



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

MAESTRÍA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**Detección y evaluación de la actividad hematopoyética *in vitro* e
in vivo de *Urtica dioica* L. variedad *angustifolia* Wedd.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA

B. E. Sara Beatriz Herrera Solís

DIRECTOR DE TESIS
Dr. Rodolfo Velasco Lezama

ASESORES:
Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar
Dr. Ricardo Reyes Chilpa

COMITÉ TUTORAL

DIRECTOR

Dr. Rodolfo Velasco Lezama
Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud-Iztapalapa
Universidad Autónoma Metropolitana
velr@xanum.uam.mx

ASESOR

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar
Departamento de Ciencias de la Salud
División de Ciencias Biológicas y de la Salud-Iztapalapa
Universidad Autónoma Metropolitana
aaaf@xanum.uam.mx

ASESOR

Dr. Ricardo Reyes Chilpa
Departamento de Productos Naturales
Instituto de Química
Universidad Nacional Autónoma de México
chilpa@unam.mx

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Hematología Experimental del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, bajo la dirección del Dr. Rodolfo Velasco Lezama y la asesoría de Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar y de Dr. Ricardo Reyes Chilpa.

El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020.

Para la realización de los estudios de maestría la alumna Sara Beatriz Herrera Solís contó con el apoyo de beca CONACYT mediante el número de registro de la beca 235029/CVU:330957

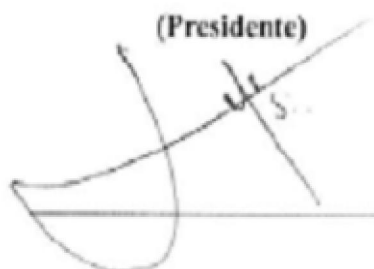
Miembros del Jurado

Los miembros del jurado fueron designados por la comisión de posgrado de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, los abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: “**Detección y evaluación de la actividad hematopoyética *in vitro* e *in vivo* de *Urtica dioica* L. variedad *angustifolia* Wedd**”. Con fecha 28 de Junio de 2013.

Dr. José Luis Flores Sáenz

Profesor Titular C
Dpto. Ciencias de la Salud. D.C.B.S.
Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa.
joseluis_7508@terra.com.mx

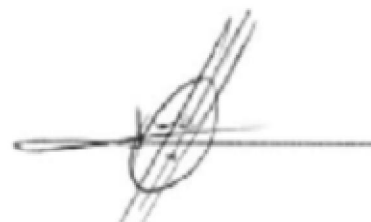
(Presidente)



Dr. Ricardo Reyes Chilpa

Investigador Titular A.
Depto. Productos Naturales.
Universidad Nacional Autónoma de México
chilpa@unam.mx

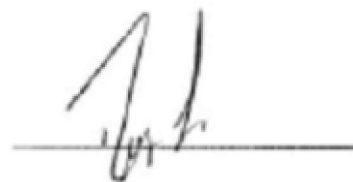
(Secretario)



Dra. Leonor Rodríguez Cruz

Profesor Titular C
Dpto. Ciencias de la Salud. D.C.B.S.
Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa.
leor@xanum.uam.mx

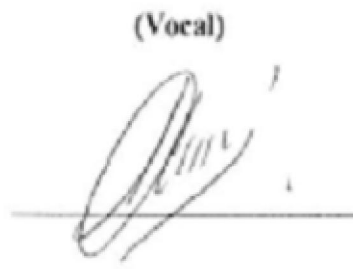
(Vocal)



Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar

Profesor Titular C
Dpto. Ciencias de la Salud. D.C.B.S.
Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa.
aaaf@xanum.uam.mx

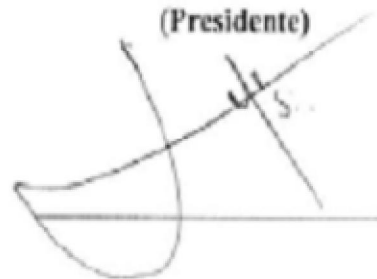
(Vocal)



Dr. José Luis Flores Sáenz

Profesor Titular C
Dpto. Ciencias de la Salud, D.C.B.S.
Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa.
joseluis_7508@terra.com.mx

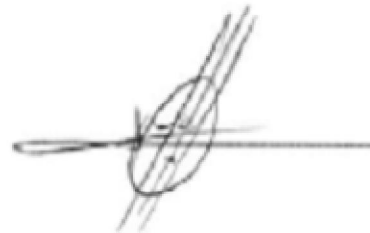
(Presidente)

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized 'J' followed by 'L.F.S.', written over a horizontal line.

Dr. Ricardo Reyes Chilpa

Investigador Titular A.
Depto. Productos Naturales.
Universidad Nacional Autónoma de México
chilpa@unam.mx

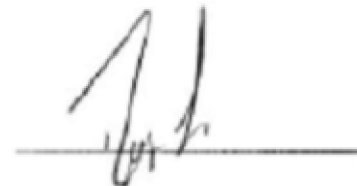
(Secretario)

A handwritten signature in black ink, featuring a large, stylized 'R' and 'C', written over a horizontal line.

