestos fenólicos influyen positivamente en el ritmo circadiano *in vitro* e *in vivo*, lo que puede ser útil para pacientes con trastornos del ritmo circadiano (Song *et al.*, 2020). El ácido hidroximandélico (PN) es un metabolito fenólico cuya concentración plasmática y urinaria aumenta después del consumo de jugo de naranja (Xu *et al.*, 2019). Este compuesto fenólico también se ha recuperado de la materia fecal, después de la fermentación colónica humana de la semilla de uva (Pereira-Caro *et al.*, 2016), un compuesto acumulado en la cubierta de la semilla de pistache (Fung *et al.*, 2019). El

benzaldehído (PN+SC) es el producto intestinal de la cianidina, una antocianina presente en cubierta de semilla de pistache (Mena *et al.*, 2015). Se ha reportado que los polifenoles pueden mejorar los ritmos circadianos regulando la microbiota colónica, así como tener efectos locales y sistémicos de sus metabolitos microbianos derivados (Lee *et al.*, 2020).

El aumento significativo de indol, el principal metabolito colónico de triptófano (Trp), por PN, puede significar mejores beneficios para la salud en sujetos con sobrepeso y/o obesidad que muestran alteración de la vía metabólica del triptófano colónico. Esto se refleja en una baja producción de indol y derivados que se correlaciona con la inflamación sistémica relacionada con la obesidad (Bellomo *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2022). Sin embargo, se desconoce si las indolaminas podrían metabolizarse a melatonina, aumentando los niveles plasmáticos de esta hormona.

Los frutos secos comestibles, incluidos los pistaches, son ricos en Trp (0.78 g / 100 g de proteína) y su indol, un metabolito GI derivado de microorganismos, el cual mejora la función de barrera de las células epiteliales y reduce el proceso inflamatorio relacionado con la IL-10, reduciendo las probabilidades de enfermedades inflamatorias crónicas (Venkatachalam *et al.*, 2006; Alexeev *et al.*, 2018; Cussotto *et al.*, 2020). El Trp se ha propuesto como una de las moléculas clave a evaluar en el campo de la crononutrición para mejorar los ritmos circadianos porque es un precursor tanto de la serotonina como de la melatonina (Bansal *et al.*, 2012). También se identificaron nonil-ciclopropano y 10-metilnonadecano como un componente de los aceites esenciales de otras fuentes vegetales (Bravo *et al.*, 2018; Zahra *et al.*, 2019). Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) modulan los miARN que regulan el sistema circadiano aunque la información sobre los efectos de los aceites esenciales en la regulación del reloj biológico es limitada (Avoseh *et al.*, 2018).

Por otro lado, la concentración de 1-butanol en PN+SC alcanzó su máximo entre 2 a 6 h de fermentación y luego disminuyó, sugiriendo que se dan

cambios benéficos en la actividad metabólica de la microbiota el cual se puede asociar a cambios en su composición.

VII.5.6. Análisis metagenómico de la fermentación colónica *in vitro* de pistache.

Con el objetivo de garantizar la integridad del material genético de las bacterias presentes en la microbiota colónica extraído con el kit comercial, se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 1 % (**Figura 9**). Es posible observar una sola banda que corresponde al ADN, no se presenta una degradación de este material genético y no se observa contaminación por ARN o la presencia de pequeños fragmentos de ADN.

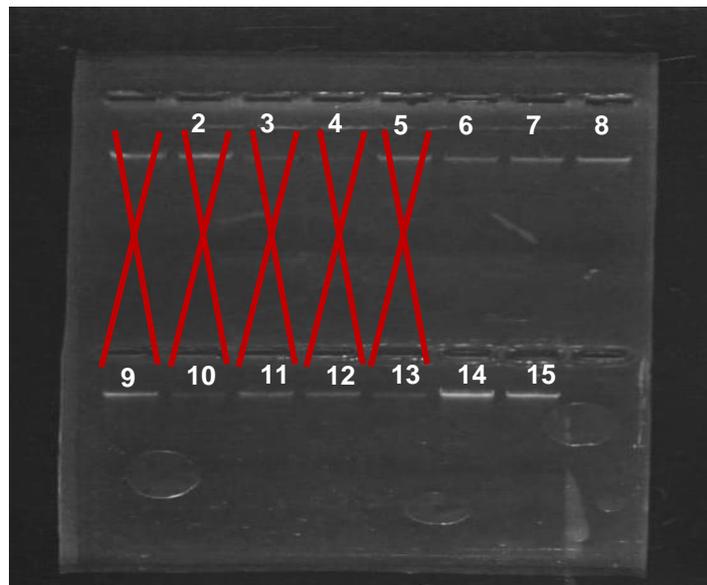
Se midió la concentración de ADN por muestra mediante su absorción máxima a 260 nm, así como las relaciones 260/280 y 260/230 para determinar la pureza del material genómico extraído. La concentración de las muestras osciló entre 15 y 32 ng / ml, considerándose una buena concentración y dentro de los rangos para su secuenciación. La relación 260/280 se encontró entre 1.8 y 2 en la mayoría de las muestras, con la cual se considera que el material genético tiene una pureza óptima. Mientras que la relación 260/230 tuvo valores <1 en todas las muestras, esto puede deberse a la presencia de contaminantes como sales, fenoles o carbohidratos (**Cuadro 8**). Sin embargo, a pesar de los valores bajos en esta relación las muestras pudieron ser enviadas para su secuenciación (Lucena-Aguilar *et al.*, 2016).

VII.5.7. Análisis del microbioma intestinal

Como se observó en el análisis metabolómico y dado que el pistache contiene fibras solubles e insolubles, así como polifenoles que pueden llegar al colon y actuar como sustrato de las bacterias de la microbiota, evaluamos si los efectos del pistache se encuentran asociados con cambios en la

microbiota intestinal. Este análisis nos permitió complementar el análisis metabólico en la etapa colónica.

Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa 1% de muestras de ADN extraído de las muestras de fermentación de pistache *in vitro* (0 y 6 h).



Cuadro 8. Concentración y pureza de ADN extraído

# ID	Muestra	Concentración de DNA (ng/ml)	260/280	260/230
6	PN+SC	20.64	2.35	0.27
7	PN+SC 1	21.82	2.17	0.33
8	PN+SC	16.18	2.24	0.22
9	PN+SC 2	21.43	1.95	0.29
10	PN	14.22	2.41	0.20
11	PN 1	18.09	1.93	0.26

13	PN	15.35	1.81	0.25
12	PN 2	19.71	2.07	0.30
14	0 h Basal	22.50	2.43	0.18
15	0 h Basal 2	32.41	1.92	0.47

VII.5.7.1. Cambios a nivel de Filo

Primero es importante recordar las características del donador: cronotipo vespertino y un IMC de 32 Kg/m². En la muestra basal (previo a la fermentación colónica) se encontraron mayoritariamente 3 filos: Bacteroidetes, Firmicutes y Proteobacteria. Mientras que posterior a la fermentación de ambas muestras de pistache (0.1g de la fracción no digerible (FND) de pistache proveniente de la digestión gastrointestinal *in vitro*) la microbiota se compuso de 4 filos mayoritarios: Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria y Proteobacteria. La abundancia relativa de los filos Bacteroidetes y Firmicutes representan el 93.68 % para la muestra inicial, para las muestras con y sin piel representan el 78.62 % y el 80.56 % respectivamente. Es importante mencionar que la fermentación de ambas muestras de pistache favorece el crecimiento de microorganismos pertenecientes al filo Actinobacteria al aumentar su abundancia relativa hasta un 400 % con respecto a la muestra basal. Este comportamiento ha sido previamente reportado por otros autores posterior al consumo de nueces de pistache en roedores (Terzo *et al.*, 2020; Yanni *et al.*, 2020).

Es de particular interés discutir el aumento que se observa para el filo Proteobacteria, el cual aumenta su abundancia relativa en las muestras de pistache (60 %) con respecto a la microbiota basal. Este filo ha sido asociado negativamente con la salud del huésped debido a que comprende en su mayoría a bacterias patógenas, gram negativas, las cuales producen

moléculas proinflamatorias como lipopolisacáridos, ayudando a un mayor aprovechamiento de la energía y por lo tanto un aumento del almacenamiento de grasas del huésped (Rinninella *et al.*, 2019). Sin embargo, también se ha reportado que este filo bacteriano tiene funciones que contribuyen a la homeostasis del entorno anaeróbico del intestino y por lo tanto, a la estabilidad de la microbiota estrictamente anaerobia. Por ejemplo, preparando el intestino para la colonización sucesiva por anaerobios estrictos necesarios para una función intestinal saludable. Además, la proliferación de este filo se ha asociado a dietas altas en proteína y lípidos como lo es el pistache, sustrato de esta fermentación (Moon *et al.*, 2018). Sin embargo, es necesaria una mayor investigación para establecer el papel de las Proteobacterias en el huésped.

El filo Firmicutes ha sido relacionado con una mayor efectividad para extraer energía de los alimentos y por lo tanto una mayor absorción de calorías, favoreciendo la ganancia de peso (Magne *et al.*, 2020). También ha sido reportado que las personas con una condición de obesidad presentan disbiosis en la microbiota colónica caracterizada por una menor diversidad de poblaciones bacterianas, así como una menor abundancia relativa de Bacteroidetes y una mayor abundancia de Firmicutes, es por ello que se ha planteado que la relación Firmicutes/Bacteroidetes (F/B) podría funcionar como un marcador de la microbiota intestinal en personas con sobrepeso y obesidad (Rinninella *et al.*, 2019). En la **Figura 10a**, los resultados muestran que posterior a la fermentación con ambas muestras de pistache, la abundancia relativa de Bacteroidetes aumenta un 15 % con respecto a microbiota de la muestra basal; mientras que, el filo Firmicutes disminuye un 10 %, esto es algo benéfico debido a que como se comentó, la microbiota de personas con obesidad se caracteriza por una alteración en estos filos.

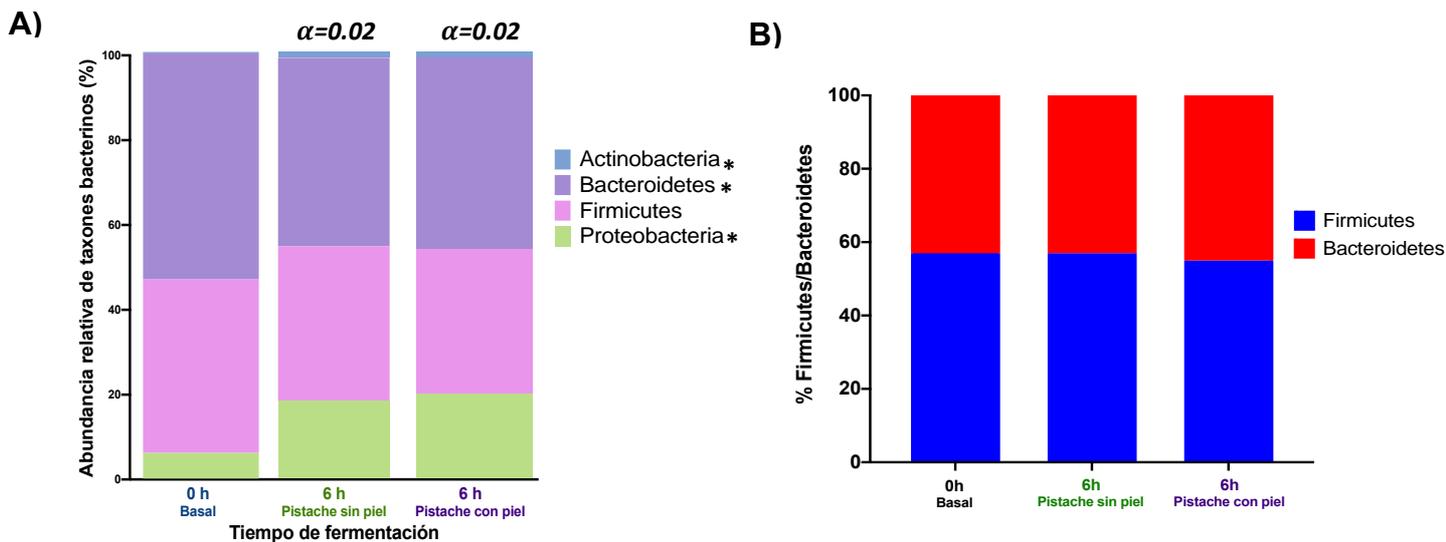


Figura 10. Cambios en la composición de la microbiota a nivel de Filo (A) y abundancia relativa de Firmicutes y bacteroidetes (B).

La relación F/B se obtiene tras dividir las abundancias relativas de los filos Firmicutes entre la de los Bacteroidetes. Ha sido reportado que una mayor relación F/B es característica de personas con obesidad, debido a la disbiosis intestinal que presentan, mientras que una menor relación se observa en pacientes con normopeso (Rivera-Piza y Lee, 2020). En los resultados se encontró una mayor relación F/B en la microbiota basal (0.8), mientras que posterior a la fermentación con pistache, esta relación se modifica particularmente en la muestra con piel (0.76) (**Figura 10b**). Sin embargo, este cambio no es estadísticamente significativo. Se ha reportado que la asociación obesidad-alteraciones F/B no es del todo convincente debido a los resultados contradictorios en diferentes poblaciones. Sugiriéndose que es necesario mejorar la caracterización de los sujetos e identificar claramente las covariables, que pueden afectar la composición de la microbiota e interferir con la interpretación de los resultados. Además, el concepto de una firma taxonómica única asociada con la obesidad parece comprometido. Recomendándose centrar la investigación del microbioma intestinal en marcadores taxonómicos para estratificar a los pacientes en subgrupos y no basar esta relación de filos como un marcador único en condiciones de sobrepeso y obesidad (Magne *et al.*, 2020).

VII.5.7.2. Cambios a nivel de familia

Para visualizar los cambios a nivel de familia posterior a la fermentación de ambas muestras de pistache se presenta un mapa de calor de la microbiota intestinal de la muestra basal (sin fermentar) y las muestras PN y PN+SC posterior a las 6 h de fermentación (**Figura 11**). El mapa de calor nos permite distinguir 3 grupos principales, el primero corresponde a familias de microorganismos que reducen su participación posterior a la fermentación con ambas muestras de pistache. Dentro de este grupo destacan las familias *Ruminococcaceae* y *Rikenellaceae* las cuales se encuentran mayormente en la microbiota inicial y han sido asociadas a poblaciones con obesidad y resistencia a la leptina. La abundancia de estas familias es dependiente de la dieta y han sido estrechamente asociadas con obesidad y Diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (Rinninella *et al.*, 2019). Posterior a las 6 h de fermentación de ambas muestras de pistache se observa un decremento en la abundancia (60 % *Ruminococcaceae* y 30 % *Rikenellaceae* con respecto a la abundancia en la muestra basal) de estas dos familias lo que sugiere un cambio positivo en la composición de la microbiota intestinal.

El segundo grupo corresponde a familias de microorganismos que proliferan debido a la fermentación de la muestra PN+SC. En este grupo es importante destacar la proliferación de *Bifidobacteriaceae*, una familia de bacterias asociadas con un efecto promotor a la salud y un efecto prebiótico (Hanifi *et al.*, 2020). La proliferación de esta familia de bacterias ha sido previamente reportada posterior a la ingesta de pistache en modelos *in vivo* (Terzo *et al.*, 2020; Yanni *et al.*, 2020).

