



Evaluación *in vivo/in vitro* de la capacidad antioxidante del LECISAN

In vivo/in vitro evaluation of the antioxidant capacity of LECISAN

Leidys Cala Calviño ^{1*}, Haydée Cruz Vadell ¹, Yaixa Beltrán Delgado ², David Garrido Larramendi ³,
Onel Fong Lores ³

¹ Universidad de Ciencias Médicas de Santiago de Cuba. Santiago de Cuba, Cuba.

² Universidad de Oriente, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Centro de Estudios de Biotecnología Industrial. Santiago de Cuba, Cuba.

³ Centro de Toxicología y Biomedicina (TOXIMED). Santiago de Cuba, Cuba.

*Autor para la correspondencia: leidyscalacalvino@gmail.com

Cómo citar este artículo

Cala Claviño L, Cruz Vadell H, Beltrán Delgado Y, Garrido Larramendi D, Fong Lores O. Evaluación *in vivo/in vitro* de la capacidad antioxidante del LECISAN. Rev haban cienc méd [Internet]. 2023 [citado];22(3):e5323; Disponible en: <http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/5323>

Recibido: 15 de junio de 2023

Aprobado: 20 de junio de 2023

RESUMEN

Introducción: La lecitina de soya es un suplemento dietético altamente demandado, con supuestos beneficios como antioxidante, basados en su alto contenido de ácidos grasos.

Objetivo: Determinar el efecto preclínico de la lecitina de soya en el estado oxidativo de ratas Wistar y en eritrocitos humanos como biomodelo farmacológico *in Vitro*

Material y Métodos: Se realizó un estudio de farmacología no clínica experimental para determinar perfil oxidativo en ratas Wistar tras la administración de lecitina de soya en dosis consideradas como máximas y mínimas, y comparar los efectos con grupo control no suplementado. Posteriormente, se realizó un estudio prospectivo, experimental y no clínico-farmacológico en eritrocitos humanos como biomodelo farmacológico, según test de hemólisis, con tres grupos experimentales a diferentes concentraciones del producto de ensayo, un control positivo y uno, negativo. Las diferencias entre los grupos experimentales se evidenciaron mediante test ANOVA de Kruskal Wallis y test post hoc de Dunn con un nivel de significación menor de 5%.

Resultados: Se redujeron los marcadores de estrés oxidativo *in vivo* en los grupos de administración, resultaron más evidente a mayor dosis, con tendencia a estabilidad en valores de catalasa. La lecitina de soya empleada mostró signos de hemólisis y el estudio de microscopía óptica expuso daños morfológicos severos en los eritrocitos tratados adicionalmente con el producto ensayado y H₂O₂.

Conclusiones: Los resultados obtenidos sugieren la existencia de un efecto pro oxidante al inducir estrés oxidativo *in vivo* y hemólisis eritrocitaria *in vitro*.

ABSTRACT

Introduction: Soy lecithin is a highly demanded dietary supplement, with supposed benefits as antioxidants based on its high fatty acid content.

Objective: To determine the preclinical effect of soy lecithin on the oxidative status of Wistar rats and on human erythrocytes as an *in vitro* pharmacological biomodel.

Material and Methods: An experimental non-clinical pharmacology study was carried out to determine the oxidative profile in Wistar rats after the administration of soy lecithin in maximum and minimum doses, and to compare the effects with the non-supplemented control group. Subsequently, a prospective, experimental and non-clinical pharmacological study was carried out in human erythrocytes as a pharmacological biomodel according to the hemolysis test, with three experimental groups at different concentrations of the test product, a positive control and a negative control. The differences between the experimental groups were evidenced by the Kruskal Wallis ANOVA test and Dunn's post hoc test with a significance level of less than 5%.

Results: *In vivo* oxidative stress markers were reduced in the administration groups, becoming more evident at higher doses, with a tendency towards stability in catalase values. The soy lecithin used showed signs of hemolysis, and the optical microscopy study showed severe morphological damage in the erythrocytes additionally treated with the tested product and H₂O₂.

Conclusions: The results obtained suggest the existence of a pro-oxidant effect by inducing oxidative stress *in vivo* and erythrocyte hemolysis *in vitro*.

Palabras Claves:

Lecitina de soya, estrés oxidativo, test de hemólisis, estudio *in vitro*.

Keywords:

Soy lecithin, oxidative stress, hemolysis test, *in vitro* study.



INTRODUCCIÓN

El suplemento nutricional LECISAN resulta demandado por sus supuestos efectos antioxidantes. En su composición predominan los fosfolípidos que cumplen funciones estructurales de la membrana celular y proporcionan permeabilidad y carga eléctrica necesarias para que las enzimas y otras proteínas transportadoras de membrana, realicen sus funciones.^(1,2) Según refieren Suárez-Carmona y col. participan como segundos mensajeros en la transmisión de señales al interior de la célula y activan enzimas que participan en la síntesis de sustancias de señalización celular.⁽³⁾

La lecitina experimenta hidrólisis en el tracto gastrointestinal y origina la formación de N-óxido de trimetilamina (TMAO), que induce mutaciones genéticas y aberraciones cromosómicas estructurales. La colina liberada se desalquila a dimetilamina. La nitrosación puede ocurrir en condiciones fisiológicas y se ha demostrado que 85 % de las nitrosamidas producen cáncer en animales de laboratorio.⁽⁴⁾ TMAO tiene efecto proinflamatorio, perturba la función endotelial mediante generación de estrés oxidativo (EO).^(5,6,7)

