



Artículo Original

Efecto antioxidante del aporte dietario de harinas integrales de semillas de chía y lino en un modelo murino de estrés oxidativo inducido por D – galactosa.

Luciana B. Benítez*¹ (luchyben@gmail.com), **Eduardo Schelover**², **Narella A. Colussi**¹ (docente tutor de contenido), **María V. Aguirre**¹ (docente tutor metodológico).

*Autor responsable: Luciana Benítez, estudiante carrera Medicina, Facultad de Medicina Universidad Nacional del Nordeste. Mariano Moreno 1240, Corrientes Argentina.

¹ Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional del Nordeste. Mariano Moreno 1240, Corrientes Argentina.

² Cátedra I de Histología y Embiología, Facultad de Medicina de la Universidad Nacional del Nordeste. Campus Sargent Cabral, Sargento Cabral 2001, Corrientes Argentina.

Fecha de recepción: 14/11/2023

Fecha de aceptación: 27/11/2023

Resumen:

El estrés oxidativo cumple un papel central en enfermedades crónicas no transmisibles.

El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto antioxidante de las harinas de chía y lino en un modelo murino de estrés oxidativo inducido por D-galactosa. Para ello, se elaboraron dietas a partir de harina de chía y lino y se administraron a lo largo de 70 días. Luego, se indujo estrés oxidativo con D-galactosa y se evaluó el potencial antioxidante. Los resultados mostraron que el aumento de peso y el consumo de alimentos no variaron significativamente entre grupos. Sin embargo, se observó disminución de la peroxidación lipídica en hígado y riñón en los grupos experimentales vs control. La actividad catalasa aumentó en ambos tejidos, especialmente en el grupo alimentado con harina integral de lino. En conclusión, las dietas elaboradas con harinas integrales poseen mayor actividad antioxidante respecto al control.

PALABRAS CLAVE: nutrición, polifenoles, ratón.

ABSTRACT.

Oxidative stress plays a central role in chronic non-communicable diseases. The objective of the work was to evaluate the antioxidant effect of chia and flax flours in a murine model of oxidative stress induced by D-galactose. To do this, diets were prepared from chia and flax flour and administered over 70 days. Next, oxidative stress was induced with D-galactose and the antioxidant potential was evaluated. The results showed that weight gain and food consumption did not vary significantly between groups. However, a decrease in lipid peroxidation was observed in the liver and kidney in the experimental vs control groups. Catalase activity increased in both tissues, especially in the group fed whole flax meal. In conclusion, integral flours diets have greater antioxidant activity compared to the control.

KEY WORDS: nutrition, polyphenols, mice.

RESUMO.

O estresse oxidativo desempenha um papel central nas doenças crônicas não transmissíveis. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito antioxidante das farinhas de chia e linhaça em modelo murino de estresse oxidativo induzido por D-galactose. Para isso, foram elaboradas dietas a partir de farinha de chia e linhaça e administradas durante 70 dias. Em seguida, foi induzido o estresse oxidativo com D-galactose e avaliado o potencial antioxidante. Os resultados mostraram que o ganho de peso e o consumo alimentar não variaram significativamente entre os grupos. No entanto, foi observada uma diminuição na peroxidação lipídica no fígado e nos rins nos grupos experimental versus controle. A atividade da catalase aumentou em ambos os tecidos, principalmente no grupo alimentado com farinha de linhaça integral. Concluindo, dietas elaboradas com ambas as farinhas integrais apresentam maior atividade antioxidante em comparação aos controles.

PALAVRAS CHAVE: nutrição, polifenóis, rato.



INTRODUCCIÓN:

El estrés oxidativo es causado por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y la capacidad de un sistema biológico de detoxificar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante. Este fenómeno tiene un papel importante en la génesis de las enfermedades crónicas no transmisibles. La incorporación en la dieta compuestos antioxidantes a través de intervenciones dietoterápicas destinadas a fomentar el consumo de alimentos de origen vegetal ha demostrado ejercer un efecto protector y beneficioso para la salud (1).

Antiguamente las semillas de chía y lino han sido valoradas por su alto contenido de ácidos grasos insaturados Omega-3 bajo la forma de ácido alfa-linolénico (ALA, Omega-3) (1). Sin embargo, recientemente la evidencia ha demostrado la existencia de un potencial efecto antioxidante en ambas semillas a partir del hallazgo de fitoquímicos en su composición (2, 3), específicamente de compuestos polifenólicos.

