

Trabajo completo

La semilla de Salba (*Salvia hispánica* L.) dietaria previene la esteatosis hepática y dislipidemia inducida en ratas normales por una dieta rica en sacarosa.

RECIBIDO: 16/06/2011

ACEPTADO: 15/08/2011

Rossi, A. • Oliva, M. E. • Ferreira, M. R. • Chicco, A. • Lombardo, Y. B.

Cátedra de Química Biológica. Laboratorio de estudios de enfermedades metabólicas relacionadas con la nutrición. Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Ciudad Universitaria. Paraje El Pozo. S3000ZAA Santa Fe. Argentina. Tel.: (0342) 457 5211. Email: ylobbard@fbc.unl.edu.ar

RESUMEN: El objetivo del trabajo fue analizar si un cambio en la grasa dietaria (aceite de maíz (AM)) por semilla de *Salvia hispánica* L., variedad Salba (chía) induciría modificaciones en la actividad de enzimas clave de la lipogénesis hepática (acetil CoA carboxilasa, sintetasa de ácidos grasos, glucosa -6-fosfato dehidrogenasa) que contribuyan a prevenir la esteatosis hepática y alteraciones lipídicas plasmáticas inducidas en ratas Wistar normales por la administración de una dieta rica en sacarosa (DRS) durante 3 semanas. Se utilizaron tres grupos de animales alimentados con: dieta control, DC (% p/p: almidón 65.9, AM 11, proteínas 15), dieta DRS (% p/p: sacarosa 65.9, AM 11, proteínas 15) y dieta DRS + chia (DRS donde el AM se reemplazó por chia). La presencia de chia en la dieta previno el aumento de la actividad de las enzimas lipogénicas evaluadas, observándose un contenido de triglicéridos en hígado y plasma similares al grupo DC. El alto contenido de ácido linoleico de

la chia previene el incremento de la lipogénesis hepática ejerciendo un efecto hipolipemiante similar al observado con ácidos grasos ω -3 de origen marino.

PALABRAS CLAVES: *Salvia hispánica* L. – Insulino Resistencia – Dislipemia – Lipogénesis.

SUMMARY: *Dietary Salba seed (Salvia hispánica L.) prevents hepatic steatosis and dyslipidemia induced in normal rats by a sucrose rich diet.*

The aim of the present work was to analyze if the substitution of dietary source of fat (corn oil (CO) by *Salvia hispánica* L. seed, variety Salba (chia) could lead to changes in the activity of key lipogenic hepatic enzymes (acetyl CoA carboxylase, fatty acid syntetase, glucose-6-phosphate dehydrogenase) which contribute to prevent the hepatic steatosis and plasma lipid alterations induced in normal Wistar rats fed a sucrose rich diet (SRD) during 3 weeks. Three animal groups were used: 1. control diet (CD) (% p/p: maize starch 65.9, CO 11, protein 15),

2. SRD (% p/p: sucrose 65.9, CO 11, protein 15) and 3. SRD + chía (SRD where CO was replaced by chía seed). The presence of chía seed in the diet prevented the increase in activity of the lipogenic enzymes assayed, and it was also observed that the hepatic and plasmatic

triglyceride content did not change. The high alpha-linolenic acid content of chía seed prevented the increase in hepatic lipogenesis showing a hypolipidemic effect similar to that observed for marine ω -3 fatty acids.

KEY WORDS: *Salvia hispanica* L. – Insulin Resistance – Dyslipidemia – Lipogenesis

Introducción

El Síndrome Metabólico (SM) es un conjunto de diferentes desórdenes metabólicos y los factores de riesgo que lo definen incluyen obesidad abdominal, resistencia insulínica, intolerancia a la glucosa, dislipemia (elevados triglicéridos (Tg) y ácidos grasos libres (AGNE) plasmáticos) e hipertensión. La mayoría de los estudios muestran que el SM está asociado con un incremento del riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y diabetes mellitus tipo 2 (1). La prevalencia de este síndrome se incrementa a proporciones epidémicas en todo el mundo, llegando a un 20% en países latinoamericanos, incluida la Argentina (2).

Numerosos estudios epidemiológicos y experimentales han demostrado que cambios en la composición de macronutrientes de la dieta son importantes determinantes ambientales en la prevención y/o mejoramiento de los desórdenes metabólicos presentes en el SM (3). Al respecto, existe abundante evidencia que indica que la ingesta de ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga ω -3 (LCPUFAs) de origen marino, especialmente el ácido eicosapentaenoico 20:5 n-3 (EPA) y el ácido docosahexaenoico 22:6 n-3 (DHA), cumpliría un rol beneficioso contra los efectos adversos de este síndrome (4-7). De esta manera, estudios realizados en modelos experimentales animales demostraron que el aceite de pes-

cado dietario (rico en EPA y DHA) se asocia con un número de efectos que colectivamente actúan reduciendo la dislipemia y mejorando la sensibilidad insulínica (7, 8). Sin embargo, son menos numerosas las investigaciones realizadas sobre el posible efecto beneficioso del ácido α -linolénico (ALA; 18:3 ω -3), en prevenir y/o mejorar a nivel experimental y humano estos desórdenes metabólicos.