La obesidad se asocia con elevados niveles de marcadores de daño oxidativo debido posiblemente a alteraciones metabólicas en la mitocondria,⁽⁸⁾ baja defensa antioxidante, inflamación crónica y la generación posprandial de especies reactivas de oxígeno (ROS). La malonildialdehído (MDA) alterada se asocia con un aumento de los triglicéridos.⁽⁹⁾ Las glutatión transferasas (GST) son cruciales en el proceso de desintoxicación celular al catalizar el ataque nucleofílico del glutatión reducido (GSH) en sustratos electrofílicos tóxicos, y producen un compuesto menos peligroso. Las actividades elevadas de las enzimas catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD) pueden ser manifestación de una mayor producción de ROS, especies reactivas del nitrógeno (RNS) y especies reactivas del azufre (RSS) en eritrocitos humanos.⁽¹⁰⁾

La eritropoyesis presenta un problema particular para la regulación redox, ya que la presencia de hierro, hemo y cadenas de globina desapareadas conducen a altos niveles de EO mediado por radicales libre.⁽¹¹⁾ El EO tiene un papel importante en la alteración de la integridad de la membrana y la fragilidad de células rojas de la sangre (Red Blood Cells, RBC de sus siglas en inglés), por lo que existen estudios *in vitro* que los emplean como biomodelos para evaluar efecto redox de la exposición a determinados productos en estudio.⁽¹²⁾ No existen evidencias mediante estudios no clínicos y clínicos en el contexto cubano que demuestren el efecto antioxidante de este suplemento nutricional desarrollado en el país. El estudio de sus efectos pudiera facilitar el reposicionamiento del mismo como medicamento natural, aspecto que permitiría su uso racional.

Se propone un estudio experimental de farmacología no clínica con el **objetivo** de determinar el efecto de la lecitina de soya, materia prima empleada para la producción del suplemento nutricional registrado LECISAN®, sobre el estado oxidativo en ratas Wistar y en eritrocitos humanos como biomodelo farmacológico *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron dos estudios no clínicos. Uno, *in vivo* en ratas Wistar y otro, *in vitro* en eritrocitos humanos como biomodelo farmacológico, según test de hemólisis. La investigación se desarrolló durante 2022, en el Centro de Toxicología y Biomedicina (TOXIMED) y el Laboratorio de Ciencias Básicas de la Universidad de Ciencias Médicas de Santiago de Cuba.

Procedimientos de tenencia y manejo de los animales de experimentación

Se utilizaron 18 ratas Wistar de sexo femenino, peso 200±70 gramos y 10 semanas, suministradas por el Centro de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), pertenecientes a la categoría sanitaria convencional, con sus correspondientes certificados de calidad higiénico-sanitaria y genética. La manipulación de los animales se realizó según las recomendaciones orientadas al respecto, cumpliendo los procedimientos de cuarentena.⁽¹³⁾ Se seleccionaron al azar y se albergaron en cajas plásticas traslúcidas (cajas T2), con tapas de rejilla de acero inoxidable, recambiable y encamado previamente esterilizado. El alimento comercial para la especie, suministrado por el CENPALAB (pellet), y el agua, fueron suministrados *ad libitum*. La habitación contó con régimen de iluminación de 12 h luz y 12 h de oscuridad, temperatura ambiental de 22 ± 2 °C y la humedad relativa de 60 ± 5 %.

Técnicas y procedimientos para determinar estrés oxidativo *in vivo*

Se dividieron en tres grupos (n=6). Los grupos experimentales recibieron lecitina de soya por vía oral mediante cánula intragástrica 16 G durante 30 días, a dosis equivalentes a 600 (8,57 mg/kg para el peso de la rata) y 300 (4,29 mg/kg) miligramos/día⁽¹⁾ en un humano de peso promedio 70 kg. El grupo control para comparación, sólo recibió la alimentación habitual y el mismo volumen de agua destilada en el momento de la administración. Se determinó el perfil oxidativo en suero, según valores descritos para GSH⁽¹⁴⁾, CAT⁽¹⁵⁾ y MDA.⁽¹⁶⁾

Técnicas y procedimientos para evaluar efecto redox *in vitro*

Se realizó el ensayo de RBC o test de hemólisis y se desarrolló según el Protocolo No. 37 de *Invitox*.⁽¹²⁾

Preparación de las disoluciones y muestras a evaluar

Se emplearon eritrocitos aislados de sangre fresca de voluntarios sanos. Se colectaron muestras de 10 ml y se añadieron en tubos de ensayo con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (1:10) y el plasma fue separado por centrifugación (2500 r.p.m x 15 minutos, *ependorf*, 5702 R, Alemania) y luego fue descartado. La suspensión de eritrocitos fue lavada con una solución estéril de búfer fosfato (PBS) (PBS: 0,2 g de K₂HPO₄, 1,8 g de glucosa y 9 g de NaCl, pH 7,4) cuatro veces hasta que el sobrenadante se observó incoloro y el sedimento fue reconstituido (1:40 v/v, 8 x 10⁻⁹ células/ml). La suspensión de RBC, se preparó antes del ensayo.⁽¹⁷⁾

La lecitina de soya fue solubilizada en dimetilsulfóxido (DMSO) puro para análisis, y se prepararon tres concentraciones al 0,0625, 0,125 y 0,250 µg/mL, a partir de una disolución preparada con contenido de sólidos totales de 7 mg/ml. Todas las muestras se prepararon por triplicado.