Los modelos animales de estrés oxidativo inducidos por D-galactosa son ampliamente aceptados y comúnmente utilizados para estudiar el daño oxidativo (4). Los tejidos tienen diferentes susceptibilidades frente a este fenómeno. El hígado y el riñón están potencialmente más expuestos o son más sensibles al daño generado por los agentes oxidantes pudiendo desarrollar mayor inflamación y apoptosis (5).

A partir de lo expuesto el presente trabajo se realizó con el objetivo de evaluar el efecto antioxidante del aporte dietario de harinas integrales de semillas de chía (*Salvia hispánica*) y lino (*Linnum usitatisimum*) en un modelo murino de estrés oxidativo inducido por D-galactosa.

Materiales y Método

Formulación de las dietas. Se formularon dietas según los requerimientos nutricionales de los murinos acorde a las recomendaciones internacionales del National Research Council Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition. Para ello previamente se constató no solo la composición centesimal y perfil lipídico de las harinas sino también su perfil cualitativo de compuestos polifenólicos por cromatografía HPLC- DAD acoplada a espectrómetro de masas.

Se elaboraron alimentos a escala laboratorio a partir de harina integral de semillas de chía y lino, se adicionaron otros ingredientes nutritivos y se analizó el perfil cualitativo de compuestos polifenólicos previa administración a los murinos.

Diseño experimental. El estudio contó con el aval del Comité de Cuidado y Usos de Animales de Laboratorio (CICUAL) MED-UNNE (Resol. N°0002-CICUAL/17) (iniciado expediente N°10-2022-03321).

La muestra estuvo constituida por 18 ratones machos de 28 días de vida de la cepa Balb-c pertenecientes al Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional del Nordeste.

Previo al inicio del experimento se realizó la aclimatación de los animales a las dietas formuladas, para ello se los expuso a los mismos una semana previa al destete para la habituarlos a su sabor, olor y caracteres organolépticos. Posteriormente, los animales fueron asignados al azar simple a tres grupos experimentales: Grupo control = balanceado comercial: n = 6; Grupo B (dieta B, alimento en base a harina integral de semillas de chía): n = 6; Grupo C (dieta C, alimento en base a harina integral de semillas de lino): n = 6. El agua y los alimentos fueron provistos *ad libitum* durante 70 días (10 semanas). Se monitoreó semanalmente el peso de los murinos y el consumo de alimento, así como su aspecto general, pelaje, mucosas y comportamiento.

Modelo animal de estrés oxidativo. Durante los últimos 3 días del experimento se indujo estrés oxidativo mediante administración intraperitoneal (i.p) de D-galactosa disuelta en solución salina estéril a una concentración de 100 mg/kg/día. En cada grupo anteriormente descrito se procedió a



dividirlos en: *no estimulados* inyectados i.p con solución fisiológica estéril (NaCl 0,9%): n=3/grupo y *estimados* inyectados i.p con 100 mg/kg de D-gal disuelta en solución estéril: n=3/grupo.

Concluido el plazo estipulado se procedió a la anestesia (70 ul pentobarbital 10%) de los animales para la toma de muestra de sangre periférica por punción cardíaca y a la eutanasia por dislocación cervical. Se tomaron además muestras de hígado y riñón en condiciones estériles para los análisis posteriores.

Ensayos de actividad antioxidante.

Estimación del daño oxidativo a través de ensayo TBARS. Con el objetivo de evaluar la peroxidación lipídica en tejidos claves como indicador de daño oxidativo se realizó la determinación del contenido de sustancias reactivas con el ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) mediante el procedimiento descrito por Ohkawa (6). La absorbancia del sobrenadante se midió en espectrofotómetro a 532 nm. El resultado se expresó como % de peroxidación lipídica en el tejido de los animales de los grupos experimentales respecto al control.

Estimación de defensa antioxidante enzimática mediante determinación de actividad catalasa. Se realizó acorde al protocolo de Mizunoe con modificaciones (7). Con el fin de cuantificar la actividad catalasa se trazó una curva de calibración estándar con la unidad definida de actividad de catalasa empleando la enzima disuelta en agua destilada (catalasa de hígado bovino, 2000-5000 unid/mg prot, Sigma Aldrich).

