

**MARCELLA DUARTE VILLAS MISHIMA**

**EFEITO DA CHIA (*Salvia hispanica* L.) NA BIODISPONIBILIDADE DE  
CÁLCIO E NA SAÚDE ÓSSEA E CARDIOVASCULAR DE RATAS  
OVARIECTOMIZADAS ALIMENTADAS COM DIETA HIPERLIPÍDICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, para obtenção do título Magister Scientiae.

Orientadora: Hércia Stampini Duarte Martino

Coorientadoras: Neuza Maria Brunoro Costa  
Maria Eliza de Castro Moreira

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2020**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

M678e  
2020  
Mishima, Marcella Duarte Villas, 1995-  
Efeito da chia (*Salvia hispanica L.*) na biodisponibilidade  
de cálcio e na saúde óssea e cardiovascular de ratas  
ovariectomizadas alimentadas com dieta hiperlipídica / Marcella  
Duarte Villas Mishima. – Viçosa, MG, 2020.  
124 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Hércia Stampini Duarte Martino.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Remodelação-óssea. 2. Disponibilidade biológica.
  3. Coração - Doenças. 4. Ovariectomia. 5. Minerais.
- I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Nutrição e  
Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição.  
II. Título.

CDD 22 ed. 616.17

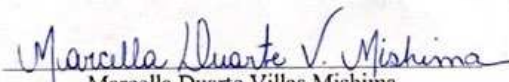
MARCELLA DUARTE VILLAS MISHIMA

EFEITO DA CHIA (*SALVIA HISPANICA L.*) NA BIODISPONIBILIDADE DE  
CÁLCIO E NA SAÚDE ÓSSEA E CARDIOVASCULAR DE RATAS  
OVARIECTOMIZADAS ALIMENTADAS COM DIETA HIPERLIPÍDICA

Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de Pós-Graduação  
em Ciências da Nutrição do Departamento  
de Nutrição e Saúde, para obtenção do título  
*Magister Scientiae*.

APROVADA: 19 de Fevereiro de 2020.

Assentimento:

  
Marcella Duarte Villas Mishima  
Autora

  
Hércia Stampini Duarte Martino  
Orientadora

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por todos os dias me dar forças para continuar, e sempre me mostrar qual o melhor caminho para mim. À minha família, por incentivar meus sonhos e me apoiar. De forma muito especial à minha mãe, que sempre colocou nossos objetivos como prioridade, e me apoia em todas as decisões, ao meu irmão, por compartilhar essa vida comigo, e com todo amor, à minha vó Ana, que é meu colo, e me faz ter vontade de voltar pra Juiz de Fora todos os dia, meu exemplo de fortaleza. Agradeço imensamente à minha orientadora Hércia, por confiar em mim, desde sempre, por me apoiar, e me mostrar sempre que sou capaz, nunca terei palavras para expressar minha gratidão e admiração! Agradeço muito à Bárbara, por toda a disponibilidade, boa vontade e atenção sempre, me deu a mão do início ao fim do mestrado, sempre muito solícita com todas as minhas dúvidas, devo muito deste trabalho a ela. Muito obrigada à Renata, por toda ajuda nas análises e sempre muito disponível e empenhada em me ajudar em todas as dúvidas. Agradeço também ao Luiz, pela parceria, também sempre muito disponível a me ajudar e esclarecer minhas dúvidas. A todos os queridos colegas do Laboratório de Nutrição Experimental. Compartilhei esse tempo do mestrado com pessoas muito especiais e generosas, que compartilharam suas experiências e conhecimento comigo, e este trabalho é o resultado da soma de todas essas forças.

Agradeço muito aos meus amigos de toda vida, que sempre confiaram em mim, me motivam, incentivam, e compartilham comigo minhas conquistas e felicidade, mas também os momentos difíceis, fazendo sempre com que eu me sinta tão querida e apoiada. Às minhas amigas de Viçosa, obrigada por compartilharem comigo momentos de dúvidas e cansaço, vocês fazem essa caminhada ser mais leve, vocês são um grande presente que ganhei nesse momento, e fico muito feliz de agora ter vocês na minha vida! Às minhas companheiras de casa, que me escutam me apoiam e compartilham comigo dias felizes e dias difíceis.

Aos Laboratório de Embalagens, Núcleo de Microscopia e Microanálise/UFV, Laboratório de Microscopia Analítica, Laboratório de Metabolismo e Fermentação e Hospital Veterinário. À Universidade Federal de Viçosa, por todas as oportunidades de aprendizado e crescimento que proporciona aos seus alunos. À FAPEMIG, CNPq e CAPES pelo financiamento. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Muito obrigada a todos que contribuíram e participaram dessa caminhada!

## RESUMO

MISHIMA, Marcella Duarte Villas, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2020. **Efeito da chia (*Salvia hispanica* L.) na biodisponibilidade de cálcio e na saúde óssea e cardiovascular de ratas ovariectomizadas alimentadas com dieta hiperlipídica.** Orientadora: Hércia Stampini Duarte Martino. Coorientadoras: Neuza Maria Brunoro Costa e Maria Eliza de Castro Moreira.

A redução da produção de estrogênio que ocorre na fase de pós-menopausa é associada ao desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis como a osteoporose e doenças cardiovasculares. O desequilíbrio nas atividades das células ósseas leva a anormalidades esqueléticas como a perda óssea, que pode ocorrer devido a fatores como alterações hormonais e inflamação. Esse período também se relaciona à dislipidemia, inflamação, aumento nas medidas de gordura central e defesas antioxidantes reduzidas, que são fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. O consumo de alimentos ricos em nutrientes e compostos bioativos pode proteger o organismo dessas alterações metabólicas. A semente de chia (*Salvia hispanica* L.) apresenta elevado valor nutricional, e é uma excelente fonte de cálcio. Sua composição de lipídios e peptídeos tem demonstrado ação cardioprotetora. O objetivo deste estudo foi avaliar a biodisponibilidade de cálcio da chia, seu efeito na remodelagem óssea, e na biometria, estresse oxidativo, conteúdo de minerais e enzimas ATPases do coração, quando consumida como parte de uma dieta padrão ou dieta hiperlipídica em ratas ovariectomizadas ou não. O estudo foi conduzido com 80 ratas fêmeas linhagem Wistar, que receberam dieta padrão ou dieta hiperlipídica por 18 semanas. Durante as primeiras 7 semanas os animais receberam dieta padrão ou hiperlipídica (HFD), em seguida, 40 ratas foram ovariectomizadas (OVX) e 40 ratas sofreram a cirurgia sem a retirada do órgão (SHAM). Após recuperação da cirurgia (3 semanas) os animais foram alocados em 8 grupos (n=10) e receberam as seguintes dietas: padrão, padrão+chia, HFD ou HFD+chia, para os grupos OVX e SHAM. Durante 8 semanas a farinha de chia foi utilizada como fonte de 20% da recomendação de cálcio. Os efeitos da ingestão de farinha de chia na biodisponibilidade de cálcio foram mensurados por meio da técnica de balanço de cálcio. Foram avaliadas a resistência óssea e a morfometria óssea por meio de medidas de peso, comprimento e microtomografia. O coração dos animais foi avaliado em relação a dados biométricos, estresse oxidativo, conteúdo mineral e atividade das enzimas ATPases. O consumo de uma dieta hiperlipídica resultou em maior cálcio sérico e menor retenção de cálcio. A farinha de chia apresentou biodisponibilidade de cálcio comparável ao carbonato de cálcio nos animais SHAM. A ovariectomia diminuiu o percentual de volume ósseo e a espessura trabecular e aumentou a separação trabecular e porosidade, e quando foi associada

à dieta hiperlipídica, aumentou o peso final dos animais, o perímetro da cintura, o IMC (índice de massa corporal) e a adiposidade. A dieta hiperlipídica no grupo OVX aumentou a hipertrofia cardíaca, óxido nítrico, e a concentração de K e diminuiu a atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase. A ovariectomia associada a dieta hiperlipídica diminuiu a atividade de catalase, a concentração de Mg, Cu e Zn e a atividade de ATPase total, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase e Mg<sup>2+</sup>ATPase, e ainda aumentou óxido nítrico, e a concentração de Ca, K, Fe e Mn no coração. O grupo SHAM alimentado com chia apresentou menor conteúdo de gordura no coração, no grupo OVX alimentado com HFD a chia aumentou a atividade de superóxido dismutase, diminuiu o óxido nítrico e manteve o conteúdo de minerais e enzimas ATPase no coração. Assim, a chia manteve a saúde óssea e apresentou biodisponibilidade de cálcio comparável à uma fonte padrão de cálcio, quando oferecida como fonte de 20% de cálcio em uma dieta que atendeu a 100% da recomendação do mineral para roedores, independentemente do tipo de dieta, em animais adultos não ovariectomizados. A chia também melhorou os parâmetros biométricos do coração, a atividade antioxidante e manteve o conteúdo de minerais e enzimas ATPase, evidenciando uma ação cardioprotetora, mas sem reverter os efeitos deletérios da ovariectomia.

**Palavras-chave:** Remodelagem-óssea. Biodisponibilidade-de-cálcio. Doença-cardiovascular. Ovariectomia. Minerais.

## ABSTRACT

MISHIMA, Marcella Duarte Villas, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2020. **Effect of chia (*Salvia hispanica* L.) on the bioavailability of calcium and bone and cardiovascular health in rats ovariectomized feeding with high fat diet.** Adviser: Hércia Stampini Duarte Martino. Co-Advisers: Neuza Maria Brunoro Costa and Maria Eliza de Castro Moreira.

The reduction in estrogen production that occurs in postmenopausal stage is associated with the development of chronic non-communicable diseases such as osteoporosis and cardiovascular diseases. Skeletal abnormalities such as bone loss occur when there is an imbalance in bone matrix synthesis and bone resorption. This imbalance is also caused by hormonal changes and inflammation. Postmenopausal period is also related to dyslipidemia, inflammation, increased measures of abdominal fat and reduced antioxidant defenses, which are risk factors for the development of cardiovascular diseases. A diet rich in nutrients and bioactive compounds can protect the body from metabolic changes. Chia seed (*Salvia hispanica* L.) has a high nutritional value and is an excellent source of calcium. Its composition of lipids and peptides has demonstrated cardioprotective action. The aim of this study was to evaluate the bioavailability of calcium from chia, and its effect on bone metabolism, biometrics measurements, oxidative stress, mineral content and ATPases enzymes of the heart when consumed as part of a standard diet or high fat diet in ovariectomized rats or not. The study was conducted with 80 female Wistar rats that received standard diet or a high-fat diet for 18 weeks. During the first 7 weeks the animals received a standard or high fat diet (HFD), then 40 female mice were ovariectomized (OVX) and 40 were SHAM-operated (SHAM). After recovery from surgery (3 weeks) the animals were allocated to 8 groups (n = 10) and received the following diets: standard, standard + chia, HFD or HFD + chia, for the OVX and SHAM groups. For 8 weeks, chia flour was used as a source of 20% of the calcium recommendation. The effects of chia intake on calcium bioavailability were measured using the calcium balance technique. Bone strength and bone morphometry were evaluated by weight, length and microtomography measurements. The hearts were evaluated for biometric data, oxidative stress, mineral content and ATPase enzyme activity. Consumption of a high fat diet resulted in higher serum calcium and lower calcium retention. Chia showed calcium bioavailability comparable to calcium carbonate in SHAM animals. Ovariectomy led to a lower percentage of bone volume, smaller trabecular thickness, higher trabecular separation and higher porosity, and when ovariectomy

was associated with HFD, the final weight, waist circumference, body mass index (BMI) and adiposity were increased. HFD in OVX group improves cardiac hypertrophy, nitric oxide, and K concentration and decreased the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase activity. The ovariectomy associated to the HFD decreased the catalase activity, Mg, Cu and Zn concentration and the total ATPase, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase e Mg<sup>2+</sup>ATPase activity, improves nitric oxide, and Ca, K, Fe and Mn concentrations in heart. The SHAM group fed with chia showed lower fat content in heart. In OVX group fed with HFD, chia improves superoxide dismutase activity, decrease nitric oxide and maintained mineral content and ATPase enzymes in the heart. Therefore, chia maintained bone health and showed calcium bioavailability comparable to a standard source of calcium, when offered as a source of 20% of the calcium recommendation in a diet that meets 100% of the mineral recommendation for rodents, in standard and high fat diet in adult rats non ovariectomized. Chia also improve biometrics parameters of the heart, the antioxidant activity and maintained the mineral content and ATPase enzymes, showing a cardioprotective action, but without reversing the deleterious effects of ovariectomy.

**Keywords:** Bone remodeling. Calcium bioavailability. Cardiovascular disease. Ovariectomy. Minerals.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ilustração de corte longitudinal de um fêmur demonstrando as regiões trabecular e cortical.....	23
<b>Figura 2.</b> Regulação da formação de osteoclastos e reabsorção óssea pela dieta hiperlipídica e ovariectomia.....	25
<b>Figura 3.</b> Papel cardioprotetor do estrogênio.....	30
<b>Figura 4.</b> Desenho experimental.....	35
<b>Artigo 1</b>	
<b>Fig. 1.</b> Biometric and consumption data of animals (n=10/group) for 126 days .....	72
<b>Fig. 2.</b> Measurements from the femur (n=10/group) .....	77
<b>Fig. 3.</b> mCT analysis of femur (n=10/group) .....	78
<b>Fig. 4.</b> mCT analysis of femur (n=10/group) .....	79
<b>Artigo 2</b>	
<b>Fig. 1.</b> Analyzes of oxidative stress in the heart.....	107
<b>Fig. 2.</b> Mineral proportion in the heart from Wistar rats fed chia and HFD.....	109
<b>Fig. 3.</b> The activities of total ATPase, Ca <sup>2+</sup> ATPase, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase and Mg <sup>2+</sup> ATPase in the heart of control and experimental animals.....	110
<b>Fig. 4.</b> Effect of adding chia to the high fat diet in the heart of ovariectomized Wistar rats.....	116

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Composição das dietas experimentais.....	38
---	----

### Artigo 1

<b>Table 1.</b> Composition of experimental diets.....	68
--	----

<b>Table 2:</b> Effect of chia ingestion on calcium bioavailability in Wistar rats (n=10/group) for 126 days.....	74
---	----

<b>Table 3:</b> Effects of different factors (calcium source, different diets and ovariectomy) on calcium and bone health status in Wistar rats (n=10/group) for 126 days.....	76
--	----

<b>Table 4:</b> Effects of different factors (calcium source, different diets and ovariectomy) on femur measurements and femur mCT analysis in Wistar rats (n=10/group) for 126 days.....	81
---	----

### Artigo 2

<b>Table 1.</b> Composition of experimental diets.....	101
--	-----

<b>Table 2:</b> Biometric data of experimental animals.....	105
---	-----

<b>Table 3.</b> Effect of high-fat diet and ovariectomy on the heart of Wistar rats.....	115
--	-----

## LISTA DE ABREVIÇÕES

°C: grau Celsius

μA: microampère

μL: microlitro

μm: micrometro

BH4: tetra-hidrobiopterina

BS: superfície óssea

BV: volume ósseo

Ca: cálcio

CaCl: cloreto de cálcio

CAT: catalase

CC: carbonato de cálcio

CEA: coeficiente de eficiência alimentar

CF: comprimento do fêmur

cm: centímetro

CT: comprimento da tíbia

Cu: cobre

DCV: doença cardiovascular

DP: desvio padrão

EDS: espectroscopia de raios X por dispersão em energia

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

eNOS: enzima óxido nítrico sintase

ERN: espécies reativas de nitrogênio

ERO's: espécies reativas de oxigênio

Fe: ferro

FSH: hormônio folículo estimulante

g: grama

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio

HCl: ácido clorídrico

HDL: lipoproteína de alta densidade

HFD: dieta hiperlipídica

IL-1β: interleucina 1 beta

IL-6: interleucina 6  
IMC: índice de massa corporal  
K: potássio  
KCl: cloreto de potássio  
keV: quilo elétron volt  
Kg: quilograma  
kV: quilovolt  
LDL: lipoproteína de baixa densidade  
LF: largura do fêmur  
LT: largura da tíbia  
m: metro  
MDA: malondialdeído  
mesh: número de abertura por polegada na peneira  
mg/d: miligramas por dia  
Mg: magnésio  
mg: miligrama  
MgCl: cloreto de magnésio  
min: minuto  
mL: mililitro  
mm: milímetros  
mM: milimolar  
mmol: milimol  
Mn: manganês  
ms: milissegundo  
n: número  
Na: sódio  
NaCl: cloreto de sódio  
NF- $\kappa$ B: fator nuclear kappa B  
nm: nanômetros  
ômega-3 (ou n-3): ácido alfa-linolênico  
ômega-6 (ou n-6): ácido alfa-linoleico  
ON: óxido nítrico  
OPG: osteoprotegerina  
OVX: ovariectomizados

p/v: peso/volume

pH: potencial hidrogeniônico

Po(tot): porosidade total

PTH: hormônio paratireoidiano

RANK: receptor ativador do fator nuclear kappa B

RANK-L: ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B

rpm: rotações por minuto

SHAM: não ovariectomizados

SOD: superóxido dismutase

Tb.N: número trabecular

Tb.Sp: espaçamento trabecular

Tb.th: espessura trabecular

TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCA: ácido tricloroacético

TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa

TV: volume trabecular

U: unidade

VE: ventrículo esquerdo

Zn: zinco

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	18
<b>2.1. Objetivo geral</b> .....	18
<b>2.2. Objetivos específicos</b> .....	18
<b>3. HIPÓTESES</b> .....	18
<b>4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	19
<b>4.1. Chia</b> .....	19
<b>4.2. Cálcio</b> .....	20
<b>4.3. Saúde óssea</b> .....	22
<b>4.4. Dieta hiperlipídica, inflamação e remodelagem óssea</b> .....	24
<b>4.5 Menopausa</b> .....	26
<b>4.6 Papel cardioprotetor do estrogênio</b> .....	27
<b>4.6.1 Estrogênio, estresse oxidativo e inflamação</b> .....	27
<b>4.6.2 Estrogênio e hipertrofia cardíaca</b> .....	28
<b>4.6.3 Estrogênio e óxido nítrico</b> .....	29
<b>4.8 ATPases</b> .....	31
<b>5. METODOLOGIA</b> .....	33
<b>5.1. Matéria prima</b> .....	33
<b>5.2. Desenho experimental</b> .....	34
<b>5.3. Procedimento de ovariectomia</b> .....	35
<b>5.4. Composição da dieta e ingestão alimentar</b> .....	36
<b>5.5. Medidas biométricas dos animais</b> .....	38
<b>5.5.1 Índice de massa corporal</b> .....	38
<b>5.5.2. Perímetro abdominal</b> .....	39
<b>5.5.3. Adiposidade</b> .....	39
<b>5.6. Determinação do balanço metabólico de cálcio</b> .....	39

5.7. Morfometria óssea .....	39
5.7.1. Dimensões anatômicas dos ossos .....	39
5.7.2. Teste mecânico.....	40
5.7.3. Microtomografia óssea .....	40
5.8. Medidas biométricas do coração .....	42
5.9. Estresse oxidativo no coração.....	42
5.9.1 Preparação do homogeneizado .....	42
5.9.2. Quantificação de proteína .....	42
5.9.3. Níveis de superóxido dismutase .....	42
5.9.4. Malondialdeído.....	43
5.9.5. Atividade da enzima catalase (CAT) .....	43
5.9.6. Óxido Nítrico .....	44
5.10. Microanálise mineral no coração .....	44
5.11. Determinação da atividade de ATPase, Ca <sup>2+</sup> -ATPase, Na <sup>+</sup> / K <sup>+</sup> -ATPase e Mg <sup>2+</sup> -ATPase no coração .....	44
5.12. Aspectos éticos .....	45
5.13. Análise estatística.....	45
REFERÊNCIAS.....	46
6. RESULTADOS .....	60
6.1. ARTIGO 1: Bioavailability of calcium from chia ( <i>Salvia hispanica</i> L.) in ovariectomized rats fed a high fat diet.....	60
6.2. ARTIGO 2: Cardioprotective action of chia ( <i>Salvia hispanica</i> L.) in ovariectomized rats fed a high-fat diet .....	96
7. CONCLUSÃO GERAL .....	123
ANEXO .....	124

## 1. INTRODUÇÃO

O envelhecimento é um processo fisiológico e, nas mulheres, é acompanhado de algumas alterações hormonais. A menopausa ocorre quando há um declínio natural de hormônios reprodutivos e a fase de pós-menopausa é associada ao desenvolvimento de doenças crônicas, como osteoporose (BONNICK et al., 2010; CANO et al., 2018) e doenças cardiovasculares (DCV) (BITTNER, 2009; MURPHY, 2012).

A redução da produção de estrogênio leva ao aumento da remodelagem óssea e maior fragilidade do esqueleto, contribuindo para a patogênese da osteoporose (HEANEY et al., 1989; HEANEY et al., 2003; RECKER et al., 2004). A osteoporose é uma doença caracterizada pela redução da massa óssea e deterioração da estrutura do tecido, com redução da densidade e aumento da porosidade, levando a fragilidade e conseqüentemente a maior risco de fraturas. De acordo com a Federação Internacional da Osteoporose, a doença causa mais de 8,9 milhões de fraturas por ano em todo o mundo, afeta homens e mulheres, mas pode ser prevenida e tratada (IOF, 2017; NIH, 2018). A baixa ingestão de cálcio tem sido associada à menor massa óssea, rápida perda de tecido e altas taxas de fratura. Por isso, a saúde óssea é a evidência utilizada para o estabelecimento das recomendações de cálcio, que é uma das principais estratégias para construção e manutenção dos ossos. Dessa forma, é fundamental garantir uma ingestão adequada de cálcio (IOM, 2011; NIH, 2018; HODGES et al., 2019).

Mudanças na distribuição da massa de gordura, com maior acúmulo de gordura central (AMBIKAI RAJAH et al., 2019), dislipidemia, inflamação (TALEB-BELKADI et al., 2016), peroxidação lipídica e defesas antioxidantes alteradas (LÓPEZ-GRUESO et al., 2014) foram observadas em mulheres após a menopausa, e são fatores de risco para o desenvolvimento de DCV (TALEB-BELKADI et al., 2016), que são as principais causas de morte no mundo (ROTH et al., 2017). O estrogênio fornece proteção ao endotélio vascular (SOMANI et al., 2019) e mulheres na pós-menopausa e com obesidade podem ser mais suscetíveis a prejuízos na função endotelial (SUBOC et al., 2013).

O papel cardioprotetor do estrogênio deve-se às suas propriedades antioxidantes. O aumento das espécies reativas de oxigênio (ERO's) devido à ausência de estrogênio é apontado como uma das causas da disfunção endotelial e efeitos prejudiciais no sistema cardiovascular (VIRDIS et al., 2000; BIANCHI et al., 2006; ZHAO et al., 2018). O estrogênio também atua na resposta inflamatória (CORCORAN et al., 2010), tem papel na inibição do desenvolvimento da hipertrofia cardíaca (WU et al., 2019) e na regulação da expressão da óxido nítrico sintase na parede dos vasos, induzindo a liberação de óxido nítrico (ON), que atua na proteção arterial



(DANTAS et al., 2004; KIM, BENDER, 2005; KIM, BENDER, 2009; DIAS et al., 2014). Assim, os efeitos negativos em função da redução do estrogênio podem se associar aos efeitos deletérios do consumo de uma dieta hiperlipídica, com aumento do estresse oxidativo (VENTURA et al., 2017) e inflamação (DA SILVA et al., 2019a).

A ingestão de uma dieta hiperlipídica pode provocar uma inflamação sistêmica, a hipertrofia dos adipócitos resulta em um processo inflamatório que estimula a secreção de substâncias pró-inflamatórias pelo tecido adiposo, como fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (DUAN et al., 2018; DA SILVA et al., 2019b). Os níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias ativam a via do ligante do receptor ativador do fator nuclear kB (RANKL)/receptor ativador do fator nuclear kB (RANK)/osteoprotegerina (OPG) e estimulam a diferenciação de osteoclastos e consequente reabsorção óssea (WONG et al., 2016). Dessa forma, além da baixa de estrogênio que ocorre no período pós-menopáusico, a inflamação decorrente do consumo de dieta hiperlipídica também pode atuar na reabsorção óssea, além dos efeitos prejudiciais ao coração.

Nesse sentido, a fim de proteger o organismo das alterações metabólicas que ocorrem na pós-menopausa e devido ao consumo de uma dieta hiperlipídica, o consumo de alimentos ricos em nutrientes e compostos bioativos pode ser uma boa estratégia. A semente de chia (*Salvia hispanica* L.) apresenta elevado valor nutricional, com altas concentrações de lipídios (30,17 g.100g<sup>-1</sup>), proteínas (19,72 g.100g<sup>-1</sup>), fibra alimentar total (37,18 g. 100g<sup>-1</sup>) e minerais, além de compostos bioativos benéficos à saúde humana (DA SILVA et al., 2017). Em relação ao conteúdo de minerais, a semente contém concentrações significativas de potássio, magnésio, ferro e zinco, e se destaca como excelente fonte de cálcio (cerca de 430mg/100g) (DA SILVA et al., 2017).

Além do conteúdo de cálcio dos alimentos, a sua biodisponibilidade é um fator que deve ser considerado para atender as recomendações desse mineral. A absorção intestinal está sujeita a muitas variáveis, incluindo idade, sexo, grupo étnico, outros componentes da dieta e o padrão de ingestão de cálcio (CANO et al., 2018). A biodisponibilidade depende também da solubilidade e permeabilidade no intestino (ERFANIAN, RASTI, MANAP, 2017), essa biodisponibilidade geralmente é aumentada quando o cálcio é bem solubilizado e diminuída quando há agentes que se ligam ao cálcio formando sais de cálcio insolúveis, como o lipídio, o ácido oxálico e o ácido fítico (WEAVER, 1994; IOM, 2011). A presença de fibra alimentar solúvel no cólon pode melhorar a morfologia intestinal e colonização bacteriana, reduzir o pH e dessa forma melhorar a absorção de cálcio (DA SILVA et al., 2019c).

O consumo da semente de chia tem apresentado uma série de benefícios à saúde, dentre eles, proteção cardiovascular e hepática (MELO, MACHADO, OLIVEIRA, 2019). Os benefícios da semente de chia associados a marcadores de DCV têm sido atribuídos a grande quantidade de ácido  $\alpha$ -linolênico ( $\omega$ -3) em sua composição (TOSCANO et al., 2014; FORTINO et al., 2017). A avaliação do perfil de peptídeos da semente de chia quanto as suas funções, também demonstrou sequências peptídicas com potencial biológico promissor, com propriedades antioxidantes e hipotensora (GRANCIERI, MARTINO, MEJIA, 2019).

Em estudo anterior, o consumo de chia durante 35 dias como única fonte de cálcio, fornecendo 50% da necessidade de cálcio para roedores apresentou baixa biodisponibilidade do mineral, independentemente do tipo de dieta consumida (padrão ou hiperlipídica) em ratos Wistar machos jovens, mas seu consumo reduziu o processo inflamatório e melhorou o perfil de lipídio. O consumo de dieta hiperlipídica aumentou a inflamação e reduziu a resistência óssea sugerindo que a inflamação, em decorrência de dieta hiperlipídica, a longo prazo pode interferir na biodisponibilidade do cálcio (DA SILVA et al., 2019a). No modelo de animais ovariectomizados (DA SILVA et al., 2019b), o consumo de chia, melhorou o perfil de lipídios, melhorou a atividade antioxidante no fígado dos animais e diminuiu marcadores inflamatórios.

Neste estudo, investigamos se a chia, fornecendo 20% da recomendação de cálcio, com base em um consumo humano de 40g de chia/dia, em uma dieta que atende a 100% da recomendação do mineral, pode manter o estado nutricional de cálcio em animais ovariectomizados, e se o consumo de uma dieta hiperlipídica por estes, pode prejudicar o estado nutricional de cálcio, além dos efeitos na estrutura óssea e no coração dos animais. A inovação do estudo deve-se ao fato de não ter sido relatado anteriormente o efeito do consumo de chia associado à dieta padrão e à dieta hiperlipídica, em ratas Wistar fêmeas submetidas ou não à ovariectomia, em relação a biodisponibilidade de cálcio e seu efeito no metabolismo ósseo, além da avaliação do estresse oxidativo, do conteúdo mineral, e o papel dos minerais na atividade de enzimas antioxidantes no coração dos animais experimentais.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar o efeito da chia (*Salvia hispanica* L.) na saúde óssea e cardiovascular de ratas Wistar ovariectomizadas alimentadas com dieta hiperlipídica.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Avaliar a biodisponibilidade de cálcio da chia, e seu efeito na remodelagem óssea, no consumo alimentar e na biometria dos animais, quando consumida como parte de uma dieta hiperlipídica em ratas ovariectomizadas;
- Avaliar o efeito do consumo de chia na biometria, estresse oxidativo, conteúdo de minerais e enzimas ATPases do coração, quando consumida como parte de uma dieta hiperlipídica em ratas ovariectomizadas.

## **3. HIPÓTESES**

O cálcio presente na semente de chia, em uma dieta em que a chia fornece 20% da recomendação total de cálcio, apresentará biodisponibilidade semelhante a uma fonte padrão de cálcio (carbonato de cálcio), quando consumida como parte de uma dieta que atende a 100% da recomendação do mineral para roedores. O consumo de dieta hiperlipídica irá diminuir a absorção de cálcio, que associada a ovariectomia levará a perda óssea.

A chia terá efeitos benéficos em relação ao estresse oxidativo e dados biométricos do coração e irá manter o seu conteúdo mineral. A dieta hiperlipídica associada a ovariectomia, irá alterar as medidas biométricas dos animais e do coração, aumentar o estresse oxidativo e alterar a atividade das ATPases.

## 4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1. Chia

A chia (*Salvia hispanica* L.) é uma planta herbácea que pertence à família Lamiaceae nativa do sul do México e norte da Guatemala (CAPITANI et al., 2012), atualmente é cultivada comercialmente na Austrália, Bolívia, Colômbia, Guatemala, México, Peru e Argentina (BUSILACCHI et al., 2013), apesar de ter a China como o maior exportador. As sementes de chia são pequenas ( $1,87 \pm 0,1$  mm de comprimento,  $1,21 \pm 0,08$  mm de largura e  $0,88 \pm 0,04$  mm de espessura) com formato elipsoide e cor escura ou branca (MUÑOZ et al., 2013; MELO, MACHADO, OLIVEIRA, 2019), são consumidas a muitos anos e eram utilizadas para fins artísticos e terapêuticos por civilizações maias e astecas (DE SOUZA et al., 2015; MARCINEK, KREJPCIO, 2017). Entretanto, o consumo de chia tem aumentado ao longo dos anos, devido aos seus benefícios à saúde decorrentes principalmente da sua composição nutricional. A semente de chia é consumida inteira, na forma de farinha ou óleo, sozinha (in natura), adicionada a outros alimentos, como iogurtes, saladas e frutas e em preparações como pães, bolos, barras alimentícias, bebidas e outros. A incorporação de chia nos alimentos melhora suas características físico-químicas e sensoriais, principalmente suas propriedades nutricionais e concentrações de proteínas, ácidos graxos insaturados, antioxidantes e fibras alimentares (GRANCIERI, MARTINO, MEJIA, 2019).

Uma recente revisão mostrou que o consumo da semente e do óleo de chia tem apresentado uma série de benefícios à saúde, como efeitos antidiabéticos, potencial antitumoral, atividade imunoestimulante, proteção antioxidante, proteção cardiovascular e hepática (MELO, MACHADO, OLIVEIRA, 2019). Esses benefícios resultam principalmente do elevado valor nutricional da semente de chia, com altas concentrações de lipídios ( $30,17 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ), proteínas ( $19,72 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ), fibra alimentar total ( $37,18 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ) e minerais, além de compostos antioxidantes benéficos à saúde humana como compostos fenólicos, tocoferóis e tocotrienóis que conferem à semente uma alta atividade antioxidante (DA SILVA et al., 2017).

Os benefícios da semente de chia associados a marcadores de DCV têm sido atribuídos a quantidade de ácido  $\alpha$ -linolênico ( $\omega$ -3) em sua composição (TOSCANO et al., 2014; FORTINO et al., 2017). A chia é a maior fonte botânica de ácido  $\alpha$ -linolênico (AYERZA, 2009). A proporção de ácido  $\alpha$ -linoléico ( $\omega$ -6) /  $\alpha$ -linolênico ( $\omega$ -3) nas sementes brasileiras de chia foi relatada como 1:3 (DA SILVA et al., 2017), ambos são nutrientes essenciais ao organismo humano. Grancieri et al. (2019) avaliaram o perfil de peptídeos da semente de chia quanto as suas funções, que demonstraram sequências peptídicas com potencial

biológico promissor, apresentando principalmente propriedades antioxidantes, hipoglicêmica e hipotensora.

Em relação ao conteúdo de minerais da semente de chia, pode-se citar concentrações significativas de cálcio, potássio, magnésio, ferro e zinco (USDA, 2015; DA SILVA et al., 2017). A semente se destaca como excelente fonte de cálcio, apresentando cerca de 430mg do mineral em 100g de semente (DA SILVA et al., 2017).

O estudo de Montes Chañi et al. (2018) mostrou que ratos machos adultos (Sprague-Dawley) e eutróficos, alimentados a longo prazo (aproximadamente 10 e 13 meses) com sementes de chia representando 10% da dieta (100g de chia/kg de dieta), apresentaram maior conteúdo mineral ósseo e melhor morfologia dos hepatócitos e tecido intestinal, em comparação a uma dieta padrão. Sugerindo efeitos benéficos do consumo a longo prazo da semente de chia na saúde óssea, que é a evidência utilizada para o estabelecimento das recomendações de ingestão de cálcio (IOM, 2011).

#### **4.2. Cálcio**

O cálcio é o mineral divalente mais abundante no corpo humano, contribuindo com cerca de 1,5% do peso corporal total. Desempenha muitos papéis biológicos críticos, especialmente na fisiologia óssea e no sistema cardiovascular, é fundamental para mediar a contração e a vasodilatação, a função muscular, transmissão nervosa, sinalização intracelular e secreção hormonal. O tecido ósseo serve como reservatório e fonte de cálcio para as necessidades metabólicas críticas por meio do processo de remodelação óssea, sendo que mais de 99% do cálcio corporal total é encontrado nos ossos e dentes (IOM, 2011; NIH, 2018).