Procedimientos para determinar porcentaje de hemólisis inducido por lecitina de soya en eritrocitos humanos

Las suspensiones de eritrocitos fueron tratadas con PBS (control negativo) y H₂O₂ (control positivo). Una parte fue dividida en 3 grupos experimentales:

- Control negativo (contiene 250 µl de suspensión de eritrocitos, 1250 µl de PBS).
- Control positivo (contiene 250 µl de suspensión de eritrocitos, 955 µl de PBS y 300 µl de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (10 mM)).
- Actividad hemolítica de las sustancias de ensayo (contiene 250 µl de suspensión de eritrocitos, 250 µl de las diluciones a diferentes concentraciones de lecitina de soya (L1-0,0625, L2-0,125 y L3-0,250 µg/mL) y 700 µl de PBS).

Todos los grupos experimentales se incubaron durante una hora a 37 °C en baño termostático (*Precistern Selecta*, S-140, España) con agitación cada 10 min en vortex (*Heidolph REAX 2000*). Finalizada la incubación, los tubos fueron centrifugados con el fin de separar las células intactas y el detritus. Se midió la absorbancia del sobrenadante obtenido a 530 nm en espectrofotómetro UV/VIS (*PG Instruments T60*, Reino Unido) contra una solución blanco (control negativo) a cada una de las diluciones correspondientes, con el objetivo de determinar el contenido de hemoglobina (hemólisis) mediante el logaritmo del tiempo y la concentración con un enfoque de regresión lineal. El porcentaje de hemólisis se calculó con el empleo de la siguiente ecuación:

$$PH (\%) = \frac{A1}{A2} * 100 \quad [1]$$

donde: PH (%) = porcentaje de hemólisis, A1 =densidad óptica del control negativo y A2 = densidad óptica de muestra de prueba en el medio oxidante o control positivo.

Procedimientos para determinar cambios morfológicos de los eritrocitos

Un volumen de 50 µL del sedimento de RBC de cada experimento fue añadido en láminas de vidrio para la realización de un frotis sanguíneo, teñido con Giemsa. Posteriormente las muestras fueron visualizadas en un microscopio de transmisión de luz (*Leica DM 1000*, Alemania) acoplado con cámara digital (*Leica MC 170 HD*, 400×, 2592 × 1944 pixeles, Alemania). Se consideraron cambios morfológicos observados los inducidos lecitina de soya y por el H₂O₂ como agente oxidante en los RBC tales como cambio de forma de eritrocitos e integridad de la membrana; presencia/ausencia de deformaciones, y se consideraron otras alteraciones morfológicas.⁽¹⁸⁾

Procesamiento estadístico de los datos

Los registros sobre la base de datos permitieron el procesamiento estadístico-matemático de los resultados con el sistema SS® versión 23.0 (SPSS, Inc., Philadelphia) para WINDOWS® (Microsoft, Redmond, Virginia). Las diferencias entre los grupos experimentales se evidenciaron mediante test ANOVA de Kruskal Wallis y test post hoc de Dunn con un nivel de significación menor del 5 % para ambos.

