

Efecto del consumo del extracto de alfalfa (*medicago sativa*) en anemia ferropénica inducida, en ratones (*mus musculus*)

Effect of consumption of alfalfa extract (*Medicago sativa*) on induced iron deficiency anemia in mice (*Mus musculus*)

Jony Z. Amaro-Terrazos, María E. Iparraguirre y Pamela C. Isla-Ponciano

Recibido 21 junio 2017 / Enviado para modificación 14 mayo 2018 / Aceptado 29 agosto 2018

RESUMEN

Objetivos Determinar el efecto del consumo del extracto de alfalfa en anemia ferropénica inducida, en ratones.

Materiales y Métodos Se utilizaron treinta ratones albinos *M. musculus* de la cepa Balb/c, machos de peso promedio $23\pm 33,7$ g. Se formaron tres grupos de diez ratones cada uno: a) grupo control negativo hierro suficiente (HS), recibió 40g/d de alimento balanceado durante siete semanas; b) grupo control positivo hierro deficiente (HD), recibió 40g/d de dieta ferropénica durante siete semanas y; c) grupo experimental hierro deficiente (HD), recibió 40g/d de dieta ferropénica durante siete semanas y a partir de la semana cinco se agregó 20g/d de extracto de alfalfa (EA).

Resultados Al finalizar el tratamiento se observó diferencia significativa en los niveles de hemoglobina entre los grupos control positivo (8.41 ± 3.9 g/dL) y experimental (13.4 ± 3.3 g/dL) (t student, $p<0,05$). No se encontró diferencia significativa en los niveles de hemoglobina, al término del periodo de inducción entre los grupos control positivo (8.76 ± 3.9 g/dL) y experimental (8.59 ± 3.1 g/dL) (t student, $p>0,05$).

Conclusiones En condiciones experimentales, la alfalfa presenta efecto antianémico, sustentado en los resultados de los niveles de hemoglobina.

Palabras Clave: Anemia ferropénica; alfalfa; nutrición; hierro; dieta; enfermedad (fuente: DeCS, BIREME).

ABSTRACT

Objective To determine the effect of alfalfa extract consumption on induced iron deficiency anemia in mice.

Materials and Methods Thirty *M. musculus* albino mice of the BALB/c strain were used for this study. All of them were males, with a mean weight of 23 ± 33.7 g. Three groups of 10 mice each were formed: a) negative control group with sufficient iron (HS), which received 40g/d of balanced feed for seven weeks; b) positive control group with iron deficiency (HD), which received 40g/d of a diet plan for anemia for seven weeks; and c) experimental group with iron deficiency (HD), which received 40g/d of a diet plan for anemia for seven weeks and 20g/d of alfalfa extract (EA) from week five. Hemoglobin levels were measured.

Results At the end of the treatment, a significant difference was observed in hemoglobin levels between the positive (8.41 ± 3.9 g/dL) and experimental (13.4 ± 3.3 g/dL) control groups (T student, $p<0.05$). There was no significant difference in hemoglobin levels at the end of the induction period between the positive (8.76 ± 3.9 g/dL) and experimental (8.59 ± 3.1 g/dL) groups (T student, $p>0.05$).

Conclusions Under experimental conditions, alfalfa has an antianemic effect based on the results of hemoglobin levels.

Key Words: Anemia iron-deficiency; *medicago sativa*; nutrition public health; iron; diet; disease (source: MeSH, NLM).

JÁ: Ph.D. Ciencias de la Educación Bioterio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. jony200927@live.com
MI: M. Sc. Educación. Lima, Perú. doctejlps@gmail.com
PI: MDV. Lima, Perú. pamelaponciano6@gmail.com

La anemia es el problema nutricional más prevalente a nivel mundial que afecta aproximadamente 1 620 millones de personas y el 50% es debido a la deficiencia de hierro, siendo una de las poblaciones perjudicadas, los niños en edad escolar con una prevalencia del 25.4 por ciento y en América Latina y el Caribe afecta al 39.5% (22.3 millones) de niños en edad preescolar (1).