A ingestão de cálcio ocorre a partir de fontes alimentares ou suplementos. O cálcio é um nutriente muitas vezes consumido em quantidades inferiores à sua recomendação, devido a padrões gerais de alimentação com baixa ingestão de alimentos que contêm esse nutriente (vegetais, grãos integrais e laticínios). Os produtos lácteos, como leite, iogurte e queijos, são fontes ricas de cálcio, e já representaram a fonte predominante desse mineral na dieta, mas atualmente, esses produtos representam apenas 40% da ingestão de cálcio, devido à redução no consumo de leite e derivados (IOM, 2011; BUCHOWSKI, 2016; HODGES et al., 2019). A necessidade desse mineral varia com as fases da vida, de acordo com o crescimento e remodelação óssea (NIH, 2018). A recomendação de ingestão dietética de cálcio para indivíduos entre 19 e 50 anos é de 1000 mg por dia, e para mulheres acima de 51 anos é de 1200 mg por dia (IOM, 2011; HHS, 2015).

Um estudo norte-americano (BAILEY et al., 2010) mostrou que menos de um terço das mulheres entre 9 e 71 anos tinham ingestão adequada de cálcio somente pela dieta, a proporção melhorou entre as que utilizavam suplementos, mas, ainda assim, menos de 50% alcançou recomendações específicas por idade. O baixo consumo de cálcio está relacionado a complicações de saúde, como a osteoporose, o que torna esse mineral ainda mais relevante para a saúde pública (HHS, 2015). Por isso aumentar a ingestão de cálcio é uma estratégia eficaz para evitar a deficiência do mineral (BRYK et al., 2015), e a busca por fontes ricas em cálcio faz-se necessária para atender a diversos públicos, como aqueles que evitam a ingestão de produtos lácteos, por exemplo. Uma ingestão adequada de cálcio como base para a redução do risco de osteoporose pós-menopáusia continua sendo recomendação nas diretrizes e intervenções alimentares (CANO et al., 2018).

O mecanismo endócrino é o principal regulador do metabolismo de cálcio. O hormônio paratireoidiano (PTH) e a vitamina D atuam em conjunto, por meio de ciclos de feedback para manter a homeostase desse mineral. Em situações de necessidade, quando ocorre diminuição de cálcio sérico, há aumento da secreção de PTH, que aumenta a reabsorção óssea, para aumentar os níveis de cálcio extracelular, e induz a conversão da vitamina D em sua forma ativa, que por sua vez estimula a absorção intestinal de cálcio. Além disso, ocorre também a redução da excreção fecal e urinária do mineral, para manter os níveis adequados de cálcio circulante (IOM, 2011). A absorção de cálcio pode ocorrer por dois mecanismos: a difusão passiva, quando a concentração luminal de cálcio é suficientemente alta; e absorção ativa, uma via de transporte saturável, envolvendo receptores de vitamina D, que ocorre quando as concentrações de cálcio são baixas (FLEET, SCHOCH, 2011; DONG, ZHANG, WONG, 2014).

Cerca de 30% do cálcio presente nos alimentos é absorvido pelos seres humanos, sua biodisponibilidade depende da capacidade de absorção, distribuição e eliminação desse nutriente pelo organismo (LIM, YEO, TAN, 2017). A absorção intestinal está sujeita a muitas variáveis, incluindo idade, sexo, grupo étnico, outros componentes da dieta e o padrão de ingestão de cálcio (CANO et al., 2018). Essa biodisponibilidade geralmente é aumentada quando o cálcio é bem solubilizado e diminuída quando há agentes que se ligam ao cálcio formando sais de cálcio insolúveis, como o lipídio, o ácido oxálico e o ácido fítico. Por outro lado, a presença de fibra alimentar solúvel no cólon pode melhorar a morfologia intestinal e colonização bacteriana, reduzir o pH e dessa forma melhorar a absorção de cálcio (DA SILVA et al., 2019c). No modelo *Gallus gallus*, a administração intra-amniótica de extrato solúvel de

chia aumentou a área da superfície, comprimento e largura das vilosidades e aumentou o número e diâmetro de células calciformes, assim como o peso do ceco, sugerindo que a chia é um alimento promissor na melhora da morfologia intestinal. Esse extrato solúvel, devido a fibra alimentar, também aumentou a abundância relativa de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* no conteúdo do ceco (DA SILVA et al., 2019c), esses gêneros bacterianos produzem ácidos graxos de cadeia curta, que reduzem o pH intestinal, o que pode aumentar a solubilidade mineral e, portanto, sua absorção (PATTERSON, LEI, MILLER, 2008).

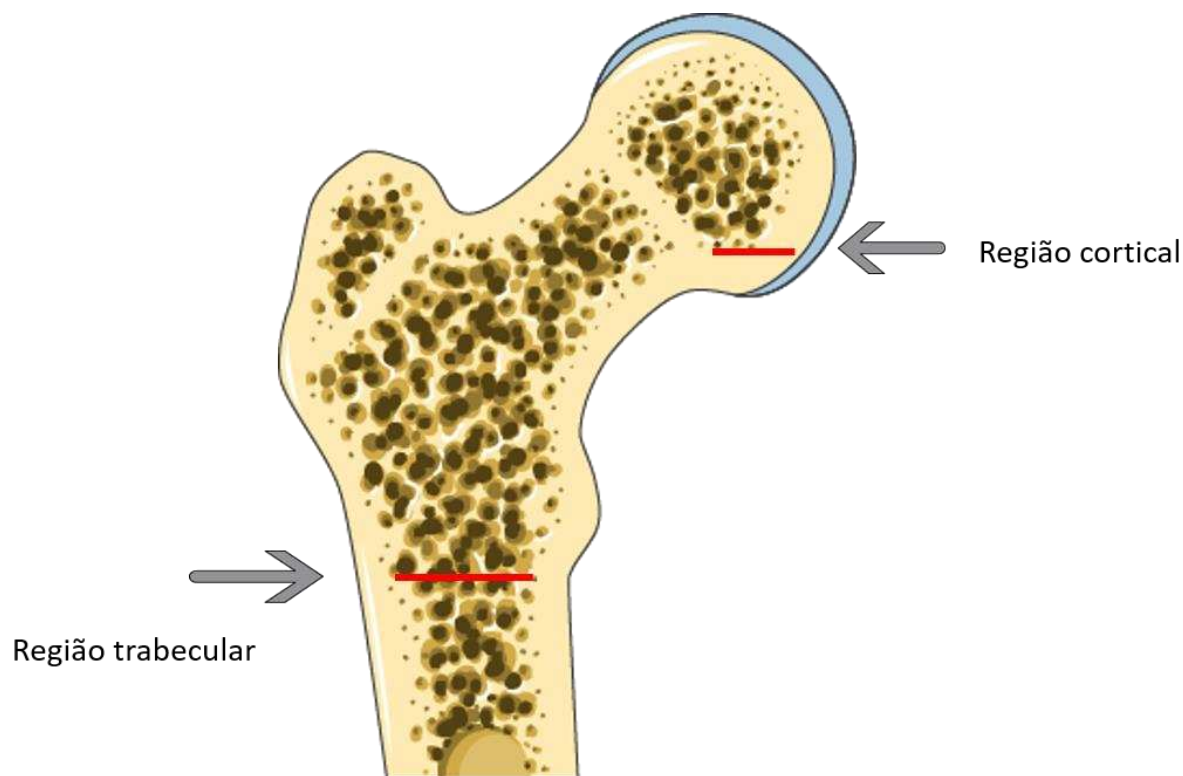
A associação entre a ingestão alimentar de cálcio e o risco de efeitos cardiovasculares foi questionada por muitos estudos. Uma recente metanálise de estudos observacionais (YANG et al., 2019) avaliou as evidências existentes nesse assunto. Os resultados indicaram que não houve associações entre a ingestão dietética de cálcio e o risco de doenças cardiovasculares, em um determinado intervalo de consumo de 200 mg/dia a 1500 mg/dia de cálcio. Esses achados mostraram que a ingestão dietética de cálcio adequada não aumenta o risco de DCV e suporta a recomendação de incentivo ao consumo de cálcio de fontes alimentares.

A saúde óssea é a evidência utilizada para o estabelecimento das recomendações de ingestão de cálcio, sendo o cálcio dietético uma das principais estratégias para construção e manutenção dos ossos (IOM, 2011; HODGES et al., 2019). O cálcio é o nutriente específico necessário para atingir o pico de massa óssea e para a redução de risco de osteoporose, mas sua recomendação, muitas vezes não é atingida pela alimentação (CASHMAN, 2006). Uma dieta insuficiente em cálcio, a longo prazo, torna o organismo mais suscetível à perda óssea que pode contribuir para o desenvolvimento da osteoporose.

### **4.3. Saúde óssea**

O osso é um tecido conjuntivo mineralizado que pode ser classificado em dois tipos diferentes: osso cortical e osso esponjoso ou trabecular. O osso cortical é uma camada compacta, espessa e densa que forma a superfície externa da maior parte dos ossos, e o osso esponjoso ou trabecular, tem o aspecto de uma esponja, é encontrado no final de ossos longos e dentro de ossos chatos e vértebras (Figura 1). O osso cortical tem uma função predominantemente estrutural e a maior parte de seu volume é calcificada, enquanto o osso trabecular tem papel metabólico, com pequeno volume calcificado, e é usado para trocas rápidas de cálcio, quando há necessidade fisiológica (WEHRLI et al., 2007; CLARKE, 2008). Observou-se que em dieta com baixa ingestão de cálcio, o número e a espessura trabecular foram reduzidos e a separação trabecular foi aumentada (CHANPAISAENG et al., 2019). Os

ossos com menor volume trabecular e menos trabéculas são mais suscetíveis a falhas estruturais (CIARELLI et al., 2000; FIELDS et al., 2012; NAWATHE et al., 2014).



**Figura 1.** Ilustração de corte longitudinal de um fêmur demonstrando as regiões trabecular e cortical.

O tecido ósseo é dinâmico, está em constante mudança ao longo da vida, acumula-se rapidamente durante a infância e a adolescência, permanece relativamente estável durante a vida adulta e é reabsorvido nos idosos, fase em que os osteoclastos são mais ativos que os osteoblastos ocasionando menor massa óssea e maior susceptibilidade a fraturas (NIH, 2018; HODGES et al., 2019). Osteoblastos e osteoclastos são as duas principais células que participam do processo de remodelagem óssea. Os osteoclastos são responsáveis pela reabsorção óssea e os osteoblastos são responsáveis pela formação óssea. A reabsorção e a formação permanecem estáveis sob condições fisiológicas normais. Mas o desequilíbrio nas atividades de síntese de matriz óssea pelos osteoblastos, e reabsorção óssea pelos osteoclastos leva a anormalidades esqueléticas como a perda óssea, e esse desequilíbrio pode ocorrer devido a fatores como alterações hormonais e inflamação (THEILL, BOYLE, PENNINGER, 2002; CHEN et al., 2018).

Com o envelhecimento, a eficiência de absorção de cálcio é diminuída, principalmente após a menopausa. A redução da produção de estrogênio que ocorre nessa fase leva ao aumento da remodelagem óssea caracterizada por um desequilíbrio entre a atividade osteoclástica e



osteoblástica, que resulta em perda óssea (HEANEY et al., 1989; HEANEY et al., 2003; RECKER et al., 2004; NIH, 2018). Essa atividade de remodelagem ocorre para reparar ossos enfraquecidos, mas torna a estrutura óssea mais fraca quando ocorre em excesso, levando a uma fragilidade maior do esqueleto (HEANEY, 2003).

A diminuição da densidade mineral e a destruição da microestrutura óssea caracterizam a osteoporose, uma doença metabólica progressiva que resulta em aumento da fragilidade do osso e suscetibilidade à fratura (SUGIMOTO et al., 2016). É uma doença crônica com prevalência crescente devido ao aumento da expectativa de vida (KANIS et al., 2013). A patogênese da doença é relacionada à diminuição dos níveis de hormônios sexuais e envelhecimento (COOPER et al., 2013), e apesar de afetar homens e mulheres, é mais comum nas mulheres e a menopausa é um fator de risco (IOF, 2017). De acordo com a Federação Internacional da Osteoporose, a doença causa mais de 8,9 milhões de fraturas por ano em todo o mundo e pode ser prevenida e tratada (IOF, 2017; NIH, 2018). A atividade física e a nutrição são medidas cruciais no estilo de vida, para reduzir o risco de osteoporose (MENDOZA et al., 2016). A ingestão adequada de cálcio, tem se mostrado uma excelente abordagem para a manutenção de um estado ósseo saudável (RIZZOLI, 2014).

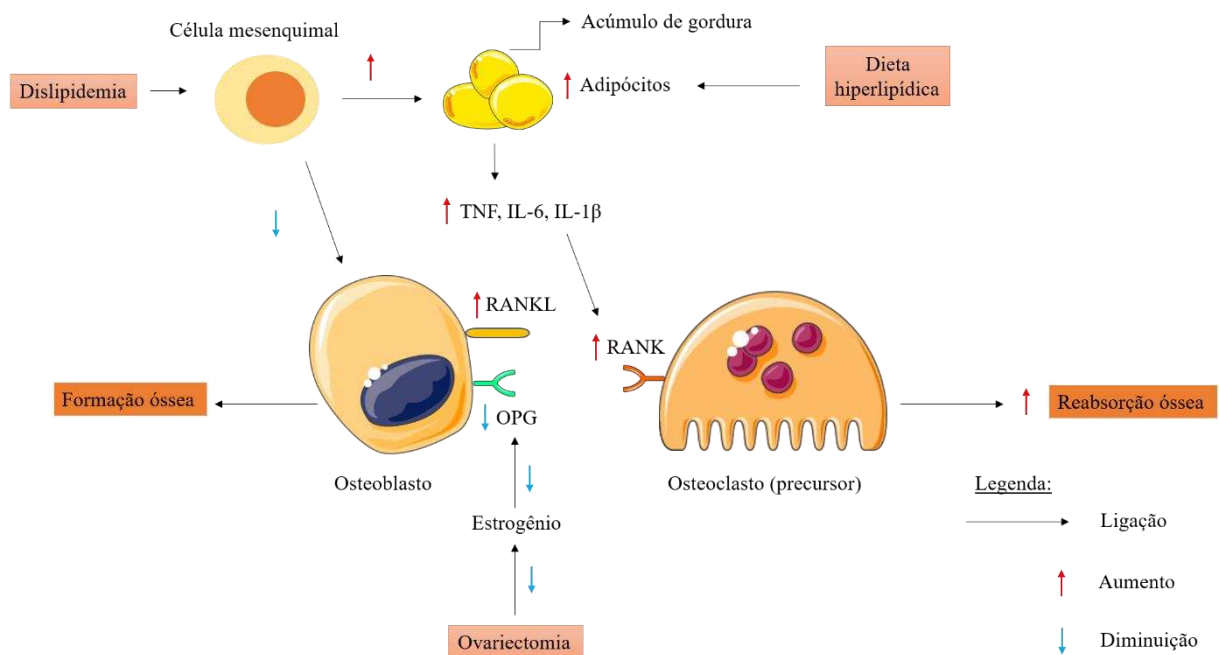
#### **4.4. Dieta hiperlipídica, inflamação e remodelagem óssea**

Os osteoblastos secretam RANKL em sua superfície e os osteoclastos expressam RANK, a ligação RANKL/RANK é o mediador chave para a osteoclastogênese, e essa ligação é inibida pela osteoprotegerina (OPG). OPG é um receptor para RANKL, sintetizada por osteoblastos e é capaz de se combinar com RANKL e inibir sua interação com RANK, e assim, inibe a maturação e ativação dos osteoclastos (THEILL, BOYLE, PENNINGER, 2002; STEEVE et al., 2004; WONG et al., 2016).

Além da regulação de OPG pela produção de estrogênio, já foi demonstrado que os adipócitos diminuem a interação entre RANKL e OPG, e aumentam RANK (XU et al., 2013), e os osteoblastos, quando foram estimulados por fatores de adipócitos, aumentaram a expressão de RANKL e diminuíram OPG (HALADE et al., 2010). Adipócitos e osteoblastos são derivados de um progenitor comum, e a oxidação lipídica associada à dislipidemia estimulou a diferenciação de adipócitos e suprimiu a diferenciação de osteoblastos (LECKA-CZERNIK et al., 2002).

O excesso crônico de ingestão calórica e, ou baixa prática de atividade física ocasiona um desbalanço energético e consequentes problemas de saúde, como a obesidade. O consumo

de uma dieta hiperlipídica aumenta a inflamação (DA SILVA et al., 2019a) e o estado inflamatório de baixo grau originado no tecido adiposo, que ocorre na obesidade, leva à geração de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) que podem se ligar a receptores na superfície dos pré-osteoclastos e estimular a via do ligante do receptor ativador do fator nuclear  $\kappa$ B (RANKL)/receptor ativador do fator nuclear  $\kappa$ B (RANK) que estimulam a diferenciação dos osteoclastos e a reabsorção óssea, retirando o cálcio dos ossos para corrente sanguínea (WONG et al., 2016) (Figura 2).



**Figura 2.** Regulação da formação de osteoclastos e reabsorção óssea pela dieta hiperlipídica e ovariectomia.

Assim, o consumo de uma dieta hiperlipídica é associado ao aumento de marcadores inflamatórios e conseqüente redução da retenção óssea de cálcio (DA SILVA et al., 2019a). Além disso, o consumo de chia melhorou a atividade antioxidante e diminuiu as concentrações dos marcadores inflamatórios, em ratas Wistar alimentadas durante 18 semanas com a chia fornecendo 20% da recomendação de cálcio (DA SILVA et al., 2019b). Mas não se sabe até o momento, o efeito do consumo de uma dieta hiperlipídica, associada ou não ao consumo de chia como fonte de 20% da recomendação de cálcio da dieta, em relação à biodisponibilidade de cálcio, em ratas ovariectomizadas.

#### 4.5 Menopausa

Clinicamente, o diagnóstico da menopausa é feito quando a mulher não menstrua há um ano, em consequência da perda da atividade folicular ovariana, geralmente entre 45 e 55 anos de idade (LANDGREN et al., 2004; KO, 2020). O período de climatério é definido pela Organização Mundial da Saúde como uma fase biológica da vida compreendendo a transição entre o período reprodutivo e o não reprodutivo na vida da mulher (BRASIL, 2008). A menopausa é correlacionada a cessação da produção ovariana de ovócitos, quando todos os folículos ovarianos estão esgotados, o ovário é incapaz de responder a níveis elevados do hormônio folículo estimulante (FSH) e ocorre o declínio dos níveis de estrogênio (TAKAHASHI, JOHNSON, 2015). Essa redução dos níveis de estrogênio na pós-menopausa é associada a distúrbios no sono e humor, sintomas vasomotores (ondas de calor e suores noturnos), atrofia urogenital, distúrbios psiquiátricos, disfunção sexual, lesões de pele, distúrbios metabólicos e obesidade (LOBO et al., 2014) e ao desenvolvimento de doenças crônicas, como osteopenia e osteoporose (BONNICK et al. 2010; CANO et al., 2018) e DCV (BITTNER, 2009; MURPHY, 2012).

A menopausa está envolvida na regulação hormonal da osteoporose, a diminuição da função ovariana leva a redução na produção de estrogênio e consequente diminuição da produção de osteoprotegerina (OPG), um fator inibidor da osteoclastogênese (THEILL, BOYLE, PENNINGER, 2002). A perda de estrogênio pode acelerar ainda mais a perda óssea através de seu efeito na diminuição da absorção de cálcio e aumento da perda urinária (NORDIN et al., 2004). Ainda não é claro até que ponto a ingestão de cálcio pode diminuir a intensidade da perda óssea, mas a ingestão inadequada de cálcio pode agravar a situação (IOM, 2011).

O estrogênio exerce um papel protetor no sistema cardiovascular, sua redução tem sido associada à inflamação e as alterações no perfil de lipídios, com aumento de colesterol total e de LDL-colesterol (lipoproteína de baixa densidade), além da redução de HDL-colesterol (lipoproteína de alta densidade) (TALEB-BELKADI et al., 2016). A produção de estrogênio ocorre principalmente nos ovários por meio de um processo que utiliza o LDL-colesterol (lipoproteína de baixa densidade) como substrato, porém, durante a menopausa, o LDL-C (circulatório) não pode ser utilizado para sintetizar estrogênio. Dessa forma, a menopausa está associada ao aumento dos níveis sanguíneos de LDL-C e ao aumento do risco de DCV (ZAW et al., 2018). A depleção de estrogênio pode diminuir a expressão dos genes necessários para um gasto energético eficiente e dos genes envolvidos no metabolismo dos ácidos graxos ou no

catabolismo lipídico, que podem induzir a obesidade ou distúrbios metabólicos em mulheres na pós-menopausa (AL-SAFI, POLOTSKY, 2015). Associa-se também ao aumento nas medidas da gordura central, indicando mudança na distribuição da massa de gordura nessa fase da vida (AMBIKAI RAJAH et al., 2019), a alteração na sensibilidade a insulina e também o aumento na pressão arterial, que são fatores de risco para DCV (TCHERNOF et al., 1998; DE KONING et al., 2007; BARTON et al., 2009; MATTHEWS et al., 2009). Mulheres na pós-menopausa apresentam maior risco de DCV do que aquelas que não passaram pela menopausa na mesma idade e essas diferenças podem ser atribuídas aos hormônios sexuais e seus receptores (BLENCK et al., 2016; REGITZ-ZAGROSEK, KARARIGAS, 2017). Antes da menopausa, a incidência de DCV é menor em mulheres em comparação com homens da mesma idade (DUBEY et al., 2005; GREEN et al., 2016). No entanto, após a menopausa e a perda associada de estrogênio endógeno, assim como alterações em outros hormônios reprodutivos, essa diferença diminui e as taxas de DCV aumentam (MATTHEWS et al., 2009; PATRIZIO et al., 2016; SONG et al., 2019). Dessa forma, o estrogênio tem sido considerado cardioprotetor, em função de seus efeitos benéficos no sistema cardiovascular (RIBEIRO JUNIOR et al., 2017).

A ovariectomia em ratas é um modelo menopausal seguro e eficaz com grandes semelhanças com as encontradas em mulheres pós-menopáusicas como diminuição dos níveis de estrogênio, declínio nos folículos, ciclagem irregular, flutuações hormonais dos esteroides, fertilidade irregular, além da osteoporose pós-menopáusica devido à perda óssea e às suas sequelas (KALU, 1991; MOIETY et al., 2015).

Assim, a menopausa pode levar a várias alterações no metabolismo lipídico devido à secreção reduzida de estrogênio, incluindo aumento da massa de gordura. Essas alterações aumentam a suscetibilidade à adiposidade, obesidade e aumento do risco de distúrbios metabólicos, incluindo DCV. Por isso mulheres na pós-menopausa devem consumir dietas com nutrientes que possam proteger das alterações que ocorrem no organismo, nesse período, como antioxidantes, ômega 3, fitoquímicos e probióticos, por exemplo (KO, 2020).

## **4.6 Papel cardioprotetor do estrogênio**

### **4.6.1 Estrogênio, estresse oxidativo e inflamação**

A ovariectomia e consequente deficiência de estrogênio aumenta a formação de ERO's (DANTAS et al., 2004; RIBEIRO JUNIOR et al., 2017). Esse aumento das ERO's devido à ausência das propriedades antioxidantes do estrogênio é apontado como uma das causas da disfunção endotelial e efeitos prejudiciais no sistema cardiovascular (VIRDIS et al., 2000;

BIANCHI et al., 2006; ZHAO et al., 2018). O estresse oxidativo é relacionado à fisiopatologia das DCV (SKIBSKA et al., 2015) e, portanto, a redução de estrogênio e o comprometimento das defesas antioxidantes podem contribuir para doenças relacionadas à menopausa (KAUR et al. 2017). Dessa forma, o papel protetor do estrogênio contra o estresse oxidativo (BORRÁS et al., 2005; BORRÁS et al., 2010; LÓPEZ-GRUESO et al., 2014) pode ser uma das razões para a diferença de gênero associada ao estresse oxidativo e as doenças cardiovasculares (KANDER, CUI, LIU, 2017).

O estrogênio modula a concentração de ERO's por meio de um mecanismo que envolve a interação com seus receptores nucleares diminuindo proteínas oxidativas e, ou aumentando a expressão de enzimas antioxidantes (NOVELLA et al., 2012). Os hormônios sexuais alteram citocinas inflamatórias, logo, o estrogênio também pode atuar na resposta inflamatória (CORCORAN et al., 2010). Nesse sentido, a deficiência de estrogênio pode prejudicar a função endotelial vascular por meio de uma regulação positiva da inflamação e, ou do estresse oxidativo (SUMINO et al., 2006; NYBERG et al., 2014).

#### **4.6.2 Estrogênio e hipertrofia cardíaca**

As DCV são a principal causa de morte no mundo (ROTH et al., 2017) e quase todos os tipos de DCV são associados à hipertrofia (ZHOU, MA, HAN, 2016). A hipertrofia é o aumento da massa ou do músculo cardíaco (NAKAMURA, SADOSHIMA, 2018), pode ser fisiológica ou patológica, aparece mais tarde nas mulheres do que nos homens (REGITZ-ZAGROSEK, SEELAND, 2011), e é caracterizada pela anormalidade na homeostase intracelular de cálcio (DONALDSON et al., 2009).

Foi demonstrado que o estrogênio diminuiu o peso ventricular e a relação peso ventricular/peso corporal (VAN EICKELS et al., 2001) e em ratas ovariectomizadas ocorreu aumento do peso do ventrículo esquerdo (LIN et al., 2018). O uso de estrogênio na terapia de reposição hormonal contribuiu para a diminuição da massa ventricular esquerda (DASH et al., 2003). O estrogênio também diminuiu a hipertrofia induzida por sobrecarga de pressão por um mecanismo dependente do receptor de estrogênio que aumentou a degradação de calcineurina (WU et al. 2005; DONALDSON et al., 2009). A eficácia do tratamento com estrogênio na sobrecarga crônica de volume foi associada a diminuição do estresse oxidativo (GARDNER et al., 2010) e a ovariectomia aumentou a hipertrofia cardíaca induzida por sobrecarga de pressão, deteriorou a função cardíaca e aumentou a mortalidade, efeitos que foram relacionados ao comprometimento das atividades da enzima óxido nítrico sintase (eNOS) pela ovariectomia (BHUIYAN, SHIODA, FUKUNAGA, 2007).

Portanto, acredita-se que o estrogênio desempenhe papel na inibição do desenvolvimento da hipertrofia cardíaca por meio da regulação de vias relacionadas ao cálcio (WU et al., 2019), a atividade da eNOS e ao estresse oxidativo.

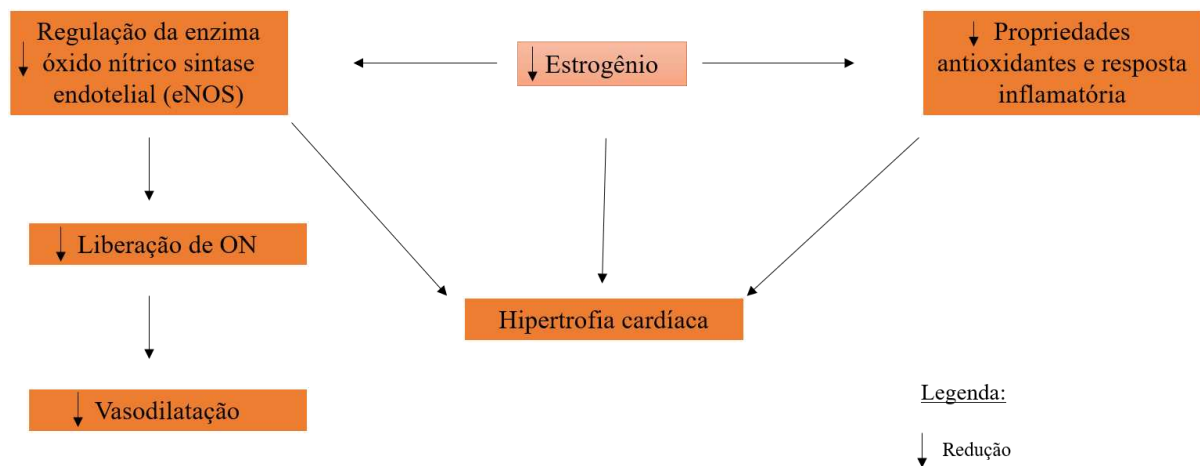
#### **4.6.3 Estrogênio e óxido nítrico**

O óxido nítrico (ON) é essencial para o funcionamento endotelial, participando de vasodilatação, sinalização celular, angiogênese, prevenção da agregação plaquetária e supressão de processos inflamatórios, por isso é considerado uma molécula cardioprotetora, mesmo sendo um radical livre. Mas, em condições de estresse oxidativo, níveis elevados de superóxido reagem com o ON formando o peroxinitrito, uma espécie reativa de nitrogênio (ERN's) que causa alterações na mitocôndria e superprodução de ERO's, levando a disfunção endotelial. Nas paredes dos vasos, o estrogênio desempenha um papel na regulação da expressão da eNOS endotelial e conseqüentemente, induz a liberação de ON promovendo, portanto, proteção arterial (DANTAS et al., 2004; KIM, BENDER, 2005; KIM, BENDER, 2009; DIAS et al., 2014). Assim, o ON demonstrou ser um componente com papel na sinalização e no efeito cardioprotetor do estrogênio (MURPHY, 2012).

A L-arginina é o precursor do ON derivado do endotélio, a reação é catalisada principalmente pela eNOS junto com o cofator tetra-hidrobiopterina (BH4) e oxigênio molecular (CHAKRABARTI et al., 2014). A estabilidade da eNOS pode ser afetada na deficiência no substrato L-arginina e, ou do cofator BH4, resultando no desacoplamento da eNOS e, conseqüente aumento da produção de superóxido. A eNOS mostrou-se desacoplada com a idade e a doença, geralmente devido à perda ou oxidação do cofator BH4 (MURPHY, 2012). No período de pós-menopausa, foi observado metabolismo aumentado de L-arginina e inibição da eNOS, contribuindo para uma relativa deficiência de L-arginina. Reduções na biodisponibilidade do cofator BH4, também ocorre em mulheres na pós-menopausa com deficiência de estrogênio (MOREAU et al., 2012), o que pode levar ao desacoplamento da eNOS e à geração de ERO's (SCHMIDT et al., 2007), contribuindo para o aumento do estresse oxidativo e diminuição da vasodilatação dependente do endotélio, característica da disfunção endotelial (DELP et al., 2008).

O endotélio mantém um equilíbrio entre vasoconstrição e vasodilatação (VIRDIS et al., 2000; FELETOU, 2015) e a diminuição dos níveis de estrogênio pode contribuir para a disfunção endotelial após a menopausa (MATURANA, IRIGOYEN, SPRITZER, 2007). A geração de ON mediada por estrogênio difunde-se no músculo liso vascular, ativando vias que contribuem para o relaxamento das células musculares lisas, levando a vasodilatação (SOMANI

et al., 2019). Portanto, a redução da geração de ON é relacionada a redução da vasodilatação dependente do endotélio (GREEN et al., 2014). Nessa fase de deficiência crônica de estrogênio, ocorre uma biodisponibilidade reduzida de ON devido ao estresse oxidativo aumentado, citocinas pró inflamatórias elevadas (SEALS et al., 2006; HILDRETH et al., 2014; SEALS et al., 2014) e menor liberação de ON (RIBEIRO JUNIOR et al., 2017). O estrogênio fornece proteção ao endotélio vascular em mulheres na pré-menopausa (SOMANI et al., 2019), e foi observado que mulheres na pós-menopausa e com obesidade podem ser mais suscetíveis a prejuízos na função endotelial do que homens e mulheres na pós-menopausa sem obesidade (SUBOC et al., 2013).



**Figura 3.** Papel cardioprotetor do estrogênio. ON: óxido nítrico. A redução do estrogênio leva à redução da liberação de óxido nítrico, das propriedades antioxidantes e da resposta inflamatória e consequentemente pode levar à hipertrofia cardíaca.

#### 4.7 Minerais X Saúde cardiovascular

Os minerais da dieta podem ter a capacidade de prevenir doenças cardiovasculares. Ma et al. (2019) encontraram que a ingestão dos minerais zinco, cobre, ferro e selênio está inversamente associada ao risco de doença cardiovascular. Relacionando o papel desses minerais ao estresse oxidativo e ao metabolismo lipídico.

A hiperlipidemia interrompe o equilíbrio redox e causa liberação anormal e descontrolada de radicais livres, levando a eventos aterogênicos acelerados e ao desenvolvimento de um estado de estresse oxidativo (MOHAN-KUMARI et al., 2011.) O sistema antioxidante do organismo combate a progressão do estresse oxidativo para recuperar a homeostase redox, mas se esgota em condições crônicas como hiperlipidemia (CAMPOLO et al., 2013.). Alguns minerais atuam como cofatores de enzimas do sistema antioxidante

endógeno, e então, dessa forma, presume-se que o conteúdo mineral seja relacionado ao funcionamento adequado dessas enzimas. O conteúdo mineral também é de interesse, visto que algumas funções intrínsecas ao órgão requerem minerais para sua execução adequada, como o cálcio relacionando-se a contração cardíaca (IOM, 2011) e o magnésio que relacionando-se à eletrofisiologia cardíaca (LI et al., 2020)

#### 4.8 ATPases

As ATPases são enzimas transportadoras, presentes em todas as membranas celulares (SOUSA et al., 2018), desempenham papel no equilíbrio osmótico, regulando as concentrações de íons no interior das células, logo, são essenciais para a manutenção da homeostase celular (APELL, 2004). O aumento do estresse oxidativo e a peroxidação de lipídios altera a composição lipídica das membranas, afetando sua fluidez e permeabilidade e, portanto, prejudicando as funções das enzimas, como por exemplo, diminuição da atividade cardíaca da  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase (HOLLÁN, 1996; SANTOS et al., 2006; SOUSA et al., 2015). Alterações na atividade enzimática podem prejudicar o transporte iônico, e levar a anormalidades no metabolismo de cálcio, podendo levar a disfunção cardíaca (BABU, SABITHA, SHYAMALADEVI, 2006). A  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase é a principal proteína ativa de transporte de cálcio responsável pela manutenção dos níveis normais de cálcio intracelular em vários tipos de células (BABU, SABITHA, SHYAMALADEVI, 2006). As ATPases de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  da membrana plasmática são responsáveis por remover o excesso de  $\text{Ca}^{2+}$  da célula, para manter a concentração do íon citosólico  $\text{Ca}^{2+}$  em um nível baixo, essencial para o funcionamento normal da célula (BERS, 2002; VANDECAETSBECK et al., 2011).