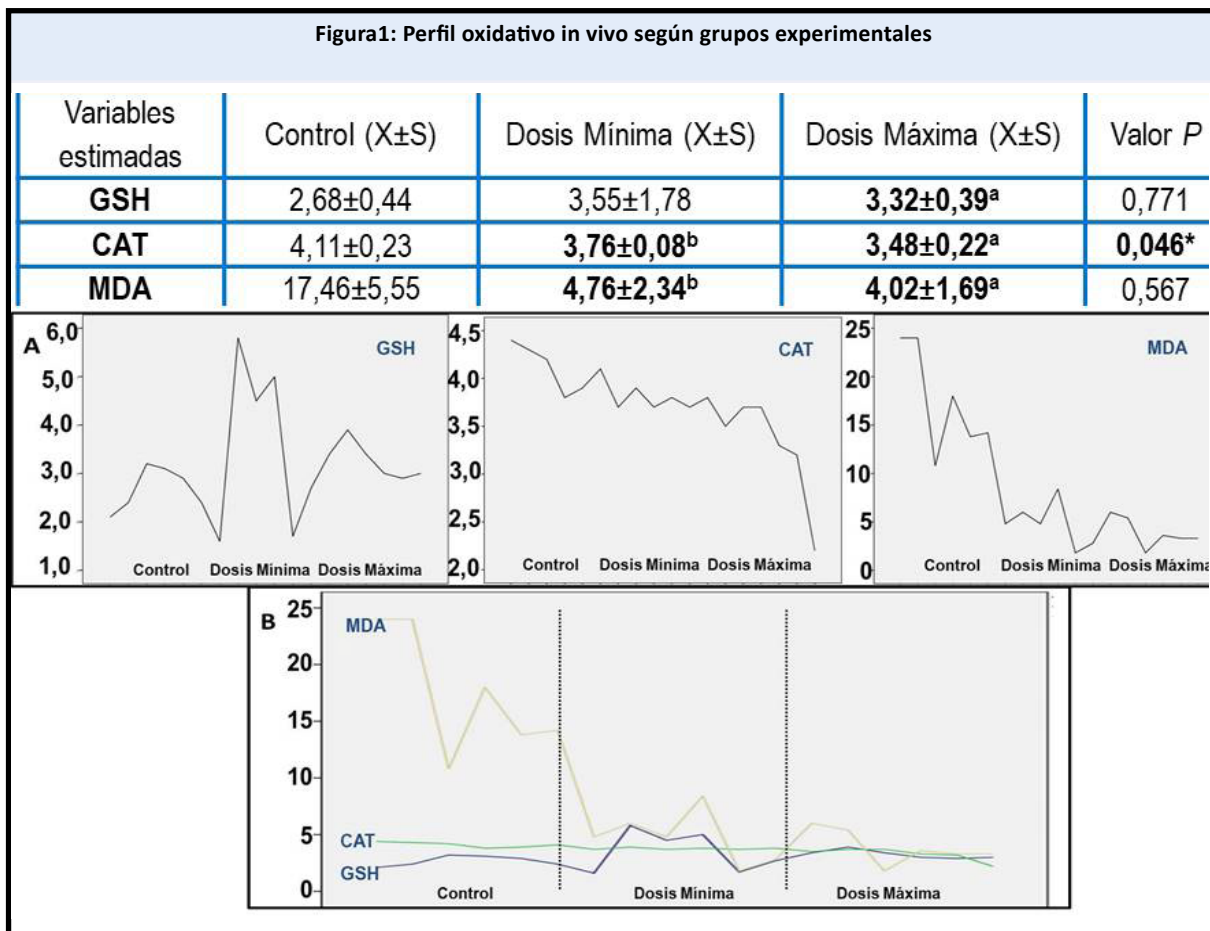
Aspectos Éticos

Todos los protocolos en el estudio estuvieron sometidos a la consideración, análisis y aprobación del Comité Institucional para el Uso y Cuidado del Animal de Laboratorio.⁽¹⁹⁾ Este trabajo forma parte del proyecto “Efectos nutricionales, farmacología y toxicología preclínica del LECISAN®” que tiene el propósito de aportar elementos que avalen el producto, registrado actualmente como suplemento nutricional.

RESULTADOS

Los biomodelos que recibieron lecitina de soya a dosis mínima mostraron valores significativos para CAT y MDA respecto al control, no así GSH, que resultó no significativo. En el grupo que recibió lecitina de soya a dosis máxima todos los marcadores de EO resultaron significativos respecto al control. En el análisis entre los grupos que recibieron la administración, solo se encontró significación para CAT.

Se observó en la CAT tendencia a estabilidad de sus valores en los tres grupos, con variaciones discretas intragrupos. Puede apreciarse la reducción de forma general de las variables estimadas como marcadores de EO en los grupos de administración, que resultó más evidente en el grupo de los animales que recibieron lecitina de soya a dosis máxima (Figura 1).



Leyenda: GSH: glutatión reducido; CAT: catalasa; MDA: malonildialdehído
 X– media; S– desviación estándar para las series experimentales; *p< 0.05, prueba ANOVA de Kruskal Wallis; letras distintas identifican diferencias en las comparaciones entre grupos, prueba de Dunn

Se utilizó la prueba de Levene para analizar el porcentaje de hemólisis como prueba estadística inferencial que permitió evaluar la igualdad de las varianzas para los grupos experimentales, lo que posibilitó suponer varianzas distintas y rechazar el supuesto de homogeneidad, al realizar mediciones a diferentes concentraciones, que resultó no significativo en todos los casos.

Los niveles de absorbancia a 530 nm, 540 nm y 575 nm determinados por espectrofotometría aparecen en la Tabla 1. Para las diferentes concentraciones de lecitina de soya, resultaron significativos con valor p<0.005 en todos los grupos. El test ANOVA de un factor para Kruskal Wallis reveló diferencias significativas en los grupos experimentales a A 540 nm (p=0,003) y A 575 nm (p=0,023) y reveló también un comportamiento similar en la comparación de grupos experimentales contra el grupo control.

Tabla 1. Valores de absorbancia determinados para las diferentes concentraciones de lecitina de soya

A	Grupos experimentales				Valor p
	L1(X±S)	L2(X±S)	L3(X±S)	Control+(X±S)	
A 530	-0,153±0,26	0,284±0,58	0,255±0,10	0,163±0,001	0,128
A 540	-0,078±0,25 c	0,118±0,24b	0,331±0,1 a	0,161±0,00	0,003*
A 575	-0,064±0,25 c	0,134±0,24b	0,064±0,44a	0,166±0,001	0,026*
	L1-H2O2(X±S)	L2-H2O2(X±S)	L3-H2O2(X±S)	Control+(X±S)	
A 530	0,341±0,000	0,176±0,000	0,334±0,001a	0,574±0,061	0,052
A 540	0,242±0,057c	0,340±0,001b	0,372±0,001a	0,769±0,077	0,019*
A 575	0,282±0,000c	0,363±0,001b	0,381±0,001a	0,808±0,080	0,041*

Leyenda: A-absorbancia, L1-0,0625 µg/mL, L2-0,125 µg/mL y L3-0,250 µg/mL, H2O2-peróxido de hidrógeno
 X– media; S– desviación estándar para las series experimentales; *p< 0.05, prueba ANOVA de Kruskal Wallis; letras distintas identifican diferencias en las comparaciones entre grupos, (prueba de Dunn)