Es un trastorno en el cual el número de eritrocitos es insuficiente para satisfacer las necesidades del organismo. Las necesidades fisiológicas específicas varían en función a la edad, sexo, altitud, tabaquismo y diferentes etapas del embarazo. Se cree que en conjunto, la carencia de hierro es la causa más común de anemia, pero pueden causarla otras carencias nutricionales como folato, vitamina B12, vitamina A y lisina (ingerir unos 40 mg por día y kilogramo de peso para mantener el equilibrio adecuado), la inflamación aguda y crónica, las parasitosis y las enfermedades hereditarias o adquiridas que afectan a la síntesis de la hemoglobina y a la producción o la supervivencia de los eritrocitos (2,3).

Hierro – (Fe) es absorbido a nivel de intestino delgado proximal (duodeno). El enterocito regula la absorción de Hierro según las necesidades del organismo: altos niveles corporales de Hierro bloquean su absorción y bajos niveles la incrementan. La dieta contiene dos tipos de Fe según su forma química. El Hierro no hemínico (inorgánico) proveniente de alimentos vegetales, sales minerales y también en carnes. El hierro hemínico derivado de carnes y sangre, cada uno con transportadores específicos. El hierro hemínico es incorporado como molécula hem al enterocito, mediante el transportador intestinal putativo de hierro hem (HCP1), que es regulado por hipoxia y deficiencia de hierro, aunque también puede ser internalizado por endocitosis. En el interior del enterocito, el hem es degradado por la enzima hemoxigenasa liberando al hierro para que este se incorpore al pool de hierro del enterocito. En cambio, el Fe no hemínico es reducido en el borde de la vellosidad, ya que el transportador de metales divalentes 1 (DMT1) transporta solo hierro ferroso, (la mayoría del Fe dietario se presenta como Fe férrico) este es captado por el DMT1 que lo internaliza a la célula.

Además del tipo de hierro de la dieta, la absorción de hierro es afectada por otros factores dietarios favorecedores o inhibidores de la absorción, por la cantidad de superficie y motilidad intestinal, el estado de los depósitos de hierro, la velocidad de la eritropoyesis y por la hipoxia. Existe una relación inversa entre la absorción y los depósitos de hierro, en relación directa con la velocidad de la eritropoyesis y la hipoxia. Pocos factores dietarios afectan la absorción del hierro hemínico, las proteínas de origen animal la favorecen, mientras el calcio la disminuye. En

cambio, la absorción de hierro no hemínico es influenciado por varios componentes de la dieta, el ácido ascórbico, las proteínas de la carne y los alimentos fermentados la favorecen, mientras que los fitatos, la fibra alimentaria y la caseína la inhiben. (4).

A nivel del mar, la concentración de hemoglobina para diagnosticar la anemia en la Población Niños de 5 a 11 años: Sin anemia, ≥ 11.5 (g/dL); Leve, 11 a 11.4 (g/dL); Moderada, 8 a 10.9 (g/dL); Grave, < 8 (g/dL) (5)

La alfalfa es una especie perenne, de raíces profundas, con muchos tallos usualmente erectos que parten de yemas en la corona. Es el cultivo forrajero más importante del mundo y un alimento de alta calidad para todo tipo de ganado. En condiciones adecuadas es la leguminosa forrajera más productiva y probablemente haya sido, históricamente, la primera especie forrajera cultivada. Fue cultivada en Irán alrededor del año 700 a. C. llegando a Grecia 200 años más tarde; se difundió a través del sur de Europa, norte de África y Asia y fue llevada a las Américas por los conquistadores españoles, difundiéndose en los Estados Unidos de América a mediados del siglo XIX. La alfalfa llegó a China en el segundo siglo a. C. cuando fueron adquiridos caballos iraníes con fines militares. Su uso se popularizó en Europa del Norte y en Australasia durante los últimos dos siglos. Es un cultivo común entre los pequeños agricultores en las partes más áridas de Asia y el norte de África; en algunas regiones, los brotes jóvenes son consumidos como hortaliza.