Dra. Leonor Rodríguez Cruz

Profesor Titular C
Dpto. Ciencias de la Salud, D.C.B.S.
Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa.
leor@xanum.uam.mx

(Vocal)

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized 'L' and 'R', written over a horizontal line.

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar

Profesor Titular C
Dpto. Ciencias de la Salud, D.C.B.S.
Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa.
aaaf@xanum.uam.mx

(Vocal)

A handwritten signature in black ink, featuring a large, stylized 'F' and 'A', written over a horizontal line.

AGRADECIMIENTOS

A mi Padre Celestial

“Porque Jehová da la sabiduría y de su boca viene el conocimiento y la inteligencia”.
Proverbios 2:6

Porque sin ti mi Señor nada podría hacer, Tú has abierto este camino para mí y yo tengo un propósito en este lugar, porque así Tú lo has querido.
Gracias Dios mío y Rey mío.
El Único Dios Verdadero y a Jesucristo a quien has enviado. San Juan 17:3

A mis padres:

Oliva Solís Méndez
Sergio Herrera Campos

Por dar todo de sí para que yo tuviera una mejor oportunidad en la vida.
Gracias porque sé que todo lo que han podido hacer lo han hecho y lo seguirán haciendo, todo por amor a sus hijos.
Los amo.

A mi esposo:

Jesús Rafael Parrilla

Gracias mi amor, por estar conmigo en las buenas y en las malas, gracias porque siempre te has preocupado por mí de tal forma que has dado todo para que yo termine, gracias mi amor.
TE AMO

A mi Hija:

Sara Elizabeth Rafael Herrera

Gracias mi niña preciosa, sé que aún no lo entiendes pero el día que lo leas quiero que sepas que te amo y que a pesar de perder tiempo juntas siempre estuviste en mi corazón.

Especialmente quiero agradecer a mi Director de Tesis:

Dr. Rodolfo Velasco Lezama

Gracias por extender su mano y apoyarme en muchos aspectos de mi vida, verdaderamente le estimo porque siempre me ha brindado su apoyo de manera incondicional, no tengo con que pagarle todo lo que ha hecho por mí, pero sé de alguien Todopoderoso que tiene algo invaluable que darle: La Vida eterna, sólo crea. Lo estimo mucho profesor... Gracias

A mis queridas y muy apreciadas profesoras:

Rafaela Tapia Aguilar

Elisa Vega Ávila

Les agradezco todo su apoyo, su amistad, sus consejos y sus charlas.

Las quiero mucho.

A los miembros de mi Comité Tutoral y a los Sinodales:

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar

Dr. Ricardo Reyes Chilpa

Dr. José Luis Flores Sáenz

Dra. Leonor Rodríguez Cruz.

Les agradezco todo el apoyo, tiempo, confianza que me han brindado, gracias por formar parte de este día tan especial para mí.

La gratitud en silencio no sirve de mucho a nadie, por ello, aunque sepan que les estoy agradecida quería dejar constancia de ello, gracias por estar a mi lado.

DEDICATORIA

Esta tesis la dedico a mi nueva familia: mi amado esposo Jesús Rafael Parrilla y mí bebe Sara Elizabeth Rafael Herrera, quiero que sepan cuanto los amo y que le agradezco a mi Señor que me haya regalado el privilegio de tenerlos conmigo y disfrutar de su presencia, su apoyo, comprensión y amor.

A mi papichi y a mi mamichi porque se lo merecen. Los amo con todo mi corazón y valoró y agradezco a Dios el habérmelos dado como padres, gracias por que siempre han estado apoyándome en cada aspecto de mi vida.

A mis amados hermanos Jesús, Sergio, Laura y Tania porque quiero que sepan que siempre están en mis pensamientos junto con cada una de mis sobrinas. Los amo.

A la familia Rafael Parrilla, porque no podría hacerlos aún lado porque desde que los conozco me han apoyado y aconsejado. GRACIAS

RESUMEN

Introducción. La *anemia* es un síndrome que se manifiesta como disminución de hemoglobina y hematócrito por debajo del nivel establecido para la edad, sexo y estado fisiológico. La causa principal de anemia a nivel mundial es la deficiencia de hierro. En México una de las plantas utilizadas para tratar la anemia es *Urtica dioica* L. variedad *angustifolia* Wedd, conocida popularmente como Dominguilla, Ortiga y Chichicastle, recomendada particularmente en mujeres embarazadas con anemia por deficiencia de hierro.

Objetivo. Determinar la capacidad de la decocción de *Urtica dioica* L. variedad *angustifolia* Wedd, para restablecer la hematopoyesis *in vitro* e *in vivo*.