A  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase é responsável pelo gradiente eletroquímico dos íons de sódio e potássio, regulando a homeostase iônica. Ela mantém o potencial de membrana nas células do músculo liso vascular e regula o tônus vascular. As alterações na sua atividade foram associadas a anormalidades na vasodilatação endotélio dependente, piorando o desfecho cardiovascular (PALACIOS et al., 2004; RIBEIRO JUNIOR et al., 2017). A concentração intracelular de sódio é mantida por um equilíbrio entre o influxo e o efluxo de sódio contra o gradiente eletroquímico (PALACIOS et al., 2004; RIBEIRO JUNIOR et al., 2017). Sob condições basais, o influxo de sódio ocorre através dos canais rápidos de sódio, enquanto o efluxo ocorre principalmente pela  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Conseqüentemente, a inibição da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase do miocárdio, resulta em aumento da concentração basal de sódio. A normalização da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase foi proposta como um dos mecanismos de proteção no coração de animais diabéticos (RAMASAMY et al., 1999). O estrogênio atua na liberação de ON que tem função



de vasodilatação das células do músculo liso vascular, ativa canais de potássio responsáveis pela regulação da função vascular e estimula a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (PALACIOS et al., 2004; RIBEIRO JUNIOR et al., 2017).

As concentrações de magnésio intracelular e extracelular têm efeitos nos canais de íons cardíacos, com papel na eletrofisiologia do coração e consequências na duração do potencial de ação, excitabilidade celular e contratilidade, o magnésio foi relacionado a proteção contra isquemia e a arritmias (LI et al., 2020).

## 5. METODOLOGIA

O presente estudo faz parte de um estudo inicial, como continuidade das investigações dos resultados existentes. Em estudo anterior, foi avaliada a biodisponibilidade de cálcio da chia em ratos machos Wistar jovens, a semente de chia foi utilizada como fonte única de cálcio, fornecendo 50% da recomendação de cálcio para roedores e apresentou baixa biodisponibilidade do mineral, independentemente do tipo de dieta consumida. Porém, seu consumo reduziu os processos inflamatórios e melhorou o perfil lipídico (DA SILVA et al., 2019a). No modelo de animais ovariectomizados (OVX), com o mesmo desenho experimental do presente estudo, o consumo de chia melhorou o perfil lipídico e, quando associada à dieta padrão em ratas OVX ou não ovariectomizadas (SHAM), melhorou a atividade antioxidante e quando associada à dieta rica em gordura em ratas OVX reduziu os níveis de marcadores inflamatórios (DA SILVA et al., 2019b). Assim, o presente estudo objetivou dar continuidade a essas investigações. Foi desenvolvido no laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa (UFV)/MG, a ovariectomia foi realizada no Hospital Veterinário (Departamento de Medicina Veterinária/UFV), para as análises foram utilizados, também, o Laboratório de Embalagens (Departamento de Tecnologia de Alimentos/UFV), Núcleo de Microscopia e Microanálise/UFV, Laboratório de Microscopia Analítica (Departamento de Física/UFV) e Laboratório de Metabolismo e Fermentação (Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/UFV).

### 5.1. Matéria prima

Foram utilizadas sementes de chia (*Salvia hispanica* L.) cultivadas no Mato Grosso (Brasil). Após a colheita, as sementes foram enviadas ao Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa, onde foram armazenadas a  $-18^{\circ}\text{C}$ , em embalagem a vácuo. As sementes foram moídas usando um moinho de facas (Marconi Equipment, Brasil) em três repetições, com tamanho de partícula de  $850\ \mu\text{m}$  (2000 rpm;  $600\ \mu\text{m}$ , 30 mesh) para serem adicionadas às dietas dos animais. Em seguida, a farinha de chia obtida foi acondicionada em sacos de alumínio de polietileno e armazenada em um freezer ( $-18^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) até o preparo da dieta experimental.

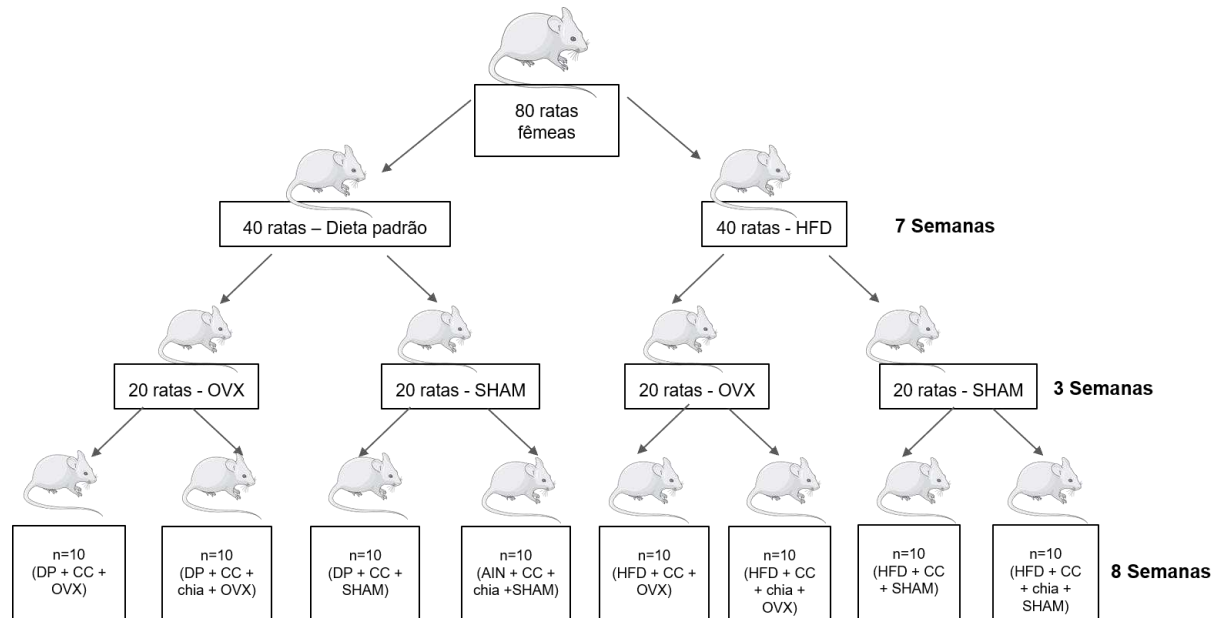
## 5.2. Desenho experimental

Oitenta ratas fêmeas (n=10/grupo) (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, variação albinus), recém-desmamadas, com 21 dias de vida foram obtidas do Biotério do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa (MG). O estudo experimental foi conduzido no Laboratório de Nutrição Experimental do Departamento de Nutrição e Saúde da mesma instituição. O cálculo amostral foi baseado na metodologia proposta por CONAGIN (1959), sendo cada animal considerado uma repetição, de modo que a diferença da média dos pesos entre os grupos não exceda seis gramas. Os animais foram distribuídos em gaiolas individuais de aço inoxidável, em ambiente com temperatura controlada ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e ciclos claro e escuro de 12 horas controlados automaticamente.

Os animais foram divididos em 2 grupos com 40 animais cada, randomizados pelo peso corporal, e receberam dietas padrão para roedores (REEVES, NIELSEN, FAHEY, 1993) (n=40) ou dieta hiperlipídica (n=40) e água deionizada ad libitum durante 7 semanas. Após esse período, 40 ratas foram submetidas a ovariectomia (grupo OVX), 20 ratas do grupo alimentado com dieta padrão, e 20 do grupo alimentado com dieta hiperlipídica e 40 ratas foram submetidas à cirurgia, sem a retirada do órgão (grupo SHAM), 20 ratas do grupo alimentado com dieta padrão, e 20 do grupo alimentado com dieta hiperlipídica, para que o estresse causado pela cirurgia ocorresse em ambos os grupos. Os animais permaneceram recebendo dieta padrão ou hiperlipídica (HFD) por mais 3 semanas, para recuperação da cirurgia. Após essas 10 semanas, os animais foram alocados nos seguintes oito grupos experimentais, nos quais permaneceram durante 8 semanas: (1) dieta padrão + carbonato de cálcio + OVX, (2) dieta padrão + chia + OVX, (3) dieta padrão + carbonato de cálcio + SHAM, (4) dieta padrão + chia + SHAM, (5) HFD + carbonato de cálcio + OVX, (6) HFD + chia + OVX, (7) HFD + carbonato de cálcio + SHAM ou (8) HFD + chia + SHAM (Figura 4).

O ganho de peso corporal e o consumo alimentar foram monitorados semanalmente durante o período experimental, utilizando uma balança eletrônica digital (Marte, Brasil). Na última semana de intervenção, as fezes e urina dos animais foram coletadas por três dias consecutivos para análise de balanço de cálcio. Ao final de 126 dias, após jejum de 12 horas, os animais foram anestesiados com isoflurano (Isoforine, Cristália®, Itapira, Brasil) e eutanasiados por punção cardíaca. O sangue foi coletado em tubos com heparina, 16 x 100 mm (BD Vacutainer®) e centrifugados (Hermle®, modelo Z216MK, Alemanha) a 800g por 10 minutos para separação do plasma. Urina, fezes, tecido adiposo, coração e fêmur direito foram armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento das análises. Os fêmures e tíbias esquerdos de cada animal

foram coletados, com o cuidado de remover todos os tecidos moles associados aos ossos e fixados em solução de formalina a 10%, por um período de 48 horas à temperatura ambiente, e, em seguida, as amostras foram desidratadas em gradiente de álcool, para análises posteriores.



**Figura 4.** Desenho experimental. DP: dieta padrão para roedores; HFD: dieta hiperlipídica; CC: carbonato de cálcio; OVX: ovariectomia; SHAM: cirurgia sem a retirada do ovário.

### 5.3. Procedimento de ovariectomia

Os animais foram submetidos à ovariectomia (OVX) com incisão e remoção do ovário, ou laparotomia (SHAM) com incisão abdominal sem remoção ovariana, para induzir estresse cirúrgico e seus efeitos. Trinta minutos antes do início da cirurgia, os animais receberam flunixinameglumina anti-inflamatória (0,68 mg/kg) e antibiótico enrofloxacina (10 mg/kg) via subcutânea. Os animais foram anestesiados com isoflurano diluído em oxigênio, por inalação através de um vaporizador calibrado. A concentração de isoflurano foi ajustada para manter a anestesia. Após indução e estabilização anestésica, os animais foram colocados em decúbito dorsal em colchão com aquecimento e o campo operatório foi preparado com iodopovidona 10%. Morfina analgésica foi administrada por via subcutânea na dose de 5 mg/kg.

Após a cirurgia, os animais permaneceram em câmara aquecida para manter a temperatura corporal e depois retornaram as gaiolas individuais. Os procedimentos cirúrgico-anestésicos e pós-cirúrgicos foram realizados no Hospital Veterinário do Departamento

Veterinário (UFV), sob responsabilidade da Médica Veterinária Lukiya Silva Campos Favarato.

#### **5.4. Composição da dieta e ingestão alimentar**

Todas as dietas utilizadas no experimento (padrão e HFD) foram preparadas no Laboratório de Nutrição Experimental. Os animais receberam dieta padrão (REEVES, NIELSEN, FAHEY, 1993) em pó (19% de proteínas, 17% de lipídios e 64% de carboidrato) ou dieta hiperlipídica (51% de lipídios, 15% de proteínas e 34% de carboidratos) (RESEARCH DIETS, 2017), com modificações, dependendo de qual grupo estavam alocados, ad libitum. A albumina foi utilizada como fonte proteica, em substituição à caseína, devido a menor concentração de cálcio contaminante.

A quantidade de chia ofertada nas dietas foi determinada de forma que a dieta fornecesse 100% das recomendações de cálcio para roedores (5000 mg de cálcio por 1 kg de dieta) (REEVES, NIELSEN, FAHEY, 1993) e a chia contribuisse com 20% do cálcio, os 80% restantes serão provenientes do carbonato de cálcio (CC). A quantidade de chia foi determinada baseada no consumo humano de 40g de chia/dia (2 colheres de sopa), representando um valor possível de ser ingerido. Os demais ingredientes das dietas foram adicionados em quantidades suficientes para equiparar a composição de lipídios, proteínas, carboidratos, fibras e calorias das dietas correspondentes (Tabela 1).

Para o cálculo da dieta experimental, foi considerada a composição centesimal da semente de chia obtida previamente (30,2 g/100g de lipídios; 19,7 g/100g de proteínas; 37,0 g/100g de fibra, 2,2 g/100g de carboidratos e 430 mg de cálcio /100g) (DA SILVA et al., 2017). Todos os ingredientes foram pesados em balança semi-analítica (Gehaca, BG2000, Brasil), misturados manualmente, peneirados e homogeneizados em batedeira industrial (Leme) durante 15 minutos. Após o preparo, as dietas foram acondicionadas em sacos de polietileno, devidamente rotulados e armazenados em freezer ( $-18^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ).

A dieta oferecida aos animais foi pesada, considerando o peso do comedouro, em balanças do tipo Filizola. Os restos de dieta deixado nos comedouros e a dieta desperdiçada nos compartimentos abaixo da gaiola, foram pesados para o cálculo do consumo alimentar dos animais. Para o manejo da água potável ofertada, foram utilizadas garrafas de vidro com cerca de 500 mL de água, adaptadas com rolha para manter o fechamento e um cano em aço inox para proporcionar a abertura necessária para que os animais obtivessem água em forma de bebedouro, com verificação diária da saída de água.

Foi calculado o coeficiente de eficiência alimentar (CEA) que é obtido pela relação entre o ganho de peso corporal e a quantidade total de dieta consumida (DA SILVA et al. 2016). O coeficiente foi determinado considerando o período em que os animais consumiram chia:

$$\text{CEA (\%)} = (\text{Ganho de peso corporal (g)} / \text{Consumo total de dieta (g)}) \times 100.$$

**Tabela 1.** Composição das dietas experimentais

Ingredientes (g kg <sup>-1</sup> )	Dietas iniciais (10 semanas)		Dietas experimentais (8 semanas)			
	DP	HFD	DP + CC	HFD + CC	DP + chia	HFD + chia
Albumina (g)*	179,50	179,50	179,50	179,50	133,70	133,70
Chia (g)	0,00	0,00	0,00	0,00	232,60	232,60
Amido dextrinizado (g)	155,00	155,00	155,00	155,00	155,00	155,00
Sacarose (g)	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Banha (g)	0,00	240,00	0,00	195,00	0,00	195,00
Óleo de soja (g)	40,00	40,00	70,20	70,20	0,00	0,00
Celulose (g)	50,00	50,00	86,00	86,00	0,00	0,00
Mix mineral livre de cálcio (g)	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00
Mix vitamínico (g)	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
L-cistina (g)	1,80	1,80	1,80	1,80	1,80	1,80
Bitartarato de colina (g)	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
Amido de milho (g)	419,95	178,45	347,50	151,00	319,40	122,90
Colesterol (g)	0,00	1,50	0,00	1,50	0,00	1,50
Carbonato de cálcio (g)	12,50	12,50	12,50	12,50	10,00	10,00
<b>Composição nutricional</b>						
Calorias totais (kcal)	3778,00	4971,80	3760,80	4728,80	3647,40	4616,40
Densidade calórica (kcal/g)	3,77	4,97	3,76	4,73	3,65	4,62

DP: Dieta padrão; HFD: dieta hiperlipídica; DP + CC: dieta padrão + carbonato de cálcio; HFD+CC: dieta hiperlipídica + carbonato de cálcio; DP + chia: dieta padrão + chia; HFD+chia: dieta hiperlipídica + chia.

## 5.5. Medidas biométricas dos animais

### 5.5.1 Índice de massa corporal

O índice de massa corporal (IMC) foi obtido pela relação entre o peso e o quadrado do comprimento. A medida foi realizada no início e no final do período experimental.

$$\text{IMC} = \text{peso} / \text{comprimento}^2$$

Foram considerados obesos os animais cujos valores de IMC foram superiores a 0,68kg/m<sup>2</sup> (NOVELLI et al., 2007).

### **5.5.2. Perímetro abdominal**

O perímetro abdominal foi obtido no ponto médio entre o crânio e os membros pélvicos do animal. Foram considerados obesos os animais cujos valores de perímetro abdominal foram superiores a 17 cm (REYNÉS et al., 2014).

### **5.5.3. Adiposidade**

O percentual de adiposidade é dado pela soma dos pesos dos tecidos adiposo visceral, gonadal, retroperitoneal, mesentérico e inguinal, divididos pelo peso corporal total e multiplicado por 100 (PEREIRA et al., 2012).

## **5.6. Determinação do balanço metabólico de cálcio**

Na semana anterior à eutanásia, cada rata foi alojada individualmente em uma gaiola metabólica e amostras de urina e fezes foram coletadas, durante três dias consecutivos, ao longo do período de 24 horas usando coletores específicos (FRANCO, 2009; DA SILVA et al., 2019a). A ingestão de cálcio de cada animal foi estimada de acordo com a sua ingestão alimentar diária, sendo as taxas de absorção e retenção calculadas utilizando as equações propostas por Ku et al. (2015):

- Taxa de absorção de Cálcio (%) =  $(\text{Ca Ingerido} - \text{Ca Fecal}) / \text{Ca Ingerido} \times 100$ ;
- Balanço de cálcio (mg / dia) =  $\text{Ca Ingerido} - (\text{Ca Urinário} + \text{Ca Fecal})$ ;
- Taxa de retenção de cálcio (%) =  $(\text{Balanço de Ca} / \text{Ca Ingerido}) \times 100$ .

Foi calculada a média de dieta consumida pelos animais por dia para cálculo do balanço de cálcio. As fezes foram pesadas, secas em estufa, trituradas e acondicionadas hermeticamente em sacos plásticos e armazenadas em congelador a -20°C até o momento das análises. A urina foi acondicionada em tubos plásticos e armazenada em congelador a -20°C até o momento das análises (LOBO et al., 2007; LOBO et al., 2009). O cálcio urinário foi analisado por meio de um kit específico (Bioclin®) utilizando o aparelho BS-200 Chemistry Analyzer (Bioclin®) enquanto o cálcio presente nas fezes e no fêmur foram analisados por espectrofotometria de absorção atômica (GOMES, 2011).

## **5.7. Morfometria óssea**

### **5.7.1. Dimensões anatômicas dos ossos**

O fêmur e a tíbia esquerdos de cada animal foram analisados quanto ao peso e suas dimensões anatômicas. Para isso, com base em Lammers et al. (1998) foi utilizado um



paquímetro digital de 200 mm (resolution, 0.01 mm; Model 530-312; Mitutoyo) e foram aferidas as seguintes medidas:

- Comprimento do fêmur (CF): do ponto mais proximal da cabeça do fêmur até o ponto mais distal na outra extremidade do osso;
- Largura da diáfise do fêmur (LF): largura da porção mais estreita na metade do fêmur;
- Comprimento da tíbia (CT): do ponto da tíbia mais próximo do fêmur até o ponto mais distal ao fêmur, mais próximo da articulação do tornozelo;
- Largura da tíbia (LT): largura no ponto mais distal.

### **5.7.2. Teste mecânico**

A resistência à tração máxima foi determinada no fêmur e na tíbia, usando uma Máquina de Teste Mecânico Universal (Instron, Norwood, MA USA) no Laboratório de Embalagens no Departamento de Tecnologia de Alimentos (UFV), por meio de aplicação da carga máxima, que é a maior carga alcançada antes da fratura e depende da morfologia óssea e do material ósseo, ela é fortemente correlacionada à área total e área cortical do osso (JEPSEN et al., 2015).

Para esse teste, os fêmures e tíbias foram colocados em dois pontos de apoio, com o terço médio da diáfise dos fêmures posicionado abaixo do dispositivo de carga, e então foram submetidos ao teste de flexão de três pontos (JEPSEN et al., 2015). O ponto de carregamento foi deslocado para baixo a uma velocidade de 0,03 mm/s até falha (fratura completa) no equipamento mecânico. A fratura óssea ocorre após a coalescência de microfissuras em uma microfissura que se propaga através do córtex (VASHISHTH, TANNER, BONFIELD, 2000).

Cada osso foi testado no plano anteroposterior (concauidade voltada para cima), com o lado anterior do osso voltado para cima. Os dados de força e deslocamento foram gravados num computador acoplado à máquina de ensaio.

### **5.7.3. Microtomografia óssea**

O escaneamento de alta resolução dos fêmures, foi realizado no Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa, utilizando um Microtomógrafo (SKYSCAN 1174v2), de acordo com as diretrizes publicadas Bouxsein (2010) e foi acompanhado por um técnico treinado.

A amostra foi colocada no aparelho alinhada ao eixo vertical do scanner, em seguida foram ajustadas as configurações de escaneamento. As configurações de energia utilizadas foram de 200uA /50keV, com um tempo de exposição de 1200ms, e um filtro de exposição de 0,5mm de acordo com as orientações do fabricante. A posição do osso também foi ajustada. As

varreduras usaram um passo a passo de rotação completa com cerca de 400 projeções totais. A resolução da imagem foi de 22,4  $\mu\text{m}$ , definido com base no tamanho da amostra.

Após o escaneamento ser concluído as imagens foram importadas para o software NRecon e verificadas quanto a artefatos de movimento e efeitos de endurecimento de feixes, e cada amostra foi reconstruída. Uma vez que a qualidade da imagem reconstruída foi considerada aceitável, a área de interesse da região óssea desejada (fêmur) foi selecionada manualmente, pelo mesmo operador para todas as amostras. Análises ósseas trabeculares para o fêmur foram realizadas na região da metáfise femoral distal no sentido proximal à placa de crescimento femoral distal, estendendo-se direção à diáfise média. Para os dados refletirem a área, um intervalo de 80 slices foi selecionado e mantido para todas as amostras. Em seguida, foram segmentadas em imagens binárias usando um limiar intermediário entre os valores em escala de cinza do osso e do fundo. Para fins de segmentação, foi utilizado um valor de limiar baseado no histograma de volume de imagem selecionando 60% de brilho.

Uma vez segmentada a região de interesse, essa foi importada para o software CTAn, onde foram construídas as imagens 3D e calculadas as medidas morfométricas ósseas, que incluem:

- Percentual de volume ósseo, relação entre o volume ósseo trabecular total e o volume total (tecido ósseo + medula óssea) ( $BV / TV$ , em %);
- Densidade de superfície óssea, relação entre a área de superfície óssea trabecular e o volume ósseo total trabecular ( $BS / TV$ , em 1/mm), representando a proporção de superfície óssea disponível para remodelação;
  - Espessura trabecular (Tb.Th, em mm);
  - Número trabecular (Tb.N, em 1/mm), em que um número maior sugere uma estrutura óssea mais forte;
  - Espaçamento trabecular (Tb.Sp, em mm), em que um número menor indica melhor estrutura;
  - Porosidade ( $Po(\text{tot})$ , em %)

Os fêmures foram escolhidos para análise porque exibem defeitos significativos de perda óssea relacionada à idade e à deficiência de estrogênio (HALLORAN et al., 2010; RENDINA et al., 2013; CHOMAN et al., 2015).

## **5.8. Medidas biométricas do coração**

Os corações foram removidos e pesados. A gordura atrelada ao coração foi separada, assim como o ventrículo esquerdo (VE) e ambos foram pesados separadamente. O índice de hipertrofia cardíaca foi calculado pela proporção de peso do coração (em mg) e comprimento da tíbia (em mm). O volume dos corações, bem como dos VEs e da gordura, foram determinados pelo método da submersão (SCHERLE, 1970).

## **5.9. Estresse oxidativo no coração**

### **5.9.1 Preparação do homogeneizado**

Para se obter um homogeneizado do coração, 200 mg de tecido foram macerados e acrescidos de 1000  $\mu$ L de tampão de fosfato (50 mM) e 1 mM de EDTA (pH 7,4). Os homogeneizados foram centrifugados a 12000g e 4°C durante 10 minutos, em seguida os sobrenadantes foram retirados cuidadosamente e transferidos para outro microtubo e usados imediatamente para os ensaios ou armazenados a -80°C até a análise.

### **5.9.2. Quantificação de proteína**

Para fazer a quantificação de proteína na amostra, foi feita a diluição do homogeneizado do coração em 1:10 (1 de tecido e 9 de tampão). Em seguida, 10  $\mu$ L da amostra diluída 1:10 foi adicionada aos poços, acrescentou-se 200  $\mu$ L do reagente de Bradford e adicionou-se água para completar o volume de 1.000  $\mu$ L e misturou-se em vortex. Após 15 min da adição do reagente Bradford foi feita a leitura por meio de um espectrofotômetro (Multiskan GO, Thermo Scientific, Ratastie, Finlândia) a absorbância a 595 nm. Os valores são expressos em mg de proteína/ $\mu$ L (BRADFORD, 1976).

### **5.9.3. Níveis de superóxido dismutase**

A quantificação da enzima superóxido dismutase (SOD) foi realizada em unidades relativas, uma unidade foi definida como a quantidade de SOD capaz de inibir a taxa de oxidação do pirogalol em 50%.

As amostras aliqüotadas nos microtubos (30  $\mu$ L), foram adicionadas de 249  $\mu$ L do tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,2, contendo 1mM de EDTA; 6  $\mu$ L de MTT (1,25 mM) e 15  $\mu$ L de pirogalol (10 mmol/L). Para o padrão, foram adicionados 6  $\mu$ L de MTT; 15  $\mu$ L de pirogalol (10 mmol/L) e 279  $\mu$ L de tampão e para a obtenção do branco foram aplicados aos poços 6  $\mu$ L de MTT e 294  $\mu$ L de tampão foram misturados. As amostras, padrão e branco foram incubadas a 37°C durante 5 minutos e a leitura executada em espectrofotômetro (Multiskan GO, Thermo Scientific, Ratastie, Finlândia) a 570 nm. Os resultados foram expressos em U de SOD/mg de

proteína. Os cálculos foram efetuados em relação ao valor da absorvância do padrão, considerando que este possui 1 U de SOD, ou seja, 100% de oxidação do pirogalol (MARKLUND, 1985).

#### **5.9.4. Malondialdeído**

A quantificação do malondialdeído (MDA) formado após a adição de ácido tiobarbitúrico foi com base na capacidade do ácido tiobarbitúrico reagir com certos compostos resultantes de peroxidação lipídica, como MDA.

Foram utilizados 400  $\mu\text{L}$  de amostra e 400  $\mu\text{L}$  de solução de TBARs (ácido tricloroacético 15% (p/v), ácido tiobarbitúrico 0,375% (p/v) e HCl 0,25 M) em microtubos de 2 mL. Em seguida, as amostras foram agitadas vigorosamente em vórtex e colocadas no banho maria a 95°C por 30 minutos. Após este procedimento, foi adicionado 600  $\mu\text{L}$  de n-Butanol, e a mistura foi agitada em vórtex e centrifugada a 3.500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente retirado e pipetado, em triplicata, em placa para leitura em espectrofotômetro (Multiskan GO, Thermo Scientific, Ratastie, Finlândia) a 535 nm (KOHN, LIVERSEDGE, 1944; PYLES et al., 1993). A concentração de MDA foi calculada utilizando-se o coeficiente de absorvância molar  $E_0 = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (BUEGE, AUST, 1978), sendo os resultados expressos em  $\mu\text{M}$  de MDA por miligramas de proteína.

#### **5.9.5. Atividade da enzima catalase (CAT)**

A determinação da atividade da enzima catalase (CAT) é baseada na sua capacidade de clivar o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) em água e o oxigênio molecular, conforme descrito por AEBI (1984).

Em um tubo de polipropileno foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  do sobrenadante do homogeneizado (diluído na proporção 1:10, em água), 1 mL de tampão fosfato 100 mM (pH 7,2) +  $\text{H}_2\text{O}_2$  (cada 25 mL de tampão 40  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30%). As absorvâncias foram determinadas nos tempos 0, 30 e 60 segundos a 240 nm em espectrofotômetro (T70 + UV/ VIS Spectrometer, Taylors, USA). O equipamento foi zerado antes de cada análise com tampão fosfato 100 mM pH 7,2 e a respectiva amostra. A absorvância utilizada para o cálculo é o delta obtido das absorvâncias lidas nos tempos 0 e 60 (absorvância final – absorvância inicial). Uma unidade (U) de catalase é equivalente a hidrólise de 1 mol de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\epsilon=39,4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) por minuto. A atividade da catalase foi calculada segundo a lei de Lambert Beer e expressa em  $\text{mmol}\cdot\text{min}/\text{mg PTN}$ .

### 5.9.6. Óxido Nítrico

A análise foi realizada no tecido cardíaco: 50  $\mu\text{L}$  do homogeneizado foi misturado as soluções A (1% sulfanilamida em 2.5%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) e B (0.1% naftil etileno amida dihydrochloride em 2.5%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) na razão de (1:1), a placa de microtitulação foi incubada no escuro por 10 min. A absorvância foi lida em um espectrofotômetro (Multiskan Go, Thermo Cientific) a 570nm e os resultados foram expressos em  $\mu\text{M}$  (GREEN et al., 1982).

### 5.10. Microanálise mineral no coração

O conteúdo mineral no tecido cardíaco foi investigado por espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS) usando um microscópio eletrônico de varredura (JEOL, JSM-6010LA) com um sistema detector de raios-x acoplado (Silicon Drift Detector). Pequenos fragmentos do coração de cada animal foram desidratados em estufa e revestidos com uma película fina de carbono evaporado (Evaporador de carbono Quorum Q150 T E, East Grinstead, West Sussex, Inglaterra, Reino Unido). A microanálise EDS foi realizada com aumento de 350  $\times$ , com uma tensão de aceleração de 20 kV e uma distância de trabalho de 10 mm. A proporção dos elementos cálcio (Ca), sódio (Na), potássio (K), magnésio (Mg), ferro (Fe), cobre (Cu), zinco (Zn), e manganês (Mn) foi medida por EDS, os valores foram normalizados e expressos como valor médio e desvio padrão (LADEIRA et al., 2019).

### 5.11. Determinação da atividade de ATPase, $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, $\text{Na}^+ / \text{K}^+$ -ATPase e Mg-ATPase no coração

A atividade total da adenosina trifosfatase ligada à membrana (ATPase), e as atividades de  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$ -ATPase,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase e Mg-ATPase a partir de tecidos cardíacos foram determinadas no sobrenadante de 100 mg de coração congelado homogeneizado em solução tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4 e centrifugado a 3500  $\times$  g a 5  $^\circ\text{C}$  por 10 min. Em um microtubo, foram adicionados 750  $\mu\text{L}$  de tampão e 250  $\mu\text{L}$  da mistura NaCl 0,1 M, KCl 0,1 M, MgCl 2 0,1 M, CaCl 2 0,1 M e solução ATP 0,01 M (50  $\mu\text{L}$  de cada solução) a 50  $\mu\text{L}$  de sobrenadante. As amostras foram incubadas a 37 $^\circ\text{C}$  por 20 min em banho maria, e a reação foi interrompida pela adição de 500  $\mu\text{L}$  de TCA 10% gelado, em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 1500  $\times$  g (AL-NUMAIR, VEERAMANI, ALSAIF, & CHANDRAMOHAN, 2015; SERTORIO et al., 2019). O teor de fósforo inorgânico no sobrenadante foi estimado por determinação colorimétrica (FISKE, SUBBAROW, 1925). A atividade total da ATPase foi expressa em micromol de fósforo liberado / min / mg de proteína.

### **5.12. Aspectos éticos**

O experimento foi realizado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, aprovado pelo Conselho Nacional de Controle de Animais experimentação (CONCEA). Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV), protocolo 20/2017, em anexo.

### **5.13. Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média e desvio padrão (média  $\pm$  DP). A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As diferenças entre o grupo SHAM e o OVX que receberam a mesma dieta foram testadas pelo teste T. Diferenças entre animais SHAM ou entre animais OVX que consumiram diferentes dietas foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguidos pelo teste de médias de Newman-Keuls a 5% de probabilidade. Todas as análises estatísticas e construção dos gráficos foram realizadas no software GraphPad Prism, versão 6 para Windows (GraphPad Prism Inc, EUA).

## REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.

AL-NUMAIR, K. S., VEERAMANI, C., ALSAIF, M. A.; et al. Influence of kaempferol, a flavonoid compound, on membrane-bound ATPases in streptozotocin-induced diabetic rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 9, p. 1372–1378, 2015.

AL-SAFI, Z. A., POLOTSKY, A. J. Obesity and Menopause. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 29, p. 548–553, 2015.

AMBIKAI RAJAH, A., WALSH, E., TABATABAEI-JAFARI, H., et al. Fat mass changes during menopause: a meta-analysis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 221, n.5 p. 15–17, 2019.

APELL, H. J. How do P-Type ATPases transport ions? **Bioelectrochemistry**, v. 63, p. 149–156, 2004.

AYERZA, R. The seed's protein and oil content, fatty acid composition, and growing cycle length of single genotype of Chia (*Salvia hispanica* L.) as affected by environmental factors. **Journal of Oleo Science**, v. 58, n. 7, p. 347–354, 2009.

BABU, P. V. A., SABITHA, K. E. et al. Green tea impedes dyslipidemia, lipid peroxidation, protein glycation and ameliorates  $Ca^{2+}$ -ATPase and  $Na^{+}/K^{+}$ -ATPase activity in the heart of streptozotocin-diabetic rats. **Pharmacological Research**, v. 162, p. 157–164, 2006.

BAILEY, R. L., DODD, K. W., GOLDMAN, J. A., et al. Estimation of Total Usual Calcium and Vitamin D Intakes in the United States. **The Journal of Nutrition**, v. 140, n. 4, p. 817–822, 2010.

BARTON, M., MEYER, M.R. Postmenopausal hypertension: mechanisms and therapy. **Hypertension**, v. 54, p. 11–18, 2009.

BERS, D. M. Cardiac excitation-contraction coupling. **Nature**, v. 415, n. 6868, p.198–205, 2002.

BHUIYAN, M. S., SHIODA, N., & FUKUNAGA, K. Ovariectomy augments pressure overload-induced hypertrophy associated with changes in Akt and nitric oxide synthase signaling pathways in female rats. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, v. 293, n. 6, p. E1606–E1614, 2007.

BIANCHI, P.R., GUMZ, B.P., GIUBERTI, K., STEFANON, I., Myocardial infarction increases reactivity to phenylephrine in isolated aortic rings of ovariectomized rats, **Life Sci**, v. 78, n. 8, p. 875–881, 2006.

BITTNER, V. Menopause, age, and cardiovascular risk: a complex relationship. **J Am Coll Cardiol**, v. 54, p. 2374–2375, 2009.

BLENCK, C. L., HARVEY, P. A., RECKELHOFF, J. F., & LEINWAND, L. A. The Importance of Biological Sex and Estrogen in Rodent Models of Cardiovascular Health and Disease. **Circulation Research**, v. 118, n. 8, p. 1294–1312, 2016.

BONNICK, S.L., HARRIS, S.T., KENDLER, D.L., et al. Management of osteoporosis in postmenopausal women: 2010 position statement of the North American Menopause Society. **Menopause**, v. 17, p. 25–54, 2010.