Hay dos subespecies principales de *Medicago* que participan en el desarrollo del amplio rango de cultivares de alfalfa disponibles hoy día: la forma común de alfalfa de flores púrpuras *M. sativa* subsp. *sativa*, y la alfalfa de flores amarillas *M. sativa* subsp. *falcata* que es rizomatosa y resistente al frío y a la sequía. *M. sativa* crece en climas más suaves al sur de la región mediterránea. En los casos en que la distribución de las dos subespecies se superpone aparecen formas híbridas antiguamente identificadas como *M. media* o *M. varia*, pero ahora conocidas como *M. sativa* subsp. *varia*.

Los cultivares pueden ser clasificados en cuatro grupos de acuerdo a su origen y a su rusticidad:

El grupo común que comprende tipos puros de *M. sativa* subsp. *sativa* con flores púrpuras y limitada resistencia al frío. Está representada por las alfalfas comunes de los Estados Unidos de América y líneas regionales de Europa Central, Argentina, África del Sur, Nueva Zelanda y Australia.

El grupo Turkistán que consiste de tipos de *M. sativa* subsp. *sativa*; su hábito de crecimiento es más breve y la planta se difunde más que las plantas del grupo Común. Tiene una recuperación lenta después del corte y

baja producción de semillas pero es resistente al frío y a la marchitez bacteriana.

El grupo variegado presenta flores variegadas, y probablemente se originó en híbridos entre *M. sativa* subsp. *falcata* y *M. sativa* subsp. *sativa*; la mayoría de sus componentes son resistentes al frío.

El grupo no resistente al frío, adaptado a regiones de días cortos y largas temporadas de crecimiento se caracteriza por su crecimiento erecto, la rápida recuperación después del corte, la susceptibilidad al daño por el frío y a las enfermedades de la hoja y a la marchitez bacteriana. Las líneas más representativas se encuentran en muchos países productores de alfalfa en zonas cálidas como Egipto, Asia Occidental, norte de África, India, Perú y algunas líneas de Argentina y Chile. (6).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del extracto de alfalfa (*Medicago sativa*) frente a anemia ferropénica inducida por dieta deficiente en hierro en ratones albinos *M. musculus* cepa Balb/c.

MÉTODOS

Se utilizó 30 ratones albinos (*Mus musculus*) de la cepa Balb/c, machos, de $23 \pm 3,7$ g peso promedio, procedente del bioterio del Instituto Nacional de Salud (Lima-Perú). Se mantuvo en jaulas individuales a temperatura ambiente de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, con ciclo luz/oscuridad de 12 horas, con alimentos y agua ad libitum, La aclimatación duró cinco días, el periodo de inducción cuatro semanas y el periodo de tratamiento tres semanas. Posterior a la aclimatación, fueron distribuidos aleatoriamente en tres grupos de diez ratones cada uno: grupo control negativo de hierro suficiente (HS), que no se le indujo y los grupo control positivo y experimental de hierro deficiente (HD) que experimentaron inducción.

El grupo control negativo (HS) recibió 40g/d de alimento balanceado (6,56mg/d de hierro elemental), durante 7 semanas. Al grupo control positivo (HD) se le administró 40g/d de dieta ferropénica (3,41mg/d de hierro elemental), durante siete semanas. El grupo experimental (HD), recibió 40g/d de dieta ferropénica (3,41mg/d de hierro elemental), durante siete semanas y, a partir de la semana cinco, se agregó 20 g/d de extracto de alfalfa (13mg/d de hierro elemental).

Se utilizó las hojas de alfalfa de la variedad Abunda Verde, de la Provincia de Ambo, Departamento de Huánuco, adquirido en el mercado 'Santa Rosa', San Juan de Lurigancho.

La dieta balanceada fue adquirida en el Instituto Nacional de Salud (Lima-Perú).