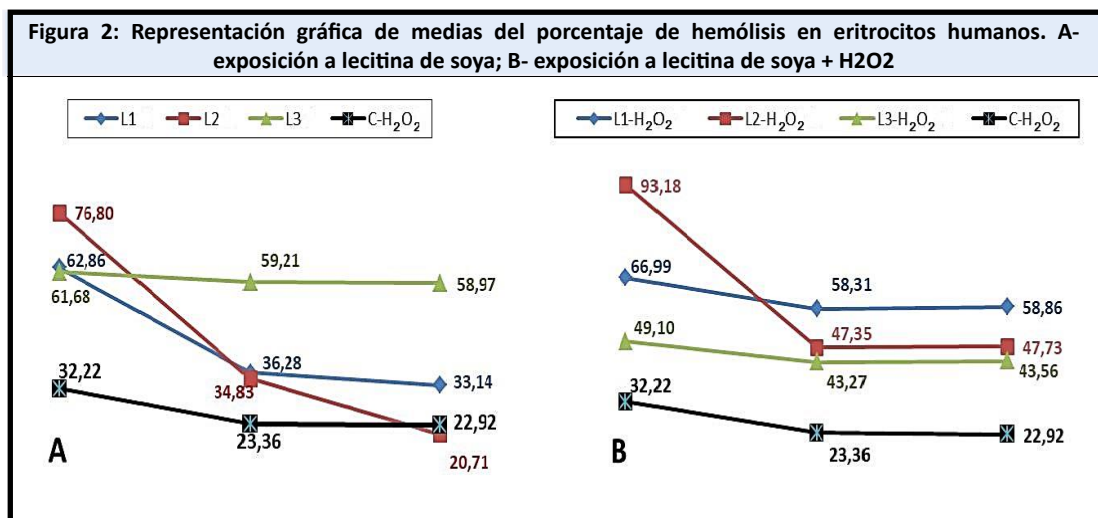
Al analizar el porcentaje de hemólisis inducida por el LECISAN®, comparada con la hemólisis oxidativa inducida el H2O2 en eritrocitos humanos (Tabla 2), resultó significativa en el test ANOVA de un factor, la diferencia para los valores de absorbancia a A 575 nm (p=0,000). En el resultado de la prueba post hoc de comparaciones múltiples la diferencia de medias fue también significativa para una concentración de 0,125 µg/mL con 24,43 % (p=0,000) y para una concentración de 0,250 µg/mL con un 44,17 % (p=0,002).

Tabla 2. Porcentaje de hemólisis inducida por diferentes concentraciones de lecitina de soya en eritrocitos humanos				
Variables	Grupos experimentales			Valor P
	L1(X±S)	L2(X±S)	L3(X±S)	
% H A 530	44,90±18,45	82,82±81,47	46,39±21,36	0,346
% H A 540	29,18±6,43	29,73±9,32	44,30±19,90	0,291
% H A 575	27,13±6,44	24,43±9,90b	44,17±19,87a	0,000*
	L1-H2O2(X±S)	L2-H2O2 (X±S)	L3-H2O2 (X±S)	
% H A 530	57,98±17,39c	92,97±0,31 b	48,99±0,16a	0,002*
% H A 540	69,38±19,17c	47,29±0,07b	43,28±0,01a	0,001*
% H A 575	58,86±0,005c	46,40±1,14b	43,56±0,02a	0,019*

Leyenda: H %-porcentaje de hemólisis, A-absorbancia (nm), L1-0,0625 µg/mL, L2-0,12 µg/mL 5 y L3-0,250 µg/mL, H2O2-peróxido de hidrógeno

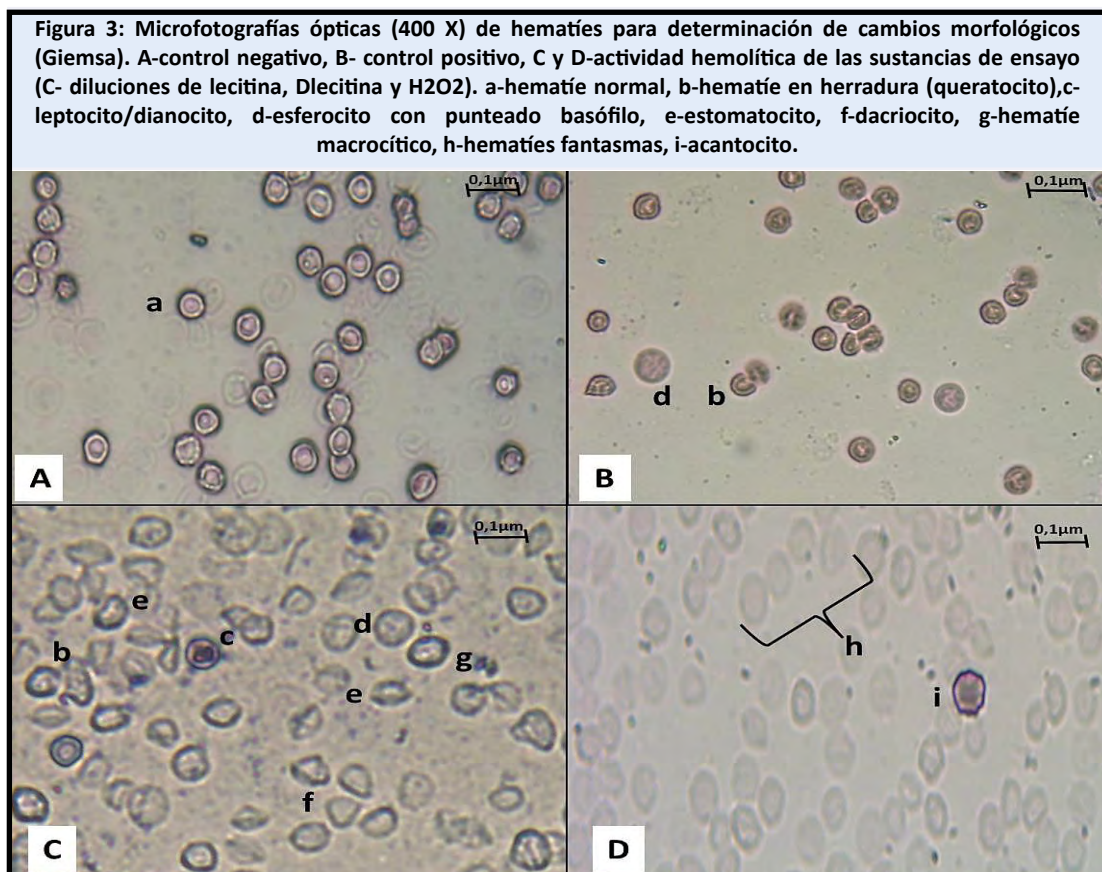
X- media; S- desviación estándar para las series experimentales; *p< 0.05, prueba ANOVA de Kruskal Wallis; letras distintas identifican diferencias en las comparaciones entre grupos, prueba de Dunn