ALA es el precursor de los ácidos grasos n-3 de cadena larga DHA y EPA, a través de la acción de las enzimas de desaturación y elongación. La aceptación general de que la función del α -linolénico era tan sólo ser un precursor de los LCPUFAs, y el hecho de que los primeros estudios epidemiológicos se realizaran en poblaciones que consumían gran cantidad de pescado, fueron los responsables principales de una sub-estimación temprana del ALA (9). Sin embargo, recientes estudios epidemiológicos sobre el rol biológico del ALA en humanos, sumados a los realizados en animales de experimentación, están cambiando el escenario de las fuentes de ω -3. Así, es posible que el ALA dietario ejerza efectos fisiológicos similares a los observados con EPA y DHA provenientes del aceite de pescado (10, 11).

ALA se encuentra presente en numerosos vegetales, pero una de las fuentes botánicas más rica en 18:3 ω -3 que se conoce es la semilla de chía (*Salvia hispanica* L., varie-

dad Salba). La semilla contiene entre un 25 y 39 % de su peso en lípidos y los ácidos grasos del aceite de chía son altamente insaturados, siendo ALA su principal componente (60-64% de los lípidos totales) (12, 13, 14). De esta manera, la chía, utilizada como alimento por los pueblos precolombinos, representa una fuente natural sustentable de ácidos grasos ω -3, que podría en parte reemplazar al pescado y algas marinas, afectadas en distinto grado por la contaminación y la depredación.

Experimentalmente es posible inducir un estado metabólico similar al descrito en el SM por manipulación dietaria (dietas ricas en azúcares refinados, sacarosa o fructosa) y sedentarismo. Al respecto, numerosos investigadores han demostrado que ratas normales alimentadas con una dieta rica en sacarosa (DRS), desarrollan dislipemia, intolerancia a la glucosa y resistencia insulínica (15, 16, 17). La magnitud de los cambios endócrino-metabólicos inducidos por la ingesta de una DRS, depende no sólo de la cantidad de sacarosa administrada sino también del tiempo de administración de la dieta. Al respecto, luego de 3 a 5 semanas de ingesta, los animales presentan normoglicemia, hiperinsulinemia, resistencia insulínica, dislipidemia e incremento del contenido de triglicéridos hepáticos.

Recientemente demostramos que la sustitución del tipo de grasa dietaria, aceite de maíz por semilla de *Salvia hispánica* L. previene no sólo el desarrollo de dislipemia e insulino resistencia en ratas alimentadas durante 3 semanas con DRS, sino también la esteatosis hepática (18). Estos resultados podrían ser la consecuencia de un cambio del destino preferencial del combustible energético (lipogénesis-oxidación).

Al respecto, Kim y col (19) observaron una disminución de los niveles de triglicéridos plasmáticos y hepáticos en ratas normales alimentadas con dietas conteniendo 10% de aceite de perilla (rico en ALA) o de aceite de pescado, relacionando estos resultados con una disminución de la actividad de la enzima sintetasa de ácidos grasos (SAG). Por su parte, Ide y col (20) demostraron que tanto el aceite de perilla como el de pescado favorecen a nivel hepático la oxidación de ácidos grasos, mientras que sólo el aceite de pescado logra inhibir la síntesis "de novo" de los mismos.

De lo expuesto, el **Objetivo** del presente trabajo fue analizar si un cambio en la composición de la grasa dietaria (aceite de maíz por semilla de chía) induciría modificaciones en las actividades de enzimas claves de la lipogénesis hepática: SAG, acetil CoA carboxilasa (ACC) y glucosa 6 fosfato dehidrogenasa (G6P-DH), que contribuyen a prevenir la esteatosis hepática y alteraciones lipídicas plasmáticas inducidas en ratas por la administración de una DRS durante 3 semanas.

Materiales y métodos

Animales y dietas

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar provenientes de la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA), Buenos Aires, Argentina, con un peso inicial de 180-200 g. Los animales se mantuvieron bajo condiciones de temperatura (22 ± 1 °C) y humedad controladas, con un ciclo luz-oscuridad de 12 horas (7:00-19:00 h) con libre acceso al agua y a una dieta estándar comercial de laboratorio (Ralston, Purina, St. Louis, MO, USA). Luego de una semana de aclimatación, las ratas fueron divididas al azar en

tres grupos y fueron alimentadas durante 3 semanas con la dieta asignada: el primer grupo recibió una dieta semi-sintética (% calorías): almidón (60), proteínas (17) y aceite de maíz como fuente de grasa (23) (dieta control: DC). Los otros dos grupos

recibieron la misma dieta semi-sintética con sacarosa como fuente de hidratos de carbono y aceite de maíz (DRS) o semilla de *Salvia hispánica* L. (chía, DRS + chía) como fuente de grasa. **La Tabla 1** muestra la composición de las dietas experimentales.

Tabla 1: Composición de las dietas experimentales.¹

Dieta	DC	DRS	DRS + Chía
	% calorías		
Carbohidratos			
Almidón de maíz	60	2,6	----
Sacarosa	----	57,4	57,4
Semilla de chía ²	----	----	2,6
Grasa			
Aceite de maíz	23	23	0,2
Semilla de chía	----	----	22,8
Proteínas			
Caseína libre de vitaminas	17	17	9,25
Semilla de chía	----	----	7,75

¹ Las dietas están basadas en las recomendaciones realizadas por el Instituto Americano de Nutrición, USA (dieta AIN-93M). Todas las dietas contienen por peso: mezcla de sales 3,5% (AIN-93M-MX), mezcla de vitaminas 1% (AIN-93M-VX), cloruro de colina 0,2%, metionina 0,3% y fibra 12%. DRS + chía fue balanceada en el contenido de fibra y sales de acuerdo a la cantidad de cada uno de estos nutrientes en la semilla de chía, composición provista por el agricultor. DC: dieta control; DRS: dieta rica en sacarosa; DRS + chía: dieta rica en sacarosa con semilla de chía.