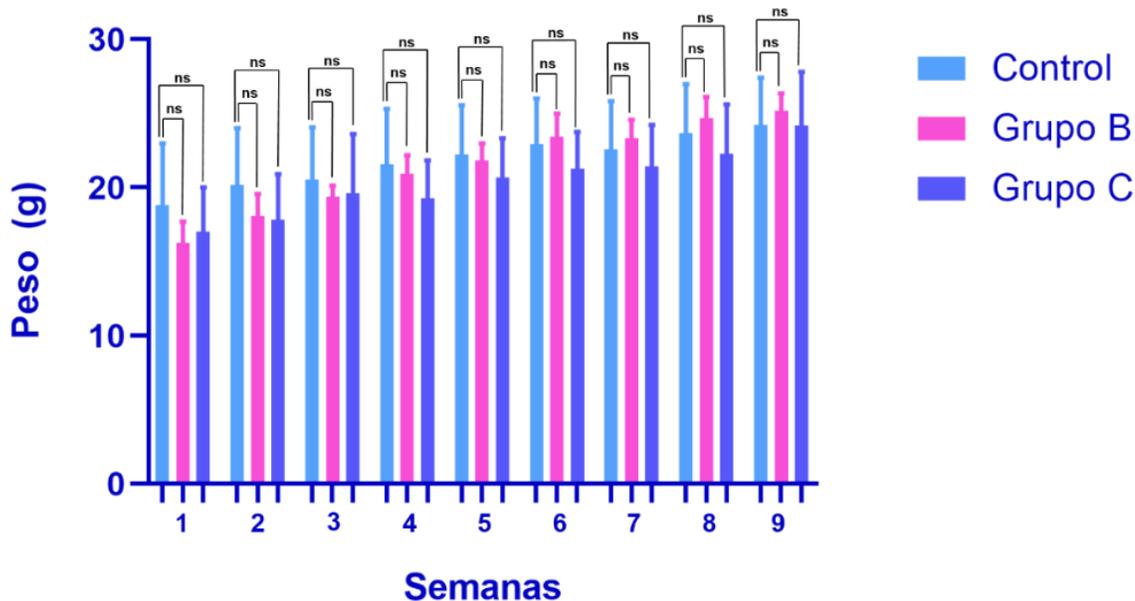
Análisis estadístico.

Los resultados se analizaron utilizando el software PRISM versión 6.0 (GraphPad Software, USA). Los análisis se realizaron usando ANOVA de doble vía. Posteriormente se aplicó el test de Bonferroni como test post-hoc para comparación entre los grupos estudiados.

Resultados

Estado nutricional de los animales y consumo de alimentos. En la **figura 1** se observa el aumento de peso progresivo de los tres grupos a lo largo del experimento, los cuales no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y los grupos B y C.

Figura 1



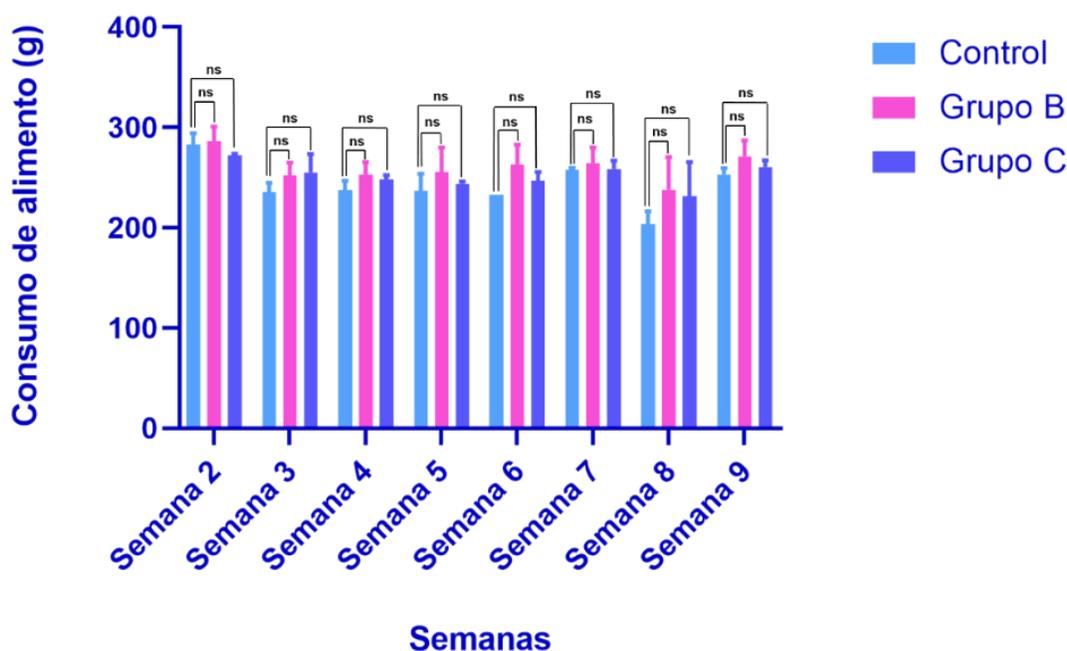
Ref.: Peso de los animales a lo largo del experimento.