De este modo, el factor concentración influye en la hemólisis, lo que demuestra mayor daño al eritrocito conforme se incrementa la concentración del producto ensayado (Figura 2). Este estudio mostró significación estadística para los valores de absorbancia en todos los grupos experimentales cuando se adicionó H2O2 a las diferentes concentraciones del producto ensayado, lo que evidenció el posible efecto pro-oxidante del mismo.



Leyenda: L1-0,0625 µg/mL, L2-0,12 µg/mL 5 y L3-0,250 µg/mL, H2O2-peróxido de hidrógeno

Las células fantasmas como eritrocitos esféricos degenerados que pierden parcialmente su contenido de hemoglobina, son resultado directo del proceso de hemólisis,^(20,21) aspecto que se observó en gran medida durante el ensayo, junto a variaciones del color y la forma de los eritrocitos (Figura 3).



DISCUSIÓN

La comparación y el análisis tendencial respecto al grupo control, no suplementado, sugiere menor actividad antioxidante del producto según aumenta la dosis o incremento del efecto negativo sobre los procesos que generan radicales libres, que refuerza la hipótesis de que a mayor generación de ROS, estos se acumulan en los tejidos, se hacen más ineficientes los sistemas de defensa antioxidantes y, por ende, se genera mayor daño.^(9,10) La reducción marcada de MDA, y el muy discreto incremento de GSH, como primera línea de defensa antioxidante en el organismo, encontrados en este estudio, lo sugieren.

La vida útil de los eritrocitos de diferentes mamíferos está correlacionada con los niveles de SOD, glutatión peroxidasa (GSH-Px), y GSH. Es decir, la formación de ERO y la eficiencia de los sistemas antioxidantes intrínsecos, deben estar equilibrados. La CAT es la principal enzima responsable de proteger los RBC del H₂O₂ extracelular, mientras que la capacidad de GSH-Px para proteger las células, está limitada por la disponibilidad de glutatión, y protege mejor del efecto del H₂O₂ generado endógenamente, muy cerca de la membrana junto con la autooxidación de la Hb.^(9,10)

En el grupo que recibió dosis mínima, se apreció discreta inversión en estos parámetros, reforzando la hipótesis de que, a menor dosis administrada, solo se modularon funciones fisiológicas que permitieron al animal una ganancia de peso alta. Sin embargo, a mayor dosis administrada, es probable que la reducción de peso esté relacionada con inducción de fenómenos inflamatorios en los tejidos dianas, como consecuencia del estrés oxidativo generado.^(11,14)

Algunos autores consideran que los fosfolípidos de la lecitina activan el sistema de la fosfolipasa A2 y la producción de citocinas inflamatorias como el Factor de Necrosis Tumoral- α (FNT- α) y la Interleucina-1 β (IL-1 β), que generan una cascada compleja de eventos entre la vasculatura de los tejidos y las células inflamatorias, con producción de selectinas y moléculas de adhesión intracelulares.^(2,3) Los RBC tienen una potente protección antioxidante que consiste en vías enzimáticas y no enzimáticas que contrarrestan ERO, lo que mantiene así la regulación redox en el cuerpo, ya que durante la respiración aeróbica se producen ROS y RNS a partir de la cadena de transporte de electrones presente en las mitocondrias.⁽¹¹⁾

Estudios recientes sobre RBC nos han proporcionado información detallada de la membrana celular y su organización estructural. La membrana plasmática es una red bidimensional de proteínas llamada esqueleto de membrana de espectrina, que ayuda en el mantenimiento de la estructura de los RBC. El EO, que disminuye la capacidad antioxidante, los daña irreversiblemente, resultando en hemólisis y su eliminación por la circulación. Los mecanismos de la muerte de RBC inducida por el EO se relacionan con la entrada de Ca²⁺ y la activación de la caspasa, junto con un aumento en los marcadores apoptóticos lo que lleva a la exposición a la fosfatidilserina y la oxidación de la hemoglobina (Hb).⁽¹¹⁾

La proteína de banda 3 (B3p) es un intercambiador de aniones esencial para la homeostasis de los RBC, cuya función se afecta tras EO a nivel de membrana.^(22,23) Las células eucariotas muestran un sistema redox de membrana plasmática que transfiere electrones desde sustratos intracelulares a aceptores de electrones extracelulares. La eritropoiesis es provocada por una amplia variedad de xenobióticos y otras lesiones como el EO. La estimulación de la fosfolipasa A2 con liberación del factor activador de plaquetas, activación de la esfingomielinasa, y formación de ceramidas también contribuyen a la eritropoiesis y puede implicar la estimulación de caspasas con la subsiguiente degradación del citoesqueleto.⁽¹¹⁾