² Semilla de chía (*Salvia hispánica* L.): 362 g/Kg de dieta. Composición de la chía (g/100 g de semilla): carbohidratos, 37.45; fibra insoluble, 81% del total de carbohidratos; grasas, 30.23; proteínas, 21.19. Composición mineral (mg/100 g de semilla): Na, 103.15; K, 826.15; Ca, 589.60; Fe, 11.90; Mg, 77.0; P, 604; Zn, 5.32; Cu, 1.66; Mn, 1.36.

El contenido de fibra, vitaminas y sales fue similar en cada una de las dietas administradas. El contenido de carbohidratos, proteínas y fibra de la DRS + chía fue balanceado teniendo en cuenta la cantidad de estos nutrientes presentes en la semilla de chía. La composición de la semilla de chía fue provista por el Agrisalba S.A. Bs Aires, Argentina. Mayores detalles de la prepara-

ción y el manejo de las dietas fueron descritos en trabajos previos (21). Todas las dietas proveen aproximadamente 18,00 kJ/g de dieta y fueron administradas "ad libitum". La mezcla base de cada dieta se realizó semanalmente y se almacenó a 4°C hasta la preparación de las dietas. **La Tabla 2** muestra la composición de ácidos grasos del aceite de maíz y de la semilla de chía.

Tabla 2: Composición de ácidos grasos del aceite de maíz y la semilla de chíá (g/ 100 ácidos grasos totales).

Ácidos grasos*	Aceite de maíz	Semilla de chíá
16:0	10.40	6.60
18:0	2.60	2.80
18:1 ω -9	32.10	6.80
18:2 ω -6	51.50	18.60
18:3 ω -3	0.76	64.60
20:1 ω -9	0.45	0.30
Total saturados	13.40	12.04
Monoinsaturados	32.55	7.44
Polinsaturados		
ω -6	51.50	18.60
ω -3	0.76	64.60
ω -6: ω -3	67.80	0.287

*Componentes menores completan el 100%.

Salvia hispánica L. (Agrisalba SA, Buenos Aires, Argentina).

La ingesta calórica y la ganancia de peso de las ratas pertenecientes a cada grupo dietario se determinó dos veces por semana a lo largo de todo el período experimental. Una vez finalizadas las 3 semanas de experimentación se retiró el alimento al finalizar el período de oscuridad (7:00h) y los animales fueron sacrificados entre las 7:00 y 9:00 h. El protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Ética y Seguridad de la Investigación de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral.

Métodos Analíticos

Los animales fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (60 mg/Kg de peso corporal). Las muestras de sangre obtenidas de la vena cava inferior fueron inmediatamente centrifugadas a 4°C. El suero fue utilizado inmediatamente o se conservó a -20°C hasta su procesamiento (no más de una semana). Los tejidos adiposos epididimal y retroperitoneal fueron extraídos y pesados.

Muestras de tejido hepático fueron rápidamente removidas, pesadas y congeladas con una pinza Wollenberger, previamente enfriada en nieve carbónica, y conservadas a la temperatura de N₂ líquido hasta su procesamiento. Los niveles plasmáticos de Tg, AGNE y glucosa fueron cuantificados por métodos espectrofotométricos convencionales (22). La insulina plasmática se determinó mediante ensayo inmunoreactivo según Herbert y col (23) utilizando un estándar de insulina de rata (Novo Nordisk, Copenhagen, Dinamarca). Homogeneizados de tejido hepático fueron utilizados para la cuantificación del contenido de Tg tisular (24) y para la determinación de las actividades enzimáticas que se describen a continuación.

Actividades enzimáticas

a. Sintetasa de ácidos grasos (SAG)

La fracción citosólica de las muestras de homogeneizado hepático (con buffer conteniendo: sacarosa 0,25 M, DTT 1 mM y EDTA 1 mM– pH: 7,4) fue obtenida por centrifu

gación a 100.000 g durante 1 hora a 4°C y se determinó inmediatamente la actividad SAG como fue descrito anteriormente por Halestrap y Denton (25). La actividad enzimática se cuantificó espectrofotométricamente a 340 nm y a temperatura ambiente en un medio conteniendo: buffer fosfato de potasio 100 mM (pH: 6,5), NADPH 0,1 mM, acetil-CoA 25 μ M y cantidades adecuadas de la enzima. La reacción se inició inmediatamente después del agregado de malonil-CoA 60 μ M. Se registró la variación de densidad óptica debido a la oxidación del NADPH. Una unidad de actividad enzimática representa 1 μ mol de NADPH oxidado por minuto a 37°C. La concentración de proteína se determinó empleando albúmina sérica bovina como estándar (26). Los resultados se expresaron como % relativo al grupo control.

b. Glucosa-6-fosfato-dehidrogenasa (G-6-PDH)