BORRÁS, C., GAMBINI, J., GÓMEZ-CABRERA, M.C. et al. 17 $\beta$ - Oestradiol up-regulates longevity-related, antioxidant enzyme expression via the ERK1 and ERK2[MAPK]/NF $\kappa$ B cascade. **Aging Cell**, v. 4, n. 3, p. 113–118, 2005.

BORRÁS, C., GAMBINI, J., LÓPEZ-GRUESO, R., PALLARDÓ, F.V., VIÑA, J. Direct antioxidant and protective effect of estradiol on isolated mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1802, n. 1, p. 205– 211, 2010.

BOUXSEIN, M.L., BOYD, S.K., CHRISTIANSEN, B.A., GULDBERG, R.E., JEPSEN, K.J., MULLER R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. **J Bone Miner Res**. v. 25, n. 7, p. 1468–86, 2010.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Atenção à Mulher no Climatério / Menopausa**. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. 1.<sup>a</sup> edição. Brasília. 2008.

BRYK, G., CORONEL, Z., PELLEGRINI, G., et al. Effect of a combination GOS / FOS  $\bar{\text{O}}$  prebiotic mixture and interaction with calcium intake on mineral absorption and bone parameters in growing rats. **Eur J Nutr**, v.54, p. 913–923, 2015.

BUCHOWSKI, M.S. Chapter 1 Calcium in the context of dietary sources and metabolism. In **Calcium: Chemistry, Analysis, Function and Effects**; The Royal Society of Chemistry: London, UK, pp. 3–20, 2016.

BUEGE, J. A., AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in enzymology**, v. 52, p. 302-310, 1978.

BUSILACCHI, H., QUIROGA, M., BUENO, M., et al. Evaluation of *Salvia hispanica* L. cultivated in the south of Santa Fe (Argentina). **Cultivos Tropicales**, v. 34, n. 4, p. 55–59, 2013.

CAMPOLO, Jonica; MARIA, Renata De; MARIOTTI, Caterina; et al. Is the Oxidant / Antioxidant Status Altered in CADASIL Patients? **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. 2–9, 2013.

CANO, A., CHEDRAUI, P., GOULIS, D. G., et al. Maturitas Calcium in the prevention of postmenopausal osteoporosis: EMAS clinical guide. **Maturitas**, v. 107, p. 7–12, 2018.



CAPITANI, M. I., et al. Physicochemical and functional characterization of by-products from chia (*Salvia hispanica* L.) seeds of Argentina. **LWT - Food Science and Technology**, v. 45, n. 1, p. 94–102, 2012.

CASHMAN, K. D. Calcium intake, calcium bioavailability and bone health. **British Journal of Nutrition**, v. 87, n. S2, p. S169, 2006.

CHAKRABARTI, S., MORTON, J.S., DAVIDGE, S. T. Mechanisms of estrogen effects on the endothelium: an overview. **Can J Cardiol**, v. 30, p.705–712, 2014.

CHANPAISAENG, K., FERNANDEZ, P. C. R., FLEET, J. C. Dietary calcium intake and genetics have site-specific effects on peak trabecular bone mass and microarchitecture in male mice. **Bone**, v. 125, n. May, p. 46–53, 2019.

CHEN, X., WANG, Z., DUAN, N.A., et al. Osteoblast–osteoclast interactions. **Connective Tissue Research**, v. 59, n. 2, p. 99–107, 2018.

CHOMAN, M., BLANTON, C., GABALDÓN, A. The Effect of a Symbiotic Diet on Bone Structure in Aging Male Mice. **FASEB J.**, v. 29, p. 738, 2015.

CIARELLI, T. E., FYHRIE, D. P., SCHAFFLER, M. B., et al. Variations in three-dimensional cancellous bone architecture of the proximal femur in female hip fractures and in controls. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 15, n. 1, p. 32–40, 2000.

CLARKE, B. Normal bone anatomy and physiology. **Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN**, v. 3 Suppl 3, p. S131-9, 2008.

CONAGIN, A. Recent tests for comparison of means. **Bragantia**, v. 18, n. UNICO, p. 01-12, 1959.

COOPER, C., COLE, Z. A., HOLROYD, C. R., et al. Secular trends in the incidence of hip and other osteoporotic fractures. **Osteoporos Int**, v. 22, n. 5, p. 1277–1288, 2013.

CORCORAN, M.P., MEYDANI, M., LICHTENSTEIN, A.H.; SCHAEFER, E.J., DILLARD, A., LAMON-FAVA, S. Sex hormone modulation of proinflammatory cytokine and C-reactive protein expression in macrophages from older men and postmenopausal women. **J Endocrinol**, v. 206, n. 2, p.217–224, 2010.

DA SILVA, B.P., ANUNCIACÃO, P.C., DA SILVA, J.C.M., DELLA LUCIA, C.M., MARTINO, H.S.D., PINHEIRO-SANT'ANA, H.M. Chemical composition of Brazilian chia seeds grown in different places. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1709-1716, 2017.

DA SILVA, B.P., DIAS, D.M., MOREIRA, M.E.C, TOLEDO, R.C.L., DA MATTA, S.L.P., DELLA LUCIA, C.M., MARTINO, H.S.D., PINHEIRO-SANTANA, H.M. Chia Seed Shows Good Protein Quality, Hypoglycemic Effect and Improves the Lipid Profile and Liver and Intestinal Morphology of Wistar Rats. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 71, n. 3, p. 225–230, 2016.

DA SILVA, B.P., KOLBA, N., MARTINO, H.S.D., HART, J., TAKO, E. Soluble Extracts from Chia Seed (*Salvia hispanica* L.) Affect Brush Border Membrane Functionality,

Morphology and Intestinal Bacterial Populations In Vivo (*Gallus gallus*). **Nutrients**, v. 11, n.10, p. 2457, 2019c.

DA SILVA, B. P., TOLEDO, R. C. L., DUARTE, M., DE CASTRO MOREIRA, M. E., VASCONCELOS, C., PEREIRA, C., PEREIRA, C. E. R., FAVARATO, L. S. C., COSTA, N. M. B., MARTINO, H. S. Effects of chia (*Salvia hispanica* L.) on oxidative stress and inflammation in ovariectomized adult female Wistar rats. **Food & Function**, 2019b.

DA SILVA, B.P., TOLEDO, R.C.L., GRANCIERI, M., DE CASTRO MOREIRA, M.E., MEDINA, N.R., SILVA, R.R., COSTA, N.M.B., MARTINO, H.S.D. Effects of chia (*Salvia hispanica* L.) on calcium bioavailability and inflammation in Wistar rats. **Food Research International**, v. 116, p. 592-599, 2019a.

DANTAS, A.P., FRANCO, M.C., SILVA-ANTONIALI, M.M., TOSTES, R.C. et al. Gender differences in superoxide generation in microvessels of hypertensive rats: role of NAD(P)H-oxidase. **Cardiovasc. Res.**, v. 61, n. 1, p. 22-29, 2004.

DASH, R., SCHMIDT, A. G., PATHAK, A., GERST, M. J., BINIAKIEWICZ, D., KADAMBI, V. J., et al. Differential regulation of p38 mitogen-activated protein kinase mediates gender-dependent catecholamine- induced hypertrophy. **Cardiovascular Research**, v. 57, n. 3, p. 704–714, 2003.

DE KONING, L., MERCHANT, A. T., POGUE, J., et al. Waist circumference and waist-to-hip ratio as predictors of cardiovascular events: Meta-regression analysis of prospective studies. **European Heart Journal**, v. 28, n. 7, p. 850–856, 2007.

DE SOUZA FERREIRA, C., DE SOUSA FOMES, L. F., DA SILVA, G. E. S., et al. Effect of chia seed (*Salvia hispanica* L.) consumption on cardiovascular risk factors in humans: A systematic review. **Nutricion Hospitalaria**, v. 32, n. 5, p. 1909–1918, 2015.

DELP, M.D., BEHNKE, B.J., SPIER, S.A., WU, G., MULLER-DELP, J.M. Ageing diminishes endothelium-dependent vasodilatation and tetrahydrobiopterin content in rat skeletal muscle arterioles. **J Physiol**, v. 586, n. 4, p. 1161–1168, 2008.

DIAS, F.M., RIBEIRO, R.F.Jr, FERNANDES, A.A., FIORIM, J., TRAVAGLIA, T.C., VASSALLO, D.V, STEFANON, I. Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase activity and K<sup>+</sup> channels differently contribute to vascular relaxation in male and female rats, **PLoS One**, v. 9, n. 9, 2014.

DONALDSON, C., EDER, S., BAKER, C., ARONOVITZ, M. J., WEISS, A. D., HALL-PORTER, M., et al. Estrogen attenuates left ventricular and cardiomyocyte hypertrophy by an estrogen receptor-dependent pathway that increases calcineurin degradation. **Circulation Research**, v. 104, n. 2, p. 265–275, 2009.

DONG, X. L., ZHANG, Y., WONG, M.S. Estrogen deficiency-induced Ca balance impairment is associated with decrease in expression of epithelial Ca transport proteins in aged female rats. **Life Sciences**, v. 96, n. 1–2, p. 26–32, 2014.

DUAN, Y., ZENG, L., ZHENG, C., et al. Inflammatory links between high fat diets and diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1–10, 2018.

DUBEY, R.K., IMTHURN, B., BARTON, M., JACKSON, E. K. Vascular consequences of menopause and hormone therapy: importance of timing of treatment and type of estrogen. **Cardiovasc Res**, v. 66, p. 295–306, 2005.

ERFANIAN, A., RASTI, B., MANAP, Y. Comparing the calcium bioavailability from two types of nano-sized enriched milk using in-vivo assay. **Food Chemistry**, v. 214, p. 606-613, 2017.

FELETOU, M., Endothelium-dependent hyperpolarization and endothelial dysfunction, **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v.67, n. 5, p. 373-387, 2016.

FIELDS, A. J., NAWATHE, S., ESWARAN, S. K., et al. Vertebral fragility and structural redundancy. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 27, n. 10, p. 2152–2158, 2012.

FISKE, C. H., SUBBAROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 66, p. 375–400, 1925.

FLEET, J. C., SCHOCH, R. D. Molecular Mechanisms for Regulation of Intestinal Calcium Absorption by Vitamin D and Other Factors. **Crit Rev Clin Lab Sci**, v. 47, n. 4, p. 181–195, 2011.

FORTINO, M. A., OLIVA, M.E., RODRIGUEZ, S., LOMBARDO, Y.B., CHICCO, A. Could post-weaning dietary chia seed mitigate the development of dyslipidemia, liver steatosis and altered glucose homeostasis in offspring exposed to a sucrose-rich diet from utero to adulthood? **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 116, p. 19–26, 2017.

FRANCO, F. S. C. **Efeitos da ovariectomia, ingestão de cafeína e exercício aeróbico associados à adequação ou não de cálcio alimentar na composição corporal, no tecido óseo e no balanço de cálcio em ratas**. Tese [Doutorado]. Universidade Federal de Viçosa, 2009. 206p.

GARDNER, J. D., MURRAY, D. B., VOLOSHENYUK, T. G., BROWER, G. L., BRADLEY, J. M., & JANICKI, J. S. Estrogen attenuates chronic volume overload induced structural and functional remodeling in male rat hearts. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, v. 298, n. 2, p. 497–504, 2010.

GOMES, J. C. **Análise de Alimentos**. Universidade Federal de Viçosa: Viçosa, Brasil, p.126, 2011.

GRANCIERI, M., MARTINO, H. S. D., MEJIA, E.G. Chia Seed (*Salvia hispanica* L.) as a Source of Proteins and Bioactive Peptides with Health Benefits: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 18, p. 480 – 499, 2019.

GREEN, D. J., DAWSON, E.A., GROENEWOUD, H. M., JONES, H., THIJSSSEN, D. H. Is flow-mediated dilation nitric oxide mediated? A meta-analysis. **Hypertension**, v. 63, p. 376–382, 2014.

GREEN, D. J., HOPKINS, N. D., JONES, H., THIJSSSEN, D.H., EIJSVOGELS, T. M., YEAP, B. B. Sex differences in vascular endothelial function and health in humans: impacts of exercise. **Exp Physiol**, v.101, p. 230–242, 2016.

GREEN, L. C., WAGNER, D. A., GLOGOWSKI, J., SKIPPER, P. L., WISHNOK, J. S., TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, v. 126, p. 131 – 138, 1982.

HALADE, G.V., RAHMAN, M. M., WILLIAMS, P.J., FERNANDES, G. High Fat Diet-Induced Animal Model of Age-associated Obesity and Osteoporosis. **J Nutr Biochem**, v. 21, n. 12, p. 1162–1169, 2010.

HALLORAN, B.P., WRONSKI, T.J., VON HERZEN, D.C., CHU, V., XIA, X., PINGEL, J.E., WILLIAMS, A.A., SMITH, B.J. Dietary dried plum increases bone mass in adult and aged male mice. **J. Nutr.**, v. 140, n. 10, p. 1781–1787, 2010.

HEALTH AND HUMAN SERVICES, HHS. 2015–2020 Dietary Guidelines for Americans. 8th Edition. December 2015. Disponível em: <<<http://health.gov/dietaryguidelines/2015/guidelines/>>>. Acesso em 21 de maio de 2019.

HEANEY, R. P. Is the paradigm shifting? **Bone**, v. 33, n. 4, p. 457–65, 2003.

HEANEY, R. P., RECKER, R. R., STEGMAN, M. R, et al. Calcium absorption in women: Relationships to Calcium intake, Estrogen status, and age. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 4, n. 4, p. 469–475, 1989.

HILDRETH, K.L., KOHRT, W.M., MOREAU, K. L. Oxidative stress contributes to large elastic arterial stiffening across the stages of the menopausal transition. **Menopause**, v. 21, p.624–632, 2014.

HODGES, J. K., CAO, S., CLADIS, D. P., et al. Lactose intolerance and bone health: The challenge of ensuring adequate calcium intake. **Nutrients**, v. 11, n. 4, 2019.

HOLLÁN, S. Membrane fluidity of blood cells. **Haematologia** (Budap), v. 27, n. 3, p. 109–127, 1996.

INSTITUTE OF MEDICINE, IOM. **Report Release: Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D**. November 30, 2010.

INTERNATIONAL OSTEOPOROSIS FOUNDATION, IOF. **Osteoporosis & musculoskeletal disorders**. 2017. Disponível em: << <https://www.iofbonehealth.org/whos-risk>>>. Acesso em 10 de dezembro de 2019.

JEPSEN, K.J., SILVA, M.J.; VASHISHTH, D., et al. Establishing biomechanical mechanisms in mouse models: Practical guidelines for systematically evaluating phenotypic changes in the diaphyses of long bones. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 30, n. 6, p. 951–966, 2015.

KANIS, J. A., MCCLOSKEY, E. V., JOHANSSON, H., et al. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. **Osteoporosis International**, v. 24, n. 1, p. 23–57, 2013.

KALU, D.N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. **Bone and Mineral**, v. 15, n. 3, p. 175–191, 1991.

KANDER, M.C., CUI, Y., LIU, Z. Gender difference in oxidative stress: a new look at the mechanisms for cardiovascular diseases. **J Cell Mol Med**. v. 21, n. 5, p. 1024–1032, 2017.

KAUR, A., NEGI, P., SARNA, V., et al. The appraisalment of antioxidant and oxidant status in women undergoing surgical menopause. **Ind J Clin Biochem**, v. 32, p. 179–185, 2017.

KIM, K.H., BENDER, J.R. Membrane-initiated actions of estrogen on the endothelium. **Mol Cell Endocrinol**. v.308, p.3–8, 2009.

KIM, K.H., BENDER, J.R. Rapid, estrogen receptor-mediated signaling: why is the endothelium so special? **Sci. STKE**, v. 288, n. 28, 2005.

KO, S.H. Menopause-Associated Lipid Metabolic Disorders and Foods Beneficial for Postmenopausal Women. **Nutrients**, v. 12, n. 202, p 2020.

KOHN, H.I., LIVERSEDGE, M. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine, and menadione. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 82, n. 3, p. 292-300, 1944.

KU, S.K., CHO, H.E., CHOI, J.S., KIM, J.W. Effects of Polycan on Calcium Bioavailability in Two Different Rat Models of Osteoporosis. **Toxicology of Environmental Health and Science**, v. 7, n. 1, 35-42, 2015.

LADEIRA, L. C. M., SANTOS, E. C. DOS, VALENTE, G. E., SILVA, J. DA, SANTOS, T. A., & MALDONADO, I. R. DOS S. C. Could biological tissue preservation methods change chemical elements proportion measured by Energy Dispersive X-ray Spectroscopy? **Biological Trace Element Research**, 2019.

LAMMERS, A.R., GERMAN, R.Z., LIGHTFOOT PS. The impact of muscular dystrophy on limb bone growth and scaling in mice. **Acta Anat**, v.162, p.199–208, 1998.

LANDGREN, B.M., COLLINS, A., CSEMICZKY, G., et al. Menopause Transition: Annual Changes in Serum Hormonal Patterns over the Menstrual Cycle in Women during a Nine-Year Period Prior to Menopause. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 89, n. 6, p. 2763–2769, 2004.

LECKA-CZERNIK, B., MOERMAN, E.J., GRANT, D. F., et al. Divergent Effects of Selective Peroxisome Proliferator- Activated Receptor- $\gamma$ 2 Ligands on Adipocyte Versus Osteoblast Differentiation. **Endocrinology**, v. 143, p. 2376–2384, 2002.

LI, J., HOVEY, K.M., ANDREWS, C.A., QUDDUS, A.; et al. Association of Dietary Magnesium Intake with Fatal Coronary Heart Disease and Sudden Cardiac Death 1. **Journal of Women's Health**, v. 29, n. 1, p. 7–12, 2020.

- LIM, D. C. S., YEO, E. Y. M, TAN, W. Y. Combinatory Nutrition Supplementation: A Case of Synergy for Increasing Calcium Bioavailability. World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Biological, Biomolecular, **Agricultural, Food and Biotechnological Engineering**, v. 11, n. 2, p. 168-173, 2017.
- LIN, Y.Y., CHEN, J.S, WU, X.B., SHYU, W.C. CHAUNCHAIYAKUL, R., ZHAON, X.L., KUO, C.H., CHENG, Y.LJ., YANG, A.L., LEE, S.D. Combined effects of 17  $\beta$  -estradiol and exercise training on cardiac apoptosis in ovariectomized rats. **PLOS ONE**, v. 2, p. 1–19, 2018.
- LOBO, A. R., COLLI, C., ALVARES, E. P., FILISETTI, T. M. Effects of fructans-containing yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp & Endl.) flour on caecum mucosal morphometry, calcium and magnesium balance, and bone calcium retention in growing rats. **British Journal of Nutrition**, v. 97, n. 04, p. 776-785, 2007.
- LOBO, A. R., MANCINI FILHO, J., ALVARES, E. P., COCATO, M. L., COLLI, C. Effects of dietary lipid composition and inulin-type fructans on mineral bioavailability in growing rats. **Nutrition**, v. 25, n. 2, p. 216-225, 2009.
- LOBO, R.A, DAVIS, S.R., DE VILLIERS, T.J., et al. Prevention of diseases after menopause. **Climacteric.**, v.17, n. 5, p. 540–556, 2014.
- LÓPEZ-GRUESO, R., GAMBINI, J., ABDELAZIZ, K. M. et al. Early, but not late onset estrogen replacement therapy prevents oxidative stress and metabolic alterations caused by ovariectomy. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 20, n. 2, pp. 236–246, 2014.
- MA, Xiaoyu; JIANG, Shan; YAN, Shoumeng; et al. Association Between Copper, Zinc, Iron, and Selenium Intakes and TC/HDL-C Ratio in US Adults. **Biological Trace Element Research**, 2019.
- MARCINEK, K., KREJCIO, Z. Chia seeds (*Salvia hispanica*): health promoting properties and therapeutic applications – a review. **Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny**, v. 68, n. 2, p. 123–129, 2017.
- MARKLUND, S. Pyrogallol autooxidation. In: **Handbook of Methods for Oxygen Radical Research** (CRC Press Boca Raton FL), p.243-247, 1985.
- MATTHEWS, K.A., CRAWFORD, S.L., CHAE, C.U., EVERSON-ROSE, S.A., SOWERS, M.F., STERNFELD, B., SUTTON-TYRRELL, K. Are changes in cardiovascular disease risk factors in midlife women due to chronological aging or to the menopausal transition? **J Am Coll Cardiol**, v. 54, p. 2366–2373, 2009.
- MATURANA, M.A., IRIGOYEN, M.C., SPRITZER, P.M. Menopause, estrogens, and endothelial dysfunction: current concepts, **Clinics (Sao Paulo)**, v. 62, n. 1, pp. 77-86, 2007.
- MELO, D., MACHADO, T. B., OLIVEIRA, M.B.P.P. Chia seeds: an ancient grain trending in modern human diets. **Food & Function**, v. 10, p. 3068-3089 2019.

- MENDOZA, N., DE TERESA, C., CANO, A., GODOY, D., HITTA-CONTRERAS, F., LAPOTKA, M., et al. Benefits of physical exercise in postmenopausal women. **Maturitas**, v. 93, pp. 83-88, 2016.
- MOHAN-KUMARI, H. P.; DHALE, Mohan A.; AKHILENDER NAIDU, K.; et al. Antioxidant effect of red mould rice in hypercholesterolemic Wistar male rats. **Cell Biochemistry and Function**, v. 29, n. 7, p. 597–602, 2011.
- MOIETY, F.M., SALEM, H.A., MEHANNA, R.A., et al. Comparative study on induction and effects of surgical menopause in a female rat model: a prospective case control study. **Int J Clin Exp Med**. v. 8, p. 9403–9411, 2015.
- MONTES CHAÑI, E.M.; PACHECO, S.O.S., MARTÍNEZ, G.A., et al. Long-term dietary intake of chia seed is associated with increased bone mineral content and improved hepatic and intestinal morphology in Sprague-Dawley rats. **Nutrients**, v. 10, n. 7, p. 1–16, 2018.
- MOREAU, K.L., MEDITZ, A., DEANE, K.D., KOHRT, W.M. Tetrahydrobiopterin improves endothelial function and decreases arterial stiffness in estrogen-deficient postmenopausal women. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 302, p. H1211–H1218, 2012.
- MUÑOZ, L.A., COBOS, A., DIAZ, O., et al. Chia Seed (*Salvia hispanica*): An Ancient Grain and a New Functional Food. **Food Reviews International**, v. 29, n. 4, p. 394–408, 2013.
- MURPHY, E. Estrogen Signaling and Cardiovascular Disease Elizabeth. **Circ Res.**, v. 109, n. 6, p. 687–696, 2012.
- NAKAMURA, M., SADOSHIMA, J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. **Nature Reviews. Cardiology**, v. 15, n. 7, p.387–407, 2018.
- NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, NIH. **Osteoporosis Overview**. 2018. Disponível em: <<[https://www.niams.nih.gov/health\\_info/bone/osteoporosis/osteoporosis\\_hoh.asp](https://www.niams.nih.gov/health_info/bone/osteoporosis/osteoporosis_hoh.asp)>>. Acesso em 20 de maio de 2019.
- NAWATHE, S.; AKHLAGHPOUR, H.; BOUXSEIN, M.L.; et al. Microstructural failure mechanisms in the human proximal femur for sideways fall loading. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 29, n. 2, p. 507–515, 2014.
- NORDIN, B.E.C., WISHART, J.M., CLIFTON, P.M., et al. A longitudinal study of bone-related biochemical changes at the menopause. **Clinical Endocrinology**, v. 61, n. 1, p. 123–130, 2004.
- NOVELLA, S., DANTAS, A.P., SEGARRA, G., MEDINA, P., HERMENEGILDO, C. Vascular aging in women: is estrogen the fountain of youth? **Front Physiol**, v. 3, p. 165, 2012.
- NOVELLI, E. L. B., DINIZ, Y. S., GALHARDI, C. M., EBAID, G. M. X., RODRIGUES, H. G., MANI et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Laboratory animals**. v. 41, n. 1, p. 111-119, 2007.

NYBERG, M., SEIDELIN, K., ANDERSEN, T.R., OVERBY, N.N., HELLSTEN, Y., BANGSBO, J. Biomarkers of vascular function in premenopausal and recent postmenopausal women of similar age: effect of exercise training. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 306, p. R510–R517, 2014.

PALACIOS, J., MARUSIC, E.T., LOPEZ, N.C., GONZALEZ, M., MICHEA, L. Estradiol-induced expression of N(+)-K(+)-ATPase catalytic isoforms in rat arteries: gender differences in activity mediated by nitric oxide donors, **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 286, n. 5, p. 1793–1800, 2004.

PATRIZIO, M., MARANO, G. Gender differences in cardiac hypertrophic remodeling. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, v. 52(2), p. 223–229, 2016.

PATTERSON, J.K., LEI, X.G., MILLER, D.D. The Pig as an Experimental Model for Elucidating the Mechanisms Governing Dietary Influence on Mineral Absorption. **Exp. Biol**, v. 233, p. 651–664, 2008.

PEREIRA, S. S., TEIXEIRA, L. G., AGUILAR, E. C., MATOSO, R. O., SOARES, F. L., FERREIRA, A. V., ALVAREZ-LEITE, J. I. **Animal Science Journal**, v. 83, p. 549–555, 2012.

PYLES, L. A., STEJSKAL, E. J., EINZIG, S. Spectrophotometric measurement of plasma 2-hiobarbituric acid-reactive substances in the presence of hemoglobin and bilirubin interference. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 202, n. 4, p. 407-419, 1993.

RAMASAMY, R., LIU, H., OATES, P.J., et al. Attenuation of ischemia induced increases in sodium and calcium by the aldose reductase inhibitor Zopolrestat. **Cardiovascular Research**, v. 42, n. 1, p. 130–139, 1999.

RECKER, R., LAPPE, J., DAVIES, K.M., HEANEY, R. Bone remodeling increases substantially in the years after menopause and remains increased in older osteoporosis patients. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 19, n. 10, p. 1628–1633, 2004.

REEVES, P., NIELSEN, F., FAHEY, G. Committee Report AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. **The Journal of Nutrition**, p.1939–1951, 1993.

REGITZ-ZAGROSEK, V., KARARIGAS, G. Mechanistic Pathways of Sex Differences in Cardiovascular Disease. **Physiological Reviews**, v. 97, n. 1, p. 1–37, 2017.

REGITZ-ZAGROSEK, V., SEELAND, U. Sex and gender differences in myocardial hypertrophy and heart failure. **Wiener Medizinische Wochenschrift**, v. 161, n. 5–6, p. 109–116, 2011.

RENDINA, E., HEMBREE, K.D., DAVIS, M.R., MARLOW, D., CLARKE, S.L., HALLORAN, B.P., LUCAS, E.A., SMITH, B.J. Dried plum's unique capacity to reverse bone loss and alter bone metabolism in postmenopausal osteoporosis model. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, 2013.



- REYNÉS, B., GARCÍA-RUIZ, E., DÍAZ-RÚA, R., PALOU, A., OLIVER, P. Reversion to a control balanced diet is able to restore body weight and to recover altered metabolic parameters in adult rats long-term fed on a cafeteria diet. **Food Research International**, v. 64, p. 839- 459, 2014.
- RIBEIRO JUNIOR, R.F.; FIORIM, J., et al. Vascular activation of K<sup>+</sup> channels and Na<sup>+</sup> -K<sup>+</sup> + ATPase activity of estrogen- deficient female rats. **Vascular Pharmacology**, v. 99, p. 23–33, 2017.
- RIZZOLI, R. Nutritional aspects of bone health Best Pract. Res. **Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 28, pp. 795-808, 2014.
- ROTH, G. A., JOHNSON, C., ABAJOBIR, A., ABD-ALLAH, F., ABERA, S. F., ABYU, G., et al. Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 70, n. 1, p. 1–25, 2017.
- SANTOS, H.L., RIGOS, C.F., CIANCAGLINI, P. Kinetics behaviors of Na,K-ATPase: comparison of solubilized and DPPC:DPPE-liposome reconstituted enzyme. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 142, n. 3–4, p.309–316, 2006.
- SCHERLE, W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. **Mikroskopie**, v. 26, n. 1, p. 57–60, 1970.
- SCHMIDT, T.S., ALP, N.J. Mechanisms for the role of tetrahydrobiopterin in endothelial function and vascular disease. **Clin Sci (Lond)**, v. 113, p. 47–63, 2007.
- SEALS, D.R., KAPLON, R.E., GIOSCIA-RYAN, R.A., LAROCCA, T.J. You're only as old as your arteries: translational strategies for preserving vascular endothelial function with aging. **Physiology (Bethesda)**, v. 29, p. 250 –264, 2014.
- SEALS, D.R., MOREAU, K.L., GATES, P.E., ESKURZA, I. Modulatory influences on ageing of the vasculature in healthy humans. **Exp Gerontol**, v.41, p. 501–507, 2006.
- SERTORIO, M. N., SOUZA, A. C. F., BASTOS, D. S. S., SANTOS, F. C., ERVILHA, L. O. G., FERNANDES, K. M., DE OLIVEIRA, L.L., MACHADO-NEVES, M. Arsenic exposure intensifies glycogen nephrosis in diabetic rats. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26(12), p.12459–12469, 2019.
- SKIBSKA, B., GORACA, A. The protective effect of lipoic acid on selected cardiovascular diseases caused by age-related oxidative stress. **Oxid Med Cell Longev**, p.1–11, 2015.
- SOMANI, Y.B., PAWELCZYK, J.A., DE SOUZA, M.J., et al. Aging women and their endothelium: probing the relative role of estrogen on vasodilator function. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v. 317, n. 40, 2019.
- SONG, J. J., MA, Z., WANG, J., CHEN, L. X., & ZHONG, J. C. Gender Differences in Hypertension. **Journal of Cardiovascular Translational Research**, 2019.

SOUSA, L., GARCIA, I.J.P., COSTA, T.G.F., SILVA, L.N.D., RENÓ, C.O., OLIVEIRA, E.S., TILELLI, C.Q., SANTOS, L.L., CORTES, V.F., SANTOS, H.L. BARBOSA, L.A. Effects of iron overload on the activity of NaK-ATPase and lipid profile of the human erythrocyte membrane. **PLoS One**, v. 10, n. 7, 2015.

SOUSA, L., PESSOA, M.T.C, COSTA, T.G.F., et al. Iron overload impact on P-ATPases. **Ann Hematol.**, v. 97, n. 3p. 377–385, 2018.

STEEVE, K. T., MARC, P., SANDRINE, T., DOMINIQUE, H., YANNICK, F. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 15, n. 1, p. 49-60, 2004.

SUBOC, T.M., DHARMASHANKAR, K., WANG, J., YING, R., COUILLARD, A., TANNER, M.J., WIDLANSKY, M.E. Moderate obesity and endothelial dysfunction in humans: influence of gender and systemic inflammation. **Physiol Rep**, v. 1, n. 3, p. 1-10, 2013.

SUGIMOTO, T., SATO, M., DEHLE, F.C., et al. Lifestyle-Related Metabolic Disorders, Osteoporosis, and Fracture Risk in Asia: A Systematic Review. **Value in Health Regional Issues**, v. 9, p. 49–56, 2016.

SUMINO, H., ICHIKAWA, S., KASAMA, S., TAKAHASHI, T., KUMAKURA, H., TAKAYAMA, Y., KANDA, T., KURABAYASHI, M. Different effects of oral conjugated estrogen and transdermal estradiol on arterial stiffness and vascular inflammatory markers in postmenopausal women. **Atherosclerosis**, v. 189, p. 436–442, 2006.

TAKAHASHI, T.A.; JOHNSON, K.M. Menopause. **Med Clin N Am**, v. 99, p. 521–534, 2015.

TALEB-BELKADI, O., CHAIB, H., ZEMOUR, L., et al. Lipid profile, inflammation, and oxidative status in peri- and postmenopausal women. **Gynecological Endocrinology**, v. 3590, 2016.

TCHERNOF, A., CALLES-ESCANDON, J., SITES, C.K., POEHLMAN, E.T. Menopause, central body fatness, and insulin resistance: effects of hormonereplacement therapy. **Coron Artery Dis** 9: 503–512, 1998.

THEILL, L.E.; BOYLE, W.J., PENNINGER, J.M. RANK-L AND RANK: T Cells, Bone Loss, and Mammalian Evolution. **Annual Review of Immunology**, v. 20, n. 1, p. 795–823, 2002.

TOSCANO, L. T. **Efeitos da suplementação de chia (Salvia hispanica L.) sobre a pressão arterial, estresse oxidativo, inflamação e modulação autonômica cardíaca em indivíduos hipertensos: um estudo de intervenção.** 2014. 95 f. Universidade Federal da Paraíba, 2014.

USDA. United States Department of Agriculture. Food and nutrition information center. Disponível em: <<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/data/>>.

VAN EICKELS, M., GROHE, C., CLEUTJENS, J. P., JANSSEN, B. J., WELLENS, H. J., & DOEVENDANS, P. A. 17beta-estradiol attenuates the development of pressure-overload hypertrophy. **Circulation**, v. 104, n. 12, p. 1419–1423, 2001.

VANDECAETSBEK, I., VANGHELUWE, P., RAEYMAEKERS, L., WUYTACK, F., VANOEVELEN, J. The Ca<sup>2+</sup> pumps of the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 3, n. 5, 2011.

VASHISHTH, D., TANNER, K.E., BONFIELD, W. Contribution, development and morphology of microcracking in cortical bone during crack propagation. **J Biomech**. V. 3, n. 9, p. 1169–74, 2000.

VENTURA, L. L., FORTES, N. C., SANTIAGO, H. C., CALIARI, M. V., GOMES, M. A., & OLIVEIRA, D. R. Obesity-induced diet leads to weight gain, systemic metabolic alterations, adipose tissue inflammation, hepatic steatosis, and oxidative stress in gerbils (*Meriones unguiculatus*). **PeerJ**, v. 5, 2017.

VIRDIS, A., GHIADONI, L., PINTO, S., LOMBARDO, M., PETRAGLIA, F., GENNAZZANI, A. et al. Mechanisms responsible for endothelial dysfunction associated with acute estrogen deprivation in normotensive women. **Circulation**, v. 101, n. 19, p. 2258–2263, 2000.

WEAVER, C.M., PLawecki, K.L. Dietary calcium: Adequacy of a vegetarian diet. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 59, p. 1238S–1241S, 1994.

WEHRLI, F.W. Structural and functional assessment of trabecular and cortical bone by micro magnetic resonance imaging. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**, v. 25, n. 2, p. 390–409, 2007.

WONG, S.K., CHIN, K.Y., SUHAIMI, F.H.J., et al. The relationship between metabolic syndrome and osteoporosis: A Review. **Nutrients**, v. 8, n. 6, 2016.

