

LIBRO DE ARTÍCULOS CIENTÍFICOS EN SALUD

**EDICION 2021
RECOPILADO 2020**

Libro de Artículos Científicos en Salud : edición 2021 / Mónica Auchter ... [et al.] ; compilación de Mónica Cristina Auchter ; Gerardo Omar Larroza ; coordinación general de Gerardo Omar Larroza ; Mónica Cristina Auchter. - 1a ed revisada. - Corrientes : Universidad Nacional del Nordeste. Facultad de Medicina, 2021.

Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga y online

ISBN 978-987-3619-64-9

ISBN 978-987-3619-64-9



9 789873 619649

1. Cirugía. 2. Medicina Clínica. 3. Educación Universitaria. I. Auchter, Mónica. II. Auchter, Mónica Cristina, comp. III. Larroza, Gerardo Omar, comp.

CDD 610.72

Editorial

Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Facultad de Medicina
Universidad Nacional del Nordeste

Diseño del Libro: Mónica Auchter.

Impreso en Argentina. Septiembre 2020

Hecho el depósito que establece la ley 11.723

Contacto: secretariacyt@med.unne.edu.ar

Facultad de Medicina de la Universidad Nacional del Nordeste - UNNE

Sede Centro:

Mariano Moreno 1240 - C.P 3400 – Ciudad de Corrientes – Corrientes – Argentina

Teléfonos: +54 379 442 2290 / 442 3155

Sede Campus Sargentó Cabral:

Sargentó Cabral 2001 - C.P 3400 – Ciudad de Corrientes – Corrientes – Argentina

Teléfonos: +54 379 443 9624 int. 34 - +54 379 442 5508

Web: <http://www.med.unne.edu.ar>

No se permite la reproducción total o parcial de este libro, ni su almacenamiento en un sistema informático, ni su transmisión en cualquier forma o cualquier medio, electrónico, mecánico, fotocopia u otros métodos, sin el permiso previo del editor.

ESTUDIO PRELEMINAR DE LOS EFECTOS ANTIINFLAMATORIOS DEL ÁCIDO ALFA-LINOLÉNICO PROVENIENTE DE HARINAS INTEGRALES DE SEMILLAS DE CHÍA Y LINO Y SU BIOCONVERSIÓN TISULAR EN EPA Y DHA EN UN MODELO MURINO DE INFLAMACIÓN SISTÉMICA.

Narella Antonina Colussia; Patricia Ruth Romero Vidomlanskya; Juan Santiago Todaroa; Gabriela Beatriz Olea a; Tania Romina Stoyanoffa; María Victoria Aguirre*

^a Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas de la Facultad de Medicina UNNE (LIBIM)

*Autor de correspondencia: María Victoria Aguirre, Ph.D - vikyaguirre@yahoo.com

RESUMEN

Las semillas de chía (*Salvia Hispánica*) y lino (*Linum usitatissimum L.*) son las fuentes vegetales de ω -3 (ácido alfa-linolénico, ALA), el estudio de las propiedades antiinflamatorias de las harinas integrales representa un abordaje innovador. El objetivo general fue estudiar de modo preeliminar los efectos antiinflamatorios del ácido alfa-linolénico proveniente de harinas integrales de semillas de chía y lino y su bioconversión tisular en eicosapentanoico y docosahexanoico en un modelo murino de inflamación sistémica inducida por LPS. Se desarrollaron dietas experimentales, dieta B (chia) y dieta C (lino) acorde a los requerimientos nutricionales de ratones de la cepa Balb/c. Concluído el plazo de tratamiento alimentario (10 semanas) se procedió a la inducción de inflamación sistémica con LPS, toma de muestras de tejidos y de macrófagos peritoneales para determinar: perfil lipídico tisular por GS/MS, análisis histopatológicos e ICQ de NF-kB. La bioconversión de ω -3 no fue uniforme, nuestros resultados revelaron cambios importantes en la bioconversión de ALA en corazón, se bioconvirtió principalmente en DHA y de modo más eficiente para aquellos tratados con la dieta C. En hígado la dieta B se metabolizó principalmente a EPA y la dieta C a DHA. Nuestro estudio no reveló una bioconversión significativa de ALA en sistema nervioso central. La expresión nuclear del factor NF- kB (p65) en macrófagos peritoneales disminuyó en muestras de animales tratados versus el control. Las dietas B y C demuestran favorables bioconversiones tisulares de ALA y potenciales efectos antiinflamatorios.