Para la preparación de la dieta ferropénica se utilizó caseína 200g; Almidón de Maíz 530g; Sacarosa 123g; Su-

plemento vitamínico 10g; Suplemento Mineral 35g; Aceite soya 50g; Cistina 2g; Celulosa 50g. (7).

En el extracto acuoso de alfalfa, las hojas fueron sometidos a micropulverizado y luego fueron macerados con 56 L de etanol, a temperatura ambiente. Se decantó, filtró y evaporó el solvente para obtener el extracto que luego fue conservado en recipientes. Este proceso ha sido desarrollado por Laboratorio Fitofarma EIRL.

Para el tratamiento de los animales con el extracto, se elaboró la solución a una concentración de 250mg/kg, diluyéndolo en agua bidestilada, y se conservó a -4°C .

La anemia ferropénica fue medida en función de hemoglobina.

Para la premedicación, se extrajo las muestras de sangre de la vena safena de la cola (8) y en volumen de 0,15 mililitros (9), al finalizar la cuarta semana, a los tres grupos, en el proceso de inducción. Se utilizó el método de cianometalhemoglobina y el espectrofotómetro, de acuerdo al Laboratorio de Patología Clínica de Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (Lima-Perú). Luego, al finalizar la tercera semana del tratamiento, el mismo proceso para la posmedicación.

Los datos cumplieron las premisas de normalidad (kolmogorov-Smirnov) y homogeneidad de varianza (Prueba de Levene) ($p > 0,05$), por lo cual todos los resultados fueron sometidos a análisis de media, seguido de una prueba Tstudent, para buscar diferencias significativas, al finalizar el periodo de inducción entre los grupos control positivo HS con el grupo experimental HD; y, al término del periodo de tratamiento, entre los grupos control positivo HD con grupo experimental HD.

Se consideró que existían diferencias significativas cuando $p < 0,05$. Los resultados de los experimentos son presentados como la media \pm el error estándar. Los datos fueron procesados en una plantilla EXCEL VERSION 2013.

El estudio fue manejado de acuerdo con el protocolo de la Comisión Ética para la Experimentación Animal de la Universidad del País Vasco (10).

RESULTADOS

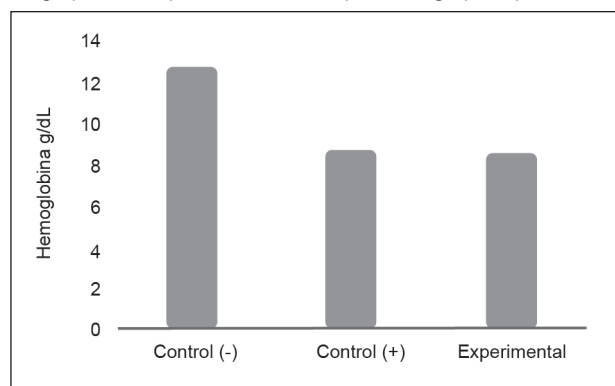
Al finalizar el periodo de inducción, los valores de hemoglobina: grupo control negativo HS ($12,73 \pm 3,9$ g/dL), en el grupo control positivo HD ($8,76 \pm 3,9$ g/dL) y en el grupo experimental HD ($8,59 \pm 3,1$ g/dL).

No se encontró diferencia significativa en los niveles de hemoglobina entre los grupos control positivo HD y experimental HD, al final del periodo de inducción (t student, $p > 0,05$) (Figura 1).

Al término del periodo de tratamiento, los valores de hemoglobina: grupo control negativo HS ($12,6 \pm 3,1$ g/

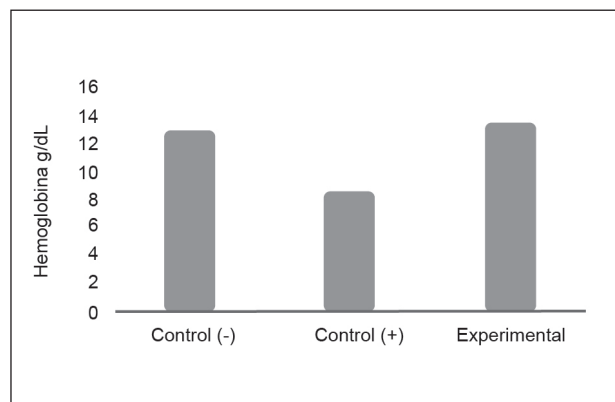
dL), en el grupo control positivo HD (8.41 ± 3.9 g/dL) y en el grupo experimental HD (13.4 ± 3.3 g/dL).