Los resultados son expresados como la media \pm SD, corresponden a animales alimentados con la dieta control y las dietas experimentales estimulados in vivo con D-galactosa. ANOVA y test de Bonferroni. Ns: no se observan diferencias significativas.

En la **figura 2** se observa el consumo semanal de alimentos, los cuales no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, lo que significa que el consumo de alimentos fue equitativo.

Figura Nº 2.

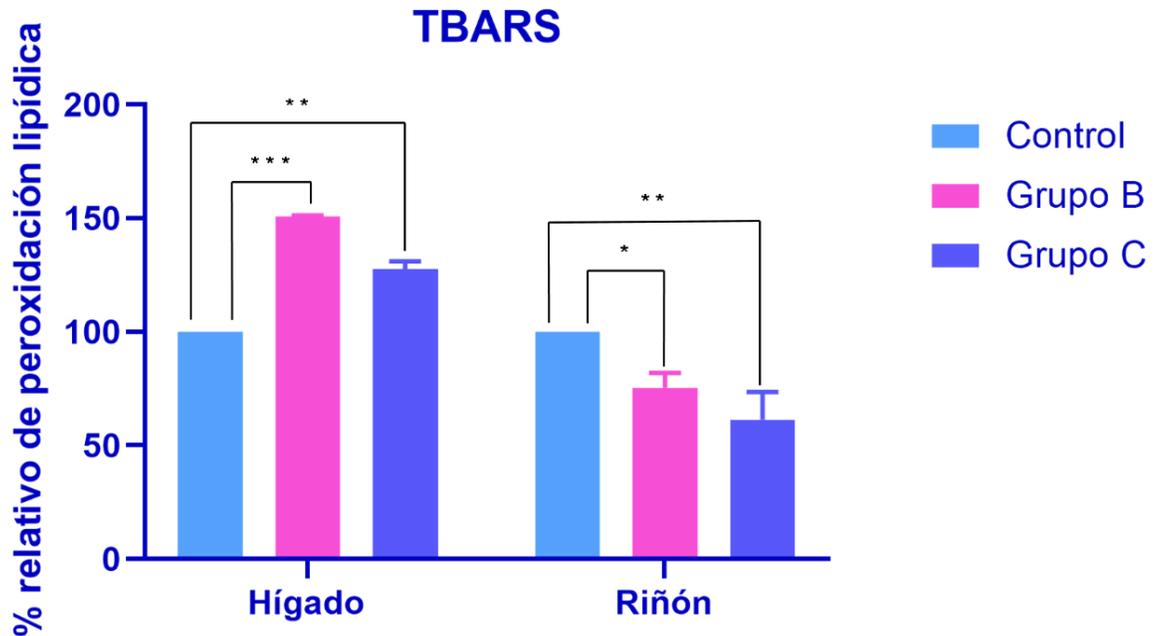


Ref.: Consumo semanal de alimento

Los resultados son expresados como la media \pm SD, corresponden a animales alimentados con la dieta control y las dietas experimentales estimulados in vivo con D-galactosa. ANOVA y test de Bonferroni. Ns: no se observan diferencias significativas.