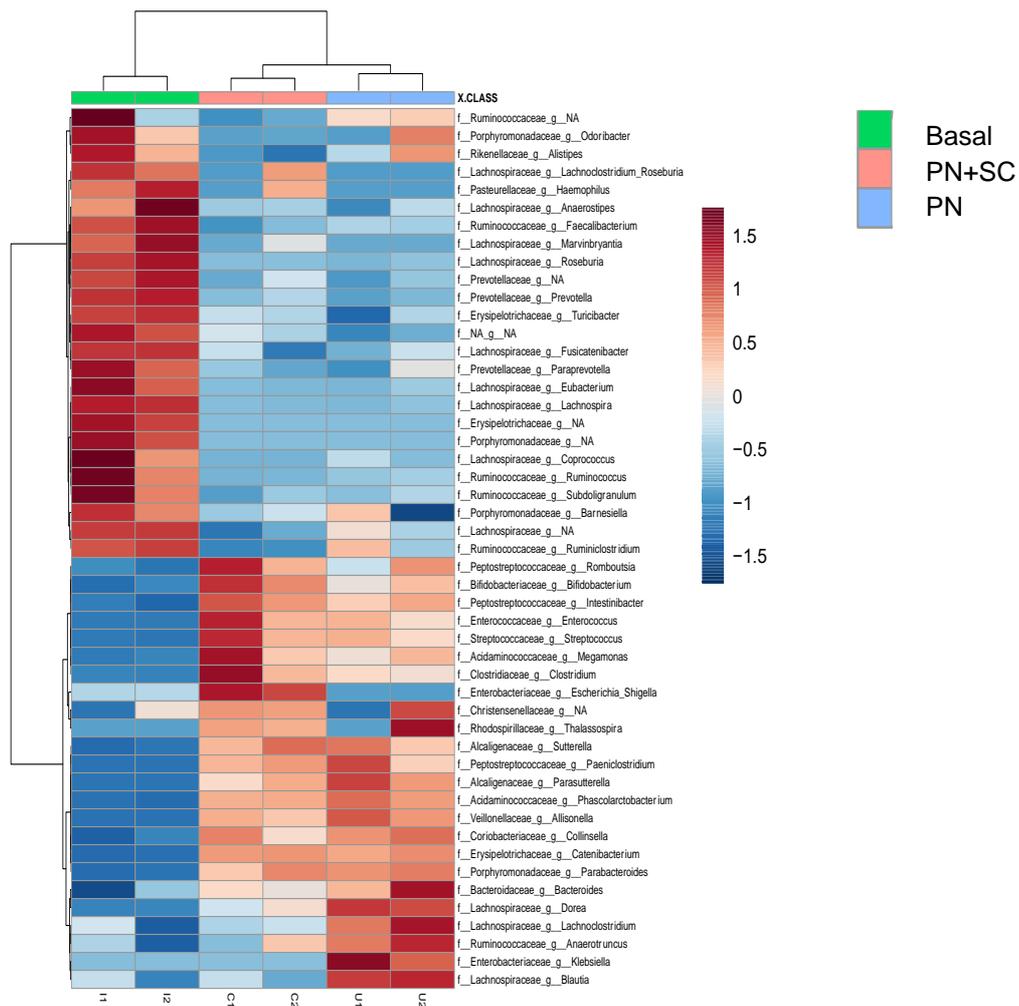


Figura 11. Mapa de calor de la microbiota intestinal a nivel familia

El tercer grupo corresponde a las familias de microorganismos que proliferan debido a la fermentación de la muestra PN. Dentro de estas familias de bacterias destaca *Lachnospiraceae*, cuyo metabolismo está asociado a la producción de AGCC, particularmente la producción de ácido butírico. El aumento de esta familia de bacterias se encuentra relacionada con los resultados previos de la producción de AGCC, donde la proporción de ácido butírico se mantuvo constante durante toda la fermentación. En la muestra basal, como en las primeras horas de la fermentación este aumento puede deberse a una mayor abundancia de filos como Firmicutes (**Figura 10**), mientras que en las horas posteriores puede deberse al aumento en la

abundancia relativa de familias de bacterias como *Lachnospiraceae* (Gomes, Hoffmann y Mota, 2018; Vacca *et al.*, 2020).

VII.5.7.3. Cambios a nivel de género

Los mayores cambios y más evidentes se presentaron a nivel de género (**Figura 12**). De 56 géneros taxonómicos identificados, 28 de ellos presentaron un aumento o disminución estadísticamente significativa posterior a la fermentación de pistache. Siendo importante destacar el aumento en géneros como *Bacteroides*, *Dorea*, *Bifidobacterium*, *Parabacteroides* y *Paraprevotella*; así como la disminución de géneros como *Odoribacter*, *Prevotella*, *Roseburia*, *Lachnospira* y *Alistipes*.

Un género importante de destacar es *Bacteroides*, el cual presentó un aumento en ambas muestras de pistache (10 %) con respecto a la abundancia de la muestra basal; sin embargo, este aumento no resultó ser estadísticamente significativo. Otro género importante de mencionar es *Dorea*, el cual aumenta su abundancia relativa (110 %) posterior a la fermentación con ambas muestras de pistache. Este género es de relevancia debido a que es productor de AGCC, particularmente butírico (Terzo *et al.*, 2020). Es importante destacar este comportamiento debido a que estos géneros se asocian con la producción de AGCC (Yanni *et al.*, 2020), los cuales concuerdan con los resultados de la producción de AGCC y del análisis metabolómico. Además, como ya se comentó estos tienen un efecto benéfico a la salud y actúan como potentes cronobióticos de relojes periféricos; contribuyendo así a la regulación del sistema circadiano lo cual es de especial interés en este trabajo (Tahara *et al.*, 2018).

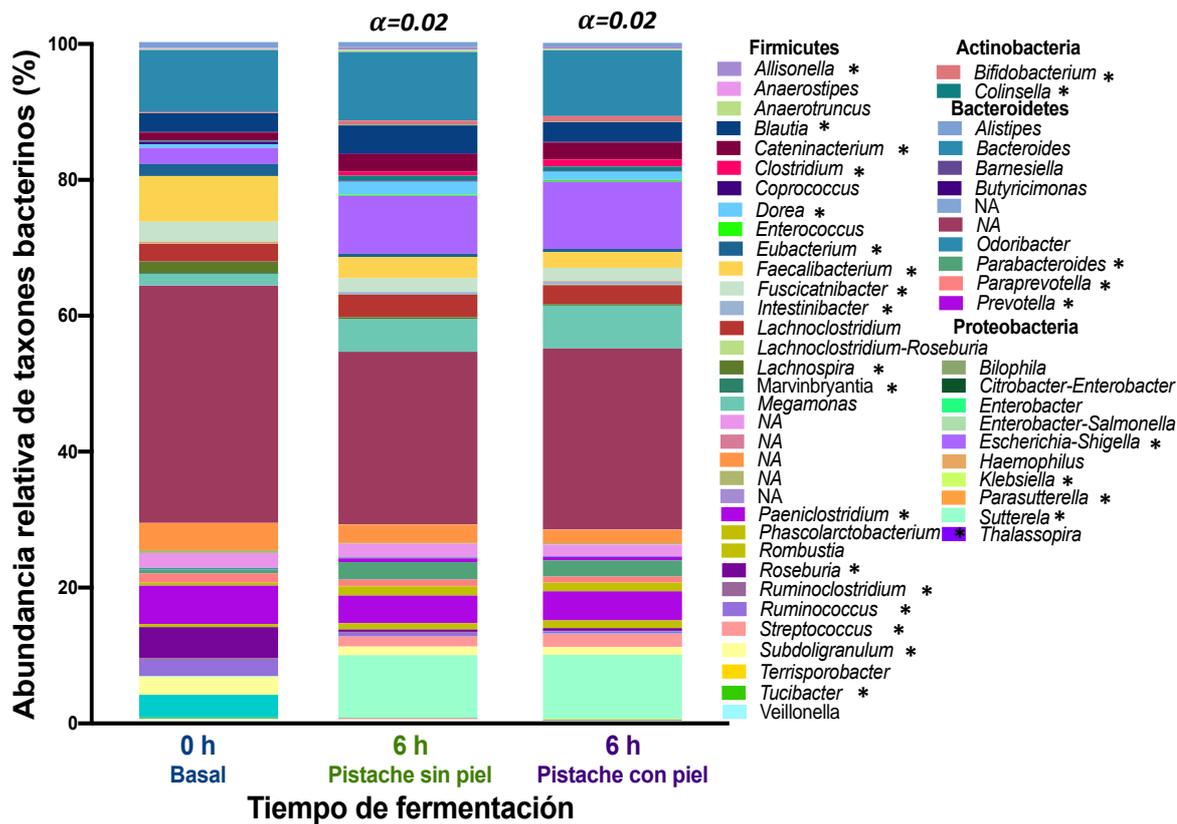


Figura 12. Cambios en la composición de la microbiota a nivel de género.

* muestra diferencia significativa entre la muestra basal y las muestras fermentadas. NA= No asignado a algún taxón bacteriano

Los resultados muestran un aumento significativo del género *Bifidobacterium* (400 %, PN+SC), el cual es un género de bacterias benéficas que ayudan a mantener la salud intestinal. Se ha reportado que la fermentación de ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs) como el ácido oleico, así como la fermentación de compuestos fenólicos en el colon favorecen el crecimiento de este género (Liu *et al.*, 2019; Carasso *et al.*, 2021). Como ya se discutió anteriormente, aproximadamente el 60 % de los lípidos del pistache son MUFAs y PUFAs, particularmente oleico y linoleico, además son una buena fuente de compuestos fenólicos los cuales pueden llegar al colon para ser fermentados, explicando así el aumento de la abundancia relativa en este género.

Los géneros *Parabacteroides* y *Paraprevotella* han sido estrechamente relacionados con la obesidad, ganancia de peso y marcadores metabólicos asociados a esta condición. *Parabacteroides* presenta un aumento en su

abundancia relativa (300 %) con respecto a su abundancia en la muestra basal, esto es de interés ya que su presencia en la microbiota se ha correlacionado negativamente con un aumento en la ganancia de peso corporal y la acumulación de grasa en el huésped (Terzo *et al.*, 2020). Por otra parte, la presencia de *Paraprevotella* ha mostrado una mejora de marcadores metabólicos de salud en una condición de obesidad, como lo son los niveles de lípidos en plasma (Bressa *et al.*, 2017). Lo cual sugiere un cambio positivo en la composición de la microbiota intestinal en el tiempo evaluado.

De los géneros que presentan una disminución en ambas muestras de pistache (50 %) es relevante mencionar el género *Odoribacter* debido a que su presencia se ha asociado con la inflamación y se ha reportado que en personas sedentarias hay una mayor abundancia de este género (Morgan *et al.*, 2012; Bressa *et al.*, 2017). De acuerdo a las características del donador de la muestra fecal, este presenta una actividad física moderada (683 MET), lo cual fue evaluado por medio del cuestionario internacional de actividad física (IPAQ); esto podría explicar la mayor abundancia de este género en la muestra basal. Otro género importante de destacar es *Prevotella*, el cual presentó una disminución (25 %) significativa de su abundancia posterior a la fermentación con pistache. La presencia de este género se asocia a proceso de inflamación y se ha encontrado en mayor abundancia en personas que padecen depresión mayor (Noriega *et al.*, 2016; Precup *et al.*, 2019).

Es de particular interés para este trabajo el factor del reloj circadiano; sin embargo, la evaluación y evidencias que consideren su interacción con la microbiota son aún limitadas. De los pocos reportes con los que se cuenta destaca que el género *Roseburia* se correlaciona con la expresión de *Per*, un componente molecular del reloj circadiano. Nuestros resultados muestran una disminución de este género posterior a la fermentación de 6 h de pistache (90 %) con respecto a la muestra basal. Recientemente Carrasso *et al.* (2021)

reportaron que existen poblaciones de microorganismos característicos en cronotipos extremos como el matutino y vespertino. De acuerdo con sus resultados, los géneros característicos de una persona con cronotipo vespertino son *Lachnospira* y *Alistipes* al encontrarse una mayor abundancia relativa de ellos, esto concuerda con nuestros resultados donde hay una mayor abundancia de estos dos géneros en la microbiota basal. Sin embargo, con la fermentación de ambas muestras de pistache se observa una disminución de su abundancia relativa (85 % y 36 %, respectivamente), siendo más pronunciada la disminución en la muestra PN+SC, lo cual podría contribuir con una mejora en el cronotipo a través del restablecimiento del equilibrio de estas poblaciones microbianas en el colon. Por otra parte, Yin *et al.* (2020) reportaron que el género *Lachnospira* tiene una correlación positiva con la expresión de *Cry1* y una correlación negativa con la expresión de *Cry2*; mientras que el género *Alistipes* mostró una correlación positiva en la expresión de *Per2* y *Clock*. Además, sus resultados destacan que el género *Alistipes* a su vez se correlaciona positivamente con los niveles de triglicéridos y colesterol LDL plasmáticos. Destacando la importancia de la modulación de estos géneros en padecimientos como la obesidad y su relación con los ritmos circadianos.

VII.5.7.4. α y β diversidad

La α diversidad se refiere a la diversidad dentro de un área en particular, y generalmente se expresa por el número de especies (es decir, la riqueza de especies) en esa área (Pla, 2006). Es decir, nos ayuda a medir la diversidad de la microbiota en cada muestra evaluada. En este trabajo evaluamos la α diversidad mediante los índices de Shannon y Simpson (**Figura 13**). La diversidad medida por el índice Shanon (Figura 13a) resultó ser mayor en las muestras de pistache fermentadas que en la muestra sin fermentar, esto se traduce en una mayor diversidad de microorganismos en las muestras fermentadas. Siendo importante destacar también que la diversidad entre ambas muestras de pistache no es significativa. Esto resulta

benéfico porque el tratamiento temporal con un alimento como el pistache tiene un efecto sobre la diversidad microbiana, lo cual podría contribuir a la disminución de la disbiosis colónica del huésped y una mejora en parámetros metabólicos asociados a la obesidad y parámetros cronobiológicos. La diversidad medida por el índice de Simpson (**Figura 13b**) muestra la misma tendencia que el índice de Shannon, es decir, las muestras fermentadas muestran un mayor índice de Simpson que la muestra sin fermentar, sin una diferencia entre ambas muestras de pistache. El índice de diversidad de Simpson mide la diversidad considerando el número de especies presentes, así como la abundancia relativa de cada especie. Así de manera general, si aumenta la riqueza y la uniformidad de las especies, también aumenta la diversidad de la microbiota. Su valor varía entre 0 y 1. Con este índice, 1 representa diversidad infinita y 0, sin diversidad (Thukral, 2017). Por lo tanto, las muestras de pistache después de 6 h de fermentación además de presentar una mayor diversidad presentan una mayor riqueza de microorganismos.

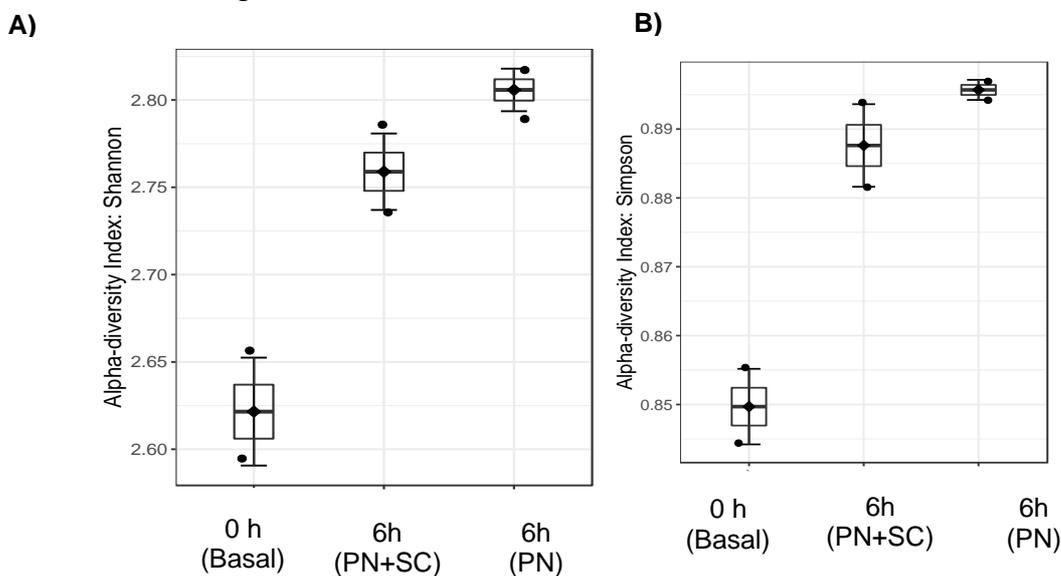


Figura 13. Índices de α diversidad (A) Shannon y B) Simpson. PN (Pistache sin piel), PN+SC (Pistache con piel), Basal (Muestra sin fermentar)

La β diversidad mide el cambio en la diversidad de especies entre dos ambientes (Halffter *et al.*, 2001). Los resultados muestran diferencias claras entre las muestras de pistache fermentadas y la muestra sin fermentar de acuerdo al índice de Bray-Curtis (**Figura 14**). El índice de Bray-Curtis se basa en abundancia y permite observar diferencias en la abundancia microbiana entre dos o más muestras a nivel de especie.

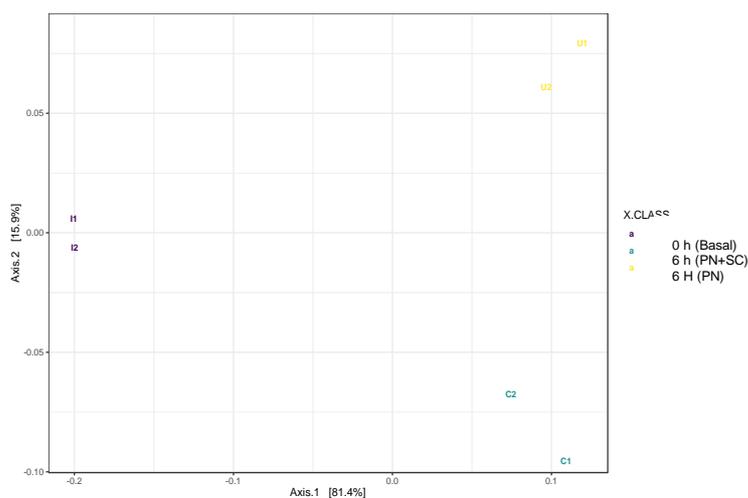


Figura 14. Índice Bray-Curtis de β diversidad

VII.5.8. Biodisponibilidad de Fito-melatonina

La biodisponibilidad es un paso clave para garantizar la bioeficacia de compuestos bioactivos presentes en los alimentos o fármacos orales. Este es un proceso complejo que involucra varias etapas: liberación, absorción, distribución, metabolismo y eliminación (ADMED) (Rein *et al.*, 2012), las cuales, como se comentó anteriormente han sido evaluadas por medio de un análisis *in silico* como parte de este trabajo para moléculas de interés como lo es la fito-melatonina; sugiriendo que la fito-melatonina es biodisponible por la vía oral, altamente absorbible en el TGI y permeable a la barrera hematoencefálica (BHE).