WU, C. H., LIU, J. Y., WU, J. P., HSIEH, Y. H., LIU, C. J., HWANG, J. M., et al. 17beta-estradiol reduces cardiac hypertrophy mediated through the up-regulation of PI3K/Akt and the suppression of calcineurin/NF-AT3 signaling pathways in rats. **Life Sciences**, v. 78, n. 4, p. 347–356, 2005.

WU, J., DAI, F., LI, C., et al. Gender differences in cardiac hypertrophy. **Journal of Cardiovascular Translational Research**, 2019.

XU, F., DU, Y., HANG, S. et al. Adipocytes regulate the bone marrow microenvironment in a mouse model of obesity. **Molecular Medicine Reports**, v. 8, n. 3, p. 823–828, 2013.

YANG, C., SHI, X., XIA, H., et al. The Evidence and Controversy Between Dietary Calcium Intake and Calcium Supplementation and the Risk of Cardiovascular Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of Cohort Studies and Randomized Controlled Trials. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 18, p. 1–19, 2019.

ZAW, J. J. T., HOWE, P. R. C., WONG, R. H. X. Postmenopausal health interventions: Time to move on from the Women' s Health Initiative? **Ageing Research Reviews**, v. 48, p. 79–86, 2018.

ZHAO, D., GUALLAR, E., OUYANG, P., et al. Endogenous sex hormones and incident cardiovascular disease in post-menopausal women. **J Am Coll Cardiol**. v. 71, p. 2555–2566, 2018.

ZHOU, L., MA, B., & HAN, X. The role of autophagy in angiotensin II-induced pathological cardiac hypertrophy. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 57, n. 4, p. R143–R152, 2016.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. ARTIGO 1: Bioavailability of calcium from chia (*Salvia hispanica* L.) in ovariectomized rats fed a high fat diet

\* Published in Journal of the American College of Nutrition



Journal of the American College of Nutrition



ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/uacn20>

### Bioavailability of Calcium from Chia (*Salvia hispanica* L.) in Ovariectomized Rats Fed a High Fat Diet

Marcella Duarte Villas Mishima , Bárbara Pereira da Silva , Renata Celi Lopes Toledo , Neuza Maria Brunoro Costa & Hércia Stampini Duarte Martino

**Abstract**

Skeletal abnormalities such as bone loss occur when there is an imbalance in bone matrix synthesis and bone resorption. This imbalance is also caused by hormonal changes and inflammation. Chia (*Salvia hispanica* L.) has a high nutritional value and is an excellent source of calcium. Objective: Evaluate the bioavailability of calcium from chia, and its effect on bone metabolism when consumed as part of a standard or high fat diet (HFD) in ovariectomized rats. Methods: The study was conducted with 80 female Wistar rats that received standard diet or HFD. 40 female mice were ovariectomized (OVX) and 40 were sham-operated (SHAM). After recovery from surgery the animals received chia as a source of 20% of the calcium recommendation, calcium bioavailability was measured using the calcium balance technique. Bone strength and bone morphometry were evaluated by weight, length and microtomography measurements. Results: HFD increased serum calcium and decreased calcium retention. The addition of chia to HFD did not alter bone morphology. Ovariectomy led to lower percentage of bone volume, smaller trabecular thickness, higher trabecular separation and higher porosity, when ovariectomy was associated with HFD, the final weight, waist circumference, body mass index and adiposity were increased. Conclusions: Chia maintained bone health when offered as a source of 20% calcium, in a diet that met 100% of the mineral recommendation, regardless of the type of diet, in animals non-ovariectomized adults.

**Keywords:** calcium; bioavailability; chia seed; bone health; ovariectomy.

## 1. Introduction

With aging and post-menopause, the efficiency of calcium absorption is decreased. Low estrogen levels are known to induce bone remodeling and skeletal frailty, determinants of osteoporosis pathogenesis (1-3). Skeletal abnormalities such as bone loss occur when there is an imbalance in bone matrix synthesis and bone resorption, controlled by osteoblasts and osteoclasts, respectively. This imbalance is also caused by hormonal changes and inflammation (4). In this sense, bone resorption is affected by low estrogen in the postmenopausal period and inflammation induced by obesity. Consumption of a high fat diet increases inflammation (5), adipocyte hypertrophy stimulates the secretion of proinflammatory cytokines. In turn, these cytokines stimulate the differentiation of osteoclasts and bone resorption (6, 7). Recommendation of calcium intake is based on bone health since calcium is one of the main strategies to ensure bone construction and maintenance (8), thus its adequate intake is important (9).

Some nutrients such as omega 3, dietary fiber, protein, vitamins, minerals, phytochemicals and phenolic compounds are considered responsible for the improvement of biological markers related to diseases due to anti-inflammatory, antioxidant, hypoglycemic and hypocholesterolemic properties (10). Thus, a diet rich in nutrients and bioactive compounds can protect the body from metabolic changes. Chia (*Salvia hispanica* L.) is an herbaceous plant of the Lamiaceae family, native to southern Mexico and northern Guatemala (11). Its seed has a high nutritional value, containing high concentrations of lipids, proteins, total dietary fiber, bioactive compounds and minerals. The high content of phenolic compounds, including rosmarinic acid, quercetin, myricetin, kaempferol, caffeic acid and gallic acid, give the seed antioxidant activity (5, 12, 13). In addition, soluble compounds extracted from chia seed have been shown to improve intestinal morphology and functionality, intestinal microbiota and gene expression of mineral metabolism-related proteins (14). Chia seed is an excellent source of

calcium, presenting about 430mg of the mineral in 100g of seed (12). However, the bioavailability of calcium must be considered in order to meet calcium recommendations. Several factors, such as solubility and intestinal permeability (15) can affect the bioavailability of calcium. Also, other compounds may alter its absorption, such as proteins, sodium, caffeine, phosphorus, oxalate and phytate (16).

Our previous study (17) found that when chia is used as a sole source of calcium to meet 50% of the requirement of the mineral in rodents, the bioavailability of calcium is low regardless of the type of diet consumed (standard or high fat) in young male Wistar rats. Despite this, chia intake reduced inflammation and improved lipid profile, reducing LDL-c and total cholesterol. A high fat diet increased inflammation and reduced bone strength suggesting that long term inflammation may interfere with the bioavailability of calcium in animals fed a high fat diet. In ovariectomized animal model (5), the ingestion of chia improved lipid profile, reducing LDL-c and total cholesterol and increase HDL-c. These positive effects on lipid profile can be attributed to the presence of polyunsaturated fatty acids, dietary fiber and phenolic compounds present in the seed (5, 12). The consumption of chia in overweight patients showed benefits to human health related to the improvement of the lipid profile, body weight and waist circumference (18). A review by ENES et al., (10) reported that the consumption of chia improved the lipid profile, is also related to normalization of insulin response and improvement on lipogenesis, effects on decreasing oxidative stress by increasing total antioxidant capacity, restoring antioxidant enzymes, decreasing reactive oxygen species (ROS) and lipid peroxidation and reduction on inflammation biomarkers. Due to the health benefits related to chia seed, its consumption has been increasing. Chia flour and oil decreased adiposity in rats fed HFHF diet (19). Chia seed is consumed whole or in the form of flour, in natura, added to other foods and in preparations. The use of chia as a food ingredient can improve the physical-chemical and sensory characteristics of food and especially its nutritional properties, such as



glycemic index, increased concentration of proteins, unsaturated fatty acids, minerals, dietary fibers and antioxidant activity (18).

In this study, we investigated whether chia, providing 20% of recommended calcium intake, in a diet that meets 100% of the mineral recommendation, can maintain the nutritional status of calcium in ovariectomized animals. And if the consumption of a high fat diet and ovariectomy will impair the nutritional status of calcium. The novelty of the study is related to the fact that no study has reported the effect of consuming chia combined with a standard or high fat diet on calcium bioavailability, especially in ovariectomized Wistar rats. Thus, the objective of this study was to evaluate the bioavailability of calcium from chia among ovariectomized and non-ovariectomized rats, and its effect on bone remodeling when consumed as part of a standard diet or high fat diet.

## **2. Materials and Methods**

### **Raw materials and preparation of flours**

The chia seeds were ground to a particle size of 850  $\mu\text{m}$  using a knife mill (Marconi Equipment, Brazil) in three replicates. The chia flour obtained was packed in polyethylene aluminum bags and stored in a freezer ( $-18^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) until the experimental diet preparation. The seeds (*Salvia hispanica* L.) used in this study were grown in the state of Mato Grosso (Brazil). The seeds were planted in April 2015 and the harvest in July 2015. The samples were packed and transported to the laboratory in cardboard boxes, by land. Samples were stored in hermetically sealed plastic bags and protected from light, frozen ( $-18^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) until the time of analysis, which occurred within 30 days.

### **Determination of calcium content and chemical composition**

The analyses of moisture, ash, lipids, carbohydrates, proteins, total dietary fiber, calcium and total phenolic compounds in chia were performed as reported previously (11), and its chemical composition was determined according to Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (20) (lipids: 30.2%; carbohydrates: 2.2%; proteins: 19.7%; total dietary fiber: 37.2%; calcium: 430mg/100g). The total energy value of chia was estimated considering the conversion factors of 4 kcal·g<sup>-1</sup> for protein or carbohydrate and 9 kcal·g<sup>-1</sup> for lipids.

The calcium concentration in chia was determined by coupled plasma atomic emission spectrometry (instrument model Optima 3300 DV, Perkin Elmer, Massachusetts, USA) with an inducible plasma argon source, according to Gomes (21). Calibration curves were constructed by means of standard calcium solutions, according to Pires et al. (22) and the analyses were performed in triplicate.

### **Animals and diets**

Eighty female rats (*Rattus norvegicus*, Wistar, albinus variation), newly weaned, 21 days old, were obtained from the Central Animal Facility of the Center for Biological Sciences and Health at Federal University of Viçosa, Minas Gerais, Brazil. The rats were housed in individual stainless-steel cages with controlled temperature (22°C) and automatically controlled light and dark cycles of 12 h. The animals were systematically subdivided into 2 groups of 40 animals each, randomized by body weight and they received a standard diet (23) or a high fat diet (Research Diets, New Brunswick, NJ) with modifications. The animals received deionized water and their respective experimental diets ad libitum. The standard diet contained 19% protein, 17% fat and 64% carbohydrate. The high fat diet contained 51% fat, 15% protein and 34% carbohydrate. After 7 weeks, 40 female mice were ovariectomized (OVX) (20 animals from each group) and 40 were SHAM-operated (SHAM) (20 animals from

each group) but they continued to receive their respective diets for an additional 3 weeks for recovery from surgery.

At 10 weeks, the OVX and SHAM animals were relocated to receive one of the following experimental diets (n=10/group) for 8 weeks: standard diet + calcium carbonate (SD+CC), standard diet + chia (SD+chia), high fat diet + calcium carbonate (HFD+CC) or high fat diet + chia (HFD+chia). The animals were relocated after randomization based on body weight, being each animal considered a repeat, so that the mean difference weights between the groups did not exceed 5 grams.

The diet offered to the animals met the 100% of calcium necessity for rodents (0.005 kg/kg diet), according to recommendations (23). For the groups fed chia, chia provided 20% of the recommended amount of calcium (0.0010 kg of calcium per 1 kg of diet) based on its composition. The rest of the calcium recommendations was provided by calcium carbonate. The other ingredients were added in sufficient quantities to provide the recommended amounts of lipids, proteins, carbohydrates, dietary fiber, and calories (Table 1). On day 126, after a 12 h fasting, the animals were anesthetized with isoflurane (Isoforine, Cristália®, Itapira, Brazil) and blood samples were collected by cardiac puncture. The blood samples were centrifuged at 4°C, 800g for 10 min (Fanem-204, São Paulo, Brazil) and the plasma was stored prior to analysis at -80°C. Urine, feces, and right femur samples were collected and stored at -80°C. Left femur were fixed in 10% formaldehyde for 48 h, stored in 70% ethanol and maintained at room temperature for bone resistance and morphological analysis.

Body weight gain and food consumption were monitored weekly during the experimental period to determine feed efficiency ratio (FER) (24). Adiposity was calculated as a percentage using the following formula: (visceral + gonadal + retroperitoneal + mesenteric + inguinal adipose tissues) / total body weight x 100 (25). The body mass index (BMI) was obtained by the relationship between weight and square of length (26). Body length was

measured as nose-to-anus length (26). The abdominal perimeter was obtained at the midpoint between the skull and the pelvic limbs of the animal (27).

All the experimental procedures with animals were performed in accordance with Directive 86/609/EEC of November 24, 1986 and ethical principles for animal experimentation. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Viçosa (Protocol 20/2017; date of approval: July 13th, 2017).

**Table 1.** Composition of experimental diets.

<b>Experimental diets</b>						
<b>Ingredients (g.kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Week 1 - Week 10</b>		<b>Week 10 – Week 18</b>			
	<b>SD</b>	<b>HFD</b>	<b>SD + CC</b>	<b>HFD + CC</b>	<b>SD + chia</b>	<b>HFD + chia</b>
Albumin (g)*	179.50	179.50	179.50	179.50	133.70	133.70
Chia (g)	0.00	0.00	0.00	0.00	232.60	232.60
Dextrinized starch (g)	155.00	155.00	155.00	155.00	155.00	155.00
Sucrose (g)	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Lard (g)	0.00	240.00	0.00	195.00	0.00	195.00
Soybean oil (g)	40.00	40.00	70.20	70.20	0.00	0.00
Cellulose (g)	50.00	50.00	86.00	86.00	0.00	0.00
Calcium-free mineral mix (g)	35.00	35.00	35.00	35.00	35.00	35.00
Vitamin mix (g)	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
L-cystine (g)	1.80	1.80	1.80	1.80	1.80	1.80
Choline bitartrate (g)	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50
Corn starch (g)	419.95	178.45	347.50	151.00	319.40	122.90
Cholesterol (g)	0,00	1.50	0.00	1.50	0.00	1.50
Calcium carbonate (g)	12.50	12.50	12.50	12.50	10.00	10.00
<b>Nutritional Composition</b>						
Total calories (kcal)	3778.00	4971.80	3759.80	4728.80	3647.40	4616.40
Caloric density (kcal/g)	3.77	4.97	3.76	4.73	3.65	4.62
Calcium (g.kg <sup>-1</sup> ) **	4.58±0.03	4.55±0.02	4.57±0.01	4.62±0.02	4.52±0.02	4.57±0.01

\* Considering that albumin is 78% pure.

\*\* Analyzed according to the methodology proposed by Gomes (2011). SD: standard diet; SD+CC: standard diet + calcium carbonate; SD+chia: standard diet + chia; HFD+CC: high fat diet + calcium carbonate; HFD+chia: high fat diet + chia. No statistics difference was observed among experimental diets.

### **Calcium bioavailability**

Prior to euthanasia, each animal was individually housed in a metabolic cage and samples of urine and feces were collected during 3 consecutive days for the determination of calcium bioavailability (17). Blood plasma and urine calcium levels were measured by colorimetric methods involving commercially available kits (Bioclin®, Belo Horizonte, Brazil). Urine and plasma concentration analyses were performed in a BS-200 Chemistry Analyzer (Bioclin®, Nanshan, China). Calcium concentrations in feces and in the femurs were determined by atomic absorption spectrophotometry according to Gomes (21). For each animal, calcium intake was estimated according to daily food intake, and calcium bioavailability (calcium absorption, calcium balance, and calcium retention) was calculated using equations proposed by Ku et al. (28): Calcium absorption rate (%) =  $(\text{Ca Intake} - \text{Fecal Ca}) / \text{Ca Intake} \times 100$ ; Calcium balance (mg / day) =  $\text{Ca Intake} - (\text{Ca Urinary} + \text{Fecal Ca})$ ; Calcium retention rate (%) =  $(\text{Ca Balance} / \text{Ca Intake}) \times 100$ .

### **Bone Resistance**

Mechanical properties of each femur were determined by three-point bending using standard techniques for assessing diaphyseal cortical bone (29). Maximum tensile strength was determined using a Universal Mechanical Testing Machine (Instron, Norwood, MA USA). The bones were placed on two support points, with the bone midpoint positioned beneath the upper point of the loading fixture. The loading point was displaced downward at 0.03 mm/s until failure (fracture). The force and displacement data were recorded on a computer coupled to the test machine.

## **Bone morphology**

The femur was weighed and its length and width were measured with a 200-mm digital pachymeter (resolution, 0.01 mm; Model 530-312; Mitutoyo) according to Lammers et al. (30).

Cross-sectional bone morphology of each femur was assessed using microCT (SkyScan1174 microCT scanner) available in the Microscopy and Microanalysis Nucleus of the Federal University of Viçosa, Minas Gerais, Brazil, according to the method of Bouxsein et al. (31). The volume of interest for micro-CT scanning is 2.5 mm. The power settings used were 200uA/50 kEv, with an exposure time of 1200 ms and a 0.5 mm aluminum filter was applied. The reconstructions of the acquired projections resulted in images with spatial resolution of 22.40  $\mu\text{m}$ . The bone regions were cut according to area of interest and were analyzed separately. The data were segmented into binary images using an intermediate threshold between the bone and background grayscale values. A threshold value based on the histogram of volume was used which selected 60% of the brightest pixels. This value discriminated the cortical bone from the trabecular bone and bone marrow, and the value was kept consistent for all specimens. Trabecular bone analysis of the femur was performed in the region of the distal femoral metaphysis extending towards the mid diaphysis.

The value of each parameter was based on the average of 80 slices of each bone. Once each region was segmented, the bone morphometric parameters were calculated by the CT Analyzer software which included percentage of bone volume (BV/TV, in %); bone surface density (BS/TV, in 1/mm); trabecular thickness (Tb.Th, in mm); trabecular number (Tb.N, in 1/mm); trabecular separation (Tb.Sp, in mm); and porosity (Po(tot), in %).

## **Statistical analysis**

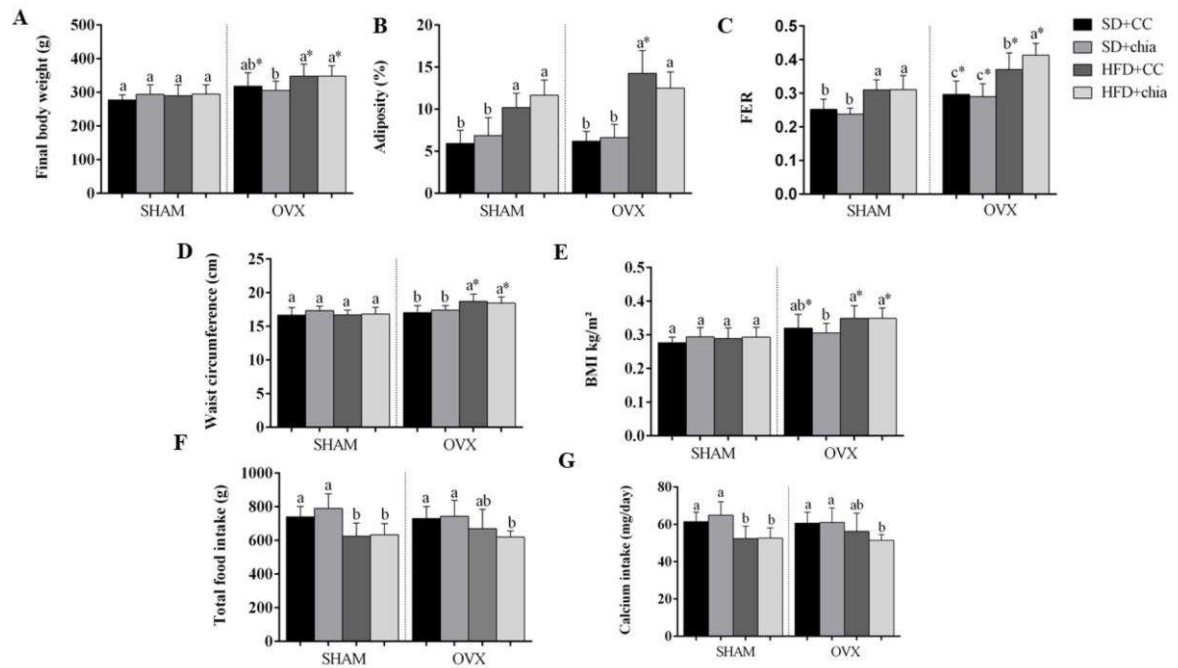
The treatments were conducted in a completely randomized design, with ten biological replicates (n=10 animals/group). The results were subjected to analysis of variance (ANOVA)

at 5% probability. To determine "F-value" significance, the post hoc Newman Keuls test was used to compare intra group means (among groups with or without ovariectomy). T-tests were used to compare inter group differences (groups fed the same diet with and without ovariectomy) for biometric and consumption data of animals. Factorial ANOVA was used to delineate the effects of each variable (calcium source, different diets and ovariectomy) on calcium and bone health status. Statistical analysis were performed in the GraphPad Prism software, version 6. Data with a p-value  $\leq 0.05$  were considered statistically significant.

### **3. Results**

In the SHAM and in the OVX groups, a high fat diet (HFD + CC) did not alter final body weight but increased adiposity and feed efficiency ratio compared to a standard diet (SD + CC). The consumption of chia did not alter final weight and adiposity, neither in the animals fed a standard diet nor in those fed a high fat diet. In the SHAM and OVX groups, both fed a standard diet, chia consumption did not change feed efficiency ratio. However, among the OVX group fed a high fat diet, an increase in feed efficiency ratio was observed with the consumption of chia. A high fat diet increased the waist circumference of only the OVX animals. Regarding surgery, OVX animals on a high fat diet or a standard diet without chia (HFD + CC, HFD + chia or SD + CC) showed higher final weight, those fed a high fat diet without chia (HFD + CC) showed higher adiposity and the OVX animals on a high fat diet (HFD + CC, HFD + chia) had a higher waist circumference when compared to the SHAM group on the same diet. The OVX animals on a high fat or standard diet without chia had higher body mass index (BMI) than the SHAM animals and presented higher feed efficiency ratio for all diets (Figure 1).





**Fig. 1.** Biometric and consumption data of animals (n=10/group) for 126 days. SD + CC: standard diet + calcium carbonate; SD+chia: standard diet + chia; HFD+CC: high fat diet + calcium carbonate; HFD+chia: high fat diet + chia; FER: weight gain/food intake x 100; BMI: body mass index. Graphs show final body weight (A), adiposity (B), food efficiency ratio (FER) (C), waist circumference (D), body mass index (BMI) (E), total food intake (F) and calcium intake (G). \* mean significant differences inter group, according to the T-test ( $p < 0.05$ ). Different small letters (a–b) mean significant differences intra group according to the Newman–Keuls test at the 5% threshold of probability. Data expressed as mean  $\pm$  standard deviation.

The animals in the SHAM group fed HFD + CC, had a lower total food intake and calcium intake compared to animals fed SD + CC. For the OVX animals, the values were not different. In the SHAM and in the OVX groups, when chia was consumed with a standard diet and a high fat diet, total food intake and calcium intake were not altered, when compared to animals fed SD + CC and HFD + CC respectively. Ovariectomy did not alter total food intake and calcium intake in animals fed the same diet (Figure 1).

Regarding calcium bioavailability, no difference in the values of urinary calcium, fecal calcium and calcium in the femur were observed in the SHAM and OVX groups. For the SHAM and OVX groups, serum calcium increased with the consumption of a high fat diet, but it was not altered by chia consumption. Also, calcium balance and absorption were not altered by a high fat diet (HFD + CC X SD + CC) or by chia consumption (SD + CC X SD + chia and HFD + CC X HFD + chia). In the OVX group, chia with a standard diet (SD + CC X SD + chia), and a high fat diet (HFD + CC X SD + CC) decreased calcium retention while in the SHAM group, we observed no difference in calcium retention between the groups. Bone strength was not altered between the animals. Regarding surgery, the OVX groups on standard diet (SD + CC or SD + chia) had lower concentrations of serum calcium when compared to the SHAM group fed the same diet (Table 2).

**Table 2:** Effect of chia ingestion on calcium bioavailability in Wistar rats (n=10/group) for 126 days.

Groups	Non-ovariectomized (SHAM)				Ovariectomized (OVX)			
	SD+CC	SD+chia	HFD+CC	HFD+chia	SD+CC	SD+chia	HFD+CC	HFD+chia
Urinary Ca (mg/day)	1.39 ± 0.26 <sup>a</sup>	1.32 ± 0.26 <sup>a</sup>	1.34 ± 0.30 <sup>a</sup>	1.28 ± 0.24 <sup>a</sup>	1.15 ± 0.19 <sup>a</sup>	1.41 ± 0.35 <sup>a</sup>	1.38 ± 0.36 <sup>a</sup>	1.33 ± 0.17 <sup>a</sup>
Fecal Ca (mg/day)	3.35 ± 0.20 <sup>a</sup>	3.40 ± 0.40 <sup>a</sup>	3.22 ± 0.13 <sup>a</sup>	3.21 ± 0.34 <sup>a</sup>	3.28 ± 0.10 <sup>a</sup>	3.30 ± 0.30 <sup>a</sup>	3.46 ± 0.31 <sup>a</sup>	3.58 ± 0.23 <sup>a</sup>
Ca femur (g/100g <sup>-1</sup> )	23.67 ± 1.18 <sup>a</sup>	24.36 ± 2.05 <sup>a</sup>	24.60 ± 3.67 <sup>a</sup>	24.88 ± 2.24 <sup>a</sup>	22.24 ± 2.07 <sup>a</sup>	23.17 ± 1.86 <sup>a</sup>	22.57 ± 2.67 <sup>a</sup>	22.44 ± 2.82 <sup>a</sup>
Ca serum (mg/dL)	7.98 ± 0.23 <sup>b*</sup>	7.90 ± 0.44 <sup>b*</sup>	9.07 ± 0.36 <sup>a</sup>	9.25 ± 0.80 <sup>a</sup>	7.18 ± 0.74 <sup>b</sup>	7.37 ± 0.35 <sup>b</sup>	8.72 ± 0.57 <sup>a</sup>	8.55 ± 0.54 <sup>a</sup>
Ca balance (mg/day)	56.81 ± 5.86 <sup>a</sup>	54.43 ± 6.41 <sup>a</sup>	49.01 ± 5.17 <sup>a</sup>	47.46 ± 7.27 <sup>a</sup>	56.12 ± 4.48 <sup>a</sup>	52.54 ± 7.08 <sup>ab</sup>	49.08 ± 4.71 <sup>ab</sup>	45.37 ± 3.05 <sup>b</sup>
Ca absorption rate (%)	94.57 ± 0.48 <sup>a</sup>	94.23 ± 0.94 <sup>a</sup>	93.94 ± 0.67 <sup>a</sup>	93.74 ± 0.97 <sup>a</sup>	94.57 ± 0.38 <sup>a</sup>	93.98 ± 0.97 <sup>a</sup>	93.55 ± 0.72 <sup>ab</sup>	92.86 ± 0.70 <sup>b</sup>
Ca retention rate (%)	91.76 ± 1.65 <sup>a</sup>	91.98 ± 0.93 <sup>a</sup>	91.44 ± 0.83 <sup>a</sup>	91.23 ± 1.38 <sup>a</sup>	92.67 ± 0.55 <sup>a</sup>	90.91 ± 1.29 <sup>b</sup>	90.96 ± 1.13 <sup>b</sup>	90.20 ± 0.95 <sup>b</sup>
Bone resistance (N)	142.63 ± 8.56 <sup>a</sup>	138.48 ± 10.94 <sup>a</sup>	138.66 ± 16.24 <sup>a</sup>	132.31 ± 15.03 <sup>a</sup>	128.57 ± 11.94 <sup>a</sup>	130.92 ± 12.02 <sup>a</sup>	129.60 ± 14.21 <sup>a</sup>	125.28 ± 8.92 <sup>a</sup>

SD + CC: standard diet + calcium carbonate; SD+chia: standard diet + chia; HFD+CC: high fat diet + calcium carbonate; HFD+chia: high fat diet + chia; Ca: calcium. N: newton; OVX: ovariectomized group and SHAM: not ovariectomized group. \* mean significant differences, according to T-test (p < 0.05). Different small letters (a–b) mean significant differences intra group according to the Newman–Keuls test at the 5% threshold of probability. Data expressed as mean ± standard deviation.

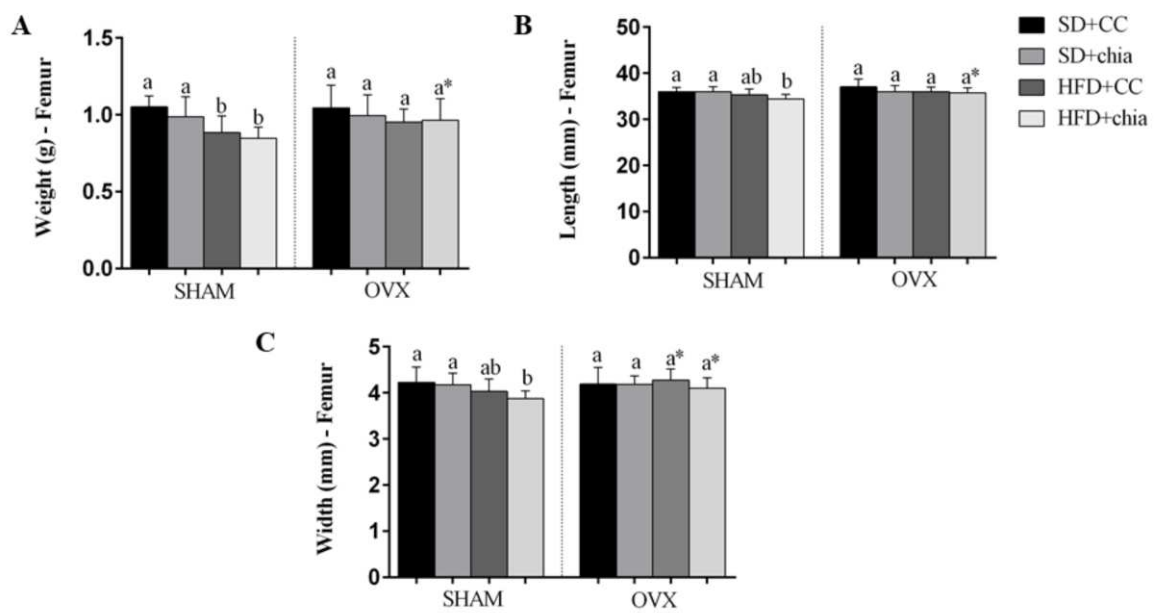
In relation to factorial ANOVA, when the factor analyzed was ovariectomy (OVX and SHAM groups), we observed that ovariectomized animals showed lower calcium concentration in femur and in serum. When we analyzed the diet (HFD and SD), we observed that animals fed with HFD had higher serum calcium, lower calcium balance, calcium absorption and calcium retention. Finally, when we performed the analysis in relation to the calcium source (calcium carbonate and chia), we observed that animals fed with calcium carbonate showed higher calcium absorption (Table 3).

**Table 3:** Effects of different factors (calcium source, different diets and ovariectomy) on calcium and bone health status in Wistar rats (n=10/group) for 126 days.

Factor	Levels	Variables							
		Urinary Ca (mg/day)	Fecal Ca (mg/day)	Ca Femur (mg.100 <sup>-1</sup> )	Ca Serum (mg/dL)	Ca Balance (mg/day)	Ca Absorption (%)	Ca Retention Rate (%)	Bone Resistance (N)
Ovariectomy	OVX	1.30±0.28	3.36±0.23	22.52±2.26	7.95±0.88	50.59±	93.73±6.37	91.12±0.93	128.80±11.70
	SHAM	1.33±0.25	3.29±0.27	24.38±2.34*	8.55±0.78*	51.93±	94.12±7.00	91.60±0.80	134.48±14.95
Diet	HFD	1.33±0.26	3.33±0.26	23.62±2.94	8.90±0.62*	47.73±	93.52±5.15	90.96±0.83	131.31±13.98
	SD	1.29±0.27	3.32±0.25	23.30±1.90	7.61±0.57	54.97±*	94.35±6.07*	91.80±0.72*	131.59±13.31
Source of calcium	CC	1.31±0.29	3.30±0.15	23.27±2.57	8.24±0.88	52.76±	94.16±6.07*	91.71±0.70	131.27±14.83
	CHIA	1.32±0.24	3.35±0.33	23.67±2.38	8.27±0.89	49.73±	93.69±7.02	91.01±0.99	131.68±12.10

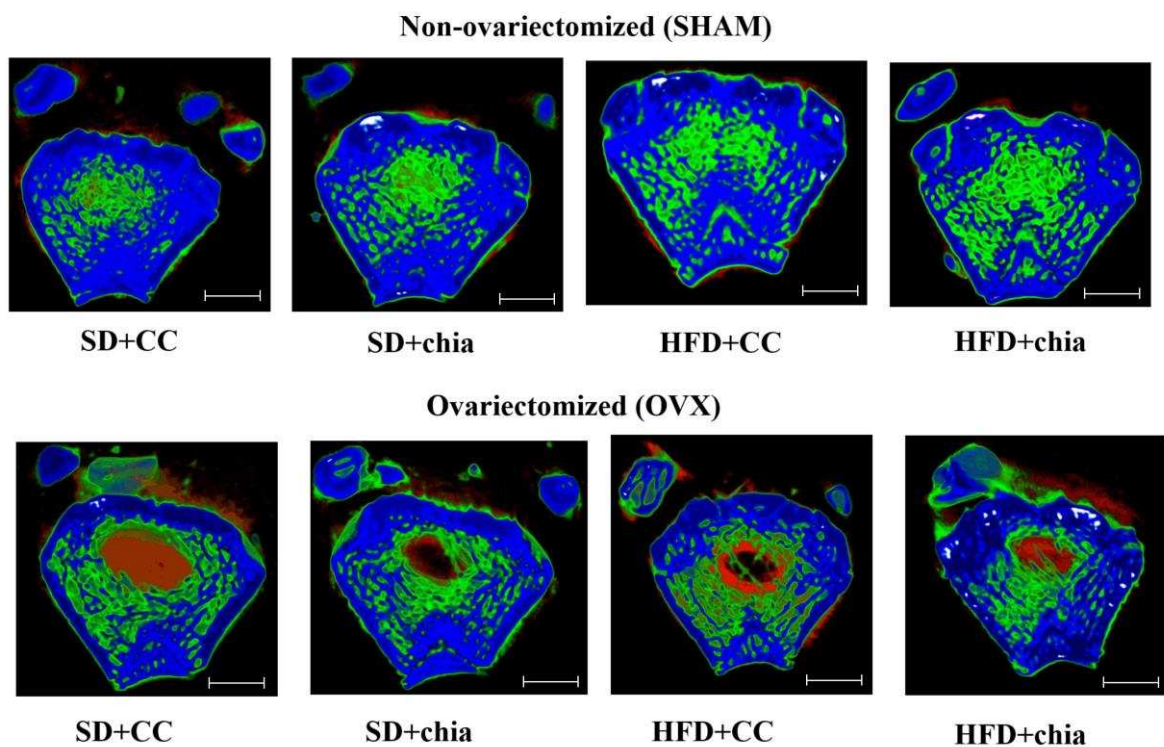
OVX: ovariectomized group; SHAM: not ovariectomized group; HFD: high fat diet; SD: standard diet; CC: calcium carbonate; Ca: calcium.\* mean significant differences, according to ANOVA factorial test (p< 0.05).