Actividad antioxidante de las dietas formuladas a partir de harinas integrales de semillas de chía y lino. La **figura 3** exhibe que en riñón los niveles de TBARS fueron más bajos en las dietas experimentales B (harina integral de chía) y C (harina integral de lino) respecto al control. La interpretación de estos resultados sugiere que hay menor peroxidación lipídica en riñón a partir del aporte dietario de ambas harinas integrales. Por el contrario, en hígado, se observa un mayor % de peroxidación lipídica para ambas dietas experimentales en comparación al control, esto sugeriría que las propiedades antioxidantes del aporte dietario de ambas harinas no son ejercidas de la misma manera y a través de los mismos mecanismos en todos los tejidos. Restan futuros estudios para aclarar este aspecto.

Figura Nº 3.

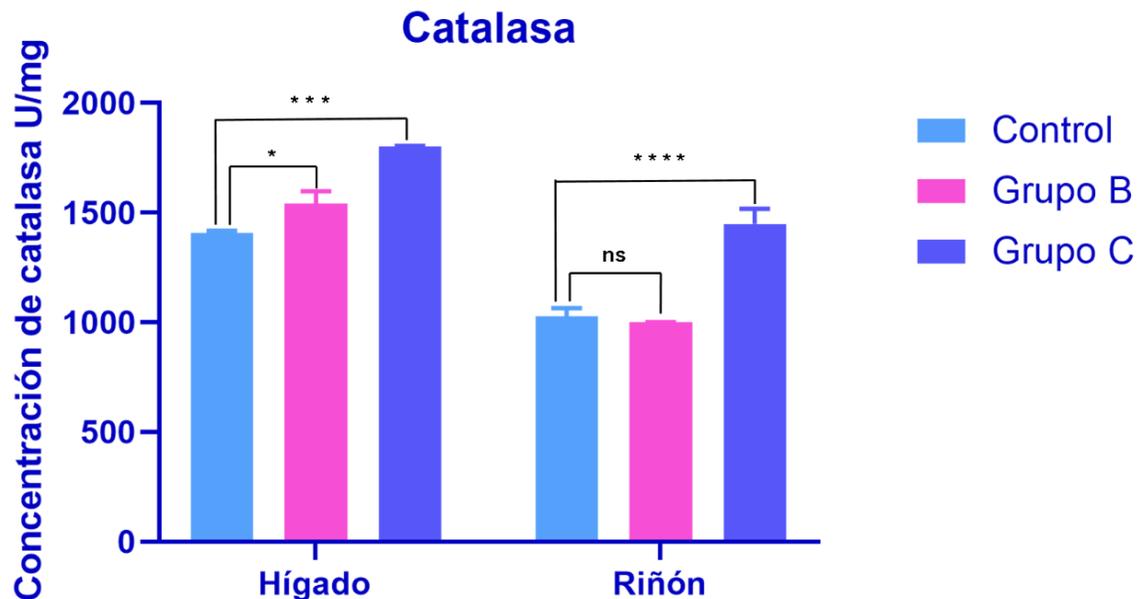


Ref.: Estimación del daño oxidativo a través del ensayo TBARS.

Los resultados son expresados como la media \pm SD de tres experimentos, corresponden a animales alimentados con la dieta control y las dietas experimentales estimulados *in vivo* con D-galactosa. Las diferencias entre grupos fueron analizadas con ANOVA y test de Bonferroni. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, diferencias entre grupos B y C vs. Control.

La **figura 4** ilustra la actividad de la enzima antioxidante catalasa. Se observa que el aporte dietario de harina integral de chía y harina integral de lino, condujeron a un aumento significativo en la actividad enzimática de catalasa en comparación al grupo control. Es importante destacar que el grupo C mostró un incremento especialmente notable en esta actividad enzimática, con una diferencia altamente significativa ($p < 0,001$). Estos resultados sugieren que el aporte dietario de harina integral de lino podría estar asociado con una mayor respuesta antioxidante en el hígado. Por otro lado, en muestras renales, se observaron valores de actividad enzimática de catalasa más bajos en comparación con las muestras hepáticas, sin embargo se evidenció una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales respecto al control, el grupo C se destacó evidenciando mayor actividad catalasa en riñón ($p < 0,001$). Este resultado sugiere que la harina integral de lino podría también ejercer un efecto antioxidante protector en riñón mediante aumento de actividad catalasa, aunque con un grado de respuesta menor que la evidenciada en el hígado.

Figura Nº 4.