La actividad de la enzima G-6-PDH fue analizada como se describió anteriormente (27). Brevemente, aproximadamente 500 mg de hígado congelado se homogeneizaron con 10 volúmenes de buffer fosfato-bicarbonato (KHCO_3 70 mM, K_2HPO_4 85 mM, KH_2PO_4 9 mM, DTT 1 mM- pH: 8) y se centrifugaron durante 40 minutos a 15000 rpm, determinándose en el sobrenadante obtenido la actividad enzimática. La velocidad de formación de NADPH, expresada en μ mol/minuto, representa la actividad enzimática de G-6-PDH. La concentración de proteína del extracto se determinó empleando albúmina sérica bovina como estándar (26). Los resultados fueron expresados como mU/mg proteína.

c. Acetil CoA carboxilasa (ACC)

Un volumen de tejido hepático fue homogenizado en 3 volúmenes de buffer de homogenización [KH_2PO_4 9mM, K_2HPO_4

85mM, DTT 1 mM y KHCO_3 70 mM (pH 7,0)]. La fracción citosólica fue obtenida luego de una centrifugación a 30000 rpm durante 1 hora 30 minutos a 4°C (28). La actividad ACC se cuantificó espectrofotométricamente a 340 nm y a 37°C en una mezcla de reacción conteniendo: Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), citrato de potasio 10 mM, MgCl_2 10 mM, glutatión 3,75 mM (pH 8,0), albúmina sérica bovina 0,75 mg/ml, ATP 3,75 mM, acetil-CoA 0,125 mM, KHCO_3 25 mM, fosfoenolpiruvato 0,5 mM, NADH 0,125 mM, piruvato quinasa 15 μ g/ml, lactato dehidrogenasa 6 μ g/ml y enzima (hasta 5 mU) en un volumen final de 0,8 ml. Un volumen de 0,76 ml de mezcla conteniendo todos los ingredientes excepto ATP y KHCO_3 fue preincubado a 37°C durante 10 min. Luego de la adición de ATP, el consumo de NADH fue registrado espectrofotométricamente a 340 nm por 1 minuto iniciándose posteriormente la reacción por la adición de KHCO_3 (29). Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μ mol de malonil-CoA o ADP por minuto bajo las condiciones de ensayo descritas anteriormente. La concentración de proteínas se determinó empleando albúmina sérica bovina como estándar (26). Los resultados fueron expresados como mU/mg proteína.

Análisis estadísticos

Los resultados se expresan como media \pm SEM. El estudio estadístico entre grupos se realizó por análisis de varianza (ANOVA) y posterior test de Newman Keuls, para examinar las diferencias entre pares de medias (30). Valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Resultados

Ingesta calórica y curva de peso

La ingesta calórica y el peso corporal fueron cuidadosamente monitoreados en todos los grupos experimentales durante

las 3 semanas de ingesta. La **Figura 1** muestra una ingesta calórica y una ganancia de peso corporal comparables para los tres grupos experimentales.

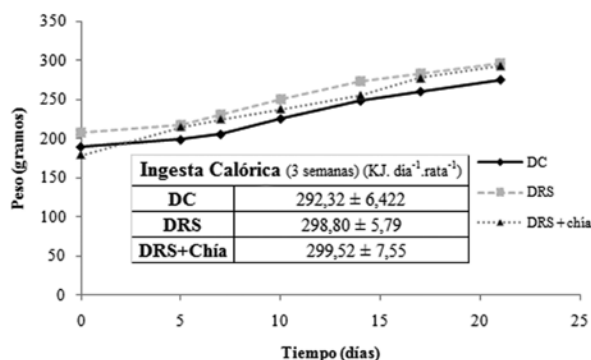


Figura 1: Curva de peso e ingesta calórica de ratas alimentadas durante 3 semanas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) o DRS + semilla de chíá (*Salvia hispánica* L.) Los valores son expresados como media ± SEM. Seis animales se incluyeron en cada grupo experimental.

Peso del tejido adiposo epididimal y retroperitoneal

Como se muestra en la **Tabla 3**, no se observaron diferencias significativas entre

los grupos de animales con respecto al peso total o relativo a 100g de peso corporal de los tejidos adiposos epididimal o retroperitoneal.

Tabla 3: Peso total y relativo del tejido adiposo epididimal y retroperitoneal de ratas alimentadas durante 3 semanas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) o DRS + semilla de chíá (*Salvia hispánica* L.)

	Peso Epidídimo		Peso Retroperitoneal	
	Total (g)	Relativo (g/100g de peso corporal)	Total (g)	Relativo (g/100g de peso corporal)
DC	4,18±0,09	1,39±0,02	3,34±0,4	1,11±0,02
DRS	4,12±0,19	1,37±0,04	3,44±0,08	1,15±0,02
DRS + chíá	4,18±0,13	1,43±0,05	3,21±0,09	1,10±0,03

Los valores son expresados como media ± SEM. Seis animales se incluyeron en cada grupo experimental.

Niveles de metabolitos séricos y contenido de triglicéridos en hígado

En la **Tabla 4** se observan los niveles plasmáticos de Tg, AGNE, glucosa e insulina, junto al contenido de Tg en el tejido

hepático de los animales alimentados con DC, DRS o DRS + chíá durante 3 semanas. Los niveles de Tg y AGNE del grupo de animales que ingirió la DRS fueron significativamente mayores a los observados en el

El reemplazo de la fuente de grasa dietaria en la DRS por la semilla de chíá fue capaz de prevenir estas alteraciones.