Para ejercer efectos benéficos a la salud, los compuestos bioactivos alimentarios, ya sean derivados de diversas fuentes vegetales o animales, deben estar biodisponibles. Después de ser liberados de la matriz alimentaria y volverse bioaccesibles, los compuestos bioactivos pueden absorberse en el TGI. La absorción de estos compuestos puede verse influenciada por la solubilidad, la interacción con otros ingredientes de la dieta, las transformaciones moleculares, los diferentes transportadores celulares, el metabolismo y la interacción con la microbiota intestinal, lo que resulta en cambios en su biodisponibilidad (Richelle *et al.*, 2006). En el presente trabajo se demostró que la fito-melatonina de pistache es bioaccesible en las diferentes etapas del TGI.

La biodisponibilidad de la fito-melatonina ha sido previamente reportada, el aumento de la melatonina plasmática resulta tras el consumo de alimentos enriquecidos con melatonina (Kennaway, 2017). La melatonina sintética se absorbe en el tracto gastrointestinal 45 min después de la administración oral, después de este tiempo es metabolizada en el hígado. Del 3 al 76 % de la melatonina consumida llega a la circulación y tiene una vida media corta, $t_{1/2}$ (es decir, alrededor de 20-40 min) (Bhattacharjee *et al.*, 2016). Luego, la melatonina se excreta principalmente como metabolitos sulfatados en la orina, principalmente como 6-sulfatoximelatonina (aMT6s) (Abey Suriya *et al.*, 2018). La investigación sobre la biodisponibilidad y la farmacocinética de la fito-melatonina es bastante escasa hasta la fecha. A pesar de la influencia de la matriz alimentaria y los procesos de digestión en la absorción de esta molécula anfipática, los estudios han revelado que la ingesta de alimentos ricos en melatonina (jugo de uva, jugo de piña, naranja y plátano, germinados de lenteja) da lugar a un aumento de las concentraciones de melatonina circulante en diferentes modelos de estudio, incluyendo estudios con humanos (González-Flores *et al.*, 2012; Sae-Teaw *et al.*, 2013; Rebollo-Hernanz *et al.*, 2020).

Como parte de este proyecto se evaluó la biodisponibilidad de fito-melatonina de pistache en estudio de intervención en personas, para determinar el horario de consumo de los pistaches para garantizar la llegada de la fito-

melatonina a plasma y que ejerza sus efectos benéficos asociados. Las características de los participantes del estudio de biodisponibilidad de fito-melatonina se presentan en el **Cuadro 9**. Se contó con la participación de 9 voluntarios de los cuales 77.8 % fueron mujeres y 22.2 % hombres. La media del IMC de los participantes fue de 23.6 ± 1.4 , lo cual quiere decir que tenían normopeso y se tuvo un mayor porcentaje (87.5 %) de participantes con cronotipo intermedio, mientras que el resto tenían un cronotipo matutino moderado.

Cuadro 9. Características de los participantes del estudio de biodisponibilidad

Variable	
N	9
Edad (años)	26.9 ± 0.5
Peso (Kg)	64.1 ± 3.2
Talla (cm)	164.3 ± 2.2
IMC (Kg/m²)	23.6 ± 1.4
Grasa (%)	24.7 ± 1.8
Músculo (%)	28.1 ± 1.3
Grasa visceral	2.5 ± 0.2
Cronotipo intermedio (%)	87.5 ± 0.0
Cronotipo matutino moderado(%)	12.5 ± 0.0

IMC: Índice de masa corporal. Los resultados se presentan como la media \pm el error estándar

En la **Figura 15** podemos observar el perfil de concentración plasmática media de fito-melatonina con respecto al tiempo. La fito-melatonina se detectó en niveles basales en el tiempo 0, alcanzándose la mayor concentración a los 40 minutos. La concentración disminuyó a partir de ese punto para alcanzar la concentración basal 80 minutos después de la ingesta de pistaches.

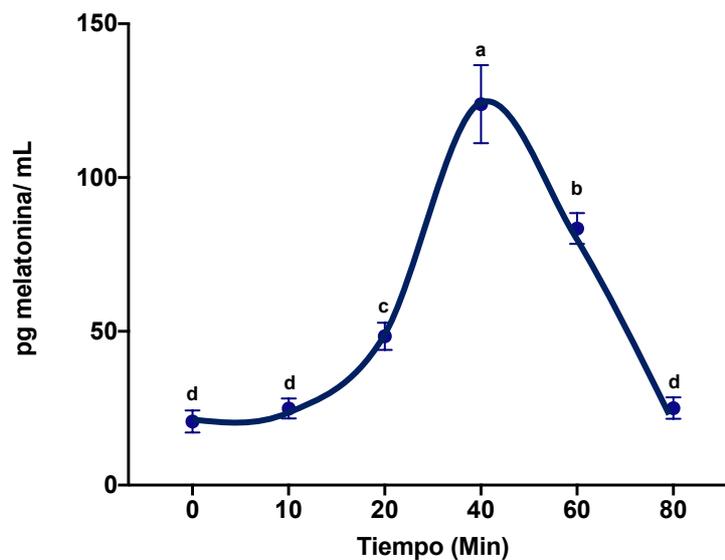


Figura 15. Biodisponibilidad de fito-melatonina de pistache. Los resultados se presentan como la media \pm el error estándar. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre tiempos por la prueba de Tukey $p < 0.05$. $n=9$

Los parámetros farmacocinéticos se calcularon a partir del perfil de concentración plasmática de fito-melatonina con respecto al tiempo (**Cuadro 10**). Después de la ingesta de 32 g de pistache, la fito-melatonina mostró una rápida absorción ($T_{max} = 40$ min), su vida media plasmática fue de alrededor de 44 min, similar a lo previamente reportado para melatonina pura (Kennaway *et al.*, 2020), lo que indica un metabolismo rápido. Se ha reportado que la melatonina tiene un metabolismo rápido en el hígado por parte de las enzimas del citocromo P450 y luego se sulfata o glucuronida. La melatonina también puede degradarse por vías no enzimáticas que involucran especies de radicales (Hardeland *et al.*, 2015). Estos resultados demuestran la rápida absorción y el metabolismo de la fito-melatonina de pistache después de una ingesta aguda. De acuerdo al análisis *in silico*, su valor de biodisponibilidad es de 0.55, lo que indica que aproximadamente la mitad de este compuesto alcanza la circulación sistémica. Ha sido previamente reportado que la biodisponibilidad de melatonina pura es de 0.15, y que la co-ingestión de compuestos fenólicos con la melatonina puede aumentar la biodisponibilidad de esta molécula, representando un beneficio en el consumo de matrices alimentarias ricas en polifenoles como lo es el pistache (Jana y Rastogi, 2017).

Cuadro 10. Parámetros farmacocinéticos de fito-melatonina de pistache

Parámetro	32 g pistache (6.4 mg fito-melatonina)
T_{max} (min)	40.0 ± 0.0
C_{max} (pg/mL)	123.8 ± 4.2
Ke (1/h)	0.97 ± 0.1
$t_{1/2}$ (min)	43.7 ± 0.0
AUC _{0-t} (pg/mL min)	2048.4 ± 0.2
AUC _{0-∞} (pg/mL min)	2238.6 ± 0.7
Biodisponibilidad*	0.55

T_{max} : Tiempo concentración plasmática máxima; C_{max} : Concentración plasmática máxima; Ke : Constante de eliminación; $t_{1/2}$: Vida media de eliminación; AUC: Área bajo la curva. * Dato calculado a través de la plataforma SwissADME

VII.5.8.1. Actividad antioxidante

Dado que la principal bioactividad de la melatonina es su potencial antioxidante, se evaluó la actividad antioxidante en plasma mediante los métodos FRAP y ORAC a los 0, 10, 20, 40, 60 y 80 minutos, en el estudio de biodisponibilidad. La actividad antioxidante plasmática medida por ambos métodos (**Figura 16**) mostró un comportamiento similar al de la fito-melatonina. Se detectó la mayor actividad antioxidante a los 40 min después de la administración de pistaches; luego, se percibió una ligera disminución antes de volver al nivel basal (después de 80 min). Se ha demostrado que la melatonina alcanza su concentración máxima entre 20 y 100 min después de su administración oral (Harpsøe *et al.*, 2015). Para la fito-melatonina de pistache, se observó un comportamiento similar.

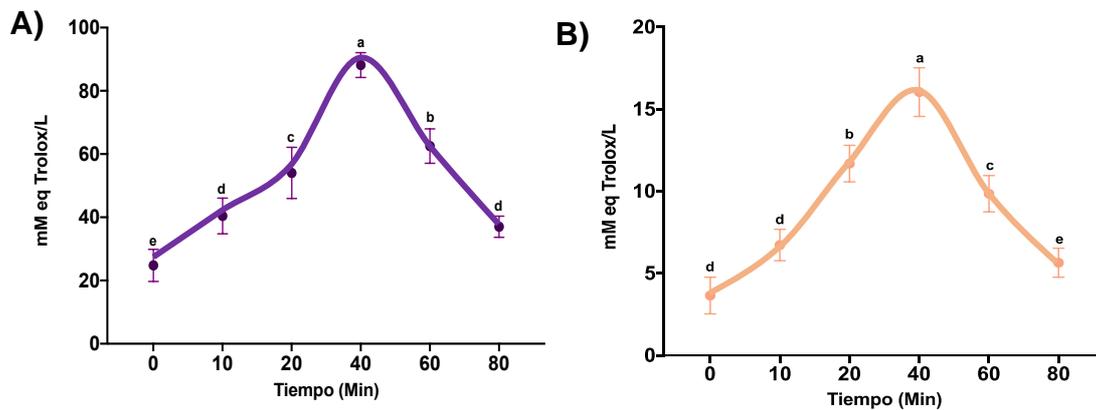


Figura 16. Actividad antioxidante medido por las técnicas de (A) ORAC y (B) FRAP. Los resultados se presentan como la media \pm el error estándar. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre tiempos por la prueba de Tukey $p < 0.05$. $n=9$

Como se reportó previamente, la ingesta de alimentos ricos en melatonina como frutas y derivados (cerezas, uvas y sus jugos, germinados de lentejas) o bebidas fermentadas (vinos y cervezas) resulta en un aumento de la capacidad antioxidante plasmática (Maldonado *et al.*, 2009; Garrido *et al.*, 2010; González-Flores *et al.*, 2012; Sae-Teaw *et al.*, 2013; Rebollo-Hernanz *et al.*, 2020). Sin embargo, estos resultados pueden implicar una evaluación conservadora de la actividad antioxidante y no deben atribuirse únicamente a la presencia de fito-melatonina. Estos resultados podrían estar relacionados con otros fitoquímicos no medidos, como la vitamina C u otros antioxidantes que podrían estar asociados con el aumento de la capacidad antioxidante plasmática *in vitro* (Selby-Pham *et al.*, 2017). Además, los ensayos FRAP y ORAC evalúan exclusivamente la capacidad de captación de radicales libres. La fito-melatonina muestra propiedades antioxidantes directas e indirectas, que cubren no solo la capacidad de eliminación de radicales libres, sino también la estimulación de la expresión de enzimas antioxidantes endógenas (Reiter *et al.*, 2016). La administración de fito-melatonina se ha correlacionado con la mejora de la capacidad antioxidante plasmática tanto en modelos animales como en estudios humanos (Salehi *et al.*, 2019). Con respecto a los estudios previos, nuestros resultados difieren en el tiempo de mayor actividad antioxidante después de la

ingesta de una matriz rica en fito-melatonina, de 60 a 90 minutos para brotes de lenteja en un modelo animal (Rebollo-Hernanz *et al.*, 2020), esto puede deberse a las características de la matriz alimentaria, la cantidad de fito-melatonina consumida y el tiempo de residencia en la etapa oral, lo cual determina la biodisponibilidad de la misma.

Se realizó un análisis de correlación de Pearson (**Figura 17**) para determinar si la fito-melatonina contribuye a la actividad antioxidante observada. Cabe señalar que ORAC y FRAC nominalmente miden diferentes mecanismos antioxidantes; la técnica de FRAP evalúa la transferencia de un solo electrón, mientras que ORAC la transferencia de átomos de hidrógeno. Es posible observar que la concentración de fito-melatonina en el plasma se correlaciona directa y significativamente con la actividad antioxidante medida por ambos métodos (ORAC: $r = 0.9481$, FRAP: $r = 0.8659$; $p < 0.05$). Esto confirma que, si bien puede haber otros antioxidantes, fito-melatonina es el principal involucrado en el aumento de la actividad antioxidante observada. Se puede observar que la correlación resulta mayor con la técnica de ORAC. Ha sido previamente reportado en nueces que los niveles de FRAP no estaban necesariamente o exclusivamente relacionados con el aumento de la melatonina. Las nueces, como el pistache contienen otros antioxidantes importantes, por ejemplo, vitamina E y polifenoles, que también se absorben en el intestino e influyen en la actividad antioxidante total del suero (Reiter *et al.*, 2005).

Como es posible observar, la ingesta de pistaches aumenta la concentración de fito-melatonina plasmática en humanos, incrementando también la capacidad antioxidante plasmática. A la luz de estos resultados, los pistaches pueden considerarse como una fuente natural de fito-melatonina biodisponible la cual aumenta los niveles circulantes de melatonina y podría influir en el inicio del sueño o alterar la fase circadiana, actuando como un potente cronobiótico en procesos de cronodisrupción, proceso clave en el desarrollo de sobrepeso y obesidad. Con estos resultados se estableció que el tiempo de consumo de los pistaches en el estudio de intervención debería ser

de 30 min a 1 h antes de irse a acostar, para garantizar la presencia de fito-melatonina de pistache en plasma y con ello el efecto deseado.

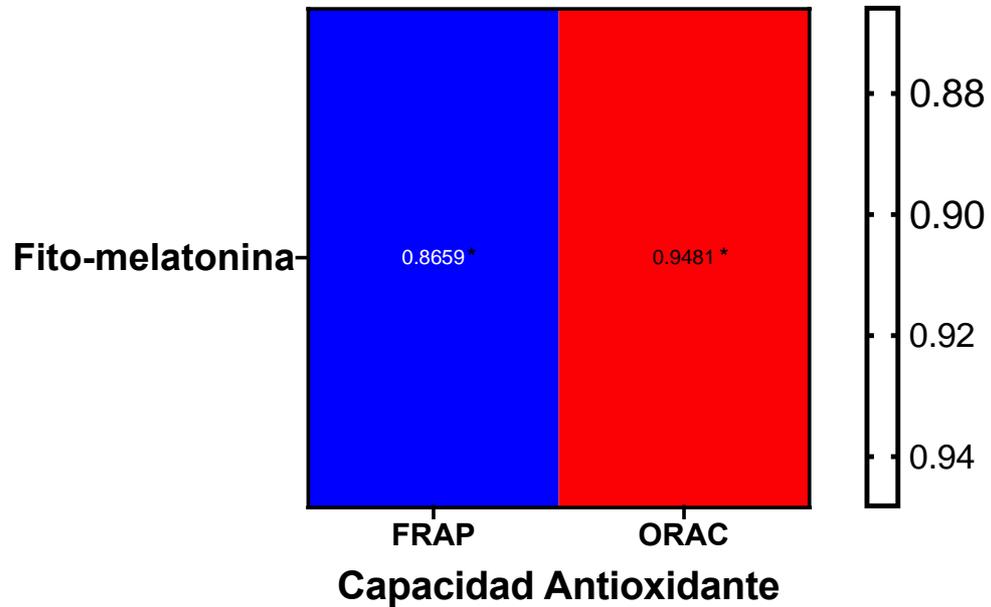


Figura 17. Correlación de Pearson para la actividad antioxidante y el contenido de fito-melatonina plasmática. Coeficientes de correlación de Pearson. * indica diferencia estadística significativa $p < 0.05$

VII.5.9. Efecto del consumo de pistache mediante un estudio de intervención

En la **Figura 18** se presenta el diagrama de flujo del estudio de intervención basal-final no controlado llevado a cabo durante el mes de octubre, 2021.