Palabras claves: : nutrición- ácidos grasos omega 3- compuestos bioactivos

SUMMARY

Chia seeds (*Salvia Hispánica*) and flax (*Linum usitatissimum L.*) are the vegetable sources of ω -3 (alpha-linolenic acid, ALA), the study of the anti-inflammatory properties of whole wheat flours represents an innovative approach. The aim was to study preliminarily the anti-inflammatory effects of alpha-linolenic acid from whole grains of chia and flax seeds and its tissue bioconversion into eicosapentaenoic and docosahexaenoic in a murine model of systemic inflammation induced by LPS. Experimental diets were developed, diet B (chia) and diet C (flax) according to the nutritional requirements of mice of the Balb / c strain. After the period of food treatment (10 weeks), the induction of systemic inflammation with LPS, taking samples of tissues and peritoneal macrophages to determine: tissue lipid profile by GS / MS, histopathological analysis, and ICQ of NF-kB. The bioconversion of ω -3 was not uniform, our results revealed important changes in the bioconversion of ALA in the heart, it bioconverted mainly into DHA and more efficiently for those treated with diet C. In the liver, diet B was metabolized mainly to EPA and diet C to DHA. Our study did not reveal a significant bioconversion of ALA in the central nervous system. The nuclear expression of factor NF-kB (p65) in peritoneal macrophages decreased in samples from treated animals versus control. Diets B and C demonstrate favorable tissue bioconversions of ALA and potential anti-inflammatory effects.

Keywords: nutrition- omega 3 fatty acids- bioactive compounds: nutrition- omega 3 fatty acids- bioactive compounds

INTRODUCCIÓN

La búsqueda y el estudio de nuevos ingredientes naturales ricos en compuestos bioactivos con propiedades beneficiosas para prevenir o retrasar la aparición de algunas enfermedades crónicas es una de las áreas de mayor interés de las investigaciones en el campo alimentario, farmacéutico y nutracéutico.

Algunos de los compuestos bioactivos que han adquirido probada relevancia para tal fin son los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPICL) ω -3. Estos participan en la modulación de la respuesta inmune, reducción de la inflamación y daño anatómico-funcional ejerciendo así un rol antiinflamatorio y citoprotector que previene el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, entre otras ⁽¹⁾.

Las semillas de chía (*Salvia Hispanica*) y lino (*Linum usitatissimum L.*) son las fuentes vegetales más ricas en ω-3 (ácido alfa-linolénico, ALA) ⁽²⁾.

La inflamación es una respuesta biológica del sistema inmune que se desencadena por una infeción o lesión en un tejido. Cuando la respuesta se prolonga se convierte en crónica tal como ocurre en patologías prevalentes como las cardiovasculares, obesidad y diabetes ⁽³⁾. En este proceso participan macrófagos que reconocen el antígeno y dan respuesta rápida a éste, estos producen diversas citoquinas proinflamatorias, especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, y aumentan la expresión génica de NF-κB como respuesta a señales de activación ⁽³⁾; por lo tanto, la modulación de estos productos proporciona una diana para el control de enfermedades inflamatorias.