Luego de 3 semanas de ingesta, los niveles de glucosa en plasma fueron comparables entre los grupos experimentales y la hiperinsulinemia inducida por la DRS (21,

31) fue confirmada en el presente estudio, logrando ser parcialmente disminuida en los animales alimentados con DRS + chíá. La administración de la semilla de chíá dietaria previno la esteatosis hepática (substancial incremento del contenido de triglicéridos en hígado) inducida por la DRS (**tabla 4**).

Tabla 4: Parámetros plasmáticos y contenido de triglicéridos en hígado de ratas alimentadas durante 3 semanas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) o DRS + semilla de chíá (*Salvia hispánica* L.)

	DC	DRS	DRS + chíá
Glucosa (mM)	6,6±0,3	6,5±0,3	7,0±0,4
Insulina (μU/ml)	61,4±3,9 ^b	92,0±4,3 ^a	81,0±11,0 ^{a,b}
AGNE (μM)	251,3±18,5 ^b	596,2±24,3 ^a	242,2±15,5 ^b
Triglicéridos (mM)	0,67±0,04 ^b	1,50±0,12 ^a	0,55±0,03 ^b
Tg hepáticos (μmol/g tej húm)	10,4±0,5 ^b	18,4±1,2 ^a	10,8±0,6 ^b

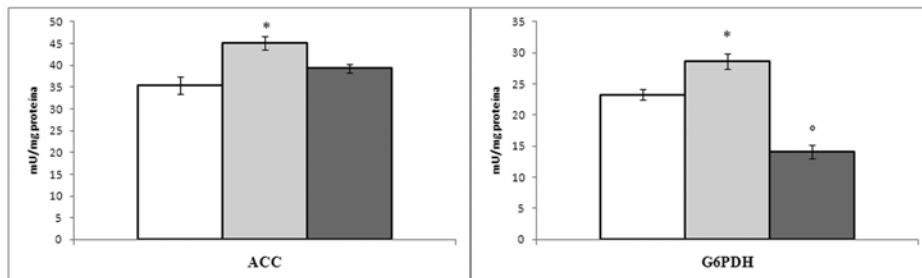
Los valores son expresados como media ± SEM. Seis animales se incluyeron en cada grupo experimental. Los valores en cada fila que no comparten la misma letra superescrita son significativamente diferentes ($p < 0,05$) cuando una variable a la vez es comparada con el test de Newman Keuls´.

Actividad de enzimas lipogénicas en tejido hepático

La **Figura 2** muestra la actividad de las enzimas lipogénicas acetil-CoA carboxilasa (ACC) y glucosa-6-fosfato dehidrogenasa (G6PDH) en hígado de ratas alimentadas durante 3 semanas con las diferentes dietas experimentales. La actividad enzimática ACC incrementó significativamente ($p < 0,05$) en el grupo DRS en relación al grupo DC. El reemplazo de la fuente de grasa, aceite de maíz por semilla de chíá en la DRS, previno este incremento, observándose en el grupo DRS + chíá valores comparables con aquellos obtenidos para el grupo alimentado con dieta control.

La actividad enzimática G6PDH aumentó ($p < 0,05$) en el grupo DRS y descendió significativamente ($p < 0,05$), inclusive hasta valores menores a los obtenidos para el grupo DC, cuando se reemplaza la fuente de grasa aceite de maíz por semilla de chíá. Además, analizando la actividad enzimática sintetasa de ácidos grasos (SAG) observamos que la misma incrementa significativamente en el grupo de animales alimentados con DRS alcanzando niveles semejantes al grupo DC cuando se administró semilla de chíá. Los valores obtenidos fueron: media ± SEM % relativo a dieta control; DRS 170 ± 7 y DRS + chíá 120 ± 10; $p < 0,05$ DRS vs DC y DRS + chíá.

Figura 2: Actividad enzimática acetil-CoA carboxilasa (ACC) y glucosa-6-fosfato dehidrogenasa (G6PDH) en tejido hepático de ratas alimentadas durante 3 semanas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) o DRS + semilla de chíá (*Salvia hispánica* L.)



Los valores son expresados como media \pm SEM. Seis animales se incluyeron en cada grupo experimental. * $p < 0,05$ DRS vs DC y DRS + chíá, $^{\circ}p < 0,05$ DRS + chíá vs DC.

□ DC: dieta control; ■ DRS: dieta rica en sacarosa; ■ DRS + Chíá: DRS + semilla de chíá.

Discusión

En el presente trabajo, el aceite de maíz (rico en ácido linoleico 18:2 ω -6, LA) fue reemplazado por semilla de *Salvia hispánica* L. (chía, rica en 18:3 ω -3, ALA) como fuente de grasa en la dieta, con el objetivo de estudiar si esta intervención nutricional induciría modificaciones en las actividades de enzimas clave de la lipogénesis en hígado (ACC, SAG y G6PDH) que contribuyen a prevenir la esteatosis hepática y alteraciones lipídicas plasmáticas inducidas en animales de experimentación por la administración de una DRS durante 3 semanas.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

1. La semilla de chíá fue capaz de prevenir la dislipemia sin cambios en los niveles plasmáticos de glucosa. La hiperinsulinemia inducida por la ingesta de una DRS logró ser parcialmente disminuida en los animales alimentados con DRS + chíá durante 3 semanas.