Figura 1. Efecto del periodo de inducción, administrando alimento balanceado al grupo control negativo; dieta ferropénica al grupo control positivo; dieta ferropénica al grupo experimental



Se encontró diferencia significativa en los niveles de hemoglobina entre los grupos control positivo HD y experimental HD-EA (extracto de alfalfa), al final del periodo de tratamiento (t student, $p < 0,05$) (Figura 2).

Figura 2. Efecto del periodo de tratamiento, administrando alimento balanceado al grupo control negativo; dieta ferropénica al grupo control positivo; dieta ferropénica + alfalfa, al grupo experimental



DISCUSIÓN

Se observó que la administración de 20 g/d de alfalfa añadido a la dieta ferropénica incrementó los niveles de hemoglobina hasta alcanzar valores normales. El preparado de alfalfa presenta alto contenido de hierro elemental (13 mg/d), en $327,17 \pm 14,23$ (mg/kg) (11), el cual es necesario para la síntesis de hemoglobina.

Se conoce que el hierro no hem, encontrado en los vegetales, es de menor biodisponibilidad que el hierro hem. La fuerte característica quelante del ácido fítico reduce la biodisponibilidad de otros nutrientes esenciales nutrientes tales como minerales, oligoelementos (por ejemplo,

Ca²⁺, Zn²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺ y Fe²⁺ / ³⁺), proteínas y aminoácidos (12-14).

Además, los fitatos inhiben la absorción de Hierro Fe (15). Sin embargo, la presencia de la vitamina C en la alfalfa (16) favorece la absorción de hierro (17). La Vitamina C convierte el Fe⁺³ a Fe⁺² en la luz intestinal y mejora su absorción (4).

Siendo la alfalfa un producto vegetal, presenta alto contenido de fibra.

Los presentes estudios examinaron que estas mismas fibras disminuyen la absorción de hierro por el intestino delgado canino (18).

Weber (19) informa que la administración de una mixtura de fibra (polisacárido de soya, inulina, almidón resistente, goma arábiga, fruto-oligosacárido y celulosa) en ratas inducidas a anemia ferropénica que recibieron tratamiento con citrato férrico (30mg de hierro elemental), no interfirió en la absorción intestinal de hierro, no habiendo diferencia significativa con los resultados del grupo que no recibió fibra.

En este estudio, la administración del extracto de alfalfa tuvo un efecto sobre la anemia ferropénica inducida en ratones albinos *M. musculus* de la cepa/Balbc, sustentado por el incremento en los niveles de hemoglobina ♦

Conflicto de interés: Ninguno.