Teniendo en cuenta lo anterior, se estudiarán las semillas de *Salvia Hispanica* y *Linum Usitatissimum L.* bajo la forma triturados o harinas integrales, presentación aún no estudiada que involucra la no separación de los respectivos aceites y harinas desgrasadas con el propósito de evaluar el potencial antiinflamatorio del ALA. Para ello se inducirá un estado inflamatorio sistémico mediante LPS (lipopolisacárido) de *E.coli* en un modelo murino *in vivo* en el que se cuantificará el perfil lipídico en corazón, hígado y cerebro, se determinará la expresión del factor de transcripción NF-κB en macrófagos peritoneales y la capacidad fagocítica de macrófagos peritoneales estimulados *in vitro* con LPS mediante ensayo de carbono coloidal.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar preliminarmente los efectos antiinflamatorios del ácido alfa-linolénico proveniente de harinas integrales de semillas de chía y lino y su bioconversión tisular en eicosapentanoico y docosahexanoico en un modelo murino de inflamación sistémica inducida por LPS.

Objetivos Específicos

- Formular alimentos con harinas integrales de semillas de chía y lino acorde a los requerimientos nutricionales de los murinos y cuantificar su perfil lipídico.
- Inducir inflamación sistémica y estrés oxidativo mediante la administración de LPS proveniente de *Escherichia coli* 0127: B8 (Sigma, St Louis, MO) (1.5 mg/ kg) por vía i.p.
- Estudiar la expresión del factor de transcripción NF-κB en células provenientes de lavados i.p por inmunocitoquímica (ICQ) y determinar la capacidad fagocítica de macrófagos peritoneales estimulados *in vitro* con LPS (ensayo de carbón coloidal).
- Valorar la bioconversión de ALA en EPA y DHA mediante el contenido de ácidos grasos poliinsaturados ácido alfa-linolénico, eicosapentanoico y docosahexanoico en corazón, hígado y cerebro.

MATERIAL Y MÉTODOS

Materia prima: Se obtuvieron las harinas integrales de semillas de chía y lino a partir de la molienda de las mismas en molinillo de café eléctrico (Peabody Pe-mc9100-180W).

Diseño de las dietas experimentales: se formularon dietas según los requerimientos nutricionales de los murinos (National Research Council Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition). Se analizó la composición centesimal, perfil lipídico y seguridad microbiológica de cada una de ellas.

Diseño experimental.

Animales: Se utilizaron 30 ratones machos de 28 días de vida, isogénicos de la cepa Balb/c pertenecientes al Bioterio de la Facultad de Medicina- UNNE. Los animales se alojaron en condiciones controladas de T° y humedad, manteniendo ciclos luz/oscuridad de 12 hs. Se siguieron las normas bioéticas nacionales e internacionales GLP (aval CICUAL Fac. Med UNNE Resol 0002-CICUAL/17). Fueron provistos de las dietas experimentales durante 70 días (10 semanas). Los murinos fueron asignados por azar simple a los siguientes grupos experimentales:

- Dieta A: grupo control, balanceado comercial Cooperación ® (n= 10)
- Dieta B: grupo experimental 1, harina integral de semillas de chía (n=10)
- Dieta C: grupo experimental 2, harina integral de semillas de lino (n= 10)

El agua y los alimentos fueron provistos *ad libitum*. Concluido el tiempo estipulado se procedió a la **determinación de la actividad antiinflamatoria**:

A-In vivo.

- a. Inducción estado proinflamatorio: inyección intraperitoneal (ip) de Lipopolisacárido (LPS) de *E. Coli* con solución fisiológica estéril (ClNa 0,9%) en dosis 1.5 mg/kg 6 horas antes del sacrificio:
 - Dieta A, n= 10: estimulados (n=5), no estimulados (n=5)
 - Dieta B, n= 10: estimulados (n=5), no estimulados (n=5)
 - Dieta C, n= 10: estimulados (n=5), no estimulados (n=5)
- b. Sacrificio: Tras 6 horas de la inducción por LPS eutanasia por dislocación cervical.
- c. Perfil lipídico: a muestras de corazón, hígado y cerebro se les extrajeron los lípidos por el método Bligh & Dyer 1959 y se analizó el perfil lipídico por cromatografía GS/MS.