2. La administración de la semilla de chíá dietaria previno la esteatosis hepática

inducida por la ingesta de DRS. Este efecto fue acompañado por una prevención en el incremento de las actividades enzimáticas ACC, SAG y G6PDH en hígado, alcanzando esta última, valores inclusive por debajo de los observados para el grupo control.

Hemos demostrado previamente (7) que la administración de una DRS durante 3 semanas a ratas Wistar normales, conduce al desarrollo de hipertrigliceridemia como resultado de una acelerada secreción hepática de VLDL-Tg y una menor remoción plasmática de triglicéridos circulantes. Esto se asocia con un mayor contenido de Tg hepáticos. Este efecto sería producido tanto a través de un incremento en las actividades de las enzimas lipogénicas como constatamos en el presente trabajo así como a una disminución en la actividad de las enzimas involucradas en la oxidación de ácidos grasos (7, 3, 32).

El reemplazo de la fuente de grasa de la dieta, aceite de maíz por semilla de Chíá, logró prevenir el incremento de la actividad

de enzimas clave de la lipogénesis, manteniendo los niveles plasmáticos y la concentración de triglicéridos hepáticos. En este contexto, Poudyal y col (33) demostraron recientemente que la administración de semilla de chía a ratas que recibieron una dieta rica en carbohidratos y grasas durante 8 semanas, induce una redistribución lipídica que logra disminuir la esteatosis hepática, generando un efecto hepatoprotector. Kim y col. (34) demostraron que la disminución de la expresión génica y de la actividad de la enzima hepática SAG, cumpliría un rol importante en el efecto hipolipemiante observado en ratas normales alimentadas con aceite de perilla (rico en ALA). Por su parte, Ide y col (20) demostraron en hígado de ratas normales, que la administración de ALA en la dieta incrementa significativamente los niveles de ARNm de varias enzimas relacionadas con la oxidación de ácidos grasos. En el presente trabajo no determinamos la actividad de enzimas claves de la oxidación de ácidos grasos hepáticos tales como la oxidasa de ácidos grasos y carnitina palmitoil transferasa 1. Sin embargo, es bien aceptado que ALA es un sustrato preferido para la β -oxidación y por lo tanto está menos disponible para la síntesis de triglicéridos y posterior síntesis y secreción de lipoproteínas ricas en triglicéridos, contribuyendo a disminuir sus niveles plasmáticos (35).

Además, ALA, el ácido graso principal presente en la semilla de chía, puede ser convertido en el hígado a través de una secuencia de reacciones enzimáticas principalmente a eicosapentaenoico 20:5 ω -3 (EPA) y en menor grado a docosahexaenoico 22:6 ω -3 (DHA). La efectividad de esta conversión puede determinar sus efec-

tos sobre los lípidos plasmáticos. Tanto las cantidades absolutas de ALA como la relación LA: ALA dietaria influyen la conversión de ALA a EPA como resultado de la competencia entre los ácidos grasos de la familia ω -3 y ω -6 por las desaturasas, ya que LA reduce los niveles de Δ 6 desaturasa (36). Jeffery y col. (37) mostraron un efecto máximo hipotrigliceridémico en ratas alimentadas con una relación dietaria de LA: ALA de 0.33, sugiriendo que el efecto de ALA se debería a un incremento de PUFA ω -3 de cadena larga EPA y DHA en los lípidos de las membranas celulares (37, 38). En el presente trabajo, la relación dietaria LA: ALA fue de 0,287.

EPA y DHA regulan a nivel hepático la expresión génica de enzimas involucradas en la síntesis "de novo" y oxidación de ácidos grasos a través del PPAR α (upregulation) y del SREBP1c (downregulation). Esto en parte explicaría la disminución de la esteatosis hepática y dislipidemia observada en los animales alimentados con DRS en donde la semilla de chía fue administrada como fuente de grasa dietaria. En este contexto, en un estudio anterior de nuestro grupo de trabajo (18) constatamos un significativo incremento de EPA y DHA y de la relación ω -3: ω -6 en el plasma de los animales alimentados con DRS durante 3 semanas a los que se les sustituyó el aceite de maíz por semilla de chía en la dieta.

Finalmente, los resultados obtenidos muestran a nivel experimental algunos aspectos sobre los posibles efectos beneficiosos de la semilla de chía (rica en ALA, fibras y minerales) como fuente grasa dietaria sobre la homeostasis lipídica en modelos de dislipemia e insulino resistencia, los cuales mimetizan en muchos aspectos bio-

químicos, metabólicos y funcionales a los descritos en el síndrome metabólico del humano. Sin embargo, debemos ser prudentes al extrapolar estos resultados ya que la eficacia de la bioconversión de ALA a EPA y DHA es baja en el humano (39, 40). Vuk-san y col. (41) han demostrado que la suplementación por un largo período de tiempo (12 meses) con semilla de chía a pacientes con diabetes mellitus tipo 2 controlada, atenúa factores de riesgo cardiovascular como la presión sanguínea sistólica, mientras que mantiene un buen control glucémico y lipídico. Estos pacientes mostraron además un incremento en las concentraciones de ALA y EPA en suero sin cambios en el peso corporal. En otro estudio, Nieman y col (42) no observaron cambios de peso ni de presión arterial en personas obesas que consumieron chía durante 3 meses. El menor período de administración de la semilla de chía (3 vs 12 meses) podría ser un factor determinante de los resultados obtenidos por este último grupo de trabajo.