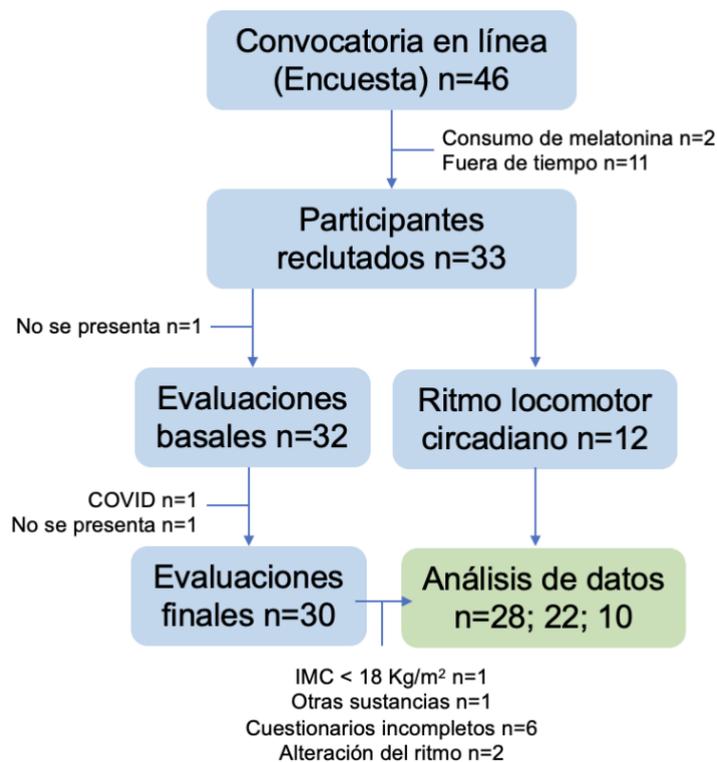


Figura 18. Diagrama de flujo del estudio de intervención

VII.5.9.1. Características bioquímicas y antropométricas

Un total de 32 adultos con edad media de 28.2 ± 0.9 participaron en el estudio. Del total de participantes 21.4 % fueron hombres y 78.6 % mujeres, al inicio del estudio se tuvo un peso corporal medio de 70.90 ± 3.1 Kg. El estudio consistió de evaluaciones basales y finales de un solo grupo de tratamiento (consumo de 28 g de pistache con piel). En el **Cuadro 11** se muestran las características bioquímicas, antropométricas (basales y finales), así como la diferencia en cada variable respuesta de los participantes del estudio y el valor p obtenido después de realizar una prueba t de Student para datos pareados.

Se observó una disminución significativa en la circunferencia de cintura (cm) ($p=0.0449$) y la grasa visceral ($p=0.0000$) al terminar la intervención;

mientras que para los valores bioquímicos, se registró una disminución significativa en el colesterol total ($p=0.0013$) y el colesterol LDL ($p=0.0409$).

Cuadro 11. Características bioquímicas y antropométricas basales y finales

Variable	Basales	Finales	Diferencia	Valor p
Edad (años)	28.2 ± 0.9	28.2 ± 0.9	NA	NA
Talla (cm)	164.1 ± 0.0	164.1 ± 0.0	NA	NA
Peso (Kg)	70.90 ± 3.1	70.62 ± 3.0	-0.28 ± 0.27	0.3139
IMC (Kg/m²)	25.94 ± 0.9	25.87 ± 0.9	-0.07 ± 0.09	0.4663
IMG (Kg/m²)	9.14 ± 0.7	8.92 ± 0.7	-0.22 ± 0.15	0.1441
Cintura (cm)	89.40 ± 2.5	87.81 ± 2.5	-1.59 ± 0.76	0.0449*
Cadera (cm)	102.91 ± 1.9	103.58 ± 1.9	0.66 ± 2.08	0.7522
Grasa (%)	33.85 ± 1.5	33.22 ± 1.5	-0.63 ± 0.35	0.0863
Grasa visceral	2.52 ± 0.2	3.67 ± 0.2	1.15 ± 0.16	0.0000*
Glucosa (mg/dL)	88.26 ± 4.5	81.35 ± 1.5	-6.9 ± 4.43	0.1310
Colesterol total (mg/dL)	163.36 ± 4.3	153.14 ± 4.2	-10.21 ± 2.85	0.0013*
HDL (mg/dL)	47.21 ± 2.1	46.82 ± 2.4	-0.39 ± 1.01	0.7006
LDL (mg/dL)	93.53 ± 3.5	86.96 ± 3.9	-6.57 ± 3.06	0.0409*
Triglicéridos (mg/dL)	112.46 ± 10.4	96.71 ± 7.5	-15.75 ± 9.13	0.0959
Riesgo aterogénico (col/HDL)	3.63 ± 0.2	3.48 ± 0.2	-0.16 ± 0.18	0.0574

IMC: Índice de masa corporal, IMG: Índice de masa grasa. Los resultados se presentan como la media ± error estándar. * Indica diferencia estadística significativa entre los datos basales y finales por la prueba t de Student para datos pareados ($p<0.05$), $n=28$.

Los pistaches son considerados como un alimento rico en energía y un alto contenido de grasa, por lo que se cree que la inclusión de este tipo de nueces a la dieta puede tener efectos negativos en el peso corporal y la adiposidad de las personas. Sin embargo, en diversos estudios epidemiológicos los reportes al respecto tienen resultados contrastantes. Siendo importante mencionar que dentro del grupo de las nueces, los pistaches son bajos en contenido de lípidos, la cual además se encuentra compuesta principalmente por ácidos grasos mono y poliinsaturados, tienen un alto contenido de fibra dietaria, presentan un bajo índice glicémico y contienen un gran número de compuestos bioactivos como caroteonides, antocianinas, compuestos fenólicos y fito-melatonina que no respaldan la perspectiva del aumento de peso (Xia *et al.*, 2020).

La media del peso corporal de la población, al finalizar el tratamiento, presentó una disminución (-0.28, $p=0.3139$). Se han sugerido varios mecanismos biológicos para explicar por qué, a pesar de un alto contenido calórico y de grasa, el consumo de nueces no está asociado con el aumento de peso (Natoli y McCoy, 2007; Mattes y Dreher, 2010). Las nueces son ricas en lípidos no saturados, que pueden tener un mayor efecto termogénico que las grasas saturadas, lo que resulta en menos almacenamiento de grasa (Piers *et al.*, 2003). Las grasas no saturadas también pueden influir en la saciedad (Kozimor *et al.*, 2013). Además, no toda la grasa de las nueces es absorbida después de su consumo, resultando en una sobreestimación de su aporte calórico a la dieta. Esto se ha demostrado en nueces, almendras y pistaches (Baer *et al.*, 2012; Novotny *et al.*, 2012; Baer *et al.*, 2016). Por lo tanto, las nueces pueden proporcionar menos energía metabolizable *in vivo* que la calculada por análisis proximal. Además de esto, los pistaches, con respecto a otras nueces de árbol, son una buena fuente de fibra dietaria y proteína, algunos de sus beneficios, como se observó en el estudio metagenómico y metabolómico, es favorecer el aumento de poblaciones bacterianas particularmente las Bifidobacterias y aumentar la producción de AGCC. También se ha reportado que estimula la secreción de péptidos relacionados a la saciedad como GLP-1 y PYY, esto podría estar relacionado con la disminución de grasa corporal

(Tavares da Silva *et al.*, 2013; Xia *et al.*, 2020). En México, la mortalidad por enfermedades cardiovasculares predomina entre las primeras causas de muerte; por lo que se ha recomendado aumentar 10 g el consumo de fibra por día, ya que esto contribuye significativamente en la reducción del riesgo de enfermedades al corazón. En este sentido, la inclusión de pistache como un snack saludable podría aumentar el consumo de fibra en la dieta de los mexicanos (Fung *et al.*, 2002).

Es posible observar que la mayor parte de los datos bioquímicos y antropométricos tuvieron una modulación positiva posterior a la intervención. La disminución en la circunferencia de cintura resultó significativa en la población evaluada (-1.59, $p=0.0449$). Al final de la intervención, la circunferencia de cintura se encontró por debajo del valor máximo saludable del perímetro abdominal establecido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 66.6 % de los participantes masculinos y el 69.2 % de los participantes femeninos. Estos cambios son favorables debido a que este parámetro funciona como indicativo de riesgo de síndrome metabólico, porcentaje de grasa total y abdominal. Este comportamiento ha sido previamente reportado en estudios de intervención con pistache, por tiempo más prolongados (180 días), en una población asiática con síndrome metabólico (Guladi *et al.*, 2014). En cuanto al porcentaje de grasa no se muestra una diferencia significativa, sin embargo, la media de la población presentó una disminución de este parámetro posterior a la intervención con pistache (-0.63, $p=0.0863$). La grasa visceral mostró un aumento con diferencia significativa (1.15, $p=0.0000$); la grasa visceral se ha asociado con un mayor riesgo cardiovascular, dislipidemia y alteraciones en el metabolismo de glucosa (Rosenquist *et al.*, 2013). Sin embargo, a pesar de esto, se mantiene dentro de valores saludables. Curiosamente, este comportamiento es inverso a parámetros antropométricos (circunferencia de cintura, índice cintura/cadera, peso corporal e IMC); esto puede deberse a que los participantes no fueron sometidos a un régimen dietario específico o restricción calórica. Por otra parte, y debido a que no hubo cambios en el peso, se sugiere una redistribución y pérdida preferencial de la grasa fuera del comportamiento abdominal (Gulati *et al.*, 2014; Ros, 2015);

lo cual puede deberse al consumo de ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs) que se sugiere tienden a redistribuir la grasa corporal del centro a la periferia (Njike *et al.*, 2015).

Las variables bioquímicas que tuvieron diferencia significativa posterior al consumo de pistache fueron el colesterol total (-10.21, $p=0.0013$) y el colesterol LDL (-6.57, $p=0.0409$). Esto sugiere el efecto hipolipidémico del pistache independiente del aumento de la grasa visceral ($r= 0-0.2$, $p>0.05$). En este sentido, existen algunas explicaciones biológicas que pueden apoyar los mecanismos de reducción de lípidos en sangre ejercidos por los pistaches. Curiosamente, Baer *et al.* (2012) observaron que los sujetos asignados al azar para recibir pistaches mostraron una digestibilidad sustancialmente menor tanto de grasa como de energía, mientras que se observó un efecto contrario para la digestibilidad de fibra dietética. De hecho, la evidencia muestra que las grasas contenidas en los pistaches son más resistentes a la absorción; esto apoya la hipótesis de que la ingesta total de grasas dietéticas puede disminuir en sujetos que consumen pistaches, lo que puede verse reflejado en cambios favorables del colesterol total, LDL y HDL. Los pistaches también son una rica fuente de fitoesteroles (hasta 289 mg / 100 g de pistache), con un contenido que se ha estimado de 2 a 3 veces mayor que la de las almendras o las nueces (Dreher, 2012). Los fitoesteroles son efectivos para reducir tanto el colesterol total como el LDL, produciendo también algunos efectos positivos sobre el colesterol HDL (AbuMweis *et al.*, 2014). Lo anterior sustenta que la ingesta de fitoesteroles derivados de pistache puede estar asociada con su efecto hipercolesterolémico. Se ha descrito un efecto similar para los compuestos fenólicos (Cicerale *et al.*, 2010), que también están presentes en gran cantidad en los pistaches (1.7 g /100 g de pistaches). Los bajos contenidos de ácidos grasos saturados también pueden contribuir al efecto hipolipemiante de los pistaches, ya que ahora está claramente establecido que la sustitución de grasa saturada por grasa poliinsaturada es efectiva para reducir el colesterol LDL y la proporción de colesterol total a HDL (Siri-Tarino *et al.*, 2010). En conclusión, la evidencia epidemiológica actual sugiere que un consumo equilibrado de pistaches puede

ser benéfico para disminuir el riesgo cardiovascular, especialmente el atribuible al control de la hipercolesterolemia, resultado que se observó en el estudio de intervención.

Se ha sugerido que los factores cronobiológicos (cronotipo y calidad del sueño) pueden tener un efecto negativo directo sobre la antropometría de los participantes y por lo tanto en su salud (Corbalán-Tutau *et al.*, 2015; Oseguera-Castro *et al.*, 2019). En este sentido, se realizó una correlación estadística entre los parámetros antes mencionados (**Figura 19**). Es posible observar 3 clúster bien definidos: el clúster 1 que tiene que ver con los lípidos en sangre ($r=0.56-0.75$), el clúster 2 que es el clúster de la composición corporal ($r > 60$) y el clúster 3 que es el correspondiente a la adiposidad central ($r=0.31-0.49$).

El aumento de la grasa visceral se encuentra correlacionado positivamente con la disminución de la circunferencia de cintura y de cadera al final del estudio. También, la calidad del sueño final se correlaciona positiva y significativamente con el cambio de cronotipos biológicos después de la intervención ($r=0.37$), fenómeno que se discutirá más adelante. Para estos parámetros es importante destacar que el 14 % de la varianza asociada a la calidad del sueño al final de la intervención, medida por la escala de Pittsburgh, se asocia a la clasificación de cronotipos finales.

En la **Figura 20** se muestra un análisis de componentes principales que nos permite agrupar las variables observándose grupos claros como el clúster cintura, cadera y grasa visceral, que se asocia con la movilización de grasa corporal. Así como también el cluster de lípidos en sangre, que se asocia a su efecto hipolipidémico y con la disminución del riesgo a padecer enfermedades cardiovasculares, como ya se comentó en párrafos anteriores.

VII.5.9.2. Efecto de la intervención con pistache sobre la melatonina plasmática y la actividad antioxidante

Como se mencionó anteriormente, la melatonina es una hormona que funciona como promotor del sueño y además se caracteriza por ser un potente antioxidante. Esta molécula se encuentra presente también de manera importante en fuentes vegetales y los pistaches han destacado por ser el alimento con mayor contenido de fito-melatonina reportado hasta el momento (Meng *et al.*, 2017). En los resultados previos del estudio de biodisponibilidad fue posible observar que la ingesta aguda de pistache incrementa los niveles de melatonina plasmática.

En el estudio de intervención con pistache (28 días) se cuantificaron los niveles de melatonina plasmática, es posible observar que posterior a la intervención existe un aumento de 1.6 veces de melatonina en plasma en contraste con los valores basales (**Cuadro 12**). Estos resultados en conjunto con los anteriormente presentados sugieren que la fito-melatonina es absorbida en el TGI, o vía oral, es biodisponible y aumenta la concentración de melatonina plasmática en los consumidores. Sin embargo, es importante destacar que la fito-melatonina no es la única que puede estar asociada con este aumento de la concentración. Hay otros factores que podrían estar influenciando como lo es la cantidad de fito-melatonina proveniente de otras fuentes como frutas, vegetales o bebidas fermentadas, la edad de los individuos, el consumo de alimentos ricos en triptófano por la noche, la síntesis de melatonina endógena, su biotransformación por la microbiota colónica y/o la presencia de compuestos fenólicos presentes tanto en la matriz alimentaria como en la dieta (Delgado *et al.*, 2012; McClements, 2015; Jana *et al.*, 2017). El aumento de la melatonina plasmática es de interés no solo por su potencial como antioxidante o sincronizador natural del ritmo circadiano, sino que también debido a que esta molécula se ha visto involucrada de manera positiva en otros padecimientos como la reducción de la inflamación, la hipertensión arterial y otros marcadores

relacionados con el síndrome metabólico (Salehi *et al.*, 2019; Szewczyk-Golec *et al.*, 2019). Esto concuerda con el reporte previo de Rebollo-Hernanz *et al.* (2020), quien reportó que el consumo de extractos de brotes de lenteja aumenta la melatonina plasmática en ratas.

Debido a que uno de los principales efectos de la melatonina es su potencial antioxidante, también se evaluó la actividad antioxidante medida por las técnicas de ORAC y FRAP antes y después de la intervención (**Cuadro 12**). Los resultados muestran un aumento estadísticamente significativo posterior a la intervención con pistache en la actividad antioxidante, evaluada por ambos métodos (ORAC: 2.1 veces; FRAP: 1.8 veces). Esto era de esperarse debido a los resultados previos que obtuvimos de bioaccesibilidad y biodisponibilidad de compuestos fenólicos de pistache, de manera particular la fito-melatonina. Oseguera-Castro *et al.* (2019) en un estudio de intervención de 21 días con 5 g al día de fibra dietaria antioxidante de café usado reportaron un aumento de la actividad antioxidante. Asimismo, se ha reportado que la ingesta de frutas y sus derivados, así como los brotes de lenteja aumentan la actividad antioxidante en modelos animales y seres humanos (Maldonado *et al.*, 2009; Garrido *et al.*, 2010; González-Flores *et al.*, 2012; Rebollo-Hernanz *et al.*, 2020). Este aumento en la actividad antioxidante resulta benéfico debido a que se asocia positivamente con una disminución del estrés oxidativo y la re-sincronización del ritmo circadiano, procesos clave en la prevención de padecimientos como el sobrepeso y obesidad (Szewczyk-Golec *et al.*, 2019).

VII.5.9.3. Efecto de la intervención con pistache sobre la actividad locomotora circadiana

Con la finalidad de evaluar el efecto del consumo de pistache sobre salidas del reloj circadiano, se monitoreo la actividad locomotora circadiana de los participantes mediante el registro de las ondas medias (basal-final) de las variables temperatura, actividad locomotora, posición corporal y exposición a la luz de los individuos incluidos en la sub-muestra (n=10). Estos resultados se

obtuvieron durante una estancia de investigación en la Universidad de las Islas Baleares, España.

Cuadro 12. Melatonina plasmática y actividad antioxidante basal y final

Variable	Basales	Finales	Diferencia	Valor p
Melatonina (pg/mL)	34.14 ± 4.0	55.84 ± 7.3	-21.70	0.01575*
Actividad antioxidante				
ORAC (mM eq Trolox/L)	13.56 ± 1.0	28.32 ± 1.2	-14.77	0.00000*
FRAP (mM eq Trolox/L)	21.87 ± 1.4	38.95 ± 3.6	-17.08	0.00004*

Los resultados se presentan como la media ± error estándar. * Indica diferencia estadística significativa entre los datos basales y finales por la prueba t de Student para datos pareados ($p < 0.05$), $n=28$.