B-In vitro.

- a. Obtención de macrófagos (MO) peritoneales murinos: La proporción de estos en la población celular peritoneal se determinó por tinción con α -naftilo para comprobación de recuperación de más del 90% de MO.
- b. Cultivos primarios de macrófagos peritoneales de ratón: sembraron MO peritoneales en placas de 24 pocillos y se incubaron por 2 h en estufa de cultivo, se adicionó 100 ng/ml de LPS gamma irradiado (Sigma) con un período de incubación de 48hs hasta la completa diferenciación de monocitos a macrófagos ⁽⁴⁾.
- c. Inmunocitoquímica de NF- κ B: Se determinó la expresión del factor de transcripción NF- κ B en células procedentes de lavados i.p. en grupos tratados y controles tras estimulación con LPS (Anti-NF- κ B p65 antibody – Santa Cruz Biotechnology).
- d. Ensayo de capacidad fagocítica de MO peritoneales: Se realizó mediante incubación con partículas de carbón coloidal a partir de MO peritoneales en grupos tratados y controles tras estimulación in vitro con LPS.

Análisis estadístico de datos. Los resultados se analizaron utilizando el software INSTAT 6.0 y PRISM versión 6.0 (GraphPad Software, USA). Los análisis se realizaron usando ANOVA a una vía. Los resultados se expresan como la media \pm SD, considerando significativo un P<0,05.

RESULTADOS

Respecto al perfil lipídico de las harinas integrales de semillas de chía y lino los resultados se pueden observar en la Figura 1. Asimismo, la Figura 2 exhibe el perfil lipídico de las dietas.

La bioconversión endógena de ALA en EPA y DHA no fue uniforme en los diferentes tejidos estudiados, la Figura 3 exhibe el perfil lipídico de hígado, corazón y cerebro de animales tratados con las dietas experimentales.

Figura 1. Perfil lipídico de triturados de semillas de chía y de lino. *Resultados expresados como la media \pm SD.*

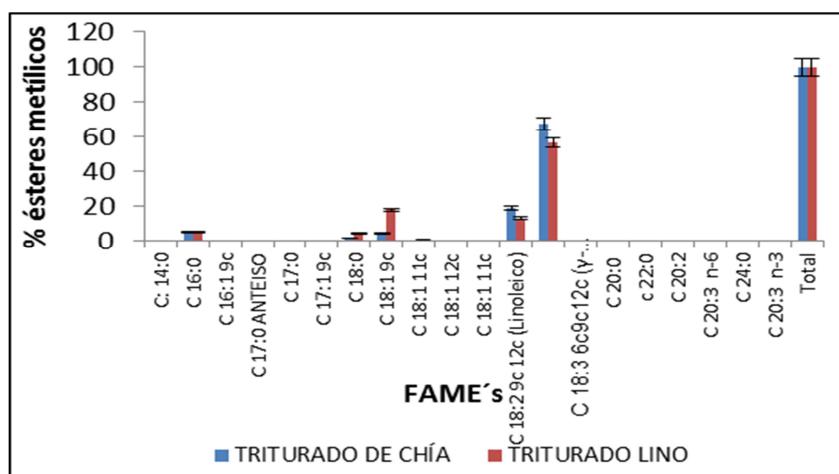


Figura 2. Perfil lipídico de las dietas. Resultados expresados como la media \pm SD.