Agradecimientos

El presente estudio fue financiado por subsidios CONICET PIP #0105 (2010) y CAI+D PI-8-37 (2010).

Bibliografía

1. Cornier, M.; Dabelea, D.; Hernandez, T.L.; Lindstrom, R.C.; Steig, A.J.; Stob, N.R.; Van Pelt, R.E.; Wang, H.; Eckel, R.H. 2008. The Metabolic Syndrome. *The Endocrine Society Review*, **29**: 777–822.
2. Schargrodsky, H.; Hernandez-Hernandez, R.; Champagne, M.; Silva, H.; Vinueza, R.; Silva Ayçaguer, L.C.; Touboul, P.J.; Boissonnet, C.P.; Escobedo, J.; Pellegrini, F.; Macchia, A.; Wilson, E. 2008. CARMELA: Assessment of cardiovascular risk in seven latinamerican cities. *AM. J. Med.* **121**:58-65.
3. Lombardo, Y.B.; Chicco, A. 2008. Biochemical and molecular mechanisms of n-3 polyunsaturated fatty acids. Effects in obesity, IR and cardiovascular dysfunction. *Advances in Lipids Metabolism*, 43-68. ISBN: 978-81-308-0246-6.
4. Clarke, S.D. 2001. Polyunsaturated Fatty Acid Regulation of Gene Transcription: A Molecular Mechanism to Improve the Metabolic Syndrome. *Journal of Nutrition*, **131**: 1129–1132.
5. Connor, W.E. 2000. Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *Am. J. Clin. Nutr.* **71**, Suppl., 171S-175S.
6. Li, Z.; Lamon-Fava, S.; Otvos, J.; Lichtenstein, A.H.; Velez-Carrasco, W.; McNamara, J.R.; Ordovas, J.M.; Schaefer, E.J. 2004. Fish consumption shifts lipoprotein subfractions to a less atherogenic pattern in humans. *Journal of Nutrition*, **134**: 1724-1728.
7. Lombardo, Y.B.; Chicco, A. 2006. Effects of dietary polyunsaturated n-3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and humans. A review. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **17**: 1-13.
8. Ghafoorunissa, A.I.; Laxmi, R.; Vani, A. 2005. Dietary (n-3) long chain polyunsaturated fatty acids prevents sucrose-induced insulin resistance in rats. *J. Nutr.* **135**: 2634-2638.
9. Lauritzen, I.; Blondeau, N.; Heurteaux, C.; Widmann, C.; Romey, G.; Lazdunski, M. 2001. Polyunsaturated fatty acids are potent neuroprotectors. *EMBO J* **19**: 1784-1793.
10. Simopoulos, A.P. 1999. Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am. J. Clin. Nutr.*, **70**:560S–9S.
11. Ghafoorunissa, A.I.; Saravanan, N. 2005. Substituting dietary linoleic acid with α -linolenic acid improves insulin sensitivity in sucrose fed rats. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1733**: 67-75.

12. Ayerza R. and Coates W. 2005. Ground chia seed and chia oil effects on plasma lipids and fatty acids in the rat, *Nutr Res* **25**, 995–1003.
13. Ayerza R. 2009. The seed's protein and oil content, fatty acid composition, and growing cycle length of a single genotype of chia (*Salvia hispanica* L.) as affected by environmental factors, *J Oleo Sci* **58**, 347–354.
14. Ayerza R. Jr. and Coates W. 2007. Effect of dietary alpha-linolenic fatty acid derived from chia when fed as ground seed, whole seed and oil on lipid content and fatty acid composition of rat plasma, *Ann Nutr Metab* **51**, 27–34.
15. Reaven, G.M.; Risser, T.R.; Chen, Y.D.; Reaven, E.P. 1979. Characterization of a model of dietary-induced hypertriglyceridemia in young, nonobese rats. *J. Lipid Res.* **20**: 371-378.
16. Schonfeld, G.; Pflieger, B. 1971. Utilization of exogenous free fatty acids for the production of very low density lipoprotein triglyceride by livers of carbohydrate-fed rats. *Journal of Lipid Research*, **12**: 614-621.
17. Lombardo, Y. B., Drago, S., Chicco, A., Fainstein-Day, P., Gutman, R., Gagliardino, J. J. & Gomez Dumm, C. L. 1996. Long-term administration of a sucrose-rich diet to normal rats: relationship between metabolic and hormonal profiles and morphological changes in the endocrine pancreas. *Metabolism* **45**:1527-1532.
18. Chicco A.G., D'Alessandro M.E., Hein G.J., Oliva M.E. and Lombardo Y.B. 2009. Dietary chia seed (*Salvia hispanica* L.) rich in alpha-linolenic acid improves adiposity and normalises hypertriacylglycerolaemia and insulin resistance in dyslipaemic rats, *Br J Nutr* **101**, 41–50.
19. Kim, H.K.; Choi, H. 2001. Dietary alpha-linolenic acid lowers postprandial lipid levels with increase of eicosepentaenoic and docosehexaenoic acid contents in rat hepatic membrane. *Lipids* **36**:1131-1136.
20. Ide, T.; Kobayashi, H.; Ashakumary, L; Rouyer, I.A.; Takahaswhi, T.; Aoyama, T.; Hashimoto, T.; Mizugaki, M. 2000. Comparative effects of perilla oil and fish oil on the activity and gene expression of fatty acid oxidation enzymes in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta.* **1485**: 23-35.
21. Chicco A, D'Alessandro ME, Karabatas L, Pastorale C, Basabe JC and Lombardo YB. 2003. Muscle Lipid Metabolism and Insulin Secretion Are Altered in Insulin-Resistant Rats Fed a High Sucrose Diet. *J Nutr* **133**: 127-133.
22. Lombardo YB, Chicco A, D'Alessandro ME, Martinelli M, Soria A and Gutman R. 1996. Dietary fish oil normalizes dyslipemia and glucose intolerance with unchanged insulin levels in rats fed a high sucrose diet. *Biochem. Biophys. Acta,* **1299**: 175–182.
23. Herbert V, Lau KS, Gottlieb CH, Bleicher S. 1965. Coated charcoal immunoassay of insulin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.,* **25**: 1375-1384.
24. Laurell S. 1966. A method for routine determination of plasma triglyceride. *Scan. J. Clin. Lab. Invest.,* **18**: 668-672.
25. Halestrap AP and Denton RM. 1973. Insulin and the regulation of adipose tissue acetylCoA carboxylase. *Biochem. J.,* **132**: 509-517.
26. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.,* **193**: 265-275.
27. Chicco A, D'Alessandro ME, Karabatas L, Gutman R, Lombardo YB. 1996. Effect of moderate levels of dietary fish oil on insulin secretion and sensitivity, and pancreas insulin content in normal rats. *Ann. Nutr. Metab.,* **40** (2): 61-70.
28. Zimmermann R, Haemmerle G, Wagner EM, Strauss JG, Kratky D, Zechner R. 2003. Decreased fatty acid esterification compensates for the reduced lipolytic activity in hormone-sensitive lipase-deficient white adipose tissue. *J Lipid Res*, **44** (11): 2089-99.
29. Tanabe T, Nakahishi S, Hashimoto T, Ogiwara H, Nakaw J, Numa S. 1981. Acetyl-CoA