Ref.: Estimación de la defensa antioxidante enzimática mediante determinación de actividad catalasa.

Los resultados son expresados como la media \pm SD de tres experimentos, corresponden a animales alimentados con la dieta control y las dietas experimentales estimulados *in vivo* con D-galactosa. Las diferencias entre grupos fueron analizadas con ANOVA y test de Bonferroni. (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ y **** $P < 0.0001$).

Discusión

Respecto al estado nutricional de los animales, nuestro trabajo se encuentra en consonancia con los hallazgos de Shafie et al (7) quienes observaron que las semillas enteras de lino no modificaban el peso corporal en un modelo experimental con ratas obesas.

Medina-Urrutia, A. et al mencionan que estudios en modelos animales han demostrado que la administración de una dieta a base de chíá puede restaurar la actividad de enzimas como la catalasa (8). Paralelamente, Ferreira, M. R et al evidenciaron que luego de la administración de semillas de chia se normaliza la actividad de la enzima en el tejido graso (9). Estos hallazgos se encuentran en concordancia con este trabajo.

Sin embargo, Martínez - Pérez, J. M. et al observaron que la suplementación dietaria con semillas de lino reducía de manera significativa en hígado los niveles de peroxidación lipídica en otro modelo animal (mamífero-ovino) (10) a través del ensayo TBARS; confrontando los hallazgos de este trabajo en donde las dietas experimentales no mostraron efecto protector frente a la peroxidación lipídica en hígado murino. Restan futuros estudios para aclarar este aspecto.

En conclusión, los resultados obtenidos aportan información valiosa sobre el efecto protector antioxidante del aporte dietario de harinas integrales de semillas de chia y lino ricas en polifenoles en el estrés oxidativo inducido por D-galactosa en murinos de experimentación.



Algunos de los mecanismos que influirían en ello se explican observando que tanto la harina integral de chíá como la de lino influyen positivamente en la actividad enzimática catalasa en tejido hepático y renal así como contribuyen a la reducción de la peroxidación lipídica en riñón. Futuros estudios son necesarios para indagar en los diferentes mecanismos implicados en el efecto antioxidante observado del aporte dietario de ambas harinas integrales ricas en compuestos polifenólicos.

Conflictos de interés.

Los autores no declaran conflictos de intereses.

Bibliografía.

1. Hrnčič, M. K. et al. (2019). Chia Seeds (*Salvia Hispanica* L.): An Overview—Phytochemical Profile, Isolation Methods, and Application. *Molecules*; DOI: 10.3390/molecules25010011.
2. Acosta Estrada, B. A. et al. (2013). Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry*; DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.11.093.
3. Kajla, P. et al. (2015). Flaxseed—a potential functional food source. *Journal of Food Science and Technology*; DOI: 10.1007/s13197-014-1293-y.
4. Hsieh, H. M. et al. (2009). Soy isoflavones attenuate oxidative stress and improve parameters related to aging and Alzheimer's disease in C57BL/6J mice treated with D-galactose. *Food and chemical toxicology*; DOI: 10.1016/j.fct.2008.12.026.
5. Li, S. et al. (2015). The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*; DOI: 10.3390/ijms161125942
6. Ohkawa, H. et al (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry Journal*; DOI: 10.1016/0003-2697(79)90738-3.
7. Shafie S. R. et al. (2019) Linseed components are more effective than whole linseed in reversing diet-induced metabolic syndrome in rats. *Nutrients*. DOI: 10.3390/nu11071677.
8. Medina Urrutia, A. et al (2020). Chia (*Salvia hispanica*)-supplemented diet ameliorates non-alcoholic fatty liver disease and its metabolic abnormalities in humans. *Lipids in Health and Disease at BMC*. DOI: 10.1186/s12944-020-01283-x.
9. Ferreira, M. R. et al (2016). Dietary Salba (*Salvia hispanica* L.) ameliorates the adipose tissue dysfunction of dyslipemic insulin-resistant rats through mechanisms involving oxidative stress, inflammatory cytokines and peroxisome proliferator-activated receptor γ . *European Journal of Nutrition*. DOI: 10.1007/s00394-016-1299-5.
10. Martínez Pérez, J. M. et al (2013). Effect of a diet supplemented with antioxidants (flax oil and -tocopherol) on ovine experimental fasciolosis. *Dialnet*.