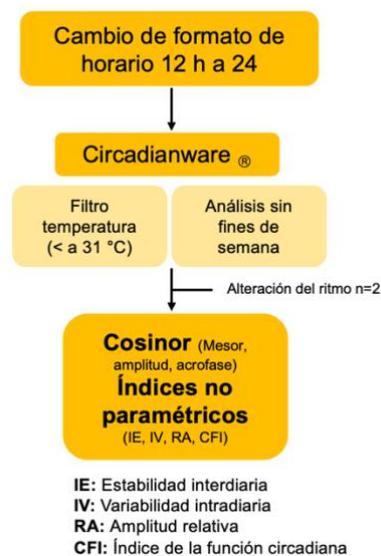


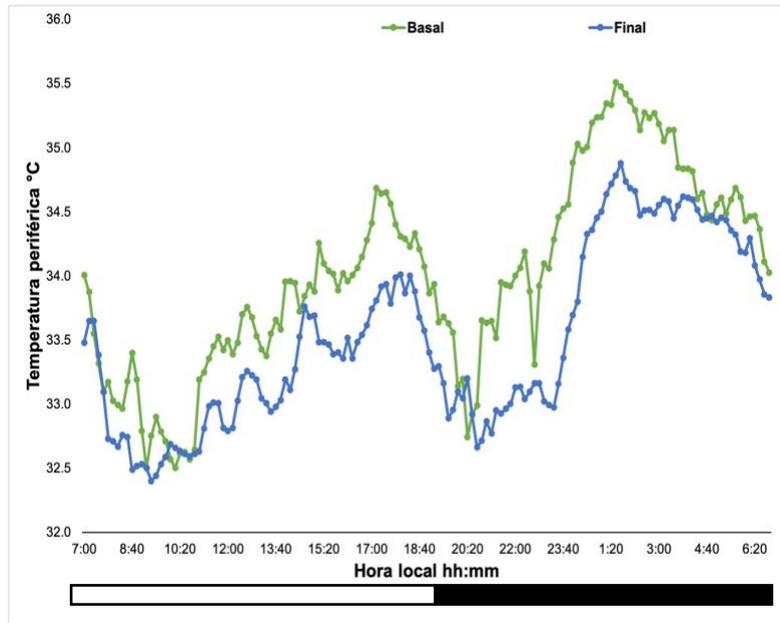
Figura 21. Flujo para el análisis del efecto de la intervención sobre la actividad locomotora circadiana

VII.5.9.3.1. Efecto sobre la temperatura corporal

El ritmo de la temperatura de la piel se asocia con un balance en el sistema nervioso. La actividad simpática durante la primera parte del día se asocia con menores temperaturas; mientras que su inhibición y activación del sistema parasimpático se asocia con un aumento de temperatura por la noche, considerándose como una señal de inicio del sueño nocturno (Martínez-Nicolás *et al.*, 2015). Para la interpretación del ritmo de temperatura corporal, se consideran valores elevados como periodos de sueño o somnolencia, mientras que las temperaturas durante el día se mantienen bajas, a excepción de la elevación postprandial (16:00 h), después de esto, la temperatura disminuye de nuevo hasta alcanzar el mínimo en la zona de mantenimiento de la vigilia (20:00 h) (Bonmatí-Carrión *et al.*, 2020).

En la **Figura 22** se presentan los resultados del patrón de temperatura basal y final. En los resultados basales se puede observar un desfase en el ritmo de la temperatura periférica, indicando cronodisrupción en los participantes (Madrid, 2006). Al inicio del tratamiento también es posible observar una disminución anticipada de la temperatura alrededor de las 20:00 h, eso puede relacionarse con un aumento de la actividad nocturna, una característica de sujetos con cronodisrupción (Sarabia *et al.*, 2008).

Para los resultados finales es importante destacar que existe un cambio positivo en la ritmicidad, teniendo las mayores temperaturas entre las 23:00 h y las 4:00 h con un marcado descenso en las primeras horas del día, lo que podría relacionarse con el inicio de la fase del sueño y con el aumento en la melatonina plasmática.



Los resultados se presentan como el promedio de la temperatura distal de la piel °C (n=10) a lo largo de un ciclo de 24 h registrada por los sensores de temperatura iButton.

Figura 22. Onda media de temperatura periférica basal y final

En el **Cuadro 13** es posible observar el análisis no paramétrico y paramétrico de la temperatura media periférica basal y final. En estos datos es importante destacar que, si bien no se presenta alguna diferencia significativa entre los valores basales y finales, se tiene una tendencia positiva al cambio en la ritmicidad, el cual puede ser observado a través de la acrofase, la cual se asemeja más a un ritmo de temperatura periférica de un adulto joven sin alteraciones del ritmo al final del tratamiento. Mientras que al inicio se observa un adelanto de fase en este parámetro. Otro indicador de mejora de la ritmicidad circadiana es el índice de la función circadiana (CFI), calculado a partir del promedio de los valores no paramétricos: índice de estabilidad interdiaria (IE), índice de variabilidad intradiaria (IV) y la amplitud relativa (AR). Observamos un ligero aumento del CFI al final del tratamiento, lo cual se asocia a una mejora en la robustez de la ritmicidad circadiana (Rubiño *et al.*, 2017).

De manera particular el valor de IE y la AR presentan un aumento posterior a la intervención con pistaches, lo que indica una modificación positiva ya que

estos valores se han asociado a ritmos con una mayor estabilidad y fortalecimiento. Asimismo, el valor IV presenta una disminución al final de la intervención. Esto se asocia con una menor fragmentación del ritmo circadiano de la temperatura periférica con respecto a la condición basal. Estos valores no resultaron estadísticamente significativos en este estudio, por lo que se sugiere ampliar el tiempo de intervención para poder observar un efecto más marcado (Ortiz-Tudela *et al.*, 2010; Rubiño *et al.*, 2017). Por lo tanto, la intervención con pistaches presupone un ritmo más regular y ajustado, lo cual es visible a través de la evaluación del ritmo de la temperatura periférica en adultos jóvenes.

Cuadro 13. Análisis paramétrico y no paramétrico de la temperatura periférica

	Basal	Final	Valor p
Mesor	33.996 ± 0.20	33.99 ± 0.26	0.223
Amplitud	0.752 ± 0.09	0.718 ± 0.11	0.796
Acrofase hh:mm	00:12 ± 00:47	03:45 ± 00:54	
Estabilidad interdiaria (IE)	0.439 ± 0.03	0.464 ± 0.02	0.531
Variabilidad intradía (IV)	0.242 ± 0.02	0.207 ± 0.02	0.250
Amplitud relativa (RA)	0.026 ± 0.00	0.028 ± 0.00	0.577
M5 °C	35.14 ± 0.21	34.687 ± 0.21	0.169
L10 °C	33.26 ± 0.21	32.94 ± 0.20	0.349
CFI	0.430 ± 0.01	0.451 ± 0.01	0.219

Los resultados se expresan como la media ± el error estándar (n=10). M5: Media de las 5 horas consecutivas con los valores más altos. L10: Media de las 10 horas consecutivas con los valores más bajos. CFI: Índice de la función circadiana.

En la **Figura 23** podemos observar los diagramas polares que representan el cociente de Rayleigh, estos se presentan de manera individual únicamente

para 4 participantes como representación de la población de estudio al inicio y al final del mismo. En estos diagramas es importante destacar de forma gráfica la representación de el ajuste en la acrofase que se comentó anteriormente.

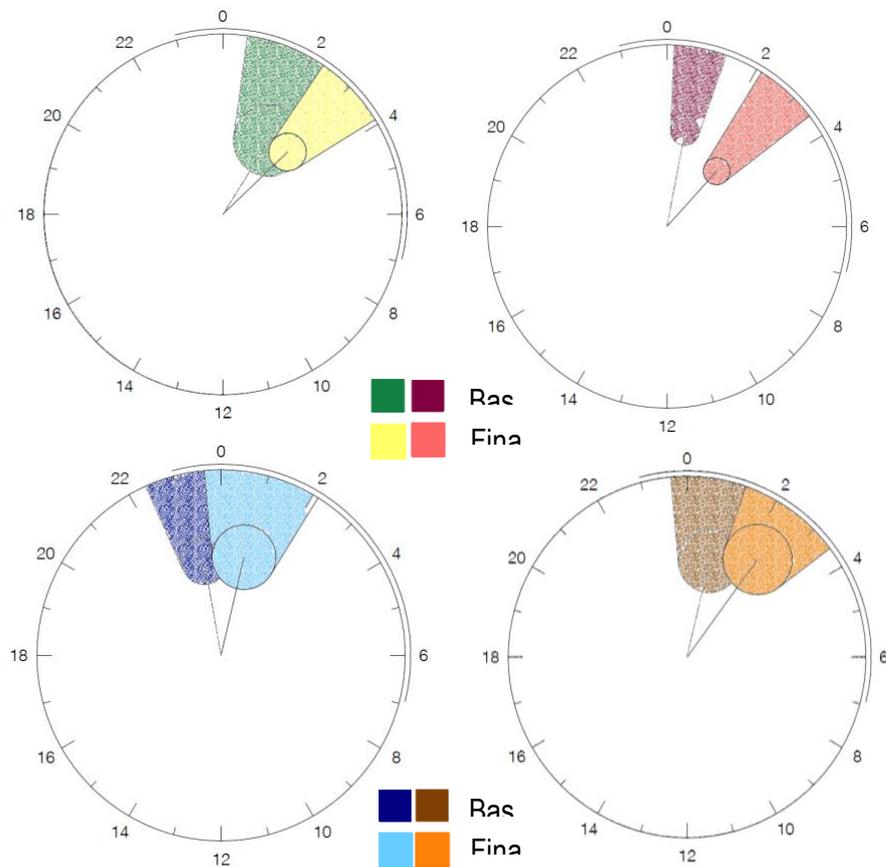


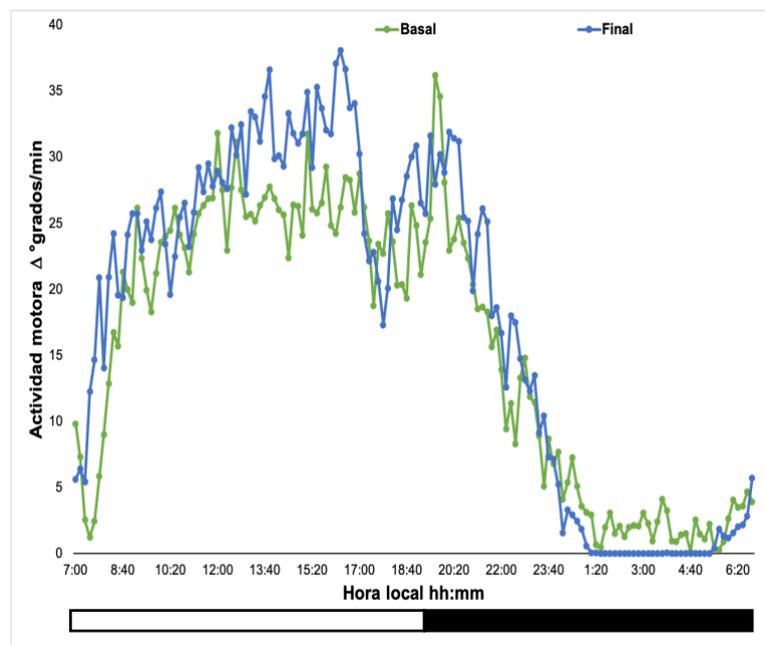
Figura 23. Representación polar de las oscilaciones de temperatura distal de la piel a lo largo de un ciclo de 24 h antes y después del consumo de pistache (n=4).

VII.5.9.3.2. Efecto sobre la actividad locomotora

El patrón de actividad locomotora circadiana ha sido asociado comúnmente al ciclo de sueño-vigilia, de ahí su interés en los estudios cronobiológicos. Además, este patrón de actividad también se relaciona con la salud física, mental y estado general del sistema circadiano en individuos. Por lo tanto, se ha establecido que un individuo despierto presenta valores de

actividad más elevados que durante la etapa del sueño (Martínez-Nicolás *et al.*, 2015).

En la **Figura 24** se observa la onda de la actividad motora basal y final, donde es importante destacar que al final, posterior a la intervención, se observa un aumento de la actividad de los participantes durante el día alcanzando valores más altos, cerca de los 40°C. De igual forma se destaca que durante la noche se alcanzan valores cercanos a los 0°C cuando el individuo se encuentra en posición horizontal, lo cual se encuentra relacionado con una mejora del sueño durante el periodo de descanso (Ortiz-Tudela *et al.*, 2010). Es posible observar que existe un retraso de fase en la condición inicial debido a que existe un descenso de la actividad más tarde (01:20 h) y una menor actividad durante el día en comparación con la condición final (23:40 h).



Los resultados se presentan como el promedio de la actividad motora (n=10) a lo largo de un ciclo de 24 h registrada por los acelerómetros HOB0 Pendant G Acceleration Data Logger. La actividad se calculó como la primera derivada del ángulo formado entre la posición actual del sensor y su posición 1 minuto antes, considerando los ejes X, Y y Z. Después se promedió cada 10 min para unificar la frecuencia de muestreo de las variables.

Figura 24. Onda media de la actividad motora basal y final

Para esta variable si fue posible observar cambios significativos tanto para los parámetros de Mesor y amplitud, como para los no paramétricos IE, RA y M10 (**Cuadro 14**). Lo cual, al igual que para la temperatura periférica se relaciona con una mejora del ritmo, en este caso medido a través de la actividad motora al final del tratamiento con pistache.

Cuadro 14. Análisis paramétrico y no paramétrico de la actividad motora basal y final

	Basal	Final	p
Mesor	18.857 ± 1.28	23.812 ± 1.28	0.028*
Amplitude	16.259 ± 0.75	23.741 ± 1.43	0.000*
Acrophase hh:mm	16:43 ± 00:13	15:21 ± 00:03	
Interdaily estability (IE)	0.384 ± 0.01	0.364 ± 0.01	0.417
Interdaily variability (IV)	0.957 ± 0.03	0.863 ± 0.01	0.009*
Relative amplitude (RA)	0.901 ± 0.03	0.999 ± 0.00	0.012*
L5 °/min	30.661 ± 1.17	30.390 ± 1.83	0.899
M10 °/min	1.693 ± 0.69	0.00 ± 0.00	0.022*
CFI	0.610 ± 0.02	0.644 ± 0.00	0.116

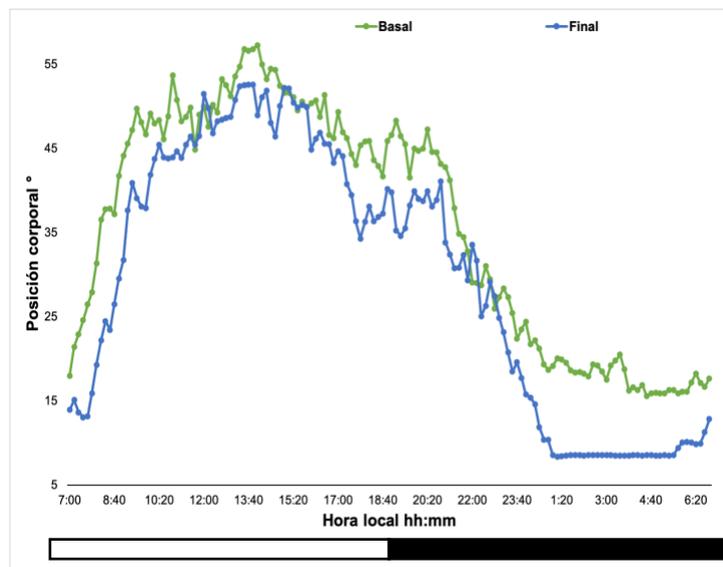
Los resultados se expresan como la media ± el error estándar (n=10). L5: Media de las 5 horas consecutivas con los valores más bajos. L10: Media de las 10 horas consecutivas con los valores más altos. CFI: Índice de la función circadiana.

VII.5.9.3.3. Efecto sobre la posición corporal

La posición corporal de los individuos es de gran interés como variable de salida cronobiológica, debido a que representa la posición del cuerpo durante las 24 h del día. Así cuando el individuo se encuentra en posición horizontal, los valores son cercanos a 0 °, esto se da por las noches o cuando el individuo se

encuentra en reposo; mientras que, cuando el individuo está en posición vertical los valores son cercanos a 90 ° (Ortiz-Tudela *et al.*, 2010).