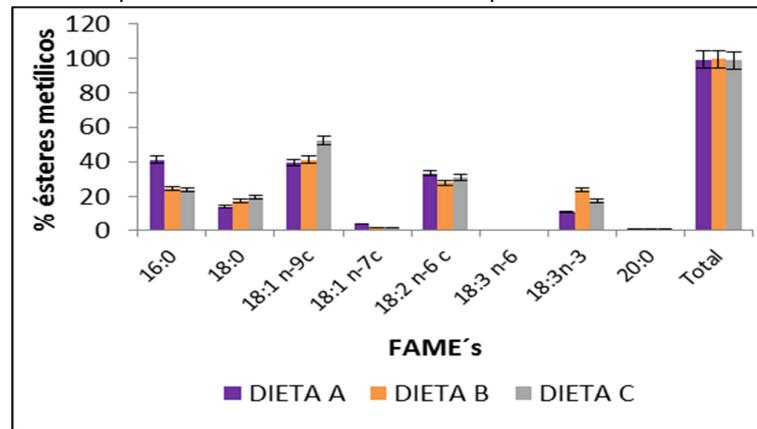
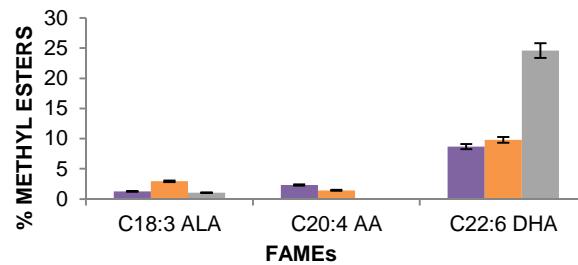
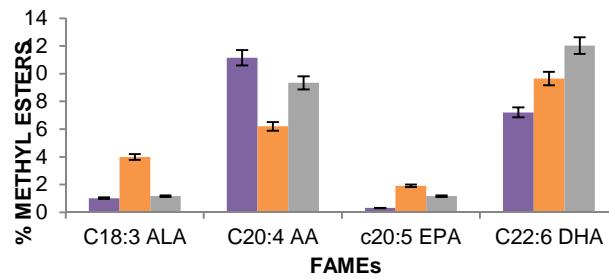


Figura 3. Perfil lipídico de corazón, hígado y cerebro de animales alimentados con las dietas experimentales (n= 10/ grupo).

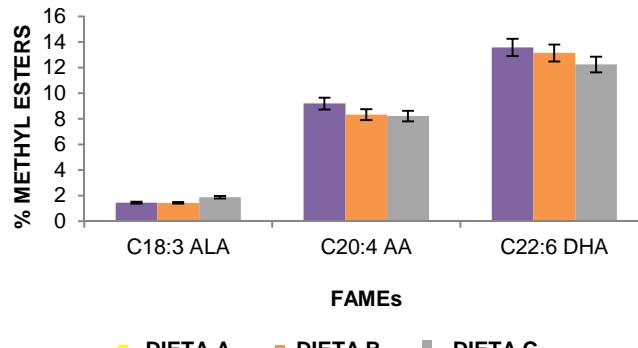
A. Corazón



B. Hígado



C. Cerebro



Resultados expresados como la media \pm SD. N=10/grupo

La fagocitosis de macrófagos murinos estimulados con LPS in vitro y la expresión nuclear del factor NF- kB (p65) en macrófagos peritoneales se exhiben en las Figuras 4 y 5.

Figura 4. Expresión del factor de transcripción NF-KB en células procedentes de lavados i.p estimulados in vitro con LPS.

Se muestran microfotografías representativas la expresión de NF- κ B en células procedentes de cultivos de macrófagos peritoneales proveniente de animales alimentados con dietas experimentales estimulados in vitro con LPS, Magnificación X100 X 400.