Desarrollo. Se preparó una decocción con 200 g del pulverizado de hojas a ebullición con 1.2 L de agua durante 15 minutos. El agua se eliminó por evaporación y del material seco se tomó una porción que se fraccionó en cadena con hexano, diclorometano y metanol. Con estas fracciones en concentraciones 1, 10 y 100 µg/mL se realizaron ensayos de actividad hematopoyética *in vitro* con células de bazo y de médula ósea de ratones hembra sanas y ratones hembra con anemia inducida experimentalmente. Para el estudio *in vivo* se estableció un esquema de inducción de anemia, con tres variantes de sangrado [I (0.2ml)], [II (0.35ml)] y [III (0.5 ml)], cinco veces, durante 15 días y una citometría hemática los días 0 y 15. El día 17 los ratones hembra se pusieron en cruce. Al día 19 de gestación las madres fueron sangradas, se les realizó citometría hemática, posteriormente se sacrificaron para la extracción de los fetos, se evaluó el número de éstos, talla, peso, así como número y grado de malformaciones morfológicamente visibles. Con la variante de sangrado tres se determinó el efecto hematopoyético de la decocción y su capacidad para evitar el desarrollo de malformaciones fetales. La decocción de la planta fue administrada durante la gestación a

sendos grupos de hembras anémicas preñadas ya sea como agua de uso (4 g/L) o por vía intragástrica (3 g/Kg).

Resultados. Únicamente la decocción de la planta estimuló significativamente la proliferación de células de bazo de ratón sano ($p < 0.05$). Ninguna de las fracciones tuvo efecto estimulante sobre la proliferación de células de médula ósea. Las variantes I, II y III causaron anemia y provocaron 2%, 11% y 12% de malformaciones fetales, respectivamente. Con la decocción administrada vía intragástrica no se observaron malformaciones fetales al igual que en los lotes testigos. Sin embargo, con la decocción como agua de uso la tasa de malformaciones fue del 6% del total de fetos, mientras que en el lote de ratones hembra anémicas no tratadas la tasa de malformaciones fue del 11%.

Conclusiones. La decocción de la planta no tiene efecto hematopoyético *in vitro* sobre las células de bazo y de médula ósea de ratón anémico y no contribuye a recuperar la hematopoyesis plenamente en ratones hembra preñadas anémicas. La administración de la decocción vía intragástrica evita el desarrollo de malformaciones de fetos de hembras anémicas, mientras que la decocción como agua de uso sólo lo disminuye.

Estos resultados confirman la relación entre anemia de la madre y malformaciones fetales y nuestro trabajo respalda el uso popular de la planta para evitar malformaciones en estas condiciones.

ABSTRACT

Introduction. Anemia is a syndrome manifested as decreased hemoglobin and hematocrit below the level established for age, sex and physiological state. The main cause of anemia worldwide is iron deficiency. In Mexico one plant used to treat anemia is *Urtica dioica* L. angustifolia variety Wedd, popularly known as Dominguilla, Ortiga and Chichicastle, particularly recommended for pregnant women with iron deficiency anemia.

Objective. To determine the ability of the decoction of *Urtica dioica* L. var. angustifolia Wedd, to restore hematopoiesis *in vitro* and *in vivo*.

Methods. A decoction was prepared with 200 g of powdered leaves boiled with 1.2 L of water during 15 minutes. The water was removed by evaporation, and a portion of the dry material was fractionated with hexane, dichloromethane and methanol. Concentrations of 1, 10 and 100 µg/mL of such materials were used for *in vitro* assays with hematopoietic activity on spleen and bone marrow cells from healthy and mice with experimentally induced anemia. For *in vivo* study a schedule for induction of anemia was established, by extraction of blood with three variants of [I (0.2ml)], [II (0.35ml)] y [III (0.5 ml)], five times, for 15 days. An hematic cytometry was performed on days 0 and 15. On day 17 mice were placed to match. At day 19 of gestation, females were bled for cytometric determinations and sacrificed to examine the fetuses, concerning the size, weight, number and degree of morphologically visible malformations. The bleeding variant III was employed to determine the hematopoietic effect of decoction and its ability to prevent the development of fetal malformations. The decoction of the plant was administered during gestation to two groups of anemic pregnant females either as drinking water (4 g / L) or by intragastric via (3g/kg).

Results. Only the decoction stimulated significantly the proliferation of spleen cells from healthy mice ($p < 0.05$). None of the fractions presented stimulatory effect on the proliferation of bone marrow cells. Variants I, II and III provoked anemia and 2, 11 and 12% of fetal malformations, respectively. No malformations were observed in fetuses from mice treated intragastrically with the decoction compared to the healthy control. However with the decoction as drinking water the rate of malformation was 6%, meanwhile 11% was observed in fetuses of the untreated group.

Conclusions. The decoction of the plant does not have hematopoietic effect in vitro on spleen and bone marrow cells from anemic mice. And does not contribute to recovery hematopoiesis in anemic pregnant female mice. The intragastric administration of the decoction prevents the development of fetal malformations whereas as drinking water only contribute to decrease malformations.

These results confirm the relationship between maternal anemia and fetal malformations and our work supports the popular use of the plant to prevent malformations under these conditions.