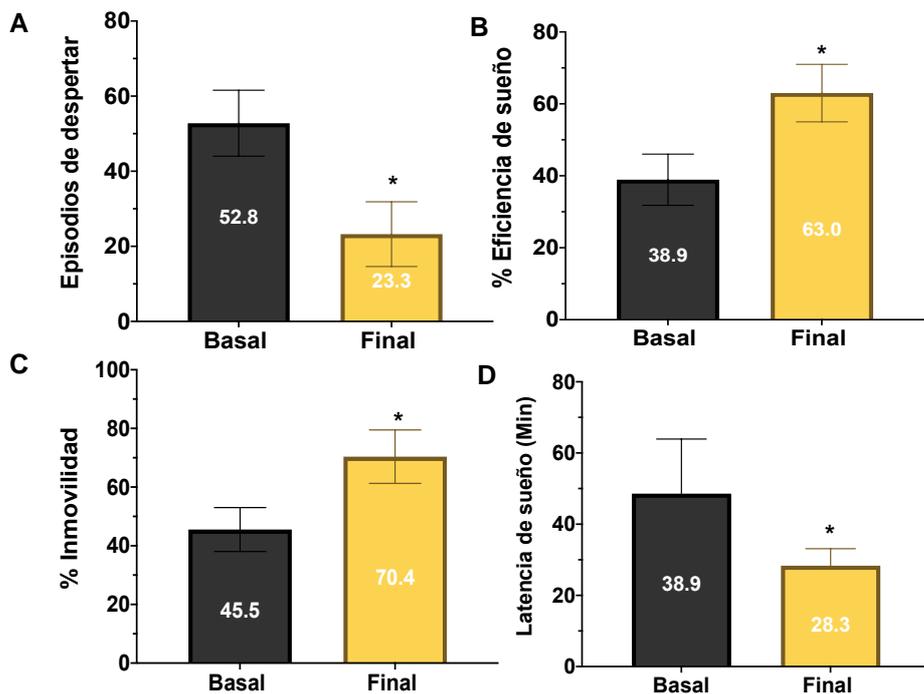
En la **Figura 25** se observa la onda media de la posición corporal al inicio y final de la intervención con pistaches. No se muestra una diferencia significativa entre ambos periodos de la intervención; sin embargo, es importante desatacar que en la condición inicial se observa que no se alcanzan valores cercanos a 0° y una mayor variación durante el periodo nocturno, lo cual podría estar asociado con un aumento de los movimientos o despertares nocturnos y por lo tanto un deficiente descanso. En estos resultados también se observa que los individuos no presentan valores cercanos a 90°, lo cual indicaría altas actividades; sin embargo, se presentan valores alrededor de 50 y 60° coincidiendo con los resultados de los cuestionarios de actividad física aplicados a los participantes antes y después de la intervención (Ortiz-Tudela *et al.*, 2010).



Los resultados se presentan como el promedio de la posición corporal (n=10) a lo largo de un ciclo de 24 h registrada por los acelerómetros HOBO Pendant G Acceleration Data Logger. La posición corporal se calculó como el ángulo entre el eje X del actímetro y un plano horizontal cada minuto, después se promedió en intervalos de 10 min para unificar la frecuencia de muestreo de las variables.

Figura 25. Onda media de la posición corporal basal y final

En la Universidad de las Islas Baleares, el software Actiwatch & Sleep Analysis® cuenta con una modalidad validada, la cual permite detectar patrones de sueño/vigilia nocturnos y derivar parámetros de sueño basados en señales de aceleración a partir de patrones actigráficos obtenidos por los sensores de actividad HOBOWare. Permitiendo tener un análisis objetivo de la calidad del sueño y complementario al análisis subjetivo medido por el cuestionario de Pittsburgh, el cual se discute más adelante.



Los resultados se presentan como la media \pm el error estándar de A) Media de episodios de despertar, B) Eficiencia de sueño, C) % de inmovilidad y D) Latencia de sueño (n=10) obtenidos con el software Actiwatch & Sleep Analysis® * Indica diferencia estadística significativa entre los datos basales y finales por la prueba t de Student para datos pareados (p<0.05)

Figura 26. Análisis de la calidad del sueño a partir de la posición corporal

Los resultados de calidad de sueño con el software Actiwatch & Sleep Analysis® en relación con los episodios de despertar, la eficiencia de sueño, el porcentaje de inmovilidad y la latencia del sueño antes y después de la intervención con pistache se presentan en la **Figura 26**. Mediante el análisis de comparación de medias fue posible observar diferencias significativas entre ambos periodos de la intervención, en todas las variables anteriormente

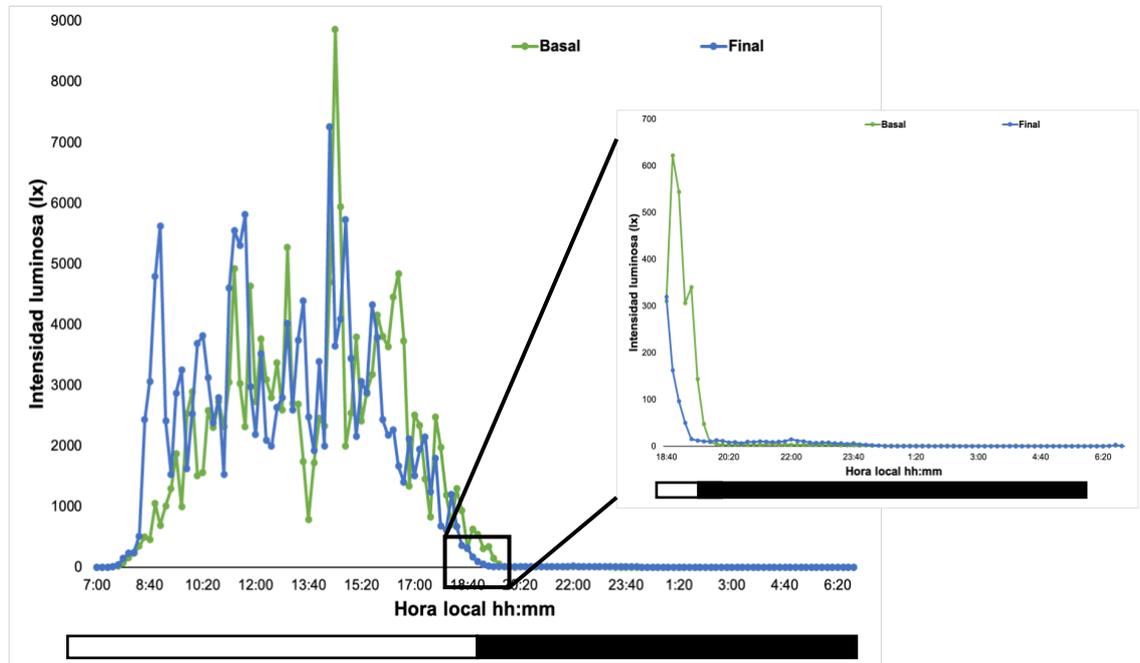
mencionadas. Estos resultados sugieren que la ingesta de pistache de 1 a 2 horas antes de irse a costar resulta en menos episodios de despertar por la noche, una mayor eficiencia y latencia del sueño, así como un menor porcentaje de inmovilidad durante de la noche lo que se asocia a una mejor calidad de sueño durante la noche. Lo anterior podría estar correlacionado con el aumento de la melatonina plasmática por un consumo de matrices ricas en fito-melatonina como los pistaches.

VII.5.9.3.4. Efecto sobre la exposición a la luz

La exposición a la luz tiene un comportamiento establecido, el cual se caracteriza por presentar altos valores de iluminación en exteriores durante el día (> 1000 lux), mientras que durante la noche son cercanos a 0 o incluso llegan a valores de 0, esta intensidad durante la noche es de interés debido a que una iluminación de baja intensidad disminuye la temperatura central, el nivel de alerta y la disminución de la síntesis de melatonina provocando un proceso de cronodisrupción (Ortiz-Tudela *et al.*, 2010). Es posible observar que al inicio y final de la intervención se registran ritmos de exposición a la luz similares, los cuales son característicos por presentar alta exposición a la luz durante el día y una disminución a partir de las 19:00 h.

En la **Figura 27** se muestran los resultados del registro de exposición a la luz al inicio y al final del estudio. Los ritmos son muy parecidos entre sí y el patrón coincide con valores reportados previamente por nuestro grupo de trabajo posterior a la intervención con fibra dietaria antioxidante de café usado (Oseguera-Castro *et al.*, 2019). Es importante mencionar también posterior a la intervención se observa una disminución de la exposición a la luz más temprano,

alrededor de las 18:30 h, lo cual puede estar relacionado a una menor actividad (Figura 24).

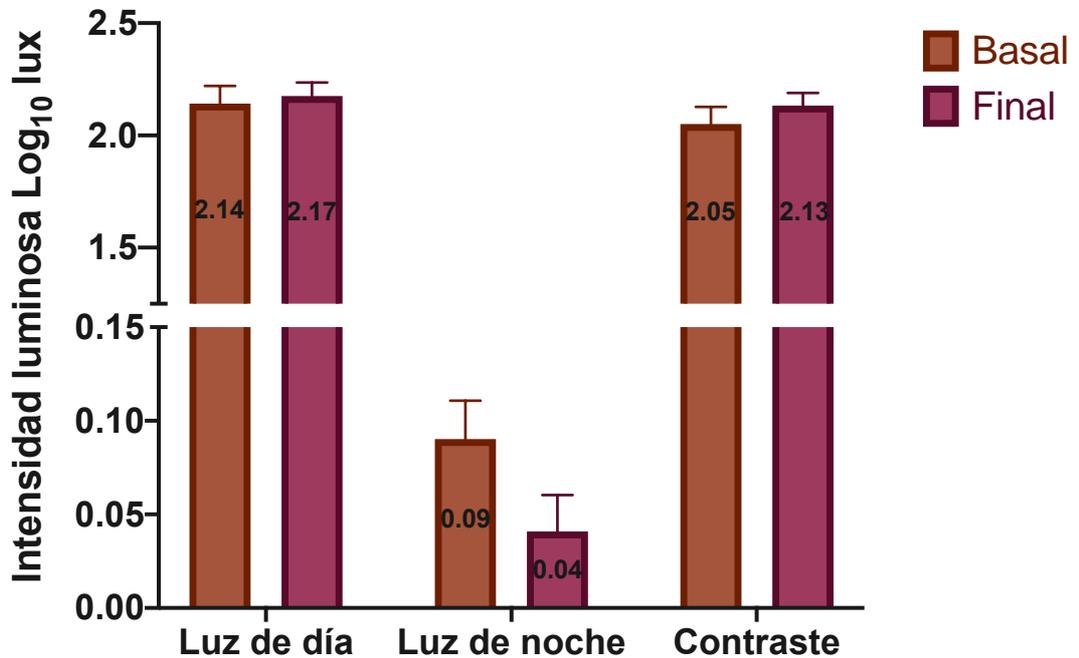


Los resultados se presentan como el promedio de la exposición a la luz (n=10) a lo largo de un ciclo de 24 h registrada por los luxómetros HOBO Light Data Logger. Los registros de intensidad luminosa se obtuvieron cada minutos y posteriormente se promediaron cada 10 min para unificar la frecuencia de muestreo de las variables.

Figura 27. Onda media de la exposición a la luz

En relación con el ajuste del ritmo sueño-vigilia hay dos parámetros de la intensidad de la luz que son de suma importancia, la intensidad de la luz de día y la de noche. Cuando la luz del día es deficiente puede ocasionar una desincronización debido a que el NSQ es sensible a la luz durante este periodo; mientras que el contraste entre luz de día y de noche indica un fortalecimiento del ritmo en personas adultas jóvenes. En la **Figura 28** se presentan los promedios obtenidos de la intensidad de luz durante el día y la noche, así como el contraste entre ambas intensidades al inicio y al final del estudio. Se tuvo en cuenta como luz de la mañana la luz entre las 7:00 am y las 17:00 horas y la luz de noche entre las 18:00 y las 6:00. Si bien no se presenta una diferencia estadística significativa en estos parámetros, hay una tendencia a la disminución

de la intensidad de luz nocturna y por lo tanto un aumento en el contraste, lo cual resulta positivo ya que se asocia también con una mejora positiva del ritmo.



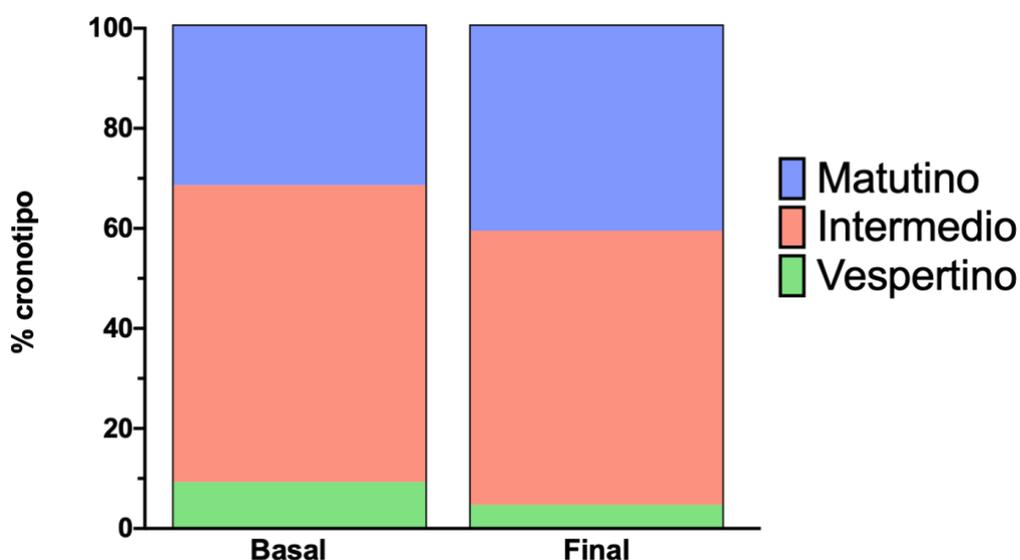
Los resultados se presentan como el promedio de la exposición a la luz durante el día y la noche (n=10) a lo largo de un ciclo de 24 h registrada por los luxómetros HOBO Light Data Logger. La intensidad luminosa se expresa como el Log₁₀ lux.

Figura 28. Promedio de la intensidad de la luz de la mañana, luz de la noche y el contraste mañana-noche

VII.5.9.3. Efecto de la intervención sobre la calidad del sueño, cronotipo y actividad física

Los resultados del Test Horne & Östberg utilizado para conocer el cronotipo de los participantes del estudio clínico, es decir, la preferencia para la realización de sus actividades se muestran en la **Figura 29**. Al finalizar la intervención con pistache, se incrementó (9.1 %) el número de sujetos con cronotipo matutino, mientras que los cronotipos intermedio y final disminuyeron significativamente (4.6 y 4.5 % respectivamente). Evidencia en humanos sugiere que cambios en el patrón de alimentación, horarios de comida y la composición de los alimentos modifican los ritmos circadianos, principalmente modificando los cronotipos (Oseguera-Castro *et al.*, 2019). Asimismo, se ha reportado que

cronotipos tardíos e intermedios se asocian con hábitos dietarios poco saludables, incluyendo que tienden a saltarse el desayuno con mayor frecuencia. Los datos también sugieren que quedarse despierto hasta altas horas de la noche puede llevar a los individuos a comer en exceso, por lo que este cronotipo presenta un mayor riesgo de desarrollar alteraciones metabólicas como la obesidad y disbiosis intestinal en el colon (Fleig y Randler, 2009; Sato-Mito *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2015).

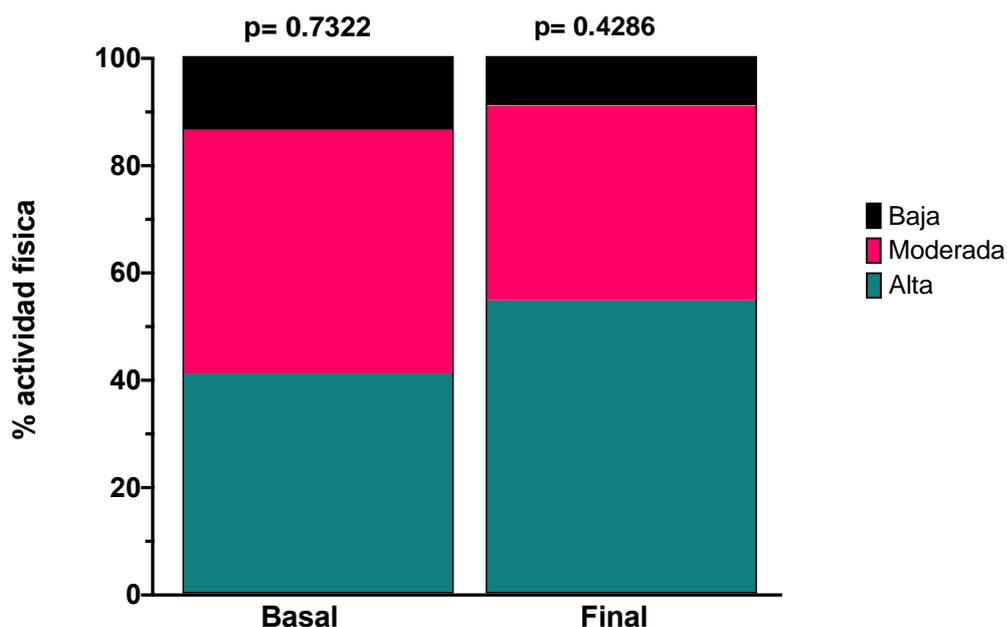


Los resultados se presentan como la frecuencia de participantes al inicio y al final del tratamiento por cronotipo). P valor para la prueba de Chi-cuadrada ($p=0.7322$), $n= 22$.

Figura 29. Porcentaje de participantes clasificados de acuerdo a su cronotipo antes y después de la intervención.