In the OVX animals, the weight, length and width of the femur were not altered by any diet. A high fat diet decreased femur weight among the SHAM animals compared to a standard diet. Regarding surgery, OVX animals on a high fat diet (HFD + CC and HFD + chia) had a greater femur width, while those on a high fat diet with chia (HFD + chia) presented higher femur weight and length when compared to SHAM animals on the same diet (Figure 2).

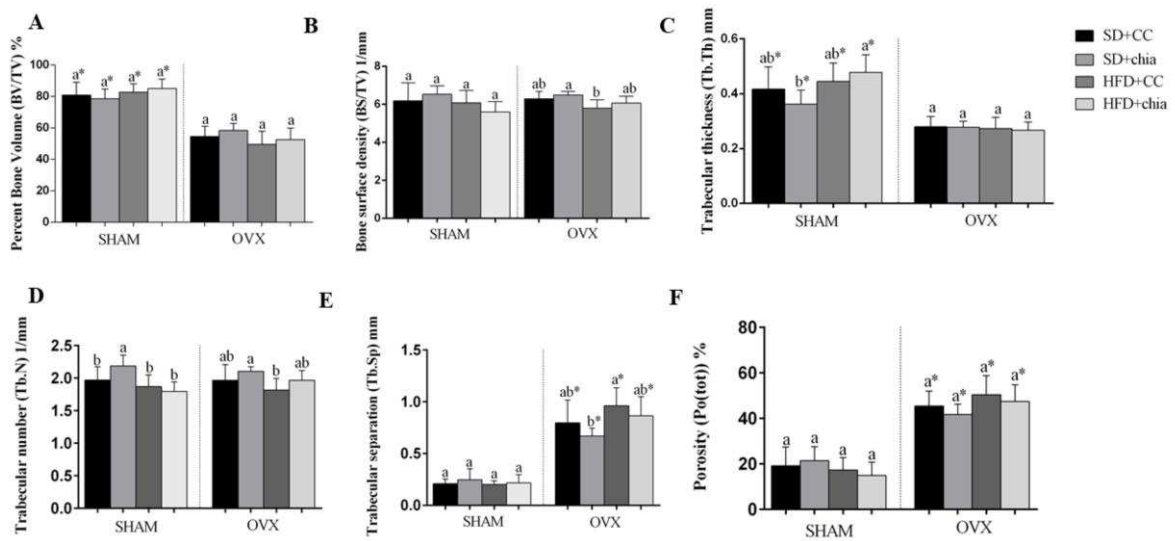


**Fig.2.** Measurements from the femur (n=10/group). SD + CC: standard diet + calcium carbonate; SD+chia: standard diet + chia; HFD+CC: high fat diet + calcium carbonate; HFD+chia: high fat diet + chia; OVX: ovariectomized group and SHAM: not ovariectomized group. Graphs show weight of femur (A), length of femur (B) and width of femur (C). \* mean significant differences inter group, according to the T-test ( $p < 0.05$ ). Different small letters (a–b) mean significant differences intra group according to the Newman–Keuls test at the 5% threshold of probability. Data expressed as mean  $\pm$  standard deviation.

According to bone microtomography (Figures 3 and 4), the percentages of bone volume, bone surface density, trabecular thickness, trabecular separation and porosity were not altered in the SHAM and OVX animals on (HFD + CC X SD + CC, SD + CC X SD + chia and HFD + CC X HFD + chia) diets. In the SHAM group, we observed an increase in trabecular number associated with the consumption of chia with a standard diet (SD + CC X SD + chia), but no difference was observed in the OVX group. Ovariectomy irrespective of diet led to a lower percentage of bone volume, smaller trabecular thickness, higher trabecular separation and higher porosity when compared to SHAM animals, while trabecular number and bone surface density were not altered.



**Fig. 3.** mCT analysis of femur (n=10/group). SD + CC: standard diet + calcium carbonate; SD+chia: standard diet + chia; HFD+CC: high fat diet + calcium carbonate; HFD+chia: high fat diet + chia. A color gradient was assigned according to the thickness of the structure, thin structures are shown in red, which changes to green and finally blue when the thickness of the structure increases. Bar: 1mm.



**Fig. 4.** mCT analysis of femur (n=10/group). SD + CC: standard diet + calcium carbonate; SD+chia: standard diet + chia; HFD+CC: high fat diet + calcium carbonate; HFD+chia: high fat diet + chia; OVX: ovariectomized group and SHAM: not ovariectomized group; mCT: microcomputed tomography. Graphs show the percent bone volume BV/TV (A), bone surface density (B), trabecular thickness (C), trabecular number (D), trabecular separation (E) and porosity (F). \* mean significant differences inter group, according to the T-test ( $p < 0.05$ ). Different small letters (a–b) mean significant differences intra group according to the Newman–Keuls test at the 5% threshold of probability. Data expressed as mean  $\pm$  standard deviation.

The analyze of bone health showed that ovariectomy was able to improve the bone length, trabecular separation and porosity and reduce the bone volume and trabecular thickness when we used factorial analysis. Regarding the diet consumed (HFD and SD), the high fat diet led to lower bone weight, bone length, bone width, bone surface, trabecular number. However, the high fat diet increased the trabecular separation. When comparing the source of calcium



(calcium carbonate and chia), we observed that calcium carbonate led to a higher bone length and lower trabecular number (Table 4).

**Table 4:** Effects of different factors (calcium source, different diets and ovariectomy) on femur measurements and femur mCT analysis in Wistar rats (n=10/group) for 126 days.

Factor	Levels	Variables								
		Weight (g)	Length (mm)	Width (mm)	Bone Vol. (%)	Bone Surface (mm)	Trab. Thickness (mm)	Trab. Number (1/mm)	Trab. Separation (mm)	Porosity (%)
Ovariectomy	OVX	0.99±0.13	36.21±1.35*	4.19±0.26	53.72±7.15	6.17±0.42	0.28±0.03	1.96±0.19	0.82±0.19*	46.28±7.15*
	SHAM	0.94±0.13	35.43±1.21	4.07±0.29	81.75±6.54*	6.10±0.72	0.43±0.08*	1.96±0.22	0.22±0.07	18.25±6.54
Diet	HFD	0.91±0.11	35.35±1.21	4.07±0.26	67.44±17.98	5.89±0.52	0.37±0.11	1.86±0.17	0.56±0.38*	32.56±17.98
	SD	1.02±0.12*	36.29±1.30*	4.19±0.28*	68.03±13.42	6.38±0.54*	0.33±0.08	2.06±0.19*	0.48±0.29	31.97±13.42
Source of calcium	CC	0.98±0.12	36.09±1.36*	4.17±0.31	66.85±16.68	6.09±0.63	0.35±0.10	1.91±0.20	0.54±0.37	33.15±16.68
	CHIA	0.95±0.13	35.54±1.27	4.08±0.24	68.62±14.96	6.17±0.54	0.34±0.10	2.01±0.20*	0.50±0.30	31.38±14.96

OVX: ovariectomized group; SHAM: not ovariectomized group; HFD: high fat diet; SD: standard diet; CC: calcium carbonate; Vol: volume; Trab:

trabecular.\* mean significant differences, according to ANOVA factorial test (p< 0.05).

#### 4. Discussion

Chia seed is an excellent source of calcium; however, the effect of consuming chia combined with a standard diet and high fat diet, on calcium bioavailability in female Wistar rats who have undergone ovariectomy has not been reported. The increased production of proinflammatory cytokines, that occurs due to inflammation caused by a high fat diet, down regulates osteoblastogenic pathways while activating osteoclastogenic processes and leads to lower bone absorption and enhanced bone resorption (7). Previous studies by our group with young male rats showed that the consumption of the high fat diet resulted in increased inflammation, reduced bone resistance e low bioavailability of calcium from chia, and beneficial effect of chia consumption on the lipid profile and inflammatory processes in young Wistar rats fed standard or high fat diet, when chia was offered as the only source of 50% of calcium requirement on the diet (17). In ovariectomized rats chia consumption leads to an improvement in anti-inflammatory capacity in rats fed the standard diet (5). The osteoporosis and high fat diet consumption may promote chronic inflammation (17, 32). Thus, in our study we verify the action of calcium from chia in bone remodeling in ovariectomized rats.

We investigated the bioavailability of calcium from chia as a partial source of calcium in OVX and SHAM rats fed standard diet or high fat diet. The animals consumed a diet that met 100% of calcium recommendation for rodents (0.005 kg Ca/kg diet) (23), with chia contributing 20% of this value.

The consumption of chia did not alter serum calcium, calcium concentration in the femur and urinary and fecal excretion of calcium in the SHAM and OVX groups. This may occur through body regulation of calcium metabolism by an endocrine feedback system that maintains the levels of circulating calcium within a physiological range. Control of serum calcium levels is maintained through an endocrine system - a system of hormone-secreting glands and characterized by control factors and feedback mechanisms. The total serum calcium

concentration should be maintained at a regular medium level. If this level is changed, the calcium sensing receptor of the parathyroid gland signals parathyroid hormone (PTH) secretion. PTH stimulates the kidney to produce calcitriol (a hormonal form of vitamin D) and activates bone resorption, which will increase extracellular calcium levels. Calcitriol also acts on the intestines, bones and kidneys to increase serum calcium levels. As the serum calcium level increases, the feedback mechanism causes PTH secretion to decrease. If there is an excess in serum calcium levels, calcitonin is secreted, which can block bone calcium reabsorption, helping to keep serum calcium levels in the normal range. Calcium that is not absorbed in the intestine is excreted through feces and when calcium intake is low, increased absorption occurs and urinary excretion is reduced (8). The calcium bioavailability variables evaluated, such as calcium retention and calcium balance were not altered by chia. However, calcium absorption was lower in animals that fed chia compared to calcium carbonate group. Chia is a seed rich in phenolic compounds, tannins, and phytate (12). These compounds can chelate calcium, forming insoluble molecules which may reduce its absorption (33).

A high fat diet showed a higher concentration of serum calcium in OVX and SHAM rats and when combined with chia, calcium absorption decreased in the OVX group. A high fat diet also lead to a lower balance, absorption and calcium retention, this can be explained by the association of this type of diet with increased levels of inflammatory markers (5) which could reduce the bioavailability and bone retention of the mineral (34). Low-grade inflammation in the adipose tissue leads to the generation of proinflammatory cytokines (5). These cytokines can bind to receptors on the surface of pre-osteoclasts and promote removal of calcium from the bones into the bloodstream through the stimulation of nuclear factor receptor activator  $\kappa$ B (RANKL)/receptor (RANK) responsible for osteoclast differentiation and bone resorption (6, 7). A reduction in femoral weight was observed in the animals fed a high fat diet. In the animals fed a high fat diet combined with chia, the length and width of the femur were reduced when

compared to standard diets. This effect can be attributed to stunted growth that occur in this type of experimental model. The result corroborated with other study. Vanleene, Rey and Tho (35) analyzed the density and elastic properties of Wistar rat cortical bone from growth to senescence and to correlate them with morphological and physico-chemical properties of bone. They observed that during growth (from 1 to 9 months), bone porosity reduced in animals. Besides this, it is important to highlight that the bone loss caused by type of diet was observed, and the addition of chia did not improve this effect.

As regards aging, increase in reactive oxygen species is linked with the causality of osteoporosis, because they influence the generation and survival of osteoclasts, osteoblasts and osteocytes. Estrogen loss decreases the defense of the bone against oxidative stress leading to increased bone resorption (36). In addition to the nutritional composition of chia, rich in calcium, lipids, proteins, total dietary fiber and bioactive compounds (11), chia seed has already been reported to improve antioxidant activity and anti-inflammatory capacity (5).

Post-menopause has been associated with a change in fat mass distribution, with increase in central fat accumulation (37), dyslipidemia and inflammation in women (38). In our study, ovariectomy when associated with a high fat diet (HFD + CC and HFD + chia) led to an increase in final weight, waist circumference, and BMI. A higher adiposity was found in the animals fed a high fat diet without chia, however when the diet was combined with chia (HFD+chia), the level of adiposity was comparable to the SHAM group. Chia has a rich content of alpha-linolenic (12, 39) which was related to the redistribution of abdominal fat and decreased adiposity (19, 40–42). The review by ENES et al. (10) also suggests that the normalization of the insulin response by the chia seed may reverse the triggers of lipogenesis.

Menopause is involved in the hormonal regulation of osteoporosis. The reduction of ovarian function that occurs during this phase leads to a reduction in estrogen production and a consequent decrease in the production of osteoprotegerin (OPG), an inhibitory factor for

osteoclastogenesis (4). In relation to the bone morphology, the OVX animals presented higher porosity and lower percentage of bone volume in relation to the SHAM animals. Ovariectomy also decreased trabecular thickness and increased trabecular separation, showing the impact of low estrogen on bone loss and confirming ovariectomy as a good model to simulate postmenopausal bone loss (43). The consumption of chia increased trabecular number when consumed in a standard diet in the SHAM group, indicating a stronger bone structure, whereas in the OVX group there was no difference.

A study (44) evaluated the long-term ingestion of chia seed and observed an increase in bone mineral content in male rats and attributed these changes in bone structure to the alpha-linolenic acid content of chia. Studies have suggested that polyunsaturated fatty acids intake affects bone metabolism, thus plant-sources of omega 3 have been shown to have a protective effect on bone metabolism (45, 46). An *in vitro* study showed that omega 3 inhibited the formation of osteoclasts induced by the receptor-activated nuclear kappa B ligand (RANKL) (47). Bone marrow adipocytes are appointed as regulators of energy metabolism associated with osteogenesis and healthy bone remodeling (48, 49). A review shows the relationship between metabolic syndrome and obesity, usually associated with low doses of omega 6 / omega 3, and low-grade chronic inflammation, leading to musculoskeletal impairments, such as bone loss (50). Griel et al. (51) suggest that incorporating plant sources of omega 3 into the diet may provide health benefits to the skeletal system. Although chia seed is of plant origin, it is rich in phenolic compounds, phytate and tannins (11), that can bind to calcium forming insoluble molecules and reducing their bioavailability (33). Chia seeds have high nutritional value and high concentrations of lipids, proteins, total dietary fiber, bioactive compounds and minerals. It has already been shown that fiber intake increased calcium absorption and was protective against bone loss (52). In addition, intra-amniotic administration of soluble chia extract improved intestinal morphological parameters, such as increased surface area, villus length and

width, number and size of goblet cells, which may increase digestive and absorptive capacity of the intestinal membrane, and thus increase the bioavailability of dietary components (14). Intra-amniotic administration of prebiotics improved intestinal health by increasing the relative abundance of beneficial bacteria and limiting potentially pathogenic bacterial populations, which reduce intestinal pH, thereby increasing mineral solubility, and by increasing the surface area of the intestinal villi and improving intestinal functionality, and thereby improving calcium bioavailability (53). Chia is also a source of protein and calcium, contributing to the maintenance of maintain healthy bones (54). Therefore, the general nutritional composition of chia enables to maintain bone health in a balanced diet that meets calcium recommendations. As limitations of this study, we must highlight the lack of data on inflammatory markers and PTH level.

## **5. Conclusion**

A high fat diet increased serum calcium concentration and decreased calcium retention, calcium absorption and calcium balance, which may indicate less bioavailability of calcium and consequent interference with bone metabolism, leading to loss and fragility of the bone structure. The addition of chia to the high fat diet did not alter these parameters nor those of bone morphology. Chia maintained bone health when offered in a diet that met 100% recommendation of calcium for rodents, regardless of diet type, in non-ovariectomized adult animals.

## **Acknowledgements**

The authors would like to thank the Foundation for Research Support of Minas Gerais (FAPEMIG, Brazil) for financial support of the research; we are also grateful to the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Brazil), and the

National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq, Brazil). Experiments and analyses involving electron microscopy were performed in Nucleus of Microscopy and Microanalysis at the Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil ([www.nmm.ufv.br](http://www.nmm.ufv.br)).

### **Conflict of interest**

There are no conflicts of interest to declare.

### **References**

1. Heaney RP, Recker RR, Stegman MR, Moy AJ. Calcium absorption in women: Relationships to Calcium intake, Estrogen status, and age. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1989; 4 (4): 469–475.
2. Heaney RP. Is the paradigm shifting? *Bone*. 2003; 33 (4): 457–465.
3. Recker R, Lappe J, Davies KM, Heaney R. Bone remodeling increases substantially in the years after menopause and remains increased in older osteoporosis patients. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2004; 19 (10): 1628–1633.
4. Theill LE, Boyle WJ, Penninger JM. RANK-L AND RANK: T Cells, Bone Loss, and Mammalian Evolution. *Annual Review of Immunology*. 2002; 20 (1): 795–823.
5. Da Silva BP, Toledo RCL, Mishima MDV, Moreira MEC, Vasconcelos CM, Pereira CER, Favarato LSC, Costa NMB, Martino HSD. Effects of chia (*Salvia hispanica* L.) on oxidative stress and inflammation in ovariectomized adult female Wistar rats. *Food & Function*. 2019; 10: 4036-4045.



6. Steeve KT, Marc P, Sandrine T, Dominique H, Yannick F. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine & growth factor reviews*. 2004; 15 (1): 49-60.
7. Wong SK, Chin KY, Suhaimi FH, Ahmad F, Ima-Nirwana S. The relationship between metabolic syndrome and osteoporosis: A Review. *Nutrients*. 2016; 8 (6): 347.
8. Institute of Medicine (US) Committee. *Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D*; National Academies Press (US): Washington, DC, USA, 2011.
9. Hodges JK, Cao S, Cladis DP, Weaver CM. Lactose intolerance and bone health: The challenge of ensuring adequate calcium intake. *Nutrients*. 2019; 11 (4): 718.
10. Enes BN, Moreira LPD, Silva BP, et al. Chia seed (*Salvia hispanica* L.) effects and their molecular mechanisms on unbalanced diet experimental studies: A systematic review. *Journal of Food Science*. 2020; 85 (2): 226-239.
11. Capitani MI, Spotorno V, Nolasco SM, Tomás MC. Physicochemical and functional characterization of by-products from chia (*Salvia hispanica* L.) seeds of Argentina. *LWT - Food Science and Technology*. 2012; 45 (1): 94–102.
12. Da Silva BP, Anunciação PC, Matyelka JCDS, Della Lucia CM, Martino HSD, Pinheiro-Sant'Ana HM. Chemical composition of Brazilian chia seeds grown in different places. *Food Chemistry*. 2017; 221: 1709–1716.

13. Oliveira-Alves SC, Vendramini-Costa DB, Betim Cazarin CB, Maróstica Júnior MR, Borges Ferreira JP, Silva AB, Prado MA, Bronze MR. Characterization of phenolic compounds in chia (*Salvia hispanica* L.) seeds, fiber flour and oil. *Food Chemistry*. 2017; 232: 295–305.
14. Da Silva BP, Kolba N, Martino HSD, Hart J, Tako E. Soluble Extracts from Chia Seed (*Salvia hispanica* L.) Affect Brush Border Membrane Functionality, Morphology and Intestinal Bacterial Populations In Vivo (*Gallus gallus*). *Nutrients*. 2019; 11: 2457, 2019.
15. Erfanian A, Rasti B, Manap Y. Comparing the calcium bioavailability from two types of nano-sized enriched milk using in-vivo assay. *Food Chemistry*. 2017; 214: 606-613.
16. Vavrusova M, Skibsted LH. Calcium nutrition. Bioavailability and fortification. *Food Sci. Technol*. 2014; 59: 1198-1204.
17. Da Silva BP, Toledo RCL, Grancieri M, Moreira MEC, Medina NR, Silva RR, Costa NMB, Martino HSD. Effects of chia (*Salvia hispanica* L.) on calcium bioavailability and inflammation in Wistar rats. *Food Research International*. 2019; 116: 592–599.
18. Grancieri M, Martino HSD, Mejia EG. Chia Seed (*Salvia hispanica* L.) as a Source of Proteins and Bioactive Peptides with Health Benefits: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2019; 18: 480-499.

19. Enes BN, Moreira LPD, Toledo RCL, et al. Effect of different fractions of chia (*Salvia hispanica* L.) on glucose metabolism, in vivo and in vitro. *Journal of Functional Foods*, 2020b; 71.
20. AOAC, Association of Official Analytical Chemistry. *Official Methods of Analysis*, Gaithersburg, MD, USA, 19th edn, 2012.
21. Gomes JC. *Análise de Alimentos*. Viçosa (MG/ Brasil): Universidade Federal de Viçosa; 2011. 126 p.
22. Pires PCC, Candido FG, Cardoso LM, Costa N, Martino HSD, Pinheiro- Sant'Ana, H. M. Comparison of mineral and trace element contents between organically and conventionally grown fruit. *Fruits*. 2015; 70: 29–36.
23. Reeves P, Nielsen F, Fahey G. Committee Report AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *The Journal of Nutrition*. 1993; 123 (11) 1939–1951.
24. Da Silva BP, Matyelka JCDS, Moreira MEC, Toledo RC, Della Lucia CM, Pinheiro- Sant'Ana HM, Martino HSD. A high fat diet does not affect the iron bioavailability in Wistar rats fed with chia and increases gene expression of iron metabolism proteins. *Food and Function*. 2016; 7 (12): 4861–4868.

25. Pereira SS, Teixeira LG, Aguilar EC, Matoso RO, Soares FL, Ferreira AV, Alvarez-Leite JI. Differences in adipose tissue inflammation and oxidative status in C57BL/6 and ApoE<sup>-/-</sup> mice fed high fat diet. *Animal Science Journal*. 2012; 83 (7): 549–555.
26. Novelli EL, Diniz YS, Galhardi CM, Ebaid GM, Rodrigues HG, Mani F, Fernandes AA, Cicogna AC, Novelli Filho JL. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Laboratory animals*. 2007; 41 (1): 111-119.
27. Reynés B, García-Ruiz E, Díaz-Rúa R, Palou A, Oliver P. Reversion to a control balanced diet is able to restore body weight and to recover altered metabolic parameters in adult rats long-term fed on a cafeteria diet. *Food Research International*. 2014; 64: 839- 848.
28. Ku SK, Cho HR, Choi JS, Kim JW. Effects of Polycan on Calcium Bioavailability in Two Different Rat Models of Osteoporosis. *Toxicology of Environmental Health and Science*. 2015; 7 (1): 35-42.
29. Jepsen KJ, Silva MJ, Vashishth D, Guo XE, Van Der Meulen MC. Establishing biomechanical mechanisms in mouse models: Practical guidelines for systematically evaluating phenotypic changes in the diaphyses of long bones. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2015; 30 (6): 951–966.
30. Lammers AR, German RZ, Lightfoot PS. The impact of muscular dystrophy on limb bone growth and scaling in mice. *Acta Anat*. 1998; 162: 199–208.

31. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Muller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res.* 2010; 25 (7): 1468–1486.
32. Mundy GR. Osteoporosis and Inflammation. *Nutrition Reviews.* 2007; 65: 147–151.
33. Amalraj A, Pius A. Bioavailability of calcium and its absorption inhibitors in raw and cooked green leafy vegetables commonly consumed in India - An in vitro study. *Food Chemistry.* 2015; 170: 430-436.
34. Soares MJ, Murhadi LL, Kurpad AV, Chan SPDWL, Piers LS. Mechanistic roles for calcium and vitamin D in the regulation of body weight. *Obesity reviews.* 2012; 13 (7): 592-605.
35. Vanleene M, Rey, C, Tho, MCHB. Relationships between density and Young's modulus with microporosity and physico-chemical properties of Wistar rat cortical bone from growth to senescence. *Medical engineering & physics.* 2008; 30 (8): 1049-1056.
36. Manolagas SC. From estrogen-centric to aging and oxidative stress: A revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis. *Endocrine Reviews.* 2010; 31 (3): 266–300.
37. Ambikairajah A, Walsh E, Tabatabaei-Jafari H, Cherbuin N. Fat mass changes during menopause: a meta-analysis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2019; 221 (5): 393-409.

38. Taleb-Belkadi O, Chaib H, Zemour L, Fatah A, Chafi B, Mekki K. Lipid profile, inflammation, and oxidative status in peri- and postmenopausal women. *Gynecological Endocrinology*. 2016; 32 (12): 982-985.
39. Ayerza R. 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. *Journal of Oleo Science*. 2009; 58(7): 347–354.
40. Fonte-Faria T, Citelli M, Atella GC, Raposo HF, Zago L, de Souza T., et al. Chia oil supplementation changes body composition and activates insulin signaling cascade in skeletal muscle tissue of obese animals. *Nutrition*. 2019; 58: 167–174.
41. Oliva ME, Ferreira MR, Chicco A, Lombardo YB. Dietary salba (*Salvia hispanica* L.) seed rich in alpha-linolenic acid improves adipose tissue dysfunction and the altered skeletal muscle glucose and lipid metabolism in dyslipidemic insulin-resistant rats. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*. 2013; 89(5): 279–289.
42. Poudyal H, Panchal SK, Waanders J, Ward L, Brown L. Lipid redistribution by alpha-linolenic acid-rich chia seed inhibits stearyl-CoA desaturase-1 and induces cardiac and hepatic protection in diet-induced obese rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2012; 23(2): 153–162.
43. Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone and Mineral*. 1991; 15 (3): 175–191.

44. Montes Chañi EM, Pacheco SOS, Martínez GA, Freitas MR, Ivona JG, Ivona JA, Craig WJ, Pacheco FJ. Long-term dietary intake of chia seed is associated with increased bone mineral content and improved hepatic and intestinal morphology in Sprague-Dawley rats. *Nutrients*. 2018; 10 (7): 1–16.
45. Vannice G, Rasmussen H. Position of the academy of nutrition and dietetics: Dietary fatty acids for healthy adults. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*. 2014; 114 (1): 136–153.
46. Subramanian A, Schilling TF. Tendon development and musculoskeletal assembly: Emerging roles for the extracellular matrix. *Development*. 2015; 142:4191–4204
47. Boeyens JC, Deepak V, Chua WH, Kruger MC, Joubert AM, Coetzee M. Effects of  $\omega$ 3- and  $\omega$ 6-polyunsaturated fatty acids on RANKL-induced osteoclast differentiation of RAW264.7 cells: A comparative in vitro study. *Nutrients*. 2014; 6:2584–2601.
48. Bartelt A, Koehne T, Tödter K, Reimer R, Müller B, Behler-Janbeck F, Heeren J, Scheja L, Niemeier A. Quantification of Bone Fatty Acid Metabolism and Its Regulation by Adipocyte Lipoprotein Lipase. *Int. J. Mol. Sci*. 2017; 18:1264.
49. Van der Eerden B, Van WA. Meeting report of the 2016 bone marrow adiposity meeting. *Adipocyte*. 2017; 6: 304–313.

50. Collins KH, Herzog W, Macdonald GZ, et al. Obesity, metabolic syndrome, and musculoskeletal disease: Common inflammatory pathways suggest a central role for loss of muscle integrity. *Frontiers in Physiology*. 2018; 9 (112).
51. Griel AE, Kris-etherton PM, Hilpert KF, et al. An increase in dietary n-3 fatty acids decreases a marker of bone resorption in humans. *Nutrition Journal*. 2007; 6: 4–11.
52. Dai Z, Zhang Y, Lu N; et al. Association Between Dietary Fiber Intake and Bone Loss in the Framingham Offspring Study. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2018; 33 (2): 241–249.
53. Hou T, Kolba N, Glahn RP, Tako E. Intra-Amniotic Administration (Gallus gallus) of Cicer arietinum and Lens culinaris Prebiotics Extracts and Duck Egg White Peptides Affects Calcium Status and Intestinal Functionality. *Nutrients*. 2017; 9 (7): 785.
54. Rizzoli R, Biver E, Bonjour JP, Coxam V, Goltzman D, Kanis JA, Lappe J, Rejnmark L, Sahni S, Weaver C, et al. Benefits and safety of dietary protein for bone health—an expert consensus paper endorsed by the European Society for Clinical and Economical Aspects of Osteoporosis, Osteoarthritis, and Musculoskeletal Diseases and by the International Osteoporosis Foundation. *Osteoporosis International*. 2018; 29 (9): 1933–1948.



## 6.2. ARTIGO 2: Cardioprotective action of chia (*Salvia hispanica* L.) in ovariectomized rats fed a high-fat diet

### Abstract

The estrogen reduction that occurs in the post-menopausal period is associated with the increase of risk factors for cardiovascular diseases development. The present study aimed to evaluate the effect of chia consumption in a standard diet (SD) or high fat diet (HFD) in ovariectomized (OVX) and non-ovariectomized (SHAM) rats, in relation to biometric measurements, oxidative stress, mineral content and ATPases enzymes of heart. The study was conducted with 80 female Wistar rats, that received a SD or HFD for 18 weeks. During the first 7 weeks the animals received SD or HFD. Then, 40 rats were ovariectomized and 40 rats were SHAM operated. After recovery from surgery (3 weeks) the animals were allocated into 8 groups (n = 10) and received the following diets: SD, SD + chia, HFD and HFD + chia, for the OVX and SHAM groups, for 8 weeks. HFD in the OVX group increased weight gain, adiposity, cardiac hypertrophy, nitric oxide (NO), K concentration and decreased Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase activity. Ovariectomy associated with HFD decreased catalase activity, Mg, Cu and Zn concentration and total ATPase activity, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase and Mg<sup>2+</sup>ATPase. In the same time, this group presented higher NO, Ca, K, Fe and Mn concentration in heart. The SHAM group fed chia had lower fat content in heart. In the OVX group fed a HFD, chia increased the activity of superoxide dismutase, decreased NO and maintained the content of minerals and ATPase enzymes. Thus, chia improved the biometric parameters of heart, the antioxidant activity and maintained the content of minerals and ATPase enzymes, showing a cardioprotective action, but without reversing the ovariectomy deleterious effects.

**Keywords:** Ovariectomy. Minerals. ATPase. Heart. Oxidative stress. Antioxidant activity.

## 1. Introduction

The post-menopause period is associated with dyslipidemia, inflammation (TALEB-BELKADI et al., 2016), increase in measures of central fat (AMBIKAI RAJAH et al., 2019) and reduce in antioxidant defenses (LÓPEZ-GRUESO et al., 2014). These are risk factors for the development of cardiovascular diseases (CVD) (TALEB-BELKADI et al., 2016), which are the leading cause of death in the world (ROTH et al., 2017). Postmenopausal women are at higher risk of CVD than those who have not gone through menopause at the same age. These differences can be attributed to female hormones and their receptors (BLENCK et al., 2016; REGITZ-ZAGROSEK, KARARIGAS, 2017). Estrogen provides protection to the vascular endothelium (SOMANI et al., 2019) and postmenopausal and obese women may be more susceptible to impairments in endothelial function (SUBOC et al., 2013). Estrogen can play an important function in inhibiting the development of cardiac hypertrophy by regulating calcium-related pathways, nitric oxide synthase (eNOS) activity and oxidative stress (MURPHY, 2012; WU et al., 2019). Thus, the negative effects related to reduction of estrogen may be associated with the effects of consuming a high-fat diet (HFD), such as the increase in oxidative stress (VENTURA et al., 2017) and inflammation (DA SILVA et al., 2019a).

In this sense, a diet rich in antioxidant nutrients and bioactive compounds can protect the body from metabolic changes. Chia seed (*Salvia hispanica* L.) has a high nutritional value, with high concentrations of lipids ( $30.17\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ), proteins ( $19.72\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ), total dietary fiber ( $37.18\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ) and minerals, in addition to the bioactive compounds that can be beneficial to human health (DA SILVA et al., 2017; GRANCIERI, MARTINO, MEJIA, 2019a). Chia is a food with great potential to protect the body from CVD, because in addition to dietary fibers, lipids and minerals, it is a rich source of proteins. In vitro studies have shown that digested chia seed proteins, which provide bioactive peptides in the hydrolysis process, such as albumin, globulin and glutelin, have beneficial effects in reducing the levels of markers related to the induction of inflammation and atherosclerosis processes in macrophages (GRANCIERI, MARTINO, MEJIA, 2019b) and antioxidant effects (GRANCIERI, MARTINO, MEJIA, 2019c).

Regarding the mineral content, we can highlight the chia seed as an excellent source of calcium ( $430\text{mg}/100\text{g}$ ), in addition to significant concentrations of potassium, magnesium, iron and zinc (DA SILVA et al., 2017). The primary function of heart is provide a coordinated muscle contraction system to pump blood into the lungs and the body, allowing tissues to receive oxygen and nutrients. The process that unites electrical activity with contraction of the

heart muscle is regulated by many calcium-dependent systems. In addition to the rapid processes that control contraction, calcium in the heart is also involved in the activation of genes which alter the expression of proteins and in adaptive processes, such as hypertrophy (DEREK, 2020). Thus, because chia is a rich source of calcium, it is justified to evaluate its effect on the mineral content and activity of ATPases in heart, through its consumption associated with the standard diet or high-fat diet, in ovariectomized (OVX) rats.

The consumption of chia seed has shown a series of health benefits, including cardiovascular and liver protection (MELO, MACHADO, OLIVEIRA, 2019). The benefits of chia seed associated with CVD markers have been attributed to the high concentration of  $\alpha$ -linolenic acid (omega-3) (TOSCANO et al., 2014; FORTINO et al., 2017). The evaluation of chia seed peptide profile in terms of its functions, also demonstrated that peptide sequences can have a beneficial biological potential, with antioxidant and hypotensive properties (GRANCIERI, MARTINO, MEJIA, 2019a). Thus, chia seed is considered as a potential bioactive food, as its consumption may be able to prevent and mitigate metabolic changes, and thus be used in the prevention and treatment of comorbidities associated with unbalanced diets (ENES et al., 2020).

A previous study by our group showed that chia consumption associated with the standard diet, improved the antioxidant activity in the liver of OVX animals, and the intake of chia associated with a high-fat diet in OVX rats increased the expression of superoxide dismutase (SOD) and catalase activity (DA SILVA et al., 2019b). However, the effect of chia on the biometric data of the animals, heart biometry, oxidative stress and mineral content of the heart in ovariectomized Wistar rats fed a HFD, has not yet been elucidated. Thus, the present study aimed to evaluate the effect of chia consumption associated with a standard diet or high-fat diet on the cardiovascular health of ovariectomized Wistar rats.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Raw materials and preparation of flours**

Chia seeds (*Salvia hispanica* L.) used in this study grown in the state of Mato Grosso (Brazil). The seeds were ground up using a knife mill (Marconi Equipment, Brazil) in three replicates to a particle size of 850  $\mu\text{m}$ , then the chia flour obtained was packed in polyethylene aluminum bags and stored in a freezer ( $-18^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) until the experimental diet preparation.