REFERENCIAS

1. WHO (Organización Mundial de la Salud, GE). Worldwide prevalence of anaemia 1993–2005: WHO global database on anaemia / Edited by Bruno de Benoist, Erin McLean, Ines Egli and Mary Cogswell. Ginebra. 2008. Consultado 13 jun. 2013. Disponible <http://bit.ly/2HY5NSS>.
2. WHO (Organización Mundial de Salud, GI). Concentraciones de hemoglobina para evaluar la anemia y diagnosticar su gravedad. 2011. Ginebra. WHO/NMH/NHD/MNM/11.1. Consultado 18 jul. 2014. Disponible: <http://bit.ly/2X9Ur4i>.
3. Madrid A. Guía práctica de nutrición y dietética. Un tratado completo, moderno y práctico de nutrición y dietética en un solo libro. AMV ediciones. 1 ed. España; 360 p. 2012.
4. Grandy G, Weisstaub G, López D. Deficiencia de hierro y zinc en niños. Rev. Soc. Bol. Ped. 2010;49 (1): 25-31.
5. WHO (Organización Mundial de Salud, GI). Concentraciones de hemoglobina para evaluar la anemia y diagnosticar su gravedad. Ginebra. 2011. WHO/NMH/NHD/MNM/11.1. Consultado 18 jul. 2014. Disponible en: <http://bit.ly/2M7E7jt>.
6. Capítulo VI Cultivos para Heno - Leguminosas Forrajeras y Legumbres. [Internet]. ROMA: Departamento de Agricultura; 2003 [citado 12 jun 2017]. Disponible en: <http://bit.ly/2W80zhg>.
7. Garcia Hernandez, Y, Morejon Calderon A, Bourg Llamo, V. Efecto oxidativo de la anemia ferropénica severa en ratas Wistar machos recién destetadas. Rev Cubana Invest Bioméd [online]. 2015; 34(1) 44-53.
8. Ciriaco A, Mendiola J, Falcon D, Cantillo J. Obtención de Sangre e Inyección Intravenoso en Roedores por vía de la vena safena. Instituto "Pedro Kourí". (IPK) Cuba. Disponible en: <http://bit.ly/2wkll7>.
9. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá. Procedimiento de Administración de Sustancias y Toma de Muestras Sanguíneas Incluyendo

- Rutas y Volúmenes en Roedores DE Laboratorio [Internet] Consultado en junio 17 de 2017. Disponible: <http://bit.ly/2VV4jh8>.
10. Comité de Ética de Experimentación Animal (CEEA/AAEB). Ética en la investigación con animales. Disponible en: <http://bit.ly/2woBmjg>.
 11. Pico FSM, Gutiérrez D, Aragón GI, Escobar SA, Ortiz D, Sánchez T, Imbachí NP, Pachón H. Evaluación de la Composición Nutricional, Antinutricional y Biodisponibilidad In Vitro de Diferentes Extractos Foliarios. *Rev Chil Nutr.* 2011;38(2): 168-176
 12. Cosgrove DJ, Irving GCJ. Inositol Phosphates: Their Chemistry, Biochemistry and Physiology, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. 1980
 13. Hurrell RF, Lynch S, Bothwell T, Cori H, Glahn R, Hertrampf E, Krawczyk Z, Miller D, Rodenstein M, Streekstra H, Teucher B, Turner E, Yeung CK and Zimmermann MB. Enhancing the Absorption of Fortification Iron A SUSTAIN Task Force Report C.K C.K Int. J. Vitam. Nutr. Res., 74 (6), 2004, 387–401..
 14. Simpson CJ, Wise A. Binding of zinc and calcium to inositol phosphates (phytate) in vitro. *Br. J. Nutr.* 1990;64(1): 225–232.
 15. Hallberg L, Brune M, Rossander L. Iron absorption in man: ascorbic acid and dose dependent inhibition by phytate. *Am J Clin Nutr.* 1989 ;49(1):140-4.
 16. Pennacchiotti Monti PI, Yanssens Gutiérrez G. Valoraciones Espectrofotométrica de la Vitamina C en Alfalfa, Heno de Alfalfa y Trébol y de Caroteno en Trébol. *Agricultura Técnica Chile.* 1953; 15 (1): 27-30.
 17. Davidsson L, Walczyk T, Zavaleta N, Hurrell R. Improving iron absorption from a Peruvian school breakfast meal by adding ascorbic acid or Na₂EDTA. *Am J Clin Nutr.* 2001 ;73(2):283-7.
 18. Fernandez R, Phillips SF. Components of fiber impair iron absorption in the dog. *Am J Clin Nutr.* 1982 Jan;35(1):107-12.
 19. Weber TK, Freitas Kde C, Amancio OM, de Moraes MB. Effect of dietary fibre mixture on growth and intestinal iron absorption in rats recovering from iron-deficiency anaemia. *Br J Nutr.* 2010;104(10):1471-6.