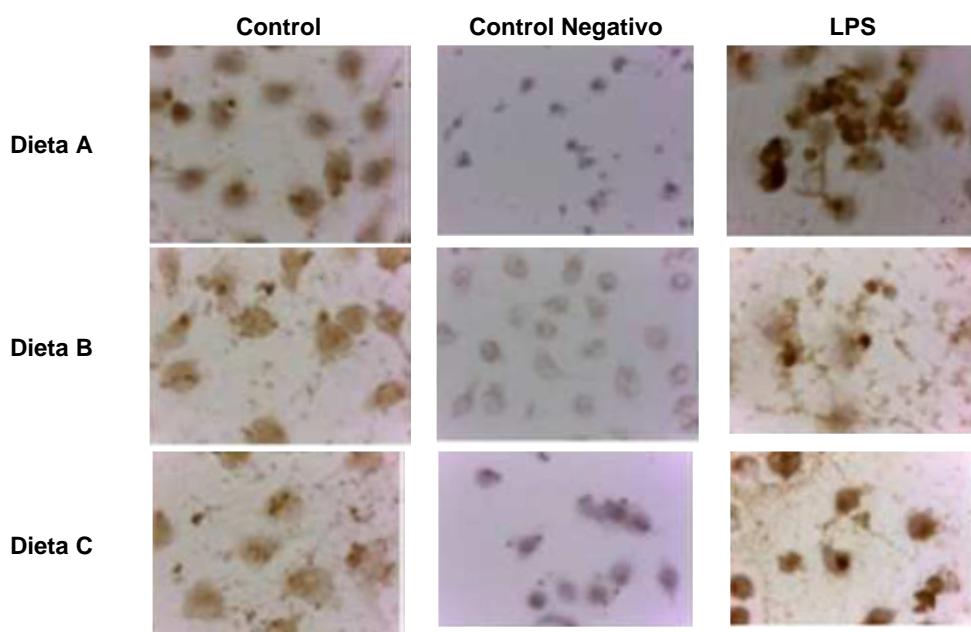
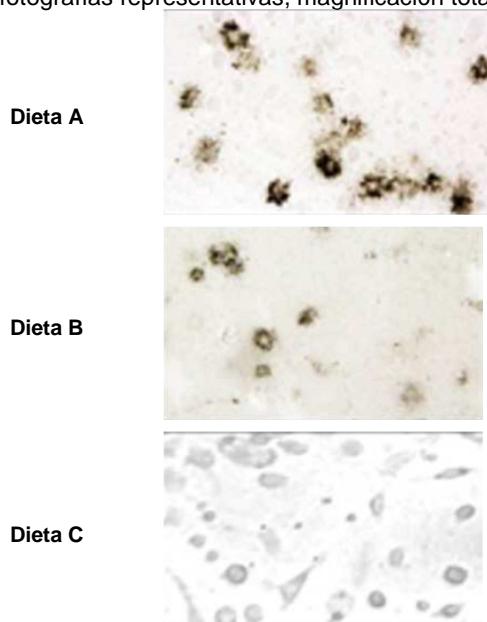


Figura 5. Prueba de fagocitosis con partículas coloidales de carbón en macrófagos estimulados con LPS.

Microfotografías representativas, magnificación total X400.



DISCUSIÓN

La mayoría de los trabajos reportados sobre semillas de chía y lino se han informado a partir del uso de harinas desgrasadas o aceites, el uso de los triturados íntegros o harinas integrales representan un aporte innovador.

Respecto a la bioconversión de ω -3, se ha informado que el EPA es cuantitativamente más importante en el hígado (0, 2 a 6%) y que el DHA es la forma predominante en el cerebro (0.05%)⁽⁵⁾. Nuestros resultados revelaron cambios importantes en la bioconversión de ALA entre tejidos y órganos. El perfil lipídico en los corazones de los ratones alimentados con dietas experimentales reveló que el ALA se convirtió principalmente en DHA. Los ratones alimentados con dieta C mostraron casi el doble del contenido de este PUFA en el tejido cardíaco en comparación con los alimentados con dieta B. Nuestros resultados están de acuerdo con el trabajo de Watkins et al⁽⁶⁾, en el cual las dietas experimentales ricas en ALA proveniente de otras fuentes diferentes a la chía y el lino se bioconvierten principalmente a DHA (22:6 ω -3) en corazones murinos. Con respecto a la bioconversión hepática de ALA, nuestros resultados mostraron que la dieta B se metaboliza a EPA y la dieta C a DHA, preferiblemente. Watkins et al⁽⁶⁾ también informaron la bioconversión de ALA a EPA (20: 5 ω -3) y DHA en el hígado murino, lo que refuerza nuestros resultados experimentales. Aunque el estudio de Valenzuela⁽⁵⁾ mencionó que el ALA se convirtió en DHA y EPA en cerebros de ratones alimentados con dietas diseñadas con chía, lino y / o aceites de salmón, nuestro estudio no reveló una bioconversión significativa.