- carboxylase from rat. In: Methods in enzymology. Lowenstein JM (ed), Academic Press, New York, **71**:5-16.
- 30.** Snedecor GW, Cochran WG. 1967. Statistical methods applied to experimental in agriculture and biology. Ames (Iowa): The Iowa State University Press; 339-50.
- 31.** Lombardo YB, Chicco A, Mocchiutti N, Rodi M, Nusimovich B and Gutman R. 1983. Effects of sucrose diet on insulin secretion in vivo and in vitro and triglyceride storage and mobilization of heart of rats. *Horm. Metab. Res.*, **15**:69-76.
- 32.** Nagai, Y.; Nishio, Y.; Nakamura, T.; Maegawa, H.; Kikkawa, R.; Kashiwagi, A. 2002. Amelioration of high fructose induced metabolic derangements by activation of PPAR. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **282**: E1180-E1190.
- 33.** Poudyal H, Panchal S, Waanders J, Ward L and Brown L. 2011. Lipid redistribution by α -linolenic acid-rich chia seed inhibits stearoyl-CoA desaturase-1 and induces cardiac and hepatic protection in diet-induced obese rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. En prensa. Web: 22-3-2011.
- 34.** Kim, H.; Sungwon, C.; Haymie, C. 2004. Suppression of hepatic fatty acid synthase by feeding α -linolenic acid rich perilla oil lowers plasma triacylglycerol level in rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **15**: 485-492.
- 35.** Ide, T.; Murata, M.; Sugano, M. 1996. Stimulation of the activities of hepatic fatty acid oxidation enzymes by dietary fat rich in α -linolenic acid in rats. *J. Lip. Res.* **37**: 448-63.
- 36.** Benatti P, Peluso G, Nicolai R and Calvani M. 2004. Polyunsaturated Fatty Acids: Biochemical, Nutritional and Epigenetic Properties. *J Am Coll Nutr* **23**:281-302.
- 37.** Jeffery, N.M.; Sanderson, P.; Sherrington, E.J.; Newsholme, E.A. ; Calder, P.C. 1996. The ratio of n-6 to n-3 polyunsaturated fatty acids in the rat diet alters serum lipid levels and lymphocyte functions. *Lipids*, **31**: 737-745.
- 38.** Ihara, M.; Umewaka, H.; Takahashi, T.; Furuichi, Y. 1998. Comparative effects of short and long-term feeding of safflower oil and perilla oil on lipid metabolism on rats. *Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Moll. Biol.* **121**: 223-231.
- 39.** Burdge, G.C.; Calder, P.C. 2005. Conversion of α -linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in humans adults. *Reprod. Nutr. Dev.* **45**: 581-597.
- 40.** Ratnayake W.M. and Galli C. 2009. Fat and fatty acid terminology, methods of analysis and fat digestion and metabolism: a background review paper, *Ann Nutr Metab* **55**, 8–43.
- 41.** Vuksan, V.; Whitham, D.; Sievenpiper, J.L.; Jenkins, A.L.; Rogovik, A.L.; Bazinet, R.P.; Vidgen, E.; Hanna, A. 2007. Supplementation of conventional therapy with the novel grain Salba (*Salvia hispanica* L.) improves major and emerging cardiovascular risk factors in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, **30**: 2804-2810.
- 42.** Nieman D.C., Cayea E.J., Austin M.D., Henson D.A., McAnulty S.R. and Jin F. 2009. Chia seed does not promote weight loss or alter disease risk factors in overweight adults, *Nutr Res* **29**, 414–418.