La **Figura 30** muestra los resultados del cuestionario internacional de actividad física (IPAQ), en donde es posible observar que antes de la intervención, la mayoría de los participantes tenían una actividad física de baja a moderada (>50 %). Se ha reportado que una actividad física baja propicia cronodisrupción en las personas, generando así un aumento en la tasa de enfermedades crónico-degenerativas y/o metabólicas como el sobrepeso y obesidad (Corbalán-Tutau *et al.*, 2015). Al final de la intervención los participantes con actividad física alta aumentaron (13.6 %), ubicándose la mayoría de los participantes en actividad moderada y alta. Esto podría relacionarse con el incremento en los cronotipos

matutinos, que se ha reportado mejora la organización social de las personas, permitiendo mejores tiempos de comida, realización de actividad física y mejora del sueño (Madrid, 2006). Estos resultados son de gran interés debido a que la inactividad física es un factor de riesgo en padecimientos como el sobrepeso y la obesidad, por lo que en este sentido la inclusión de los pistaches como parte de la dieta tiene un efecto positivo.

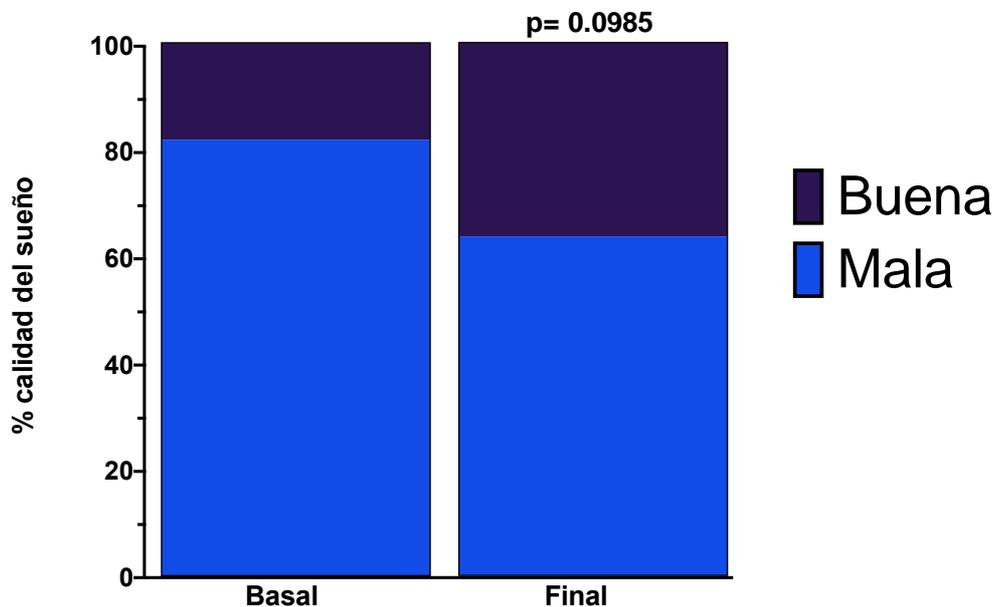


Los resultados se presentan como la frecuencia de participantes al inicio y al final del tratamiento por intensidad de actividad física. P valor para la prueba de Chi-cuadrada ($p=0.4286$), $n= 22$.

Figura 30. Porcentaje de participantes clasificados por su actividad física antes y después de la intervención

Los resultados de la calidad del sueño medido por el índice de Pittsburgh se presentan en la **Figura 31**. Al inicio del estudio la mayoría de los participantes tenían mala calidad del sueño (81.8 %); para esta clasificación se tomaron en cuenta aquellos participantes cuyo puntaje total de la escala de Pittsburgh fuera > 5 . La evidencia muestra que la mala calidad de sueño se asocia con cronotipos vespertinos, lo que a su vez se asocia con bajo rendimiento académico, hábitos dietarios poco saludables y un mayor riesgo a desarrollar alteraciones metabólicas (Miller *et al.*, 2015). Al final del estudio, la población con mala calidad del sueño disminuyó significativamente ($p<0.05$; 18.18 %), lo cual podría estar

siendo influenciado por la fito-melatonina presente en el pistache o bien cambios en la microbiota colónica; sin embargo, más estudios son necesarios para corroborarlo.



Los resultados se presentan como la frecuencia de participantes al inicio y al final del tratamiento por calidad de sueño. P valor para la prueba de Chi-cuadrada ($p=0.0985$), $n= 22$.

Figura 31. Porcentaje de participantes clasificados de acuerdo a su calidad de sueño, antes y después de la intervención

En el **Cuadro 15** se muestran los componentes individuales de la escala de Pittsburgh. Se aprecia una disminución estadística de 4 de los 7 componentes de la escala posterior a la intervención con pistache (latencia del sueño, duración del sueño, perturbaciones del sueño y disfunción dirurna); sin embargo, es importante mencionar que hay una tendencia a la disminución de los 7 componentes individuales; lo que sugiere un cambio positivo en la calidad del sueño global. Estos resultados concuerdan con lo obtenido por el software Actiwatch & Sleep Analysis®, particularmente para los parámetros de latencia, eficiencia y perturbación del sueño.

Ha sido previamente reportado que la ingesta de un producto a base de proteína de suero de leche de vaca y galactooligosacáridos [buena fuente de

triptófano (Trp), el precursor indirecto de la serotonina (neurotransmisor relajante) que se utiliza para la producción de melatonina (hormona que ayuda al sueño)], tiene efectos positivos sobre la calidad del sueño medido por la escala PSQI, en donde se observaron cambios entre el puntaje PSQI de las personas que consumieron el producto y las que recibieron un polvo placebo (Schaafsma *et al.*, 2021). Esto es de relevancia ya que los pistaches también son una buena fuente de triptófano que puede estar contribuyendo a la síntesis de melatonina por la noche y, por lo tanto, una mejora de la calidad del sueño como muestran los resultados obtenidos.

Cuadro 15. Puntaje de los componentes de la escala de Pittsburgh

	Basal	Final	Diferencia	Valor p
Índice de calidad del sueño pittsburgh (PSQI)	9.50 ± 0.95	6.14 ± 0.62	-3.36 ± 1.30	0.0168*
Calidad subjetiva del sueño	1.27 ± 0.30	0.73 ± 0.18	-0.54 ± 0.32	0.1035
Latencia de sueño	1.82 ± 0.18	1.00 ± 0.20	-0.81 ± 0.27	0.0061*
Duración del sueño	1.68 ± 0.18	1.14 ± 0.20	-0.55 ± 0.25	0.0425*
Eficiencia de sueño habitual	1.50 ± 0.26	1.09 ± 0.22	-0.41 ± 0.30	0.1858
Perturbaciones del sueño	1.23 ± 0.09	0.86 ± 0.12	-0.36 ± 0.12	0.0079*
Uso de medicación hipnótica	0.18 ± 0.11	0.09 ± 0.09	-0.09 ± 0.15	0.5396
Disfunción diurna	1.82 ± 0.18	1.23 ± 0.16	-0.59 ± 0.20	0.0088*

Los resultados se presentan como la media ± el error estándar. * Indica diferencia estadística significativa por la prueba t de Student para datos pareados ($p < 0.05$). n= 22

También ha sido reportado el efecto del consumo de una microalga (*Euglena gracilis*) rica en ácidos grasos, minerales y aminoácidos, la cual tiene un efecto positivo y significativo en la disminución del puntaje PSQI tras el consumo del suplemento a las 0, 4, 8 y 12 semanas a 3 diferentes concentraciones (500, 1000 y 3000 mg) (Nakashima *et al.*, 2020); siendo

evidencia de que la inclusión de un componente dietario puede ayudar en la regulación y la calidad del sueño como se observó en nuestro estudio.

Estos datos resultan interesantes debido a que se ha demostrado que la duración insuficiente del sueño se va vuelto un problema creciente en los últimos años, teniendo consecuencias negativas dentro de los que destacan un aumento de accidentes relacionados con errores humanos, disminución del rendimiento cognitivo, entre otras (Goel *et al.*, 2009; Luckhaupt *et al.*, 2010; Léger *et al.*, 2011). Por lo que una ventaja de la inclusión de fuentes ricas en fito-melatonina es la mejora global del sueño que se observó de manera objetiva y subjetiva en nuestro estudio.

VII.5.9.4. Efecto de la intervención sobre la regulación molecular de genes del reloj circadiano

Como se mencionó anteriormente, en los mamíferos los procesos fisiológicos y de comportamiento muestran ritmos de 24 horas que están regulados por el sistema circadiano. El cual a su vez está regulado por un conjunto de genes denominados genes reloj. En este estudio se evaluó la expresión de genes reloj y genes controlados por estos, en leucocitos circulantes, como posible mecanismo de acción molecular de la intervención nutricional con pistaches.

Se obtuvo el RNA total de los leucocitos circulantes de los participantes de la sub-muestra, ya que se ha comprobado que esta es una alternativa no invasiva para la expresión de genes reloj y su función para evaluar la biología de los relojes circadianos en humanos (Watanabe *et al.*, 2012; Wehrens *et al.*, 2017). La mayoría de los estudios que evalúan la respuesta molecular de genes del sistema circadiano, lo realizan a través de los patrones de expresión durante un periodo de tiempo (24 h). Asimismo, se ha reportado que genes del reloj circadiano (*Arntl*, *Npas2*, *Nr1d1*, *Per1-3*, *Csnk1* y *Csnk1e*), excepto *Clock*, presentan un patrón de expresión circadiana en células sanguíneas. Destacando

que la expresión máxima de *Per1* y *Per2* se encuentra al despertar, lo cual sugiere que la expresión de estos genes podría funcionar como un marcador molecular matutino en este conjunto de células para la evaluación de ciertas patologías (Archer *et al.*, 2008). Sin embargo, es importante destacar que en este proyecto únicamente se realizó el análisis basal-final de la expresión de los genes.

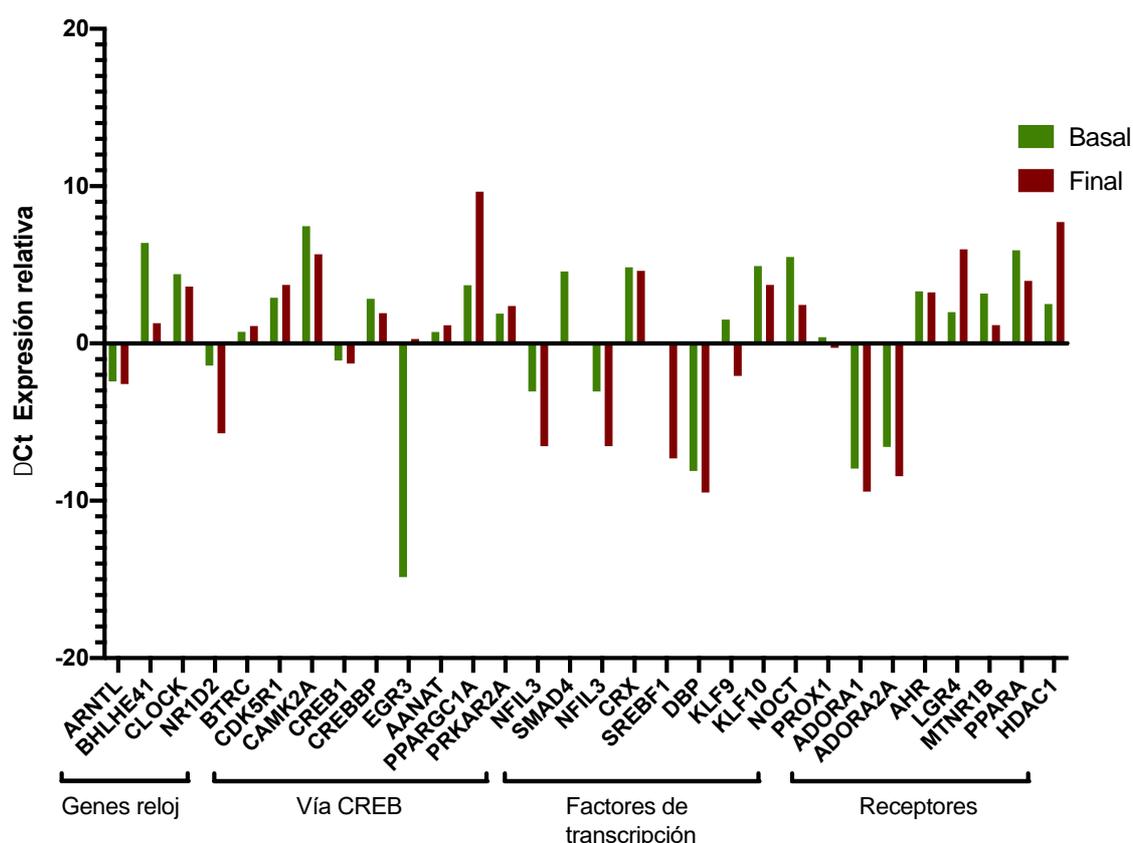
Se evaluó la expresión de 88 genes relacionados al sistema circadiano en humanos, de los cuales 51 mostraron una regulación positiva posterior a la intervención con pistaches y 37 mostraron una regulación negativa. Para el análisis de estos datos, se seleccionaron únicamente 30 genes que han sido asociados con la fisiología del ritmo circadiano, el metabolismo energético y de lípidos (**Figura 32, 33**).

Como ya se señaló, una atractiva alternativa a las biopsias de los diferentes tejidos e incluso órganos para monitorear la expresión génica de componentes del reloj circadiano en humanos, son los leucocitos circulantes, en los cuales existe una expresión oscilante circadiana de este conjunto de genes. Además de esto, existe evidencia de que el perfil de expresión de genes reloj (*Bmal1*, *Per1-2*, *Cry1-2*, y *Rev-erb*) varían entre sujetos con obesidad y con normopeso, sugiriendo su expresión como marcadores del inicio y desarrollo de estos padecimientos (Tahira *et al.*, 2011). Pirovarova *et al.* (2016) reportaron que la expresión del gen *Clock* se encuentra regulada por cambios en el peso corporal y por lo tanto en el IMC, así como los niveles de colesterol en sangre y la expresión de genes relacionados a la inflamación y el metabolismo. De tal forma que una mayor expresión de *Per2* y *Nr1d1* se asoció con una disminución de peso y la disminución de niveles de colesterol LDL y HDL. En este estudio fue posible observar una regulación positiva de los genes *Per2*, *Nr1d2* y *Clock*, en los cuales se incrementó su expresión posterior a la intervención con pistache 5, 18.4 y 1.6 veces respectivamente, en comparación con su expresión inicial (**Figura 32**), esto se podría relacionar con la disminución en el IMC y el colesterol en plasma de los participantes al final de la intervención (**Figura 33**).

La expresión de genes reloj y genes controlados por el reloj en leucocitos circulantes de humanos se han reportado para diferentes patologías. Por ejemplo, Cai *et al.* (2010) reportaron una diferencia en la expresión de genes *Bmal1* y *Per1* en pacientes que presentan enfermedad de Parkinson. La gravedad de la enfermedad se asocia con una expresión atenuada de estos genes, sugiriendo que la evaluación de la expresión de este conjunto de genes en leucocitos circulantes de humanos, podrían funcionar como base molecular para determinar el progreso de la enfermedad, así como la respuesta a fármacos y/o compuestos bioactivos. Por otra parte, los niveles de expresión en genes reloj en padecimientos como la diabetes mellitus (DM) también es importante, destacando que la expresión de estos se atenúa en pacientes que tienen esta patología. De manera particular se reportan niveles de expresión más bajos para los genes *Bmal1* y *Per1,3*, sugiriendo que la pérdida de la ritmicidad circadiana se encuentra estrechamente relacionada con la fisiopatología y desarrollo de padecimientos como la DM en humanos (Ando *et al.*, 2009). En lo que se refiere a la obesidad, se ha reportado que la obesidad abdominal, la cual es vista como un aumento en la grasa visceral, contribuye al síndrome metabólico y se asocia con una alteración en la expresión de genes reloj; de manera particular con un incremento en los niveles de expresión de *Bmal1* y *Cry* y una atenuación en la expresión de *Clock*, *Per2,3* y *Cry1,2* en leucocitos circulantes de individuos (Kim *et al.*, 2017). Los resultados obtenidos en este estudio muestran que *Bmal1* y *Cry1* tienen una regulación positiva en su expresión posterior a la ingesta con pistache; es decir, un incremento en su expresión 1.04 veces y 30.4 veces respectivamente (**Cuadro 16**) (**Figura 32,33**). Lo cual podría estar relacionado con el aumento de grasa visceral que se observó al final de la intervención en la evaluación de la composición corporal (**Cuadro 11**). También ha sido reportado que la pérdida e insuficiencia de sueño se asocian con una supresión de la expresión rítmica de genes reloj; sin embargo, esto no lo podemos comprobar en este estudio (Arnadottir *et al.*, 2014).

Los receptores acoplados a proteína G que contienen repeticiones ricas en leucina o LGR son un grupo de proteínas altamente conservadas, caracterizados por un gran dominio extracelular que alberga múltiples copias de repeticiones ricas en leucina. Dentro de esta familia de receptores, es de importancia mencionar a LGR4, el cual es codificado por el gen *Lgr4* y que fue evaluado durante este estudio (3.59 veces) (**Cuadro 17**). Se ha demostrado que este receptor contribuye a la regulación del metabolismo energético, la ingesta de alimentos, el metabolismo de lípidos y otros procesos metabólicos involucrados en patologías como la DM, que incluyen la proliferación de células β pancreáticas y la secreción de insulina (**Figura 33**). Los procesos metabólicos mencionados anteriormente se encuentran íntimamente relacionados con el reloj circadiano debido a que los genes involucrados en sus procesos son, en su mayoría, controlados por genes reloj. Se ha reportado en modelos animales que la falta de LGR4 altera el ritmo circadiano y el metabolismo de lípidos en roedores mutantes; así mismo se ha correlacionado negativamente con la disminución en la ingesta de lípidos y una alteración de los lípidos circulantes, particularmente triglicéridos (Li *et al.*, 2015). Nuestros resultados muestran que posterior a la intervención con pistache hay un incremento en la expresión de LGR4 de 3.59 veces con respecto a la condición basal, esto puede resultar benéfico debido a sus efectos en el metabolismo previamente descritos y también podría relacionarse con la disminución de los parámetros bioquímicos evaluados al final de la intervención (Colesterol, HDL, LDL y triglicéridos).