Al superarse el sistema de defensa antioxidante, la Hb dentro y fuera de los RBC sufre una transformación constante a una forma oxidada en un proceso conocido como autooxidación.⁽¹⁰⁾ El hierro hemoferroso (Fe^{2+}) se transforma espontáneamente en una forma férrica oxidada (Fe^{3+}), pero en condiciones de EO también se forma un hemo de ferrilo de mayor oxidación (Fe^{4+}). Aunque Fe^{3+} es una forma no funcional de Hb, el Fe^{4+} también es extremadamente reactivo con otras moléculas biológicas, debido a su alto potencial redox.^(22,23)

El O_2 se une reversiblemente al hierro activo redox, un metal de transición en la Hb humana, que posteriormente se oxida en el aire. Este proceso es similar a la oxidación del hierro en sistemas no biológicos y da como resultado la formación de Metahemoglobina, que no transporta O_2 (férrico) (Fe^{3+}) y ROS. En los sistemas biológicos, la Hb se considera un reactivo de Fenton en el que la toxicidad oxidativa se atribuye a la formación de un radical hidroxilo altamente reactivo ($\text{OH}\cdot$) generado por la reacción entre el hierro de la Hb (Fe^{2+}) y el H_2O_2 .⁽²⁴⁾

Las alteraciones morfológicas o dismorfias de los eritrocitos pueden estar relacionadas con variaciones en el tamaño, forma y hemoglobinización y con la presencia de inclusiones citoplasmáticas.^(20,25) Las células fantasmas se definen como eritrocitos esféricos degenerados que pierden parcialmente su contenido de hemoglobina resultado directo del proceso de hemólisis.⁽²¹⁾

Las características morfofuncionales de los RBC cambian en respuesta al aumento de la peroxidación lipídica y activación de las enzimas antioxidantes. Los principales factores que regulan la velocidad de tales procesos son la formación de ROS así como la cantidad de compuestos antioxidantes y la actividad de las enzimas que aseguran su descomposición.⁽¹⁸⁾

Al tener en cuenta las limitaciones éticas relacionadas con la reducción y refinamiento en la investigación no clínica *in vivo*, el estudio se realizó con la muestra seleccionada (n=18) y la investigación se **limitó** a realizar de manera complementaria un estudio *in vitro* con eritrocitos humanos tras evaluar la influencia del producto en el estado oxidativo de las ratas con solo tres marcadores de EO, pero se requieren evaluaciones en otros marcadores y en animales machos, en aras de excluir el posible efecto del sexo sobre los resultados obtenidos que permitan profundizar en el entendimiento de estos resultados.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos sugieren la existencia de un efecto pro-oxidante al inducir estrés oxidativo *in vivo* y hemólisis eritrocitaria *in vitro*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cala-Calviño L, Morris-Quevedo H. LECISAN® y sus potencialidades terapéuticas para el abordaje farmacológico de la obesidad. Revista Cubana de Endocrinología [Internet]. 2022 [Citado 12/04/2023]; 32(3). Disponible en: <https://revendocrinologia.sld.cu/index.php/endocrinologia/article/view/316>
2. Fernández I, Giacomino MS, Condori AI, Godoy MF, Pellegrino N, Slobodianik N, et al. Efecto de la suplementación con ácidos grasos n-3 sobre el perfil de lípidos séricos de ratas. Rev Chil Nutr [Internet]. 2021 [Citado 12/04/2023]; 48(2): 170-8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182021000200170>
3. Suárez-Carmona W, Sánchez-Oliver AJ, González-Jurado JA. Fisiopatología de la obesidad: Perspectiva actual. Rev Chil Nutr [Internet]. 2017 [Citado 12/04/2023]; 44(3): 226233. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4067/s0717-75182017000300226>
4. EFSA (Panel on Food Additives and Flavourings). Safety of use of oat lecithin as a food additive. EFSA Journal [Internet]. 2020 [Citado 12/04/2023]; 18(11):e05969. Disponible en: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2903/j.efsa.2020.5969>
5. Cho C, Aardema NDJ, Bunnell ML, Larson DP, Aguilar SS, Bergeson JR, et al. Free Choline, but Not Phosphatidylcholine, Elevates Circulating Trimethylamine-N-oxide and This Response Is Modified by the Gut Microbiota Composition in Healthy Men. Current Developments in Nutrition [Internet]. 2020 [Citado 12/04/2023]; 4(2): 379. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2072-6643/12/8/2220>
6. Álvarez J, Fernández-Real JM, Guarner F, Gueimonde M, Rodríguez JM, Saenz-de Pipaon M, Sanz Y. Microbiota intestinal y salud. Gastroenterología y Hepatología [Internet]. 2021 [Citado 12/04/2023]; 44:519-35. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0210570521000583>
7. Arias N, Arboleya S, Allison J, Kaliszewska A, Higarza SG, Gueimonde M, et al. The Relationship between Choline Bioavailability from Diet, Intestinal Microbiota Composition, and Its Modulation of Human Diseases. Nutrients [Internet]. 2020 [Citado 12/04/2023]; 12(8):2340. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32764281/>
8. Carvajal Carvajal C. Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. Med Leg Costa Rica [Internet]. 2019 [Citado 12/04/2023]; 36(1): 91-100. Disponible en: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152019000100091&lng=en