La fagocitosis de macrófagos murinos estimulados con LPS *in vitro* mostró disminuyó significativamente en animales que recibieron las harinas integrales de semillas de chía y lino incorporadas en la dieta, esto se encuentra en consonancia con lo hallado pro Saray Gutierrez⁽⁷⁾.

Paralelamente, la expresión nuclear del factor NF- kB (p65) en macrófagos peritoneales disminuyó en muestras de animales que recibieron las dietas B y C con respecto al control, esto se encuentra acorde a los hallazgos de Araujo de Miranda et al⁽⁸⁾.

CONCLUSIONES

En animales de experimentación, el consumo de las dietas B y C evidenció mejores tasas de bioconversión de ALA en sus formas activas EPA y DHA en corazón, hígado y cerebro respecto a los controles.

Respecto a los efectos antiinflamatorios de las harinas integrales incluídas en matrices alimentarias destinadas a murinos, el factor de NF- κ B disminuyó su expresión en el núcleo en macrófagos peritoneales tratados con dietas B y C en comparación con los controles. Asimismo, la fagocitosis de macrófagos murinos estimulados *in vitro* con LPS disminuyó en muestras de animales alimentados con las dietas experimentales.

Los hallazgos de este trabajo sientan las bases para profundizar el estudio de las propiedades antiinflamatorias de las harinas integrales de semillas de chía y lino.

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

1. Xi C, Xue D, Jianliang S, Lizhi L, Weiqun W. Original Research: Effect of various dietary fats on fatty acid profile in duck liver: Efficient conversion of short-chain to long-chain omega-3 fatty acids. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2017; 242(1):80-87
2. Priyanka K, Alka S, Dev Raj S. Flaxseed-a potential functional food source. *Jour of Food Sci and Tech*. 2015. Mysore, 52(4), 1857-187
3. [Martínez-Cruz O, Paredes-López O](#). Phytochemical profile and nutraceutical potential of chia seeds (*Salvia hispanica L.*) by ultra high performance liquid chromatography. *Jour of Chroma*. 2014; 1346: 43-48
4. Ordóñez Vásquez A , Jaramillo Gómez L, Ibata M, Suárez-Obando F. China ink in adherents ceil in culture. *NOVA*. 2016; 13 (25): 09-17
5. Valenzuela B, Gormáz J, Masson S, Vizcarra P, Cornejo Z, Tapia O. Evaluation of the hepatic bioconversion of α -linolenic acid (ALA) to eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) in rats fed with oils from chia (*Salvia hispanica*) or rosa mosqueta (*Rosa rubiginosa*). *Grasas y Aceites* 2012, 63 (1): 61-69,
6. Watkins SM, Lin TY, Davis RM, Ching JR, DePeters EJ, Halpern GM, Walzem RL, German JB. Unique Phospholipid Metabolism in Mouse Heart in Response to Dietary Docosahexaenoic or α -Linolenic Acids Lipids 2001, Vol. 36, no. 3:247-54
7. [Gutiérrez S, Svahn S, Johansson ME](#). Effects of Omega-3 Fatty Acids on Immune Cells. *Int J Mol Sci*. 2019 Oct; 20(20): 5028.
8. Araujo de Miranda D, Pinheiro da Silva F, Carnier M, Vales Mennitti L, Galvao Figueiredo A, Losinskas C, et al. Chia flour (*Salvia hispanica L.*) did not improve the deleterious aspects of hyperlipidic diet ingestion on glucose metabolism, but worsened glycaemia in mice. *Food Res Inter* 121 (2019) 641–647