## 2.2. Animals and diets

Eighty female rats (*Rattus norvegicus*, Wistar, albinus variation), newly weaned, 21 days old, were obtained from the Central Animal Facility of the Center for Biological Sciences and Health at Federal University of Viçosa, Minas Gerais, Brazil. The animals were systematically subdivided into 2 groups with 40 animals each, randomized by body weight, they received the standard diet (SD) (REEVES, NIELSEN, FAHEY, 1993) or a HFD (Research Diets, New Brunswick, NJ) with modifications. They were distributed into individual stainless-steel cages in a controlled temperature environment (22°C) and automatically controlled light and dark cycles of 12 hours. The SD contained 19% protein, 17% fat and 64% carbohydrate. The HFD contained 51% fat, 15% protein and 34% carbohydrate. The animals received deionized water and their respective experimental diets ad libitum. After 7 weeks of fed, 40 female mice were ovariectomized (OVX) (20 animals for each group) and 40 were sham-operated (SHAM) (20 animals for each group) and continued to receive these diets for another 3 weeks for recovery from surgery. At 10 weeks, the OVX and SHAM animals were relocated to receive one of the following experimental diets (n=10/group) for 8 weeks: SD + calcium carbonate (SD+CC), SD + chia (SD+chia), HFD + calcium carbonate (HFD+CC) or HFD + chia (HFD+chia).

The diet offered to the animals attended 100% of calcium necessity for rodents (0.005 kg/kg diet), according to recommendations (REEVES, NIELSEN, FAHEY, 1993). Groups that were fed chia, the chia flour provided 20% of the recommended amount of calcium (0.0010 kg of calcium/kg diet) based on the composition. The rest of the calcium recommendations was provided by calcium carbonate. The other ingredients were added in sufficient quantities to provide the recommended amounts of lipids, proteins, carbohydrates, dietary fiber, and calories (Table 1).

After the experimental period, the animals were anesthetized with isoflurane (Isoforine, Cristália®, Itapira, Brazil). Blood was collected by cardiac puncture. The hearts and visceral adipose tissues were removed and weighed. The hearts were frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until analysis. Tibia length was measured by means of a 200-mm digital pachymeter (resolution, 0.01 mm; Model 530–312; Mitutoyo). Body weight gain and food intake were monitored weekly during the experimental period. Adiposity was calculated as a percentage using the following formula: (visceral + gonadal + retroperitoneal + mesenteric + inguinal adipose tissues) / total body weight x 100 (PEREIRA et al., 2012).

All the experimental procedures with animals were performed in accordance with Directive 86/609/EEC of November 24, 1986, in compliance with the ethical principles for animal experimentation. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Viçosa (Protocol 20/2017; date of approval: July 13th, 2017).

**Table 1.** Composition of experimental diets.

Ingredients (g.kg <sup>-1</sup> )	Experimental diets					
	Week 1 – Week 10		Week 10 - Week 18			
	SD	HFD	SD + CC	HFD + CC	SD + Chia	HFD + Chia
Albumin (g)	179.50	179.50	179.50	179.50	133.70	133.70
Chia (g)	0.00	0.00	0.00	0.00	232.60	232.60
Dextrinized starch (g)	155.00	155.00	155.00	155.00	155.00	155.00
Sucrose (g)	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Lard (g)	0.00	240.00	0.00	195.00	0.00	195.00
Soybean oil (g)	40.00	40.00	70.20	70.20	0.00	0.00
Cellulose (g)	50.00	50.00	86.00	86.00	0.00	0.00
Calcium-free mineral mix (g)	35.00	35.00	35.00	35.00	35.00	35.00
Vitamin mix (g)	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
L-cystine (g)	1.80	1.80	1.80	1.80	1.80	1.80
Choline bitartrate (g)	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50
Corn starch (g)	419.95	178.45	347.50	151.00	319.40	122.90
Cholesterol (g)	0.00	1.50	0.00	1.50	0.00	1.50
Calcium carbonate (g)	12.50	12.50	12.50	12.50	10.00	10.00
<b>Nutritional Composition</b>						
Total calories (kcal)	3778.00	4971.80	3760.80	4728.80	3647.40	4616.40
Caloric density (kcal/g)	3.77	4.97	3.76	4.73	3.65	4.62

SD: standard diet; SD+CC: standard diet + calcium carbonate; SD+chia: standard diet + chia; HFD+CC: high fat diet + calcium carbonate; HFD+chia: high fat diet + chia.

### 2.3. Biometric measurements of the heart

The hearts were removed and weighed. The fat present in the heart was separated, as well as the left ventricle (LV), and both were weighed separately. The cardiac hypertrophy index was calculated by the proportion of heart weight (mg) and tibia length (mm). The heart volume, ventricle volume and fat volume were determined by the submersion method (SCHERLE, 1970).

## **2.4. Oxidative stress - Evaluation of the antioxidant profile**

### **2.4.1. Homogenate preparation**

To obtain a heart homogenate, 200 mg of heart was mixed with 1000  $\mu$ L of phosphate buffer (50 mM) and 1 mM EDTA (pH 7,4). The sample was macerated and centrifuged at 12,000  $\times$ g and 4 °C for 10 min, and then the supernatant was removed and transferred to another microtube and used immediately or stored in an ultrafreezer until analysis. Total protein in the heart homogenate was quantified by Bradford method (BRADFORD, 1976).

### **2.4.2. Superoxide dismutase (SOD)**

The quantification of SOD was performed in relative units, and one unit was defined as the amount of SOD enzyme that inhibits the pyrogallol oxidation rate by 50%. The analysis was carried out on a spectrophotometer (Multiskan GO, Thermo Scientific, Ratastie, Finland) at 570 nm. The results were expressed as units of SOD activity per milligram of protein. The calculations were made in relation to the absorbance value of the standard, considering that it has 1 U of SOD, that is, 100% of pyrogallol oxidation (MARKLUND, 1985).

### **2.4.3. Malondialdehyde (MDA)**

The quantification of malondialdehyde (MDA) formed after the addition of thiobarbituric acid was based on the ability of thiobarbituric acid to react with certain compounds resulting from lipid peroxidation, such as MDA. The analysis was carried out on a spectrophotometer (Multiskan GO, Thermo Scientific, Ratastie, Finlândia) at 535 nm (KOHN, LIVERSEDGE, 1944; PYLES et al., 1993). The concentration of MDA was calculated using the molar absorptivity coefficient  $E_0 = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (BUEGE, AUST, 1978). The results were expressed in  $\mu$ M of MDA per milligram of protein.

### **2.4.4. Catalase activity (CAT)**

The determination of catalase enzyme activity (CAT) is based on its ability to cleave hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) in water and molecular oxygen, as described by AEBI (1984). Absorbances were determined at 0, 30 and 60 seconds at 240 nm in a spectrophotometer (T70 + UV/ VIS Spectrometer, Taylors, USA). One unit (U) of catalase is equivalent to hydrolysis of 1 mol of  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\epsilon=39,4 \text{ L.mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) per minute. Catalase activity was calculated according to Lambert Beer's law and was recorded in mmol.min/mg PTN.

#### 2.4.5. Nitric oxide

The heart homogenate was mixed with sulfanilamide (in 2.5%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) and e naphthyl l ethylene diamide dihydrochloride (in 2.5%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ). Absorbance was read on a spectrophotometer (Multiskan Go, Thermo Cientific) at 570 nm and the results were expressed in  $\mu\text{M}$  (GREEN et al., 1982).

#### 2.5. Mineral Microanalysis

The mineral content in cardiac tissue was investigated by energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) using a scanning electron microscope (JEOL, JSM-6010LA) with an x-ray detector system attached (Silicon Drift Detector). Small fragments of the heart of each animal were dehydrated in an oven and covered with a thin film of evaporated carbon (Quorum Q150 T, East Grinstead, West Sussex, England, UK). Microanalysis EDS was performed with an increase of  $350\times$ , with an acceleration voltage of 20 kV and a working distance of 10 mm. The proportion of the elements calcium (Ca), sodium (Na), potassium (K), magnesium (Mg), iron (Fe), copper (Cu), zinc (Zn), and manganese (Mn) was measured by EDS, and the values were normalized and expressed as mean value and standard deviation (LADEIRA et al., 2019).

#### 2.6. Determination of the activity of ATPase, $\text{Ca}^{2+}$ ATPase, $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase and $\text{Mg}^{2+}$ ATPase

Total membrane-bound adenosine triphosphatase (ATPase) activity,  $\text{Ca}^{2+}$ ATPase,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase and  $\text{Mg}^{2+}$ ATPase activities was measured in the supernatant of 100 mg of frozen heart previously homogenized in Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4 buffer solution and centrifuged at  $3500\times g$  at  $5^\circ\text{C}$  for 10 min. In a microcentrifuge tube, 750  $\mu\text{L}$  of buffer and 250  $\mu\text{L}$  of the mix NaCl 0.1 M, KCl 0.1 M,  $\text{MgCl}_2$  0.1 M,  $\text{CaCl}_2$  0.1 M, and ATP 0.01 M solution (50  $\mu\text{L}$  of each solution) were added to 50  $\mu\text{L}$  of supernatant. The samples were incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 20 min, and the reaction stopped by adding 500  $\mu\text{L}$  of icecold 10% TCA (Al-Numair et al. 2015) The samples were centrifuged for 10 min at  $1500\times g$  (AL-NUMAIR, VEERAMANI, ALSAIF, & CHANDRAMOHAN, 2015; SERTORIO et al., 2019). The inorganic phosphorus content in the supernatant was estimated by colorimetric determination (FISKE & SUBBAROW, 1925). The total ATPase activity,  $\text{Ca}^{2+}$ ATPase,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase and  $\text{Mg}^{2+}$ ATPase activities was expressed as micromol of phosphorous liberated per minute per milligram of protein.



## 2.7. Statistical analysis

The treatments were conducted in a completely randomized design, with ten repetitions (n=10 animals/group). The results were subjected to analysis of variance at 5% probability. To determine "F-value" significance, the post hoc Newman Keuls test was used to compare intra group means (among animals fed with different diets). T-tests were used to compare inter group differences (between animals fed with the same diet with and without ovariectomy). Statistical analysis were performed in the GraphPad Prism software, version 6. Data with a p-value  $\leq 0.05$  were considered statistically significant.

## 3. Results

### 3.1. Biometry

SHAM animals fed a HFD showed lower food intake than SHAM animals fed a SD. In OVX animals, HFD reduced food intake when associated with chia. Total energy intake was the same among experimental groups. HFD consumption increased weight gain and visceral adiposity in OVX animals. In SHAM animals, the type of diet consumed did not alter weight gain and visceral adiposity. Regarding surgery, OVX animals fed HFD (HFD + CC or HFD + chia) showed higher weight gain and visceral adiposity, when compared to SHAM animals fed the same diets. Heart weight, heart volume and heart weight/tibia length ratio did not differ among experimental groups. The fat weight in the heart was not altered by the type of diet consumed neither in SHAM nor OVX animals, but in relation to surgery, the SHAM animals fed chia, presented a lower fat weight in the heart than the OVX animals that consumed the same diet. The volume of fat in the heart was not altered by the type of diet consumed neither in SHAM animals nor in OVX. In relation to surgery, the fat size in the heart of the SHAM animals fed a standard diet with chia (SD + chia) or HFD (HFD + CC or HFD + chia) was lower than the OVX group. In SHAM group, the ventricle weight and the ventricle weight/tibia length ratio were not altered by the type of diet consumed. However, the OVX animals that consumed HFD, had a higher ventricle weight and a ventricle weight/tibia length ratio. Regarding surgery, the OVX group that consumed chia, had lower ventricle weight and ventricle weight/tibia length ratio, compared to the SHAM group, which received the same diet. Consumption of chia or HFD did not change the ventricle volume between SHAM animals or OVX animals. In relation to the surgery, the OVX animals that consumed a standard diet with chia (SD +chia), presented a lower ventricle volume compared to the SHAM animals that consumed the same diet (Table 2).

**Table 2:** Biometric data of experimental animals.

Groups	Non ovariectomized (SHAM)				Ovariectomized (OVX)			
	SD+CC	SD+Chia	HFD+CC	HFD+Chia	SD+CC	SD+Chia	HFD+CC	HFD+Chia
Total food intake (g)	740.31 ± 61.15 <sup>Aa</sup>	789.77 ± 87.58 <sup>Aa</sup>	624.49 ± 78.22 <sup>Ab</sup>	633.48 ± 66.31 <sup>Ab</sup>	730.04 ± 70.88 <sup>Aa</sup>	743.45 ± 94.30 <sup>Aa</sup>	669.43 ± 116.07 <sup>Ab</sup>	619.80 ± 37.18 <sup>Ab</sup>
Total energy intake (kcal)	2783.55 ± 229.93 <sup>Aa</sup>	2882.66 ± 319.68 <sup>Aa</sup>	2953.83 ± 370.00 <sup>Aa</sup>	2926.70 ± 306.34 <sup>Aa</sup>	2744.94 ± 266.50 <sup>Aa</sup>	2713.61 ± 344.19 <sup>Aa</sup>	3018.33 ± 304.10 <sup>Aa</sup>	2863.40 ± 71.78 <sup>Aa</sup>
Weight gain (g)	176.70 ± 19.92 <sup>Aa</sup>	178.45 ± 23.49 <sup>Aa</sup>	202.60 ± 23.79 <sup>Ba</sup>	206.4 ± 26.94 <sup>Ba</sup>	191.37 ± 15.08 <sup>Ab</sup>	197.78 ± 14.78 <sup>Ab</sup>	261.98 ± 23.61 <sup>Aa</sup>	263.60 ± 22.10 <sup>Aa</sup>
Visceral adiposity (g)	1.13 ± 0.32 <sup>Aa</sup>	1.20 ± 0.25 <sup>Aa</sup>	1.25 ± 0.44 <sup>Ba</sup>	1.33 ± 0.39 <sup>Ba</sup>	1.02 ± 0.28 <sup>Ab</sup>	1.27 ± 0.29 <sup>Ab</sup>	1.82 ± 0.33 <sup>Aa</sup>	1.74 ± 0.29 <sup>Aa</sup>
Tibia length (mm)	39.34 ± 1.15 <sup>Aa</sup>	40.08 ± 0.76 <sup>Aa</sup>	39.53 ± 1.46 <sup>Aa</sup>	39.59 ± 0.88 <sup>Ba</sup>	40.12 ± 2.24 <sup>Aa</sup>	41.57 ± 2.35 <sup>Aa</sup>	39.57 ± 1.94 <sup>Aa</sup>	40.96 ± 1.61 <sup>Aa</sup>
Heart weight (g)	1.780 ± 0.127 <sup>Aa</sup>	1.712 ± 0.075 <sup>Aa</sup>	2.116 ± 0.262 <sup>Aa</sup>	2.090 ± 0.306 <sup>Aa</sup>	1.744 ± 0.165 <sup>Aa</sup>	2.098 ± 0.392 <sup>Aa</sup>	2.311 ± 0.414 <sup>Aa</sup>	2.439 ± 0.312 <sup>Aa</sup>
Heart volume (mL)	0.875 ± 0.111 <sup>Aa</sup>	0.908 ± 0.088 <sup>Aa</sup>	0.969 ± 0.182 <sup>Aa</sup>	1.017 ± 0.123 <sup>Aa</sup>	0.800 ± 0.049 <sup>Aa</sup>	0.904 ± 0.096 <sup>Aa</sup>	0.912 ± 0.037 <sup>Aa</sup>	0.911 ± 0.121 <sup>Aa</sup>
Heart weight (mg) / Tibia length (mm)	45.53 ± 3.22 <sup>Aa</sup>	42.96 ± 1.49 <sup>Aa</sup>	51.91 ± 5.64 <sup>Aa</sup>	53.16 ± 9.43 <sup>Aa</sup>	43.89 ± 5.23 <sup>Aa</sup>	52.14 ± 10.99 <sup>Aa</sup>	58.37 ± 10.26 <sup>Aa</sup>	60.26 ± 7.08 <sup>Aa</sup>
Fat weight (g)	0.423 ± 0.122 <sup>Aa</sup>	0.245 ± 0.093 <sup>Ba</sup>	0.328 ± 0.049 <sup>Aa</sup>	0.339 ± 0.047 <sup>Ba</sup>	0.462 ± 0.185 <sup>Aa</sup>	0.508 ± 0.192 <sup>Aa</sup>	0.720 ± 0.290 <sup>Aa</sup>	0.730 ± 0.087 <sup>Aa</sup>
Fat volume (mL)	0.377 ± 0.118 <sup>Aa</sup>	0.230 ± 0.095 <sup>Ba</sup>	0.284 ± 0.052 <sup>Ba</sup>	0.301 ± 0.045 <sup>Ba</sup>	0.573 ± 0.195 <sup>Aa</sup>	0.543 ± 0.175 <sup>Aa</sup>	0.805 ± 0.160 <sup>Aa</sup>	0.696 ± 0.058 <sup>Aa</sup>
Ventricle weight (g)	0.658 ± 0.101 <sup>Aa</sup>	0.644 ± 0.055 <sup>Aa</sup>	0.735 ± 0.101 <sup>Aa</sup>	0.765 ± 0.059 <sup>Aa</sup>	0.560 ± 0.051 <sup>Ab</sup>	0.554 ± 0.034 <sup>Bb</sup>	0.672 ± 0.053 <sup>Aa</sup>	0.654 ± 0.053 <sup>Ba</sup>
Ventricle volume (mL)	0.600 ± 0.054 <sup>Aa</sup>	0.592 ± 0.047 <sup>Aa</sup>	0.665 ± 0.104 <sup>Aa</sup>	0.690 ± 0.060 <sup>Aa</sup>	0.513 ± 0.054 <sup>Aab</sup>	0.496 ± 0.046 <sup>Bb</sup>	0.626 ± 0.078 <sup>Aa</sup>	0.608 ± 0.057 <sup>Aab</sup>
Ventricle weight (mg) / Tibia length (mm)	17.58 ± 2.63 <sup>Aa</sup>	16.16 ± 1.29 <sup>Aa</sup>	18.05 ± 2.37 <sup>Aa</sup>	19.42 ± 2.03 <sup>Aa</sup>	14.09 ± 1.60 <sup>Ab</sup>	13.56 ± 0.89 <sup>Bb</sup>	16.97 ± 1.29 <sup>Aa</sup>	16.17 ± 1.28 <sup>Ba</sup>

SD + CC: standard diet + calcium carbonate; SD+chia: standard diet + chia; HFD+CC: high fat diet + calcium carbonate; HFD+chia: high fat diet + chia. Different capital letters (A–B) mean significant differences between SHAM and OVX fed the same diet, according to the T test ( $p < 0.05$ ). Different small letters (a–b) mean significant differences among the different diets in SHAM group or in OVX group according to the Newman–Keuls test at the 5% threshold of probability. Data expressed as mean ± standard deviation.

### 3.2. Oxidative stress

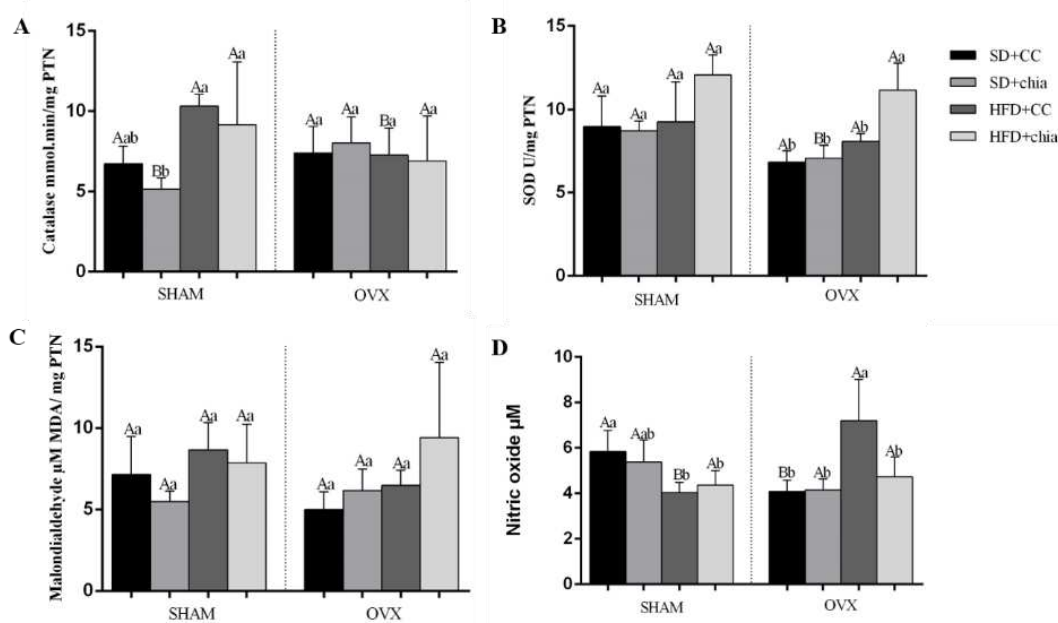
We analyzed the oxidative stress in the heart. In the SHAM group, the activity of catalase, an enzyme whose function is the dismutation of  $H_2O_2$  in oxygen and water, acting in the cellular defense against oxidative damage by  $H_2O_2$  (GLORIEUX, CALDERON, 2017), was not altered by the consumption of HFD (HFD + CC X SD + CC) nor by the consumption of chia (SD + CC X SD + chia and HFD + CC X HFD + chia). In the OVX group, the diet did not alter the catalase activity. Regarding surgery, catalase activity was higher in OVX animals that consumed SD + chia and lower in animals that consumed HFD + CC, compared to SHAM animals that consumed the same diets.

SOD is the first line of defense among antioxidant enzymes against oxygen free radicals, catalyzing the dismutation of the superoxide anion in oxygen ( $O_2$ ) and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), which is less reactive, preventing the generation of OH radicals highly reactive (BRESCIANI, DA CRUZ, GONZÁLEZ-GALLEGO, 2015). SOD activity, both for OVX and SHAM animals, did not differ between animals that consumed a standard diet or HFD (SD + CC X HFD + CC) and between animals that consumed a standard diet with calcium carbonate or standard diet with chia (SD + CC X SD + chia). Among the OVX animals that consumed HFD (HFD + CC X HFD + chia), those that consumed chia, had higher levels of SOD compared to those that did not consume chia. However, this difference was not observed in SHAM animals. Regarding surgery, OVX animals that consumed SD + chia showed less SOD activity compared to SHAM fed the same diet.

The levels of malondialdehyde, used as a biomarker of lipid peroxidation, as it is a secondary product of it (AYALA, MUÑOZ, ARGÜELLES, 2014), were not different between the groups, neither in relation to diet nor surgery.

Nitric oxide (NO) is essential for endothelial functioning, related to vasodilation, so it is considered a cardioprotective molecule, even though it is a free radical. But under conditions of oxidative stress, high levels of superoxide can react with NO to form peroxynitrite, a reactive nitrogen species (RNS) that causes changes that can lead to endothelial dysfunction (HALLIWELL et al., 2015). Among SHAM animals, NO levels were lower in animals that consumed HFD compared to those that consumed SD. In OVX animals, the consumption of HFD increased the levels of NO, but when this diet was associated with the consumption of chia, the amount of NO decreased and was comparable to that animals fed a standard diet. Regarding surgery, the OVX group that consumed a standard diet (SD + CC) had a lower amount of NO, compared to the SHAM group fed the same diet. However, when chia was

associated with a SD, NO levels was comparable between the SHAM and OVX groups. The OVX animals fed HFD + CC showed a higher NO concentration, but when chia was associated with a HFD the amount of NO was comparable between SHAM and OVX groups (Figure 1).



**Fig. 1.** Analyses of oxidative stress in the heart. SD + CC: standard diet + calcium carbonate; SD+chia: standard diet + chia; HFD+CC: high fat diet + calcium carbonate; HFD+chia: high fat diet + chia; PTN: protein; SHAM: non ovariectomized group and OVX: ovariectomized group. Graphs show (A) Catalase, (B) Superoxide dismutase, (C) Malondialdehyde and (D) Nitric oxide. Different capital letters (A–B) mean significant differences between SHAM and OVX fed the same diet, according to the T test ( $p < 0.05$ ). Different small letters (a–b) mean significant differences among the different diets in SHAM group or in OVX group according to the Newman–Keuls test at the 5% threshold of probability. Data expressed as mean  $\pm$  standard deviation.

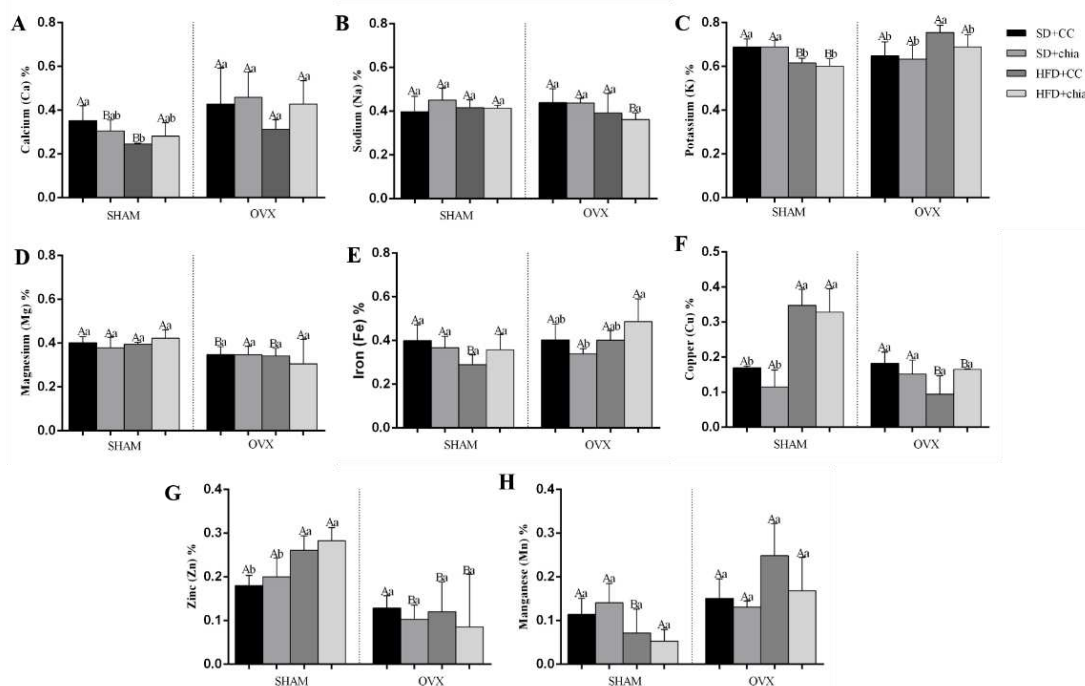
### 3.3. Mineral Microanalysis

Calcium, sodium and potassium are essential electrolytes for proper excitability of the cardiac muscle fiber membrane and contractile performance of the heart. The analysis of the concentration of minerals in the heart showed that, among OVX animals, the type of diet did not alter the calcium concentration. In SHAM animals, chia consumption did not alter the calcium concentration in the heart, but those who were fed HFD + CC had a lower calcium concentration when compared to SD + CC group. HFD associated with chia consumption was

able to maintain the calcium concentration in relation to animals fed a SD. Regarding surgery, SHAM animals fed a SD + chia or with HFD + CC had a lower concentration of calcium in the heart, when compared to OVX animals that received the same diet. For both OVX and SHAM animals, the type of diet did not change the sodium concentration in the heart. Regarding surgery, OVX animals fed HFD + chia, had lower sodium concentration in the heart. OVX animals fed HFD + CC showed a higher concentration of potassium in heart compared to other diets. In SHAM animals, consumption of a HFD (HFD + CC or HFD + chia) decreased potassium concentration when compared to standard diet consumption (SD + CC or SD + chia). In relation to the surgery, the SHAM animals that consumed HFD (HFD + CC or HFD + chia), presented lower concentration of potassium in the heart, when compared to the OVX animals that consumed the same diet. Magnesium is a mineral with a role in cardiac electrophysiology and significant effects on cardiac ion channels (LI et al., 2020). Both SHAM animals and OVX animals, did not present change in magnesium concentration in the heart. Regarding surgery, the OVX groups that did not consumed chia (SD + CC or HFD + CC) had a lower concentration of magnesium in the heart compared to SHAM animals fed the same diets.

Iron, copper, zinc and manganese have a role as a cofactor for enzymes that act in the cardiac oxidative defense. The iron concentration in the heart was not altered by the consumption of chia or HFD in the SHAM group, nor in the OVX group. Regarding surgery, OVX animals that consumed HFD + CC showed a higher concentration of iron in the heart when compared to SHAM animals that consumed the same diet. The concentration of copper in the heart of OVX animals was not altered by the diet consumed. Among SHAM animals that consumed HFD (HFD + CC or HFD + chia) the concentration of copper was higher. The consumption of chia did not change the concentration of the mineral. Regarding the surgery, the OVX animals fed HFD (HFD + CC or HFD + chia) had less copper in the heart.

Among the OVX animals, there was no difference in the zinc concentration in the different diets, and among the SHAM animals, those that consumed HFD (HFD + CC or HFD + chia) had a higher concentration of zinc in heart, compared to the animals that received SD. Regarding surgery, the OVX animals, which consumed a standard diet with chia (SD + chia) or HFD (HFD + CC or HFD + chia) showed lower zinc concentrations when compared to SHAM animals fed the same diets. The manganese concentration was not altered by the type of diet consumed for both SHAM and OVX animals. Regarding surgery, OVX animals fed a HFD + CC diet, showed a higher concentration of manganese in the heart (Figure 2).



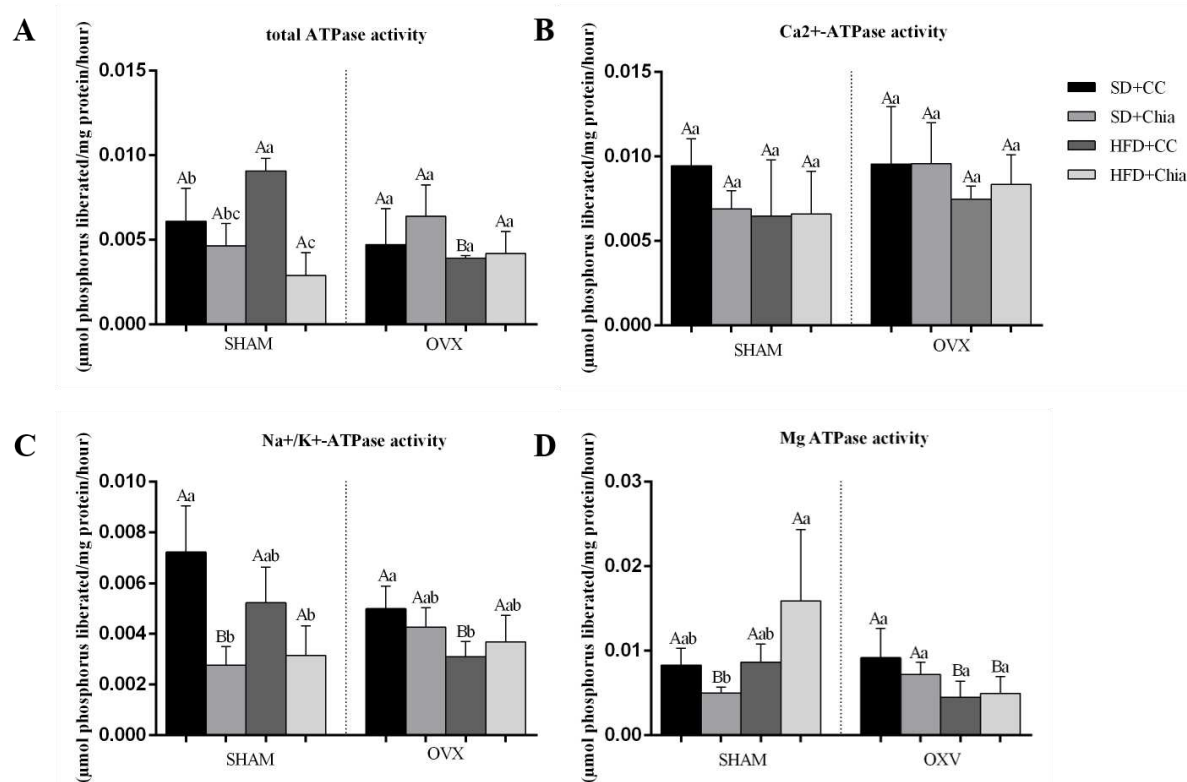
**Fig. 2.** Mineral proportion in the heart from Wistar rats fed chia and HFD. SD + CC: standard diet + calcium carbonate; SD+chia: standard diet + chia; HFD+CC: high fat diet + calcium carbonate; HFD+chia: high fat diet + chia; SHAM: non ovariectomized group and OVX: ovariectomized group. Graphs show (A) Calcium content, (B) Sodium content, (C) Potassium content, (D) Magnesium content, (E) Iron content, (F) Copper content, (G) Zinc content and (H) Manganese content. Different capital letters (A–B) mean significant differences between SHAM and OVX fed the same diet, according to the T test ( $p < 0.05$ ). Different small letters (a–b) mean significant differences among the different diets in SHAM group or in OVX group according to the Newman–Keuls test at the 5% threshold of probability. Data expressed as mean  $\pm$  standard deviation.

### 3.4. Determination of the activity of total ATPase, $\text{Ca}^{2+}$ ATPase, $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase and $\text{Mg}^{2+}$ ATPase

ATPases are transporters enzymes present in all cell membranes. It plays a role in osmotic balance, regulating ion concentrations within cells, so they act to maintain cellular homeostasis (SOUSA, et al., 2018). Among OVX animals, the diet did not alter the membrane-bound total ATPase activity. However, in the SHAM group, ATPase total activity was higher in animals that consumed HFD+CC, but when this diet was associated with consumption of chia, the activity was reduced. Regarding surgery, OVX animals fed HFD without chia, showed less total ATPase activity, compared to SHAM animals fed the same diet.

$\text{Ca}^{2+}$ ATPase activity was not altered either by the type of diet consumed or by ovariectomy. The consumption of HFD+CC by OVX animals decreased  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase activity compared to the SD consumption. In SHAM animals,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase activity was lower in the heart of rats fed standard diet + chia compared to rats fed standard diet without chia. Regarding the surgery, OVX animals fed HFD+CC, presented lower  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase activity, and when the animals were fed standard diet with chia, they presented higher  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase activity, compared to SHAM animals fed the same diet.