9. Hernández Guerra Y, Rodríguez Gómez A, Villafuerte Reinante J, Marrero Silva I, Mora Hernández CM. Influencia de los radicales libres en la génesis de la aterosclerosis. *Rev Finlay* [Internet]. 2020 [Citado 12/04/2023]; 10(2): 170-8. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2221-24342020000200170&lng=es
10. Besedina NA, Skverchinskaya EA, Shmakov S V, Ivanov AS, Mindukshev IV, Bukatin AS. Persistent red blood cells retain their ability to move in microcapillaries under high levels of oxidative stress. *Communications Biology* [Internet]. 2022 [Citado 12/04/2023]; 5:659. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s42003-022-03620-5>
11. Liao C, Carlson BA, Paulson RF, Prabhu, KS. The intricate role of selenium and selenoproteins in erythropoiesis. *Free radical biology & medicine* [Internet]. 2018 [Citado 12/04/2023]; 127:165-71. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6168382/>
12. Papem W. DB-ALM Protocol n° 37: Red Blood Cell (RBC) Test System [Internet]. Bruselas: European Commission; 1992 [Citado 12/04/2023]. Disponible en: [http://cidportal.jrc.ec.europa.eu/ftp/jrc-opendata/EURL-ECVAM/datasets/DBALM/LATEST/online/DBALM_docs/37_P_Red%20Blood%20Cell%20\(RBC\)%20Test%20System.pdf](http://cidportal.jrc.ec.europa.eu/ftp/jrc-opendata/EURL-ECVAM/datasets/DBALM/LATEST/online/DBALM_docs/37_P_Red%20Blood%20Cell%20(RBC)%20Test%20System.pdf)
13. CECMED. Buenas prácticas de laboratorio no clínico. La Habana: MINSAP; 2012.
14. Berzas JJ, Rodríguez RC, Guzmán FJ, Rodríguez C. Determinación de glutatión reducido y oxidado mediante cromatografía líquida previa formación de aducto fluorescente. I Jornadas Doctorales de Castilla-La Mancha [Internet]. España: Dialnet; 2016 [Citado 12/04/2023]. Disponible en: http://www.ehu.es/XV_SEQA/Resumenes/Posters_1/C1-63.pdf
15. Santa-González GA, Camargo M. Protección celular antioxidante y respuesta adaptativa inducida por estímulos oxidativos crónicos. *Actual Biol* [Internet]. 2016 [Citado 12/04/2023]; 38(104):71-80. Disponible en: <https://doi.org/10.17533/udea.acbi.v38n104a07>
16. Escrivá-López C. Estudio de los valores de referencia para los parámetros de estrés oxidativo: malondialdehído y glutatión, medidos por cromatografía líquida de alta eficacia, en humanos y animales de experimentación [Tesis Doctoral]. Valencia: Universidad de Valencia; 2015. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/71052834.pdf>
17. Mora-Tassé Y, Fong-Lores O, Berenguer-Rivas C, Pérez-Andrés I. Eritrocitos humanos como biomodelo farmacológico de citoprotección antioxidante para la evaluación de nuevas alternativas terapéuticas en pacientes con COVID-19. *MEDISAN* [Internet]. 2022 [Citado 12/04/2023]; 26(5). Disponible en: <https://medisan.sld.cu/index.php/san/article/view/4316>
18. Revin VV, Gromova NV, Revina ES, Samonova AY, Tyckov AY, Bochkareva SS, et al. The Influence of Oxidative Stress and Natural Antioxidants on Morphometric Parameters of Red Blood Cells, the Hemoglobin Oxygen Binding Capacity, and the Activity of Antioxidant Enzymes. *BioMed Research International* [Internet]. 2019 [Citado 12/04/2023]; 2109269 Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30792991/>
19. CECMED. Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos. Lineamientos para la constitución y funcionamiento de los comités institucionales para el cuidado y uso de los animales de laboratorio (CICUAL). Regulación No. 64/13. La Habana: MINSAP; 2013.
20. Soler-Noda G, González-Guldriz M, Forrellat-Barrios M. Diagnóstico diferencial de las anemias hemolíticas. *Rev Cub Hematol* [Internet]. 2020 [Citado 12/04/2023]; 36(4):e1097. Disponible en: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/e/biblio-128941>
21. Soler-Noda G, Peña-Leyva K, Forrellat-Barrios M. Anemias hemolíticas hereditarias por defectos en la membrana de los eritrocitos. *Rev Cub Hematol*. 2020; 36(2): e1098.
22. Remigante A, Morabito R. Cellular and Molecular Mechanisms in Oxidative Stress-Related Diseases. *Int J Mol Sci*. 2022; 23(14): 8017.
23. Alayash AI. Hemoglobin Oxidation Reactions in Stored Blood. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*. 2022; 11(4):747.
24. Alayash AI. Oxidation reactions of cellular and acellular hemoglobins: Implications for human health. *Frontiers in medical technology*. 2022; 4: 1068972.
25. Terry-Leonard NR, Mendoza-Hernández CA. Valor del frotis de sangre periférica como orientación diagnóstica en las anemias hemolíticas. *MediSur*. 2019; 17(5):706-18.

Financiamiento

No existen fuentes de financiamiento

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses

Contribución de autoría

Leidy Cala Calviño: Conceptualización, análisis formal, investigación, metodología, supervisión, visualización, redacción borrador original, redacción, revisión y edición, administración de proyecto.

Haydée Cruz Vadell: Conceptualización, visualización, redacción, revisión y edición.

Yaixa Beltrán Delgado: Investigación.

David Garrido Larramendi: Investigación.

Onel Fong Lores: Redacción, revisión y edición.

Todos los autores participamos en la discusión de los resultados y hemos leído, revisado y aprobado el texto final.