Otro grupo de receptores son los receptores adenosina, los cuales son codificados por genes ADORA1, ADORA2A, ADORA2B, ADORA3; este grupo de receptores son acoplados a proteína G y activados por adenosina. Se caracterizan por jugar un papel importante en la obesidad y la DM2. Wojcik *et al.* (2013) reportaron que la expresión incrementada de ADORA2B en leucocitos circulantes se asocia con hiperglucemia, alteraciones en la expresión de genes asociados al metabolismo de lípidos, estrés oxidativo e inflamación; revelando así la importancia en los niveles de expresión de este tipo de genes. Se evaluó la expresión de ADORA1 y ADORA2A los cuales son de interés en la evaluación de la ritmicidad de los ciclos sueño-vigilia al estar implicados en la promoción del sueño al inhibir neuronas colinérgicas que promueven la vigilia en el prosencéfalo basal. Los resultados muestran que hubo una disminución en la expresión de estos genes de 2.6 y 3.46 veces (**Cuadro 17**), respectivamente con respecto a la condición basal (**Figura 32**).



Los resultados se presentan como la expresión relativa de los genes normalizada con la expresión de los genes de referencia en un pool de leucocitos circulantes de los participantes de la submuestra al inicio y al final del tratamiento.

Figura 32. Expresión relativa de genes asociados al reloj circadiano

Es importante destacar que no existen estudios previos de la expresión diferencial de genes relacionados al ciclo circadiano en humanos posterior a la ingesta de alimentos y que a su vez esto se asocia con condiciones patológicas como el sobrepeso, la obesidad y el síndrome metabólico. Con estos resultados, se sugiere que la evaluación de la expresión génica de reloj en leucocitos circulantes podría ser una herramienta de gran utilidad para encontrar y determinar marcadores moleculares en el inicio y desarrollo de este tipo de padecimientos; sin embargo, se requiere todavía de más estudios. Esto permitirá desarrollar estrategias circadianas para mejorar la prevención y el manejo de enfermedades llevándolo a campos de aplicación clínica.

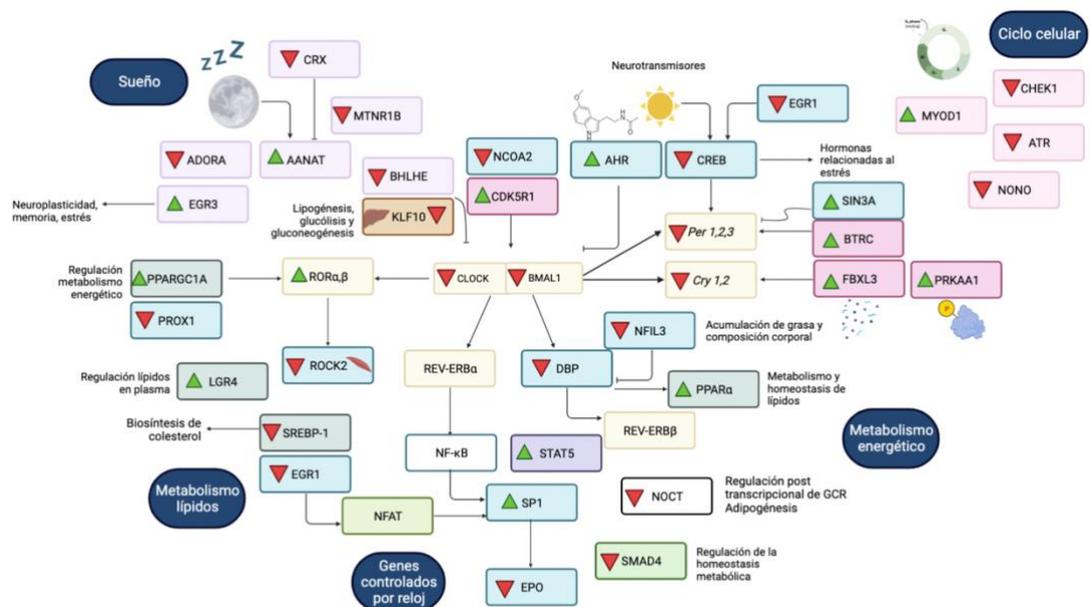


Figura 33. Cambios en la expresión génica de genes del reloj circadiano y genes controlados por reloj (GCR). Los símbolos verdes indican regulación positiva y los rojos regulación negativa en la expresión de mRNA

Cuadro 16. Regulación de genes reloj después de la intervención con pistache

GeneBank ID	Símbolo	Función biológica	Regulación	Fold change > 2	Fold change > 1.1
<i>Genes reloj</i>					
406	ARNTL (BMA1)	Forma heterodímero con CLOCK	↓		-0.05
272322	ARTNL2 (BMAL 2)	Forma heterodímero con CLOCK	↑	5.01	
9575	CLOCK	Forma heterodímero con BMAL1, Regulación del reloj molecular circadiano	↓		-0.68
4862	NPAS2	Parálogo de CLOCK	↓	-2.11	
5187	PER1	Hélice de retroalimentación negativa en la regulación del reloj molecular circadiano	↓	-4.56	
8864	PER2	Hélice de retroalimentación negativa en la regulación del reloj molecular circadiano	↓	-2.32	
8863	PER3	Hélice de retroalimentación negativa en la regulación del reloj molecular circadiano	↓	-15.23	
6095	RORa	ayuda en la regulación transcripcional de algunos genes implicados en el ritmo circadiano	↑		1.59
6096	RORb	ayudan a regular la expresión de algunos genes implicados en el ritmo circadiano.	↓	-7.65	
8553	BHLHE40	La proteína codificada puede interactuar con ARNTL o competir por los sitios de unión de E-box en el promotor de PER1 y reprimir la transactivación de PER1 por parte de CLOCK/ARNTL. Se cree que este gen está involucrado en el control del ritmo circadiano y la diferenciación celular	↓		-1.87
79365	BHLHE41	La proteína codificada puede interactuar con ARNTL o competir por los sitios de unión de E-box en el promotor de PER1 y reprimir la transactivación de PER1 por parte de CLOCK/ARNTL	↓	-5.0	
9975	NR1D2 REBERBB	La proteína codificada funciona como un represor transcripcional y puede desempeñar un papel en los ritmos circadianos y el metabolismo de carbohidratos y lípidos	↓	-4.2	

Cuadro 17. Regulación de receptores asociados a genes reloj después de la intervención con pistache

GeneBank ID	Símbolo	Función biológica	Regulación	Fold change > 2	Fold change > 1.1
<i>Receptores</i>					
134	ADORA1	Receptor acoplado a proteína G, implicado en la promoción del sueño al inhibir las neuronas colinérgicas que promueven la vigilia	↓		-1.35
135	ADORA2A	Receptor acoplado a proteína G, implicado en la inducción del sueño	↓		-1.75
196	AHR	Receptor de dioxina, regula las enzimas metabolizadoras de xenobióticos, como el citocromo P450.	↑		0.04
55366	LGR4	Receptor acoplado a proteína G, regulación de los ritmos circadianos de lípidos en plasma	↑	3.59	
4544	MTNR1B	Receptor acoplado a proteína G, receptor de melatonina	↓		-1.89
10499	NCOA2	Receptor nuclear, coactivador de BMAL1	↓	-5.75	
4804	NGFR	Necesario para la oscilación de BMAL1, PER1,2 y NR1D1	↓	-2.01	
2063	NR2F6	Receptor nuclear, regula el ritmo circadiano en el posencéfalo	↑	2.30	
5465	PPARA	Factor de transcripción nuclear, regulador directo de BMAL1 y RE-ERBa	↓		-1.83

Cuadro 18. Regulación de protein ligasas asociadas a genes reloj después de la intervención con pistache

GeneBank ID	Símbolo	Función biológica	Regulación	Fold change > 2	Fold change > 1.1
<i>Protein ligasa</i>					
8945	BTRC	Proteína F-Box, regula la degradación de PER	↑		0.46
8454	CUL1	Fosforila a CRY1,2	↓	-3.18	
26224	FBXL3	Proteína F-Box, se une a CRY1,2 para facilitar su poliubiquitinación por el complejo SCF y su posterior degradación	↑	4.62	
23291	FBXW11	Proteína F-Box, facilita la ubiquitinación	↓	-7.42	
9978	RBX1	Ubiquitin ligasa	↓	-3.46	
7337	UBE3A	Ubiquitin ligasa, degradación de proteínas interactúa con BMAL1,2	↑	4.31	

Cuadro 19. Regulación de del ciclo celular asociados a genes reloj después de la intervención con pistache

GeneBank ID	Símbolo	Función biológica	Regulación	Fold change > 2	Fold change > 1.1
<i>Ciclo celular</i>					
1111	CHEK1	Fosfatasa que regula el ciclo celular	↓	-3.01	
3065	HDAC1	Histona diacetilasa, mejora la oscilación de CLOCK	↑	5.31	
4654	MYOD1	Interactúa con CREBP, regula la amplitud transcripcional de BMAL1, modulador + del reloj molecular en músculo esquelético	↑		1.32
6500	SKP1	Ubiquitinación y degradación de proteínas	↓	-11.43	

Cuadro 20. Regulación de cinasas asociadas a genes reloj después de la intervención con pistache

GeneBank ID	Símbolo	Función biológica	Regulación	Fold change > 2	Fold change > 1.1
<i>Cinasas</i>					
8851	CDK5R1	Fosforila a CLOCK y regula la actividad transcripcional CLOCK:BMAL1	↑		0.93
1452	CSNK1A1	Protein cinasa	↑	3.10	
1453	CSNK1D	Protein cinasa, regulación del ritmo circadiano	↑	4.37	
1454	CSNK1E	Fosforila a PER, regula el ritmo circadiano	↑		0.90
1457	CSNK2A1	Regulación del ciclo circadiano	↑	2.63	
545	ATR	Ciclo celular	↓	-7.59	
9475	ROCK2	Activada por RORa	↓	-5.50	

Cuadro 21. Regulación de genes de la vía CREB asociados a genes reloj después de la intervención con pistache

GeneBank ID	Símbolo	Función biológica	Regulación	Fold change > 2	Fold change > 1.1
<i>Via CREB</i>					
815	CAMK2A	Contribuye a la activación de la E-box mediante la dimerización de CLOCK:BMAL1	↓		-1.68
1385	CREB1	Reduce la expresión de PER1,2	↓		-0.06
10488	CREB3	Regula la señalización de hormonas relacionadas con el estrés	↓		-0.46
1387	CREBBP	Media la activación CLOCK:BMAL1 y el reestablecimiento del reloj circadiano	↓		-0.81
3363	HTR7	Receptor de serotonina	↓		-0.06
5594	MAPK1	Desencadena la inducción de la expresión génica circadiana	↓		-1.83
5567	PRKACB	Proliferación y diferenciación celular	↓	-2.43	
15	AANAT	Penúltima enzima en la síntesis de melatonina y controla el ritmo noche/día en la producción de melatonina en la glándula pineal de los vertebrados	↓	-5.00	
5562	PRKAA1	Media la fosforilación de CRY1	↑		1.02
5563	PRKAA2	Fosforila ACC y HMGCR, enzimas clave en la regulación de la síntesis de AG de novo y colesterol	↑		0.59
1958	EGR1	Interactúa con CREBBP, regula la amplitud de CLOCK y la transcripción de PER2	↓		-1.40
1960	EGR3	Regula la transcripción de genes en el control del ritmo circadiano	↑	15.22	

Cuadro 22. Regulación de factores de transcripción asociados a genes reloj después de la intervención con pistache

GeneBank ID	Símbolo	Función biológica	Regulación	Fold change > 2	Fold change > 1.1
<i>Factores de transcripción</i>					
4089	SMAD4	Regulador de la homeostasis metabólica asociado a la apnea del sueño	↓	-4.46	
3659	IRF1	Respuesta inmune, proliferación celular	↓	-3.93	
4783	NFIL3	Regulador negativo de la expresión circadiana de PER2, regula la acumulación de grasa y la composición corporal	↓	-3.37	
6667	SP1	Regula la actividad de BMAL1	↑	3.46	
1406	CRX	Disminuye la expresión de AANAT	↓		-0.11
6720	SREBF1	Promotor de elementos reguladores de esteroides, involucrado en la síntesis de colesterol	↓	-17.79	
1628	DBP	Regulación del ciclo circadiano, afecta el período y la regulación del sueño	↓		-1.26
7071	KLF10	Regula la expresión circadiana de genes involucrados en lipogénesis, gluconeogénesis y glucólisis en hígado, Recluta a BMAL1	↓		-1.09
687	KLF9	Asociado a PER1 y 3, su regulación depende del cortisol y el estado de diferenciación celular	↓	-3.48	
25942	SIN3A	Represor de PER1	↑		1.60

Cuadro 23. Regulación de genes de diversos procesos celulares asociados a genes reloj después de la intervención con pistache

GeneBank ID	Símbolo	Función biológica	Regulación	Fold change > 2	Fold change > 1.1
<i>Varios procesos celulares</i>					
2056	EPO	Regulado por CRY1,2, expresión de BMAL1 y PER2 involucrados en su secreción	↓		-0.95
50865	HEBP1	Proteína de unión a Hemo1	↓		-1.21
4297	KMT2A	Coactivador transcripcional que regula la expresión génica durante la hematopoyesis	↑		0.39
326625	MMAB	Cataliza el paso final en la conversión de Vitamina B12	↓		-1.24
25819	NOCT	Regula el reloj circadiano, control post transcripcional de funciones metabólicas, inflamación y osteogénesis	↓	-2.94	
4841	NONO	Interactúa con PER, puerta circadiana al ciclo celular	↓	-5.91	
5629	PROX1	Reprime la transcripción de ROR α , activador de la actividad de ROR α y γ y la expresión de BMAL1, NPAS2, CRY	↓		-0.56

VII. CONCLUSIONES

El pistache es una fuente rica en lípidos, carbohidratos y proteínas. La muestra con piel es alta en compuestos bioactivos, como el ácido gálico y la fito-melatonina, que contribuyen en su elevada capacidad antioxidante bajo las condiciones evaluadas. De manera particular y de interés para esta propuesta, el pistache presenta un alto contenido de fito-melatonina, la cual presenta una baja bioaccesibilidad a través del TGI; sin embargo, toda la fito-melatonina bioaccesible en el intestino delgado es permeable a través del mismo, alcanzando valores ($1.6e^8$ pg/L y $2.8e^8$ pg/L) similares a los fisiológicamente deseables (120 pg/mL) sugiriendo que esta puede ser biodisponible, llegando a otros órganos para ejercer un efecto benéfico a la salud.

Varios componentes del pistache alcanzan el colon, particularmente la fibra dietaria, que al ser fermentada por la microbiota, produce AGCC, que se han asociado con un efecto benéfico sobre la sincronización del reloj periférico en el hígado y tiene un efecto positivo sobre la modulación del metaboloma y metagenoma colónico. Esto es de interés debido a que contribuye a la disminución de los efectos de la disbiosis y podría contribuir con una mejora de parámetros cronobiológicos como el cronotipo a través del restablecimiento del equilibrio de estas poblaciones microbianas en el colon.

La ingesta de pistaches aumenta la concentración de melatonina plasmática en humanos, incrementando también la actividad antioxidante. A la luz de estos resultados, los pistaches pueden considerarse como una fuente natural de melatonina biodisponible la cual puede alterar los niveles circulantes de melatonina y así influir en el inicio del sueño o alterar la fase circadiana, actuando como un potente cronobiótico, contribuyendo a la sincronización del reloj circadiano.

La inclusión de un snack (28 g) de pistaches durante la noche por 4 semanas y sin modificar el estilo de vida de los participantes, tiene un efecto

hipolipidémico, mejora la composición corporal (disminución de la circunferencia de cintura), aumenta la grasa visceral sugiriendo una redistribución de la grasa abdominal (lo que debe ser comprobado en estudios posteriores). Asimismo, tiene efectos positivos en salidas del reloj circadiano como la temperatura distal periférica, la actividad motora, la calidad del sueño, el cronotipo y la actividad física. También tiene efectos positivos sobre la expresión de genes del sistema circadiano y genes relacionados al metabolismo energético y de lípidos; sugiriendo un potencial mecanismo de acción sobre la modulación de los parámetros bioquímicos y antropométricos.

También es importante considerar las limitaciones del estudio, dentro de las cuales destacan el tamaño de muestra, la cantidad limitada de dispositivos y software para realizar las evaluaciones del ritmo circadiano en personas, la pandemia de COVID, el uso de agendas de sueño y recordatorios de 24 horas, así como cuantificar el consumo de fito-melatonina y triptófano de otras fuentes dietarias.