$\text{Mg}^{2+}$ ATPase activity was not altered by the consumption of chia or HFD in the OVX group or in the SHAM group (SD+CC X HFD+CC, SD+CC X SD+chia, HFD+CC X HFD+chia). However, in relation to surgery, OVX animals fed HFD (HFD+CC ou HFD+chia) showed less activity of  $\text{Mg}^{2+}$ ATPase compared to the SHAM group fed the same diets. OVX animals fed a standard diet with chia showed higher  $\text{Mg}^{2+}$ ATPase activity (Figure 3).



**Fig. 3.** The activities of total ATPase,  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase and  $\text{Mg}^{2+}$  ATPase in the heart of control and experimental animals. SD + CC: standard diet + calcium carbonate; SD+chia: standard diet + chia; HFD+CC: high fat diet + calcium carbonate; HFD+chia: high fat diet + chia; SHAM: not ovariectomized group and OVX: ovariectomized group. Graphs show (A) total ATPase, (B)  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase, (C)  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase and (D)  $\text{Mg}^{2+}$  ATPase.

Different capital letters (A–B) mean significant differences between SHAM and OVX fed the same diet, according to the T test ( $p < 0.05$ ). Different small letters (a–b) mean significant differences among the different diets in SHAM group or in OVX group according to the Newman–Keuls test at the 5% threshold of probability. Data expressed as mean  $\pm$  standard deviation.

#### 4. Discussion

Post-menopause is a period associated with hormonal changes with consequences on the antioxidant and cardiovascular system. Chia is a good source of bioactive compounds and minerals, and its effect on the heart of adult ovariectomized Wistar rats in relation to biometrics, oxidative stress and mineral content is being investigated. We used an animal model of ovariectomized rats to mimic cardiovascular changes, body composition and oxidative processes that occur due to hormonal loss in the post-menopausal period, associated with the consumption of a high-fat diet. Our results showed that the combination of ovariectomy with the high-fat diet consumption influenced the biometric parameters, oxidative stress, mineral content and ATPase pump activity, and chia consumption had positive effects in relation to these factors (Table 3).

The animals consumed similar amounts of energy even consuming different amounts of diet. The higher satiety and higher energy density may justify by the lower food intake observed in animals fed high-fat diet (HFD + CC and HFD + chia) in the SHAM group and with HFD + chia in the OVX group, as previously noted (DA SILVA et al., 2019b). Despite the lower food intake, the OVX groups fed HFD (HFD + CC and HFD + chia) showed greater weight gain and greater visceral adiposity, in relation to animals fed standard diet, and in relation to SHAM animals. It is suggested that ovariectomy makes rats more likely to accumulate fat due to the lack of hormonal protection, and then, high-fat diet can aggravates the effect of ovariectomy, with increased body mass and fat accumulation (HONG et al., 2009; LUDGERO CORREIA et al., 2012), corroborating our results of biometric parameters of the heart.

High-fat diet consumption in the OVX group increased the ventricle weight and the ventricle weight/tibia length ratio, indicating ventricular hypertrophy. Cardiac hypertrophy in previous studies was associated with both obesity (ALEXESCU et al., 2016) and with estrogen deficiency (ROUET-BENZINEB, MERVAL, POLIDANO, 2018). Regarding obesity, hypertrophy may be caused by factors that increase cardiac load by cardiac compression (ALPERT, 2001; BERNARDO et al., 2010), and the inflammatory conditions and fibrosis can



affect cardiac remodeling (MANABE, 2011). In ovariectomized rats, estrogen has been shown to decrease hypertrophy induced by pressure overload by an estrogen-dependent mechanism, which increases calcineurin degradation (DONALDSON et al., 2009) and decreased left ventricular mass and ventricular weight/body weight ratio (VAN EICKELS et al., 2001).

The SHAM animals fed chia had lower weight and volume of fat in the heart than the OVX animals that consumed the same diet, indicating that chia with the presence of estrogen in the SHAM group reduced the fat content in the heart. This fact showed a cardioprotective action, but without reversing the deleterious effects of ovariectomy. The nutritional composition of chia, with a large amount of  $\alpha$ -linolenic acid (omega-3) has been related to its benefits associated with CVD markers (TOSCANO et al., 2014; FORTINO et al., 2017; ENES et al., 2020), since consumption of  $\alpha$ -linolenic acid can be beneficial and is associated with a moderately lower risk of CVD (PAN et al., 2012; ENES et al., 2020). Peptides are also related to the cardioprotective benefits of chia due to the antioxidant role and the reduction of inflammatory and atherosclerotic markers (GRANCIERI, MARTINO, MEJIA, 2019b; GRANCIERI, MARTINO, MEJIA, 2019c).

Oxidative stress, an unbalanced condition between the production and decomposition of reactive oxygen species (ROS) (AGITA, THAHA, 2017), is directly related to CVD (SKIBSKA; GORACA, 2015). Chia consumption is associated with higher antioxidant activity of catalase enzyme and increased SOD expression in the liver of Wistar OVX rats (DA SILVA et al., 2019b). In our study, ovariectomy when associated with HFD showed lower catalase activity compared to the SHAM group fed the same diet. However, when chia was associated with this diet, catalase activity was comparable to the SHAM group. When ovariectomy was associated with HFD with chia, there was an increase in the concentration of SOD, suggesting a compensatory mechanism for the increase in the levels of reactive oxygen species observed in the OVX group fed a HFD. In addition, OVX animals fed HFD+CC showed higher NO production, which may increase the production of RNS (NOVELLA et al., 2012; VENTURA et al., 2017). However, when chia was associated with a HFD in the OVX group, the NO concentration returned to levels comparable to the control group.

It is known that estrogen regulates positively the eNOS that may be involved in cardiovascular protection by estrogen observed in women (NUEDLING et al., 1999; SUN et al., 2006; LIN et al., 2009; CHAKRABARTI et al., 2010). HFD and ovariectomy can lead to increased generation of reactive oxygen species and reduced antioxidant capacity, and, when these conditions were associated with chia consumption, there was a protective mechanism,

increasing SOD and reducing NO, indicating potential to inhibit and/or reduce the damage caused by the action of ROS. The antioxidant capacity of chia is due to its nutritional composition in relation to the profile of peptides (GRANCIERI, MARTINO, MEJIA, 2019c), phenolic acids and lipophilic compounds such as carotenoids, tocopherols, phospholipids and alpha linolenic acid, and the interactions and activity synergistic between these components (ENES et al., 2020).

We evaluated the relationship between minerals and antioxidant enzymes. Redox metabolism has minerals acting as cofactors for antioxidant enzymes, whose activity needs the availability and mobilization of these elements (SOETAN, OLAIYA, OYEWOLE, 2010). Imbalance in mineral levels can alter the expression and synthesis of antioxidant enzymes that maintain redox balance and prevent the oxidative stress (SOUZA et al., 2018). The variation in the content of the minerals copper, zinc and manganese, cofactors of the SOD enzyme, and iron, cofactor of the CAT enzyme, was not necessarily accompanied by corresponding variations in these enzymes in the heart. However, in the OVX group fed SD+chia, the reduction in Zn concentration was accompanied by a reduction in the quantification of SOD. Thus, the reduction of the enzyme is justified by the reduction of this mineral, which would be mobilized for the antioxidant system. In the OVX groups, diet did not change calcium concentration in heart. But in SHAM animals, HFD decreased calcium concentration in heart and when the animals were fed chia, the calcium concentrations were comparable to that animals fed calcium carbonate. These results corroborates with the results not yet published in another study of ours, which found that high-fat diet decreased calcium retention, and chia showed calcium bioavailability comparable to a standard source of calcium (calcium carbonate) when offered in a diet that met 100% of the calcium recommendation for rodents, regardless of the type of diet, in SHAM animals.

Our results showed that the OVX group fed HFD showed a reduction in total ATPase activity,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase and  $\text{Mg}^{2+}$ ATPase, compared to SHAM animals fed the same diet, suggesting HFD as an aggravating factor for the effects of ovariectomy and the consumption of chia did not reverse this effect. Hyperlipidemia and oxidative stress are associated with disturbance of membrane fluidity and stability, influencing the activity of membrane-associated enzymes (BABU, SABITHA, SHYAMALADEVI, 2006; SRIKANTHAN, SHAPIRO, SODHI, 2016; SOUSA, et al., 2018).  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase is responsible for the electrochemical gradient of sodium and potassium ions, which maintains a low intracellular concentration of Na and a high intracellular level of K. This enzyme acts to maintain the potential of the cell

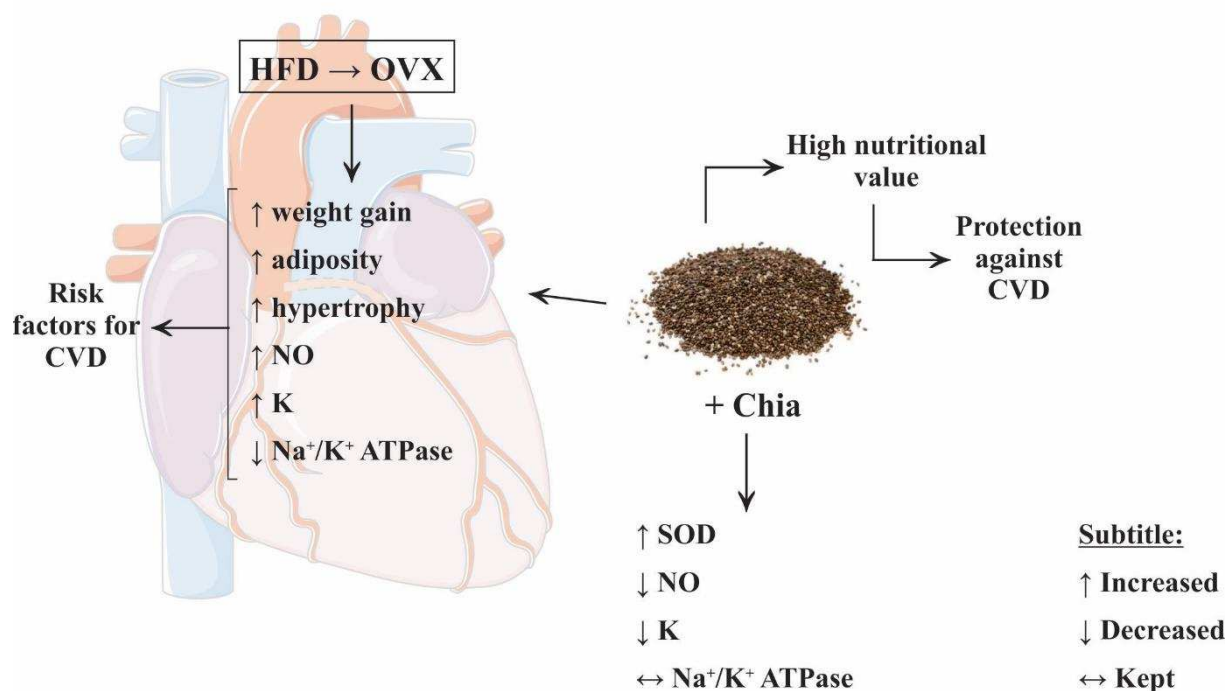
membrane and regulates vascular tone. Changes in its activity can worsen the cardiovascular outcome (PALACIOS et al., 2004; RIBEIRO JUNIOR et al., 2017; SOUSA, et al., 2018). Magnesium plays a role in cardiac electrophysiology, both extracellular and intracellular magnesium have effects on cardiac ion channels and consequences for the duration of the action potential, cellular excitability and contractility (LI et al., 2020).  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase is the main active calcium transport protein in the plasma membrane, responsible for maintaining normal levels of intracellular calcium and works by removing calcium from the cell and thus reducing free intracellular calcium. Changes in calcium homeostasis have been linked to heart failure (FRANK et al., 2002; PIESKE et al., 2002; TOISCHER et al., 2010). In muscle contraction,  $\text{Ca}^{2+}$  is released from the sarcoplasmic reticulum and  $\text{Ca}^{2+}$ ATPase pumps back the released  $\text{Ca}^{2+}$  to cause relaxation (TOYOSHIMA, 2009). Although SHAM group fed HFD had lower calcium concentration in the heart, our study observed no changes in  $\text{Ca}^{2+}$ ATPase activity, indicating that calcium homeostasis was not altered; thus, the contraction function was not affected by the treatments, in relation to mineral content.

In our study, the consumption of HFD by OVX animals resulted in deleterious effects to the heart in relation to ventricular hypertrophy, with increased animal weight gain and visceral adiposity, in addition to increased oxidative stress and reduced activity of ATPases enzymes, that can worsen the cardiovascular outcome (Table 3). Chia consumption had a cardioprotective role in relation to the fat content in the heart of SHAM animals with a standard diet and HFD, and the potential antioxidant capacity to reduce the damage caused by oxidative stress due to a HFD diet in OVX animals (Figure 4). The minerals analysis showed that the reduction in Zn concentration was accompanied by a reduction in the quantification of SOD in the OVX group fed a SD + chia. The variation of the other minerals analyzed was not necessarily accompanied by variations in antioxidant enzymes and ATPases.

**Table 3.** Effect of high-fat diet and ovariectomy on the heart of Wistar rats.

	Diet			Ovariectomy (OVX)				
	Diet	Group	Effect	Diet	Effect			
<b>Biometry</b>	HFD+CC / HFD+chia	SHAM and OVX	↓ food intake	HFD+CC / HFD+chia	↑ weight gain ↑ adiposity			
	HFD+CC / HFD+chia	OVX	↑ weight gain ↑ adiposity	SD+chia / HFD+chia	↑ weight of fat in heart ↓ ventricle weight ↓ ventricle weight / tibia length			
			↑ ventricle weight ↑ ventricle weight / tibia length		SD+chia / HFD+CC / HFD+chia	↑ volume of fat in heart		
	HFD+CC / HFD+chia	SHAM	↓ NO	SD+chia	↓ ventricle volume			
				HFD+CC	OVX	↑ NO	HFD+CC	↑ CAT ↓ SOD
				HFD+chia	OVX	↑ SOD ↓ NO	SD+CC	↓ CAT ↑ NO
<b>Mineral content</b>	HFD+CC	SHAM	↓ Ca	SD+chia / HFD+CC	↑ Ca			
	HFD+chia	SHAM	↔ Ca	HFD+chia	↓ Na			
	HFD+CC / HFD+chia	SHAM	↓ K	HFD+CC / HFD+chia	↑ K			
			↑ Cu		↓ Cu			
	HFD+CC	OVX	↑ Zn	SD+CC / HFD+CC	↓ Mg			
	HFD+chia	OVX	↑ K	HFD+CC	↑ Fe			
			↓ K	↑ Mn				
				SD+chia / HFD+CC / HFD+chia	↓ Zn			
<b>ATPases</b>	HFD+CC	SHAM	↑ total ATPase	HFD+CC	↓ total ATPase ↓ Na+/K+ ATPase			
	HFD+chia	SHAM	↓ total ATPase	SD+chia	↑ Na+/K+ ATPase ↑ Mg2+ ATPase			
	SD+chia	SHAM	↓ Na+/K+ ATPase					
	HFD+CC	OVX	↓ Na+/K+ ATPase	HFD+CC / HFD+chia	↓ Mg2+ ATPase			
	HFD+chia	OVX	↔ Na+/K+ ATPase					

SD + CC: standard diet + calcium carbonate; SD+chia: standard diet + chia; HFD+CC: high fat diet + calcium carbonate; HFD+chia: high fat diet + chia; SHAM: non ovariectomized group and OVX: ovariectomized group; NO: nitric oxide; SOD: superoxide dismutase; CAT: catalase; Ca: calcium; K: potassium; Cu: copper; Zn: zinc; Na: sodium; Mg: magnesium; Mn: manganese; Fe: iron; ↑: increased; ↓ decreased; ↔ kept.



**Figure 4:** Effect of adding chia to the high fat diet in the heart of ovariectomized Wistar rats. HFD: hyperlipidic diet; OVX: ovariectomy; CVD: cardiovascular disease; NO: nitric oxide; K: potassium.

## 5. Conclusion

The high fat diet consumption exacerbated the deleterious effects of ovariectomy on the heart. The consumption of chia associated with the HFD by OVX rats improved the antioxidant activity, indicating the potential to inhibit and/or reduce the damage caused by the action of ROS, increasing SOD and reducing NO. Chia when consumed by SHAM animals reduced heart fat content. The minerals contents and ATPase enzymes in the heart was maintained with the consumption of chia in OVX animals, showing a cardioprotective action, but without reversing the deleterious effects of ovariectomy.

## Acknowledgements

The authors would like to thank the Foundation for Research Support of Minas Gerais (FAPEMIG, Brazil) for financial support of the research; “Laboratório de Microscopia Eletrônica” of the Physics Department of the Federal University of Viçosa; we are also grateful

to the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Brazil), and the National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq, Brazil).

### **Compliance with ethical standards**

All the procedures performed in this study involving animals were in accordance with the ethical standards of the Federal University of Viçosa and with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986.

### **Conflict of interest statement**

The authors declare that they have no conflicts of interest.

## **6. References**

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.
- AGITA, A., THAHA, M. Inflammation, Immunity, and Hypertension. **Acta Med Indones**, v. 49, n. 2, p. 158–165, 2017.
- ALEXESCU, T.G., COZMA, A., SITAR-TĂUT, A., et al. Cardiac Changes in Overweight and Obese Patients. **Rom. J. Intern. Med.**, v. 54, n. 3, p. 161–172, 2016.
- AL-NUMAIR, K. S., VEERAMANI, C., ALSAIF, M. A., et al. Influence of kaempferol, a flavonoid compound, on membrane-bound ATPases in streptozotocin-induced diabetic rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 9, p. 1372–1378, 2015.
- ALPERT, M.A. Obesity Cardiomyopathy: Pathophysiology and Evolution of the Clinical Syndrome. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 6, n. 21, p. 225-236, 2018.
- AMBIKAI RAJAH, A., WALSH, E., TABATABAEI-JAFARI, H., et al. Fat mass changes during menopause: a meta-analysis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 221, n. 5, p.393-409, 2019.
- AYALA, A., MUÑOZ, M.F., ARGÜELLES, S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014.
- BABU, P.V.A., SABITHA, K.E., et al. Green tea impedes dyslipidemia, lipid peroxidation, protein glycation and ameliorates Ca<sup>2+</sup> -ATPase and Na<sup>+</sup> / K<sup>+</sup> -ATPase activity in the heart of streptozotocin-diabetic rats. **Pharmacological Research**, v. 162, p. 157–164, 2006.
- BERNARDO, B.C., WEEKS, K.L., PRETORIUS, L., MCMULLEN, J.R. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: Experimental findings and therapeutic strategies. **Pharmacol Ther**, v.128, p. 191–227, 2010

BLENCK, C. L., HARVEY, P. A., RECKELHOFF, J. F., & LEINWAND, L. A. The Importance of Biological Sex and Estrogen in Rodent Models of Cardiovascular Health and Disease. **Circulation Research**, v. 118, n. 8, p. 1294–1312, 2016.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRESCIANI, G., DA CRUZ, I.B.M., GONZÁLEZ-GALLEGO, J. Manganese superoxide dismutase and oxidative stress modulation. **Advances in Clinical Chemistry**, v. 68, p. 87–130, 2015.

BUEGE, J. A., AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in enzymology**, v. 52, p. 302–310, 1978.

CHAKRABARTI, S., LEKONTSEVA, O., PETERS, A., DAVIDGE, S.T. 17beta-Estradiol induces protein S-nitrosylation in the endothelium. **Cardiovasc Res**, v. 85, n. 4, p. 796–805, 2010.

DA SILVA, B. P.; ANUNCIACÃO, P. C.; MATYELKA, J. C. S.; et al. Chemical composition of Brazilian chia seeds grown in different places. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1709–1716, 2017.

DA SILVA, B.P., TOLEDO, R.C.L., GRANCIERI, M., et al. Effects of chia (*Salvia hispanica* L.) on calcium bioavailability and inflammation in Wistar rats. **Food Research International**, v. 116, p. 592–599, 2019a.

DA SILVA, B.P., TOLEDO, R.C.L.; MISHIMA, M.D.V., et al. Effects of chia (*Salvia hispanica* L.) on oxidative stress and inflammation in ovariectomized adult female Wistar rats. **Food & Function**, 2019b.

DEREK A. T. Calcium Signaling in the Heart. In: MD. SHAHIDUL ISLAM. **Calcium Signaling**. Second Edition. Switzerland: Springer, 2020. 1, 16, 395–435

DONALDSON, C., EDER, S., BAKER, C., ARONOVITZ, M. J., WEISS, A. D., HALL-PORTER, M., et al. Estrogen attenuates left ventricular and cardiomyocyte hypertrophy by an estrogen receptor-dependent pathway that increases calcineurin degradation. **Circulation Research**, v. 104, n. 2, p. 265–275, 2009.

ENES, B.N.; MOREIRA, L.P.D.; SILVA, B.P.; et al. Chia seed (*Salvia hispanica* L.) effects and their molecular mechanisms on unbalanced diet experimental studies: A systematic review. **Journal of Food Science**, v. 85, n. 2, p. 226–239, 2020.

FISKE, C. H., & SUBBAROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 66, p. 375–400, 1925.

FORTINO, M. A. et al. Could post-weaning dietary chia seed mitigate the development of dyslipidemia, liver steatosis and altered glucose homeostasis in offspring exposed to a

sucroserich diet from utero to adulthood? **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 116, p. 19–26, 2017.

FRANK, K. F., BOLCK, B., BRIXIUS, K., et al. Modulation of SERCA: implications for the failing human heart. **Basic Res Cardiol**, v. 97, p. 172–178, 2002.

GLORIEUX, C., CALDERON, P. B. Catalase, a remarkable enzyme: Targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. **Biological Chemistry**, v. 398, n. 10, p. 1095–1108, 2017.

GRANCIERI, M., MARTINO, H.S.D., MEJIA, E. Chia Seed (*Salvia hispanica* L.) as a Source of Proteins and Bioactive Peptides with Health Benefits: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 18, p. 480 – 499, 2019a.

GRANCIERI, M., MARTINO, H.S.D., MEJIA, E.G. Chia (*Salvia hispanica* L.) Seed Total Protein and Protein Fractions Digests Reduce Biomarkers of Inflammation and Atherosclerosis in Macrophages In Vitro. **Mol Nutr Food Res**, v. 63, n. 19, p. 1–15, 2019c.

GRANCIERI, M., MARTINO, H.S.D., MEJIA, E.G. Digested total protein and protein fractions from chia seed (*Salvia hispanica* L.) had high scavenging capacity and inhibited 5-LOX, COX-1-2, and iNOS enzymes. **Food Chemistry**, v. 289, p. 204–214, 2019b.

GREEN, L.C., WAGNER, D.A., GLOGOWSKI, J., et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131–138, 1982.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. Oxford (UK): Oxford University Press; 2015.

HONG, J., STUBBINS, R. E., SMITH, R. R., HARVEY, A. E., & NÚÑEZ, N. P. Differential susceptibility to obesity between male, female and ovariectomized female mice. **Nutrition Journal**, v. 8, n. 1, p. 1–5, 2009.

KOHN, H.I., LIVERSEDGE, M. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine, and menadione. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 82, n. 3, p. 292- 300, 1944.

LADEIRA, L. C. M., DOS SANTOS, E. C., VALENTE, G. E., DA SILVA, J., SANTOS, T. A., & MALDONADO, I. R. DOS S. C. Could biological tissue preservation methods change chemical elements proportion measured by Energy Dispersive X-ray Spectroscopy? **Biological Trace Element Research**, 2019.

LI, J., HOVEY, M.K., ANDREWS, C.A., QUDDUS, A., et al. Association of Dietary Magnesium Intake with Fatal Coronary Heart Disease and Sudden Cardiac Death. **Journal of Women's Health**, v. 29, n. 1, p. 7–12, 2020.

LIN, J., STEENBERGEN, C., MURPHY, E., SUN J. Estrogen receptor-beta activation results in S-nitrosylation of proteins involved in cardioprotection. **Circulation**, v. 120, n. 3, p. 245-254, 2009.



LÓPEZ-GRUESO R., GAMBINI J., ABDELAZIZ K. M. et al., “Early, but not late onset estrogen replacement therapy prevents oxidative stress and metabolic alterations caused by ovariectomy,” **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 20, n. 2, pp. 236–246, 2014.

LUDGERO-CORREIA, A., AGUILA, M.B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C.A., et al. Effects of high-fat diet on plasma lipids, adiposity, and inflammatory markers in ovariectomized C57BL / 6 mice. **Nutrition**, v. 28, n. 3, p. 316–323, 2012.

MANABE, I., Chronic inflammation links cardiovascular, metabolic and renal diseases. **Circulation Journal**, v. 75, n. 12, 2011.

MARKLUND, S.L. Pyrogallol autooxidation. In: Handbook of Methods for Oxygen Radical Research (CRC Press Boca Raton FL), p.243-247, 1985.

MELO, D., MACHADO, T.B., OLIVEIRA, M. B.P. P. Chia seeds: an ancient grain trending in modern human diets. **Food & Function**, v. 10, p. 3068-3089, 2019.

MURPHY, E. Estrogen Signaling and Cardiovascular Disease Elizabeth. **Circ Res.**, v. 109, n. 6, p. 687–696, 2012.

NOVELLA, S., DANTAS, A.P., SEGARRA, G., MEDINA, P., HERMENEGILDO, C. Vascular aging in women: is estrogen the fountain of youth? **Front Physiol**, v. 3, p. 165, 2012.

NUEDLING, S., KAHLERT, S., LOEBBERT, K., DOEVENDANS, P.A., MEYER, R., VETTER, H., GROHE, C. 17 Betaestradiol stimulates expression of endothelial and inducible NO synthase in rat myocardium invitro and in-vivo. **Cardiovasc Res.**, v. 43, n. 3, p. 666–674, 1999.

PALACIOS, J., MARUSIC, E.T., LOPEZ, N.C., GONZALEZ, M., MICHEA, L. Estradiol-induced expression of N(+)-K(+)-ATPase catalytic isoforms in rat arteries: gender differences in activity mediated by nitric oxide donors, **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 286, n. 5, p. 1793–1800, 2004.

PAN, A., CHEN, M., CHOWDHURY, R., et al.  $\alpha$ -Linolenic acid and risk of cardiovascular disease: a systematic review. **Clin Nutr**, v. 96, n. 6, p. 1262–1273, 2012.

PEREIRA, S.S., TEIXEIRA, L.G., AGUILAR, E.C., MATOSO, R.O., SOARES, F.L.P., FERREIRA, A.V.M., ALVAREZ-LEITE, J.I. Differences in adipose tissue inflammation and oxidative status in C57BL/6 and ApoE<sup>-/-</sup> mice fed high fat diet. **Anim Sci J.**, v. 83, n. 7, p. 549–555, 2012.

PIESKE, B., MAIER, L.S., PIACENTINO, V., et al. Rate dependence of [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> and contractility in nonfailing and failing human myocardium. **Circulation**, v. 106, p. 447-453, 2002.

PYLES, L. A., STEJSKAL, E. J., EINZIG, S. Spectrophotometric measurement of plasma 2-hiobarbituric acid-reactive substances in the presence of hemoglobin and bilirubin interference. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 202, n. 4, p. 407-419, 1993.

- REEVES, P., NIELSEN, F., FAHEY, G. Committee Report AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. **The Journal of Nutrition**, p. 1939–1951, 1993.
- REGITZ-ZAGROSEK, V., & KARARIGAS, G. Mechanistic Pathways of Sex Differences in Cardiovascular Disease. **Physiological Reviews**, v. 97, n. 1, p. 1–37, 2017.
- RIBEIRO JUNIOR, R.F., FIORIM, J., et al. Vascular activation of K<sup>+</sup> channels and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> + ATPase activity of estrogen-deficient female rats. **Vascular Pharmacology**, v. 99, p. 23–33, 2017.
- ROTH, G. A., JOHNSON, C., ABAJOBIR, A., ABD-ALLAH, F., ABERA, S. F., ABYU, G., et al. Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 70, n. 1, p. 1–25, 2017.
- ROUET-BENZINEB, P., MERVAL, R., POLIDANO, E. Effects of hypoestrogenism and / or hyperaldosteronism on myocardial remodeling in female mice. **Physiological Reports ISSN**, v. 6, n. 21, 2018.
- SCHERLE, W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. **Mikroskopie**, v. 26, n. 1, p. 57–60, 1970.
- SERTORIO, M. N., SOUZA, A. C. F., BASTOS, D. S. S., SANTOS, F. C., ERVILHA, L. O. G., FERNANDES, K. M., DE OLIVEIRA, L.L., MACHADO-NEVES, M. Arsenic exposure intensifies glycogen nephrosis in diabetic rats. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 12, p.12459–12469, 2019.
- SKIBSKA, B., GORACA, A. The protective effect of lipoic acid on selected cardiovascular diseases caused by age-related oxidative stress. **Oxid Med Cell Longev**, p.1–11, 2015.
- SOETAN, K.O., OLAIYA, C. O., OYEWOLE, O. E. The importance of mineral elements for humans, domestic animals and plants: A review. **African Journal of Food Science**, v. 4, n. 5, p. 200–222, 2010.
- SOMANI, Y.B., PAWELCZYK, J.A., DE SOUZA, M.J., et al. Aging women and their endothelium: probing the relative role of estrogen on vasodilator function. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v. 317, n. 40, 2019.
- SOUSA, L., PESSOA, M.T.C., COSTA, T.G.F., et al. Iron overload impact on P-ATPases. **Ann Hematol**, v. 97, n. 3, p. 377–385, 2018.
- SOUZA, A.C.F., MARCHESI, S.C., LIMA, G.D.A., et al. Effects of Arsenic Compounds on Microminerals Content and Antioxidant Enzyme Activities in Rat Liver. **Biol Trace Elem Res**, v. 183, p. 305–313, 2018.
- SRIKANTHAN, K., SHAPIRO, J., SODHI, K. The role of Na/K-ATPase signaling in oxidative stress related to obesity and cardiovascular disease. **Molecules**, v. 21, n. 9, p. 1172, 2016.

SUBOC, T.M., DHARMASHANKAR, K., WANG, J., YING, R., COUILLARD, A., TANNER, M.J., WIDLANSKY, M.E. Moderate obesity and endothelial dysfunction in humans: influence of gender and systemic inflammation. **Physiol Rep**, v. 1, n. 3, p. 1-10, 2013.

SUN, J., PICT, E., GINSBURG, K.S., BERS, D.M., STEENBERGEN, C., MURPHY, E. Hypercontractile female hearts exhibit increased S-nitrosylation of the L-type Ca<sup>2+</sup> channel alpha1 subunit and reduced ischemia/ reperfusion injury. **Circ Res.**, v. 98, n. 3, p. 403-411, 2006.

TALEB-BELKADI, O., CHAIB, H., ZEMOUR, L., et al. Lipid profile , inflammation , and oxidative status in peri- and postmenopausal women. **Gynecol Endocrinol.**, v. 32, n. 12, p. 982-985, 2016.

TOISCHER, K., LEHNART, S.E., TENDERICH, G., et al. K201 improves aspects of the contractile performance of human failing myocardium via reduction in Ca (2+) leak from the sarcoplasmic reticulum. **Basic Res Cardiol**, v. 105, p. 279-287, 2010.

TOSCANO, L. T. **Efeitos da suplementação de chia (Salvia hispanica L.) sobre a pressão arterial, estresse oxidativo, inflamação e modulação autonômica cardíaca em indivíduos hipertensos: um estudo de intervenção.** 2014. 95 f. Universidade Federal da Paraíba, 2014.

TOYOSHIMA, C. Biochimica et Biophysica Acta How Ca<sup>2+</sup>-ATPase pumps ions across the sarcoplasmic reticulum membrane. **BBA - Molecular Cell Research**, v. 1793, n. 6, p. 941–946, 2009.

VAN EICKELS, M., GROHE, C., CLEUTJENS, J. P., JANSSEN, B. J., WELLENS, H. J., & DOEVENDANS, P. A. 17beta-estradiol attenuates the development of pressure-overload hypertrophy. **Circulation**, v. 104, n. 12, p. 1419–1423, 2001.

VENTURA, L. L., FORTES, N. C., SANTIAGO, H. C., CALIARI, M. V., GOMES, M. A., & OLIVEIRA, D. R. Obesity-induced diet leads to weight gain, systemic metabolic alterations, adipose tissue inflammation, hepatic steatosis, and oxidative stress in gerbils (*Meriones unguiculatus*). **PeerJ**, v. 5, 2017.

WU, J., DAI, F., LI, C., et al. Gender differences in cardiac hypertrophy. **Journal of Cardiovascular Translational Research**, 2019.

## 7. CONCLUSÃO GERAL

A farinha de semente de chia manteve a saúde óssea e apresentou biodisponibilidade de cálcio comparável à uma fonte padrão de cálcio quando oferecida como parte de uma dieta que atendeu a 100% da recomendação de cálcio para roedores, independentemente do tipo de dieta, em animais adultos não ovariectomizados.

Uma dieta hiperlipídica aumentou a concentração de cálcio sérico e diminuiu a retenção de cálcio nos animais OVX, podendo representar menor biodisponibilidade do mineral e interferir no metabolismo ósseo, ocasionando perda e fragilidade da estrutura óssea e agravou os efeitos deletérios da ovariectomia no coração. A adição de chia a dieta hiperlipídica não alterou esses parâmetros, nem os de morfologia óssea. O consumo de chia associado à dieta hiperlipídica fornecida aos ratos OVX melhorou a atividade antioxidante no coração, indicando potencial para inibir e, ou reduzir os danos causados pela ação das ERO's, aumentando SOD e reduzindo ON. A chia quando consumida pelos animais SHAM, levou a menor conteúdo de gordura no coração. O conteúdo de minerais e enzimas ATPase no coração foi mantido com o consumo de chia nos animais OVX, evidenciando uma ação cardioprotetora, mas sem reverter os efeitos deletérios da ovariectomia.

## ANEXO

**CERTIFICADO**

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 20/2017, intitulado **“Efeito da ingestão de chia *Salvia hispanica* L. na biodisponibilidade e na expressão gênica de proteínas envolvidas no metabolismo de cálcio em ratos wistar alimentados com dieta hiperlipídica”**, coordenado pela professora Hércia Stampini Duarte Martno do Departamento de Nutrição e Saúde, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 11/07/2017, com validade de 12 meses.

**CERTIFICATE**

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 20/2017, named **“Effect of ingestion of chia *Salvia hispanica* L. on the bioavailability and gene expression of proteins involved in calcium metabolism in wistar rats fed a hyperlipidic diet”**, is in agreement with the actual Brazilian legislation ( Lei Nº 11.794, 2008), Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTI, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes and Teaching) and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being approved by the Committee on July 11, 2017 valid for 12 months.

  
Prof. Átima Clemente Alves Zuanon

Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV