

## Evaluación de dieta purificada para la obtención de biomodelo de ratas anémicas

### Evaluation of a purified diet to obtain a biomodel of anemic rats

MSc. Yenela García Hernández,<sup>I</sup> Tec. Águeda García- Pérez,<sup>II</sup> Lic. Sergio C. Ángeles- Campos,<sup>II</sup> Lic. Agustín Carmona- Castro,<sup>III</sup> Dr. C. René Cárdenas-Vázquez<sup>III</sup>

<sup>I</sup>Centro Nacional de Biopreparados. Mayabeque, Cuba

<sup>II</sup>Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). México DF, México

<sup>III</sup>Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Circuito exterior, Ciudad Universitaria. México DF, México

---

#### RESUMEN

**Introducción:** el desarrollo científico y tecnológico en las ciencias biológicas y biomédicas ha sido posible gracias a la utilización de modelos animales experimentales. La anemia por deficiencia de hierro (Fe), afecta aproximadamente a la tercera parte de la población mundial. La rata recién destetada ha sido el modelo animal más empleado en la obtención de un biomodelo experimental de anemia. Para la obtención de anemia se utiliza el método de depleción de la hemoglobina (Hb), mediante una alimentación basada en una dieta deficiente en Fe.

**Objetivo:** el objetivo de este trabajo fue evaluar la eficacia de una dieta purificada a partir de caseína en la obtención de ratas anémicas.

**Métodos:** se utilizaron 40 ratas Sprague Dawley recién destetadas (21-24 días), la mitad de cada sexo. Se alojaron en grupos de 3 del mismo sexo en cajas de acero inoxidable con piso de rejillas. Durante 8 semanas se les administró agua desionizada y una dieta de caseína al 12,58 % de proteínas y 1,28 mgFe/Kg. Cada dos semanas se midió el peso corporal y a partir de la cuarta semana, la concentración de Hb.

**Resultados:** se obtuvo un incremento significativo del peso corporal sin observarse diferencias entre hembras y machos. Se tomó como criterio de obtención de la anemia aquellos animales cuya Hb disminuyó al menos en un 30 % del valor inicial promedio por grupo. El porcentaje de animales anémicos a las 8 semanas fue superior en las hembras (75 %), mientras que en machos (60 %). La dieta utilizada en este estudio permitió obtener ratas anémicas en el sexo hembras con una eficiencia

aceptable, en relación al porcentaje de animales anémicos y al incremento del peso corporal.

**Conclusiones:** la dieta utilizada en este estudio permitió obtener ratas anémicas en el sexo hembras con una eficiencia aceptable, en relación al porcentaje de animales anémicos y al incremento del peso corporal.

**Palabras clave:** biomodelos, anemia, dieta, ratas anémicas.

---

## ABSTRACT

**Introduction:** the scientific and technological development of biological and biomedical sciences has been possible due to the use of experimental animal models. Iron- (Fe-) deficiency anemia affects about one third of the world population. Just weaned rats have been the animal model most commonly used to obtain an experimental biomodel of anemia. The disease is obtained by the hemoglobin (Hb) depletion method, feeding the animal an iron-deficient diet.

**Objective:** evaluate the efficacy of a purified diet based on casein to obtain anemic rats.

**Method:** a study was conducted of 40 just weaned (21-24 days) Sprague Dawley rats, 20 of each sex. The animals were housed in groups of 3 rats of the same sex in stainless steel boxes with mesh bottoms. For 8 weeks the animals were administered deionized water and a casein diet of 12.58% protein and 1.28 mgFe/kg. Body weight was measured every two weeks. Hb concentration was gauged from the fourth week onwards.

**Results:** a significant increase in body weight was obtained, with no differences between male and female rats. The criterion for anemia was at least a 30% decrease in Hb with respect to the average baseline value per group. The percentage of anemic animals at 8 weeks was higher for females (75%) than for males (60%).

**Conclusions:** the diet used for the study made it possible to obtain female anemic rats with acceptable efficiency in relation to the percentage of anemic animals and the increase in body weight.

**Key words:** biomodels, anemia, diet, anemic rats.

---

## INTRODUCCIÓN

Gran parte del desarrollo científico y tecnológico en las ciencias biológicas y biomédicas ha sido posible gracias a la utilización de modelos animales experimentales. El uso de animales es un paso imprescindible en la investigación de medicamentos antes de su aplicación clínica. Existe una amplia evidencia de los beneficios que ha significado la experimentación en animales para la biomedicina. El ser humano se halla en continuidad evolutiva con el resto de los organismos. Existen suficientes similitudes anatómicas, fisiológicas, neurológicas, bioquímicas, farmacológicas y de comportamiento, como para estudiar en ellos efectos biológicos del desarrollo de enfermedades, así como efectos terapéuticos.<sup>1</sup> La anemia constituye el problema de salud pública más extendido en el mundo y está asociada al incremento del riesgo de morbilidad y mortalidad, especialmente en las embarazadas y los niños pequeños.<sup>2</sup> En Cuba este trastorno nutricional desde la década del 90 se ha convertido en un importante problema de salud, lo que ha conducido al desarrollo

---

de diferentes estrategias gubernamentales que incluyen la suplementación de alimentos o la disponibilidad de diferentes fármacos obtenidos por vía sintética como los comprimidos de Fumarato ferroso o aquellos que se han obtenido a partir de subproductos de la industria alimentaria como el Trofin®, el NeoTrofin® o el NeoTrofin® C.<sup>3-4</sup> Además, en la zona oriental del país se están ejecutando varios proyectos internacionales para disminuir la prevalencia de la anemia en niños menores de 5 años.<sup>5</sup>

La rata recién destetada ha sido el modelo animal más empleado en estudios relacionados con el hierro (Fe). Para la obtención de anemia se utiliza el método de depleción de la Hb, por debajo de las cantidades fisiológicas propias de la especie, mediante una alimentación basada en una dieta deficiente en Fe.<sup>6</sup> El Centro Nacional de Biopreparados, (BioCen, Cuba), como productor de antianémicos de origen natural para el cuadro básico de medicamentos en el país, tiene entre sus objetivos investigativos para el desarrollo de estos medicamentos la obtención de un biomodelo experimental de anemia. En este sentido se evaluaron dos formulaciones diferentes de dietas purificadas con caseína como fuente de proteínas, en ratas Wistar, demostrándose que ambas formulaciones permitieron la obtención de anemia pero con una baja eficiencia en cuanto al número de animales que se anemizaron y al incremento del peso corporal.<sup>7</sup> Este trabajo tuvo el objetivo de continuar el desarrollo experimental de un modelo de ratas anémicas para su implementación en el país. En este sentido se evaluará una nueva formulación de dieta purificada para obtener ratas anémicas con vistas a incrementar la eficiencia del modelo.

## MÉTODOS

### Reactivos y soluciones

Las sales utilizadas en la preparación de la mezcla de minerales fueron suministradas por Applichem, Alemania. Solución patrón de Cianometahemoglobina (57.2 mg/100 mL), BDH Diagnostics. Los ingredientes de la dieta y las vitaminas que se utilizaron para preparar la mezcla fueron suministradas por MP Biomedicals, Estados Unidos.

### Elaboración y caracterización de dieta deficiente en Fe

Se elaboró manualmente 100g de dieta purificada de caseína como fuente de proteínas (tabla 1), la cual se almacenó en contenedores plásticos herméticos a una temperatura de  $8 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . A la muestra se le realizó la determinación del contenido de Fe total por Espectroscopia de Absorción Atómica, así como Análisis Químico Proximal (AQP) en base seca, utilizando las técnicas de la Association of Official Analytical Chemists (AOAC).<sup>8</sup>

### Animales y condiciones experimentales

Se utilizaron 40 ratas Sprague Dawley recién destetadas (21 a 25 días de nacidas), 20 machos y 20 hembras provenientes de la colonia del bioterio de la Facultad de Ciencias de la UNAM, México DF. El protocolo experimental ejecutado fue aprobado por el Comité de ética del bioterio de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

Se realizó el marcaje individual por perforación de las orejas. Se midió el peso corporal. Los animales fueron anestesiados en atmósfera de éter y se les realizó extracción de 50 $\mu\text{L}$  de sangre por el extremo de la cola para determinar la concentración inicial de Hb por el método de la Cianometahemoglobina.<sup>10</sup>

Los animales fueron alojados en condiciones convencionales y ciclos alternantes de luz/oscuridad de 12 horas.

**Tabla 1.** Composición de la dieta de caseína para la obtención de biomodelo de ratas anémicas

<b>Ingredientes</b>	<b>(g/Kg)</b>
Caseína de alto contenido de nitrógeno (95 % de proteína)	125
Sacarosa	500
Amidón de Maíz	150
Aceite de Maíz	60
Mezcla de Minerales <sup>1</sup>	40
Mezcla de Vitaminas <sup>1</sup>	15
Celulosa	50
Metionina	3
Cloruro de colina	2
Agua desionizada	55

<sup>1</sup> Las mezclas de minerales y vitaminas se prepararon según las recomendaciones de la AIN-93G.<sup>9</sup>

### Procedimiento experimental

Se alojaron en grupos de 3 del mismo sexo en cajas de acero inoxidable con piso de rejilla. Se les suministró agua desionizada y alimento *ad libitum* por un período de 8 semanas. Cada 2 semanas se midió el peso corporal. Al finalizar el período de tratamiento se realizó nuevamente la extracción de sangre por el extremo de la cola para determinar la concentración final de Hb. Se utilizó como criterio de aceptación de animales anémicos aquellos cuya Hb inicial había disminuido en al menos un 30 % del valor de Hb inicial promedio del grupo.

### Procesamiento de datos y análisis estadístico-matemático de los resultados:

El significado de los cambios ocurridos en los niveles de Hb y el peso corporal del animal en cada muestreo realizado respecto de los valores iniciales y respecto al muestreo anterior se evaluó mediante un ANOVA de una sola vía, mientras que las diferencias observadas en los diferentes tiempos de muestreos se realizó mediante el test de Duncan. Se utilizó el programa StatGraphics Centurion versión 15.0 (StatGraphics, Pensilvania, Estados Unidos) para el análisis estadístico. Se empleó un nivel del 5 % para denotar las diferencias observadas como significativas.

## RESULTADOS

El contenido de Fe en la dieta de caseína fue de 1, 25 mgFe/Kg<sup>-1</sup> y el resultado del AQP se muestra en la tabla 2.

**Tabla 2.** Resultados del A QP de la dieta de caseína

Determinaciones realizadas	%
Materia seca	92,53
Humedad	7,47
Proteína cruda (Nitrógeno *6,25)	12,58
Extracto etéreo (lípidos)	4,91
Cenizas	3,35
Fibra Cruda	4,38
Extracto libre de Nitrógeno (carbohidratos)	67,32

Se comprobó un aumento significativo del peso en ambos sexos durante todo el período experimental. En ambos sexos hubo un incremento similar en cada tiempo experimental, observándose una ligera superioridad en los machos a partir de la semana 4 (tabla 3).

Se observó una disminución significativa de la Hb en ambos sexos, más pronunciada para tiempos mayores de muestreo (tabla 4).

La eficiencia de la formulación de la dieta de caseína en cuanto a la cantidad de animales que se hicieron anémicos fue mayor en las hembras en todos los tiempos experimentales analizados (tabla 5).

**Tabla 3.** Comportamiento del peso de las ratas hembras y machos Sprague Dawley recién destetadas tratadas la dieta de caseína durante 8 semanas, en los tiempos experimentales, 0, 2, 4, 6 y 8 semanas

Sexo	Peso, g				
	t=0	t =2 semanas	t =4 semanas	t=6 semanas	t =8 semanas
Hembras	34,67 ± 4,39	62,51 ± 5,97*^	104,80 ± 5,29*^	128,89 ± 5,75*^	169,50 ± 5,80*^
Machos	40,60 ± 8,37	60,34 ± 8,98*^	107,63 ± 8,67*^	146,13 ± 8,54*^	178,33 ± 8,21*^

\* Diferencias significativas respecto de al momento de observación previo, para  $p < 0.05$ .

^ Diferencias significativas con respecto al inicio del experimento (t=0), para  $p < 0.05$ .

**Tabla 4.** Comportamiento de la Hb en ratas Sprague Dawley hembras y machos recién destetadas tratadas con la dieta de caseína durante 8 semanas, durante los tiempos experimentales 0, 4, 6 y 8 semanas

Sexo	Hb, g.L <sup>-1</sup>			
	t = 0	t = 4 semanas	t = 6semanas	t= 8 semanas
Hembras	118,9 ±13,0	105,9 ± 19,4*^	90,9 ± 19,3*^	84,5 ± 15,0*^
Machos	127,3 ±12,8	111,9 ± 18,3*^	94,5±17,0*^	87,3±13,5*^

\* Diferencias significativas respecto de al momento de observación previo, para  $p < 0.05$ .

^ Diferencias significativas con respecto al inicio del experimento (t=0), para  $p < 0.05$ .

**Tabla 5.** Cantidad de animales hembras y machos anémicos (Hb disminuyó en al menos un 30% del promedio inicial en cada grupo) obtenidos a las 4, 6 y 8 semanas de tratamiento.

Tiempos experimentales	Hembras (Hb ≤ 83.23 g.L <sup>-1</sup> )	Machos (Hb ≤ 89.11 g.L <sup>-1</sup> )
4 semanas	(n= 4) 20 %	(n=3) 15 %
6 semanas	n=10 (50 %)	n=8 (40 %)
8 semanas	n=15 (75 %)	n=12 (60 %)

## DISCUSIÓN

La experimentación animal ha contribuido a ampliar el conocimiento de muchos mecanismos biológicos antes desconocidos, siendo una de las herramientas que más ha ayudado no sólo al conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos de muchas enfermedades sino también al desarrollo de nuevos abordajes terapéuticos, convirtiendo a este tipo de modelos en uno de los ejes claves de la biomedicina en la actualidad. Aunque algunos de los modelos animales distan de ser modelos perfectos y las enfermedades que se mimetizan o los resultados obtenidos no son exactos a los que se obtienen en humanos, los estudios en modelos animales, como por ejemplo el ratón o rata, ofrecen la ventaja de un control del ambiente que los rodea, reduciéndose las variaciones a la mínima expresión.<sup>1</sup>

Debido al elevado número de personas deficientes de Fe y anémicas en el mundo, lo cual esta aparejado a la baja disponibilidad de alimentos, en las últimas décadas se ha incrementado considerablemente las investigaciones relacionados con el desarrollo de alimentos fortificados con diferentes fuentes de Fe y/o nuevas alternativas terapéuticas más eficaces que las que las que existen en la actualidad.<sup>2,5</sup> En ese sentido, disponer de un modelo animal que reproduzca la deficiencia de Fe y la anemia constituye una herramienta muy valiosa para el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas de la línea de antianémicos de origen natural que ha desarrollado el BioCen desde hace mas de 15 años.

La formulación desarrollada de dieta de caseína de 12,58 % de proteínas y 1, 25 mgFe/Kg<sup>-1</sup> se encontraba por debajo de los requerimientos de la especie que son de 15 % de proteínas y 35 mgFe/Kg.<sup>11</sup> Al comparar los resultados obtenidos en este estudio con los obtenidos en el 2010 por este mismo grupo de trabajo<sup>7</sup>, consideramos que estos resultados son favorables en cuanto al incremento de peso en los animales, ya que por ejemplo en las dos primeras semanas el incremento en este estudio fue de 27.84 g en las hembras y 19.74 cg en los machos (tabla 3), mientras que en ratas

machos Wistar con la formulación de caseína del 8% de proteínas fue de 9.50 g y en la de 5 % fue de 4.64 g. Los resultados favorables obtenidos en éste estudio se justifican por un incremento en la cantidad de proteína en la dieta y por la variación en las fuentes de carbohidratos que en lugar de almidón de maíz mayoritariamente, se utilizó 50% de sacarosa y un 15% de almidón de maíz, que contribuyeron a aumentar la palatabilidad de las dietas. El incremento de peso obtenido a las 6 semanas (105,53 g para los machos y 94,22 g para las hembras) es similar a lo reportado por Alférez y colaboradores, 2011 a los 40 días de depleción (2,6 g en 40 días corresponden a 104 g).<sup>6</sup>

La formulación de dieta de caseína evaluada en este trabajo tuvo como referencia la dieta reportada por Campo y colaboradores. 1996 que contenía 20 % de proteínas, 50 % de sacarosa y 15 % de almidón de maíz, con la cual obtenían anemia en 6 semanas.<sup>12</sup> La disminución del aporte de proteínas en éste estudio tuvo el objetivo de estimular la deficiencia de Fe y la anemia en un tiempo inferior a 6 semanas. Con ese objetivo se realizó el primer muestreo de sangre para determinar la concentración de Hb a las 4 semanas de tratamiento. Los resultados del bajo porcentaje de animales anémicos obtenidos a las 4 semanas (tabla 5) nos sugirió extender el período experimental hasta 8 semanas en total, realizando los muestreos de sangre cada 2 semanas.

El metabolismo del Fe se caracteriza por la conservación de Fe corporal, de manera que el obtenido por la desintegración de la hemoglobina se reutiliza continuamente para la eritropoyesis.<sup>13</sup> Al evaluar la eficacia de la formulación de caseína utilizada en términos del porcentaje de animales anémicos obtenidos, consideramos que el 75 % de animales hembras anémicas es aceptable teniendo en cuenta las características del metabolismo del mineral, así como la variabilidad del funcionamiento de los mecanismos homeostáticos del Fe que pueden presentarse en los animales. Según Duarte y colaboradores, 1999 en 45 días (aprox 6 ½ semanas), en 50 ratas Wistar machos ellos obtuvieron 27 animales anémicos (54 %), con una formulación de dieta de caseína que contenía 10 % de proteínas.<sup>14</sup> La utilización en éste estudio de la línea de ratas Sprague Dawley en lugar de Wistar fue sugerido por este mismo grupo de trabajo,<sup>7</sup> con el objetivo de aumentar el número de animales anémicos que fue de 55 % y 64 % en ratas machos Wistar. Este objetivo se cumplió solamente en las hembras, pero a cambio de extender el período experimental de 2 ó 4 semanas hasta 8.

La formulación de caseína utilizada en este estudio permitió obtener ratas anémicas en el sexo hembras con una eficiencia aceptable, en relación al porcentaje de animales anémicos y al incremento del peso corporal. Los resultados obtenidos nos sugieren que la obtención de anemia requiere un tiempo experimental de cómo mínimo 6 semanas de tratamiento lo cual coincide con lo reportado por Campos y colaboradores, 1996, Duarte y otros, 1999 y Alférez y otros, 2011.<sup>6, 12, 14</sup>

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cardozo CM, de Osorio AM, Yunta ER, Stepke FL, de Martinez CC. El animal como sujeto experimental. Aspectos técnicos y éticos. Vol I. ed CIEB. Chile: Universidad de Chile; 2007: 228.
2. McLean E, Egli I, Cogswell M, Benoissand B, Wojdyla D. Worldwide prevalence of anemia in preschool aged children, pregnant women and non-pregnant women of reproductive age. En: Nutritional anemia. Kraemer K, Zimmermann MB ed. Geneva: Sight and Life Press; 2007: 10-12.

3. Padrón M. Plan integral para la prevención y control de la anemia por deficiencia de hierro en Cuba 2009; [Citado 23 jul 2012] Disponible en: <http://www.inha.sld.cu/Documentos/plananemia.doc>
4. González R, Aznar E, González M, Hernández JC, Varela A, Silva P, et al. Nueva línea de productos para prevenir y tratar la anemia partiendo del hierro hemínico. *Informacéutico*. 2008; 15:43-8.
5. Selva NS y Ochoa AA. Acciones para la prevención y control de la anemia por deficiencia de hierro en niños de hasta 5 años. *Rev Cub Sal Pub* 2011; 37(3): 200-6.
6. Alférez MJ, Díaz JC, López IA, Rodríguez MF, Pérez LS, Campos MS. Development of nutritional iron deficiency in growing male rats: haematological parameters, iron bioavailability and oxidative defense. *Br J Nutr* 2011; 105: 517-25.
7. García Y, González R, Cárdenas R, Carmona A. Desarrollo de un biomodelo de ratas anémicas mediante dos dietas de caseína. *Rev. Cub. Aliment. Nutr.* 2010; 20(1): 1-11.
8. AOAC. Official methods of analysis analysis of the association Association of official Chemist. Official Chemists. 15th ed. Gaithersburg, MD: Association of Official Agricultural Chemists, 1990.
9. Reeves PG, Nielsen HF, Fahey GC. AIN-93G 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. American Institute of nutrition. *Nutrition*. 1993: 1939-50.
10. AOAC. Official methods of analysis of the association Association of official Chemist. Official Chemists. 14th ed. Gaithersburg, MD: Association of Official Agricultural Chemists, 1984.
11. Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition. Nutrient Requirements of laboratory rat. En: Nutrient Requirements of laboratory animals. Estados Unidos: Academy Press; 1995: 11-79.
12. Campos MS, Pallares DI, Moratalla A, Lopez-Aliaga I, Gomez-Ayala AE, Hartiti S, et al. Bioavailability of Fe, Ca, P and Mg in Fe-deficient rats treated with different sources of dietary iron. *Nutr Res*.1996; 16(4): 683-96.
13. Geissler C and Singh M. Iron, meat and health. *Nutrients*. 2011; 3: 283-316.
14. Duarte TR, Carvalho SM, Sgarbieri VC. Bovine Blood components: Fractionation, Composition, and Nutritive value. *J Agric Food Chem* 1999; 47(1): 231-6.

Recibido: 14 de marzo de 2012.

Aprobado: 18 de junio de 2012.

*MSc. Yenela García Hernández*. Laboratorio de Reconstituyentes. Centro Nacional de Biopreparados. Carretera Beltrán, km 1 ½, Bejucal, Mayabeque. Cuba.  
Correo electrónico: [yenela@biocen.cu](mailto:yenela@biocen.cu)