ÍNDICE

Lista de figuras	i
Lista de cuadros.....	iii
Abreviaturas.....	iv
Introducción	1
1. La sangre.....	2
1.1 Componentes de la sangre y médula ósea.....	2
1.2 Órganos hematopoyéticos y microambiente	3
1.3 Células tallo hematopoyéticas.....	4
1.4 Línea eritroide.....	7
1.5 Alteraciones en la eritropoyesis	8
2. Anemia.....	9
2.1 Definición.....	9
2.2 Prevalencia	11
2.3 Causas	12
2.4 Anemia por deficiencia de hierro (ADH)	13
2.4.1 Metabolismo del hierro.....	14
2.4.2 Signos y síntomas de deficiencia de hierro	18
2.4.3 Anemia por deficiencia de hierro durante el embarazo.....	18
2.4.4 Causas de anemia por deficiencia de hierro durante el embarazo.....	20
2.4.5 Consecuencias de anemia por deficiencia de hierro sobre el desarrollo fetal	21
2.4.6 Tratamientos de anemia por deficiencia de hierro durante el embarazo.....	23
3. Plantas medicinales.....	25

3.1 Plantas medicinales utilizadas en México para tratar la anemia	25
3.2 <i>Urtica dioica</i> L.	26
3.3 <i>Urtica dioica</i> L. variedad angustifolia Wedd	28
4. Planteamiento del problema	31
4.1 Justificación.....	31
4.2 Hipótesis.....	32
4.3 Objetivos	33
4.3.1 Objetivo general.....	33
4.3.2 Objetivos particulares	33
5. Material y métodos	34
5.1 Material	34
5.1.1 Productos biológicos y reactivos	34
5.1.2 Aparatos y equipo	34
5.1.3 Material biológico	35
5.2 Métodos.....	36
5.2.1 Preparación de la decocción de <i>Urtica dioica</i> L. variedad angustifolia Wedd.	36
5.2.2 Ensayos <i>in vitro</i>	36
5.2.3 Ensayos <i>in vivo</i>	39
5.2.3.1 Actividad hematopoyética.....	40
6. Resultados	41
6.1 Actividad hematopoyética <i>in vitro</i>	41
6.2. Inducción de anemia.....	45
6.2.1 Actividad hematopoyética <i>in vivo</i>	53

6.2.2 Efecto de la decocción de <i>Urtica dioica</i> L. var. <i>angustifolia</i> Wedd sobre el desarrollo de malformaciones de fetos provenientes de ratones hembra con anemia inducida por la Variante III.....	58
7. Discusión	64
8. Conclusiones	71
Bibliografía	72

LISTA DE FIGURAS

<i>Número</i>	<i>Página</i>
1. Hematopoyesis	5
2. Vías de diferenciación de la célula multipotencial restringida (CMR).....	6
3. Fases de la eritropoyesis y citocinas participantes en su regulación	7
4. Modelo de las posibles vías de absorción de Fe en los enterocitos intestinales	17
5. <i>Urtica dioica</i> L. variedad angustifolia Wedd	29
6. Efecto de los extractos de <i>Urtica dioica</i> L. var. angustifolia Wedd sobre la proliferación de células de bazo de ratones hembra CD ₁ sanas.....	41
7. Efecto de los extractos de <i>Urtica dioica</i> L. var. angustifolia Wedd sobre la proliferación de células de bazo de ratones hembra CD ₁ anémicas.....	42
8. Efecto de los extractos de <i>Urtica dioica</i> L. var. angustifolia Wedd sobre la proliferación de células de médula ósea de ratones hembra CD ₁ sanas.....	43
9. Efecto de los extractos de <i>Urtica dioica</i> L. var. angustifolia Wedd sobre la proliferación de células de médula ósea de ratones hembra CD ₁ anémicas	44
10. Concentración de eritrocitos de ratones hembra de acuerdo con la variante de inducción de anemia.	45
11. Concentración de hemoglobina en ratones hembra de acuerdo con la variante de inducción de anemia.....	46
12. Hematócrito en ratones hembra anémicas de acuerdo con la variante de inducción de anemia antes y después de la preñez.....	47
13. Talla de los fetos de acuerdo con la variante de inducción de anemia	49
14. Peso de los fetos de acuerdo con la variante de inducción de anemia.	50

15. Tasa de malformaciones fetales de acuerdo con la variante de inducción de anemia	51
16. Algunas malformaciones presentadas de acuerdo con la variante de inducción de anemia.....	52
17. Concentración de leucocitos en ratones hembra anémicas gestantes bajo diferentes tratamientos.....	54
18. Concentración de plaquetas en ratones hembra anémicas gestantes bajo diferentes tratamientos.....	55
19. Concentración de eritrocitos en ratones hembra anémicas gestantes bajo diferentes tratamientos.....	56
20. Concentración de hemoglobina en ratones hembra anémicas gestantes bajo diferentes tratamientos.....	57
21. Hematócrito en ratones hembra anémicas gestantes bajo diferentes tratamientos.....	58
22. Talla promedio de fetos de hembras con anemia inducida mediante la Variante III bajo diferentes tratamientos.....	60
23. Peso promedio de fetos de hembras con anemia inducida mediante la Variante III bajo diferentes tratamientos.....	61
24. Tasa de malformaciones de fetos de hembras con anemia inducida mediante la Variante III bajo diferentes tratamientos.....	62
25. Algunas malformaciones congénitas de los fetos de ratones hembra anémicas tratadas con la decocción de la planta administrada como agua de uso.....	62
26. Algunas malformaciones de los fetos de ratones hembra anémicas sin tratamiento	63

LISTA DE CUADROS

<i>Número</i>	<i>Página</i>
Cuadro I. Clasificación de la anemia de acuerdo al Volumen Corpuscular Medio del eritrocito (VCM)	10
Cuadro II. Principales agentes causales de malformaciones congénitas.	22
Cuadro III. Resumen del listado de malformaciones congénitas, deformaciones y aberraciones cromosómicas del XVII capítulo de la lista de códigos CIE-10 (Clasificación Internacional de Enfermedades).....	23
Cuadro IV. Plantas utilizadas en México para el tratamiento de la anemia	26
Cuadro V. Propiedades farmacológicas reportadas de <i>Urtica dioica</i> L.....	28
Cuadro VI. Distribución de los cultivos de células de bazo de ratones hembra sanas y ratones hembra anémicas por tratamiento	37
Cuadro VII. Distribución de los cultivos de células de médula ósea de ratones hembra sanas y ratones hembra anémicas por tratamiento	37
Cuadro VIII. Distribución de ratones hembra anémicas de acuerdo con el tratamiento	40
Cuadro IX. Distribución de ratones hembra sanas de acuerdo con el tratamiento...	40
Cuadro X. Número de fetos por hembra de acuerdo con la variante de inducción de anemia	48
Cuadro XI. Número de fetos por hembra de acuerdo con el tratamiento.....	59

ABREVIATURAS

ADH: Anemia por Deficiencia de Hierro

ADN: Ácido desoxirribonucleico

CFB-Meg: Células Formadoras de Brotes Megacariocíticos

CFC-Eo: Células Formadoras de Colonias de Eosinófilos

CFC-GM: Células Formadoras de Colonias de Granulocitos y Macrófagos

CFC-Meg: Células Formadoras de Colonias de Megacariocitos

CFC-B: Células Formadoras de Colonias de Linfocitos B

CFC-T: Células Formadoras de Colonias de Linfocitos T

CIE-10: Clasificación Internacional de Enfermedades, X revisión

CMR: Célula Multipotencial Restringida

CPH: Célula Progenitora Hematopoyética

CTH: Célula Tronco Hematopoyética

Dcytb: Citocromo b duodenal

DMT-1: Molécula transportadora de metales divalentes

DH: Deficiencia de Hierro

DMSO: Dimetilsulfóxido

EB: Eritroblastos

EB: Eritroblastos basofílicos

EO: Eritroblastos Ortocromáticos

EPC: Eritroblastos Policromatófilicos

EPO: Eritropoyetina

FLVCR: Feline leukemia virus subgroup C celular receptor

FPN 1: Ferroportina 1

FSC-GM: Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos

FSC-M: Factor Estimulante de Colonias de Macrófagos

Hb: Hemoglobina

HCP1: Proteína hemo-transportadora 1

Heph: Hefestina

HO-1: Hemo-oxigenasa 1

HO-2: Hemo-oxigenasa 2

IL-2: Interleucina 2

IL-3: Interleucina 3

IL-6: Interleucina 6

IL-7: Interleucina 7

IL-12: Interleucina 12

INEGI: Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática

Meg-I: Megacariocitos Inmaduros

Meg-M: Megacariocitos Maduros

OMS: Organización Mundial de la Salud

PE: Proeritroblastos

PEM: Progenitor Eritroide-Megacariocítico

RET: Reticulocitos

TPO: Trombopoyetina

UFB-E: Unidades Formadoras de Brotes de Eritrocitos

UFC-E: Unidades Formadoras de Colonias de Eritrocitos

UFC-GEMM: Unidad Formadora de Colonias de Granulocitos-Monocitos,
Eritrocitos y Megacariocitos (Célula Multipotencial Restringida)

UNICEF: United Nations International Children's Emergency Fund

VCM: Volumen Corpuscular Medio

WHO: World Health Organization

INTRODUCCIÓN

La *hematopoyesis* es un proceso dinámico de división, diferenciación, proliferación y maduración de la célula madre pluripotencial, cuya progenie es capaz de seguir varias líneas de diferenciación hasta dar origen a las células sanguíneas y plaquetas; este proceso ocurre en la médula ósea durante la vida del individuo a causa del ciclo vital relativamente corto de las células sanguíneas maduras y a la necesidad de autorrenovación, para mantener una concentración constante en la sangre.

Las células hematopoyéticas de la médula ósea se ubican en tres grandes compartimentos o pozas celulares: a) pluripotencial, b) comisionadas y c) terminal; a) constituidas por *células pluripotenciales* como el nombre lo indica, b) *células comprometidas* con una o más líneas celulares y c) *células en vías de maduración* que serán liberadas al torrente sanguíneo en cuanto desarrollen las características morfológicas y funcionales distintivas, sin potencial proliferativo, excepto linfocitos y monocitos. Este sistema de compartimentos celulares puede ser alterado en cualquiera de sus niveles, lo que podría ocasionar efectos tales como: aumento en la producción celular, hiperplasia (leucemia) o disminución, hipoplasia (anemia) (Mckenzie, 2000). La *anemia* es un síndrome que se manifiesta como disminución de hemoglobina y hematócrito por debajo del nivel establecido para la edad, sexo y estado fisiológico del individuo. La causa principal de anemia a nivel mundial es la deficiencia de hierro, padecimiento que afecta principalmente a mujeres embarazadas y niños en edad preescolar (WHO, 2008). Los tratamientos clínicos para esta deficiencia son suplementos alimenticios con hierro que pueden provocar efectos secundarios. Una alternativa para ésta y otras alteraciones, es el uso de plantas recomendadas en

la medicina tradicional, lo que recientemente ha sido alentado por la Organización Mundial de la Salud (Falade y col., 2005).

1. LA SANGRE

1.1 Componentes de la sangre y médula ósea

La sangre es una suspensión de células en un líquido llamado plasma que circula por el sistema vascular a través de vasos sanguíneos de diverso calibre. En los tejidos, el sistema vascular se ramifica y disminuye progresivamente su calibre hasta constituir la llamada microcirculación, formada principalmente por capilares y vasos de pequeño calibre. Las paredes de los capilares permiten el intercambio de agua y de sustancias diversas entre el interior del sistema vascular y tejidos circundantes, facilitando la oxigenación y el metabolismo celular. El plasma, que constituye aproximadamente 50% del volumen total de la sangre, está formado por 90% de agua, en la que se hallan disueltas diversas sustancias nutritivas, de recambio metabólico o de desecho celular. Entre ellas destacan principalmente proteínas, electrólitos, gases y derivados del catabolismo celular. El 50% restante del volumen sanguíneo está constituido por células que, al igual que los componentes plasmáticos, se hallan sometidas a un continuo proceso de renovación, llamado hematopoyesis (Lluis y Lluis, 1997; Greer y col., 2009).

Las células sanguíneas y las plaquetas desempeñan diferentes funciones de vital importancia para el organismo. Por ejemplo, los neutrófilos y monocitos intervienen en la defensa inespecífica contra agentes infecciosos, fagocitando microorganismos y células que han sido infectadas. Los linfocitos llevan a cabo funciones especializadas en la respuesta

inmunológica, produciendo y secretando anticuerpos (linfocitos B) y proteínas denominadas citocinas (linfocitos T), las cuales regulan la producción y la actividad de los distintos tipos de células sanguíneas. Los eritrocitos o glóbulos rojos intervienen en el intercambio de gases, transportando oxígeno desde los pulmones hacia todos los tejidos del cuerpo, así como bióxido de carbono en sentido inverso. Las plaquetas forman parte de los mecanismos de coagulación. Alteraciones en la producción o en el funcionamiento de cualquiera de estos tipos celulares pueden conducir a estados patológicos severos e incluso la muerte (Marshall y col. 2010; Lluís y Lluís, 1997).

Las células de la sangre tienen períodos de vida relativamente cortos, que varían de horas (granulocitos) hasta 9 y 120 días en el caso de plaquetas y eritrocitos, respectivamente. Diariamente son reemplazados en la circulación gran número de estos elementos que han completado su período de vida en el torrente sanguíneo, mediante mecanismos homeostáticos complejos que, además de responder a demandas basales, también lo hacen para casos emergentes, estimulando la producción de nuevas células a partir de la célula madre hematopoyética de la médula ósea (Torok-Strob, 1988).

1.2 Órganos hematopoyéticos y microambiente

La hematopoyesis se inicia durante las primeras semanas del desarrollo prenatal, siendo el saco vitelino el primer órgano hematopoyético. A partir del tercer mes de desarrollo, la mayor parte de la actividad hematopoyética ocurre en el hígado fetal, el cual lleva a cabo esta función hasta el séptimo mes de la etapa prenatal. Durante este período el bazo también actúa como órgano hematopoyético. Desde el sexto mes de desarrollo y durante toda la etapa postnatal, hasta

la muerte del individuo, la médula ósea es el principal órgano hematopoyético (Wintrobe, 1981; Rifkind y col., 1988; Greer y col., 2009).

En cada uno de los órganos hematopoyéticos las células sanguíneas se desarrollan dentro de un ambiente específico constituido por distintos tipos de células y proteínas extracelulares, denominado microambiente hematopoyético. En la médula ósea, este microambiente está constituido por el estroma, que a su vez está integrado por fibroblastos, macrófagos, células endoteliales, osteoblastos y adipocitos que producen y secretan diversos tipos de proteínas que desempeñan papeles fundamentales en la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas. Además, las células del estroma secretan proteínas que constituyen la matriz extracelular, como la colágena, la fibronectina, la laminina y los proteoglicanos. Por otra parte, estas células producen proteínas denominadas citocinas, las cuales regulan la fisiología de las células sanguíneas y de sus precursores. De esta manera el microambiente hematopoyético es cooperativo en conjunto y proporciona las condiciones necesarias para que la hematopoyesis se lleve a cabo de manera controlada (Cáceres y col., 1999).

1.3 Células tallo hematopoyéticas

La célula hematopoyética más primitiva es la Célula Tronco Hematopoyética o Célula Progenitora Hematopoyética (CTH o CPH) de origen mesodérmico, aunque con menor potencialidad que una célula mesodérmica, pues ya no puede diferenciarse hacia otras células del tejido conectivo, pero sigue siendo pluripotencial, ya que puede comprometerse hasta dar origen a las líneas hematopoyéticas: eritroide, granulocítica, monocítica, megacariocítica y linfoide (Figura 1). Las células tronco hematopoyéticas pueden presentar divisiones de

autorrenovación para perpetuar su especie, o bien, división y diferenciación para dar origen a células progenitoras con menor potencial de desarrollo, conocidas como comprometidas o comisionadas, que a su vez poseen capacidad de diferenciación y multiplicación. Como su nombre lo indica, están comprometidas con una o varias estirpes celulares, constituyendo así los precursores linfoides y mieloides. La célula mieloide, conocida como multipotencial restringida, es la precursora de eritrocitos, granulocitos, monocitos y megacariocitos. En tanto que la célula precursora linfóide migra de la médula ósea hacia órganos linfoides secundarios para dar origen a linfocitos T y B (Civin y Gore, 1993).

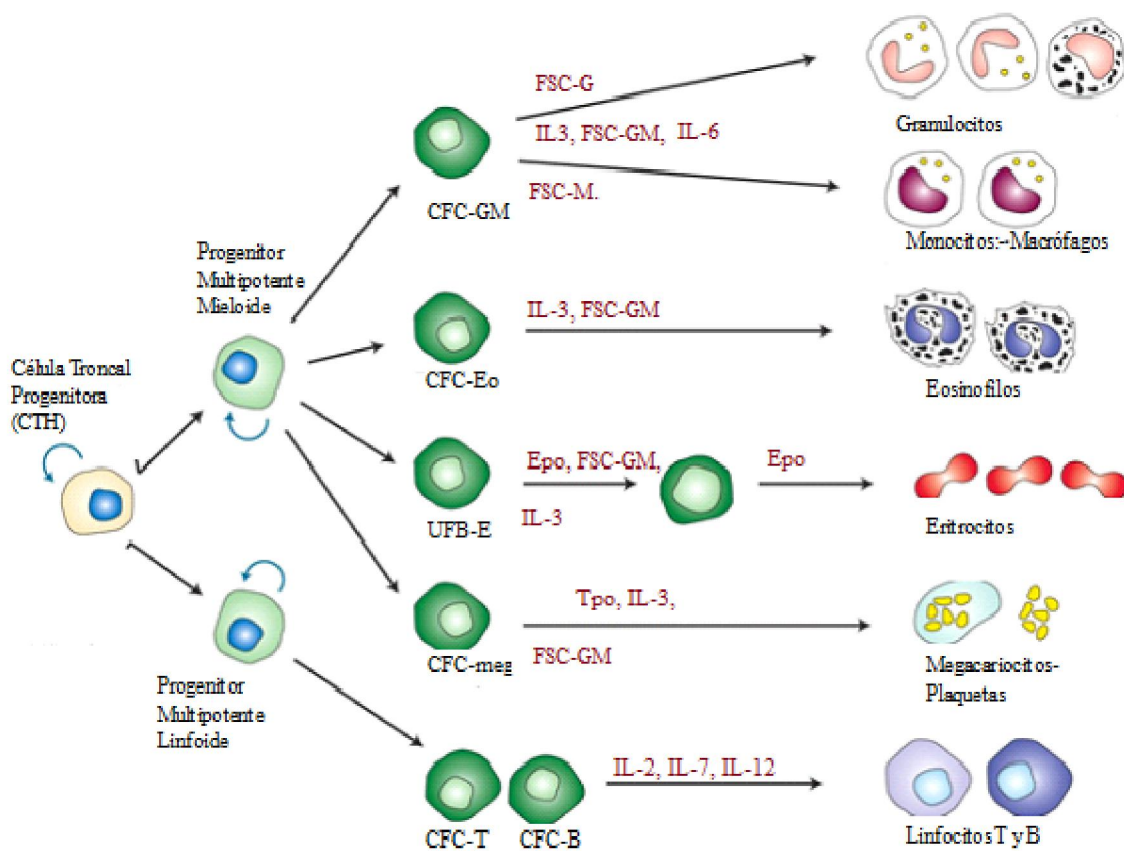


Figura 1. Hematopoyesis. La Célula Troncal Hematopoyética (CTH) puede comprometerse hacia los Progenitores Multipotentes: Mieloide y Linfóide, los cuales son capaces de generar precursores restringidos y dar origen a las células sanguíneas maduras circulantes.

El conocimiento actual de dichas células y sus procesos, así como los factores que intervienen en su formación, fueron conocidos a detalle gracias a los sistemas de cultivo *in vitro*. La primera célula progenitora no identificable morfológicamente, pero que se conoce su existencia porque da origen a granulocitos, eritroblastos, monocitos y megacariocitos, es llamada Unidad Formadora de Colonias de Granulocitos-Monocitos, Eritrocitos y Megacariocitos (UFC-GEMM) o célula multipotencial restringida (Figura 2). Los descendientes de esta célula pueden ser precursores unipotenciales o bipotenciales. Así, la primera célula precursora perteneciente a la línea eritroide es la Unidad Formadora de Colonias de Células en Brote o Estallido (UFB-EMeg) y sus descendientes son las Unidades Formadoras de Colonias de Eritrocitos (UFC-E), que *in vivo* son el equivalente al proeritroblasto, el cual mediante divisiones celulares y diferenciación originará finalmente los eritrocitos circulantes (Theml y col., 2004).

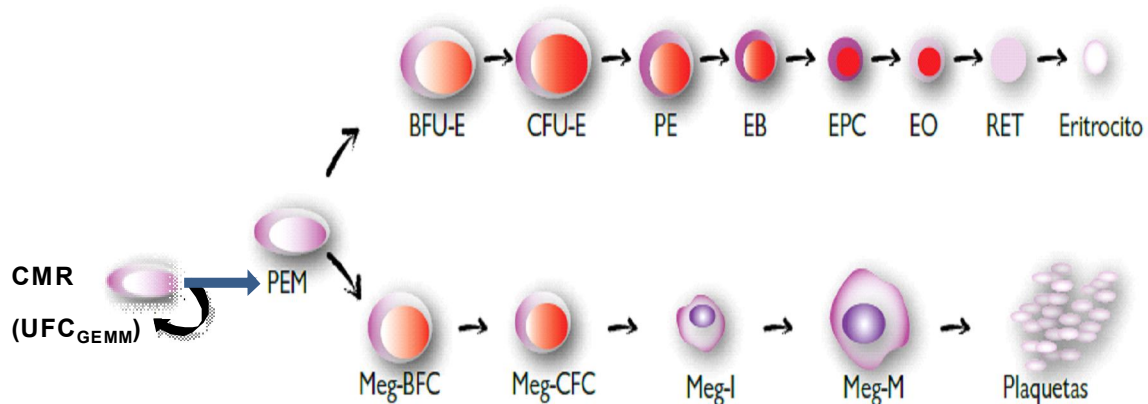


Figura 2. Vías de diferenciación de la célula multipotencial restringida (CMR). La Unidad Formadora de Colonias de Granulocitos-Monocitos, Eritrocitos y Megacariocitos (UFC_{GEMM}) da origen al progenitor eritroide-megacariocítico (PEM), el cual da lugar a Unidades Formadoras de Brote Eritroide (UFB-E), que a su vez originan Unidades Formadoras de Colonias Eritroides (UFC-E), para posteriormente dar lugar a proeritroblastos (PE), eritroblastos basofílicos (EB), eritroblastos policromatófilicos (EPC), eritroblastos ortocromáticos (EO), reticulocitos (RET) y células eritroides maduras. El progenitor eritroide-megacariocítico también puede dar lugar a Células Formadoras de Brotes Megacariocíticos (CFB-Meg), los cuales a su vez generan Células Formadoras de Colonias Megacariocíticas (CFC-Meg), que posteriormente generarán megacariocitos inmaduros (Meg-I) y maduros (Meg-M), que finalmente liberarán a las plaquetas.

1.4 Línea eritroide

Los eritrocitos (glóbulos rojos) son las células más abundantes en la sangre y constituyen aproximadamente el 50% del volumen sanguíneo; su diferenciación los ha llevado a carecer de núcleo, la hemoglobina es una molécula que ocupa la totalidad del citoplasma celular. La función de los eritrocitos es el transporte de oxígeno a los tejidos y el dióxido de carbono de los tejidos a los pulmones (Lluis y Lluis, 1997). En su formación (eritropoyesis) participan diferentes citocinas y factores estimulantes, principalmente la eritropoyetina, que mantiene la producción de eritrocitos maduros circulantes en respuesta a hipoxia tisular. Su producción inicia a nivel de la célula tallo multipotencial restringida que se compromete y diferencia hacia esta línea (Figura 2). En la diferenciación, los progenitores eritroides más inmaduros, las Unidades Formadoras de Células en Brotes Eritroides (UFB-E), experimentan una serie de modificaciones en las que van disminuyendo de tamaño y pierden el núcleo, para dar lugar a eritrocitos maduros (Figura 3) (Tsiftoglou y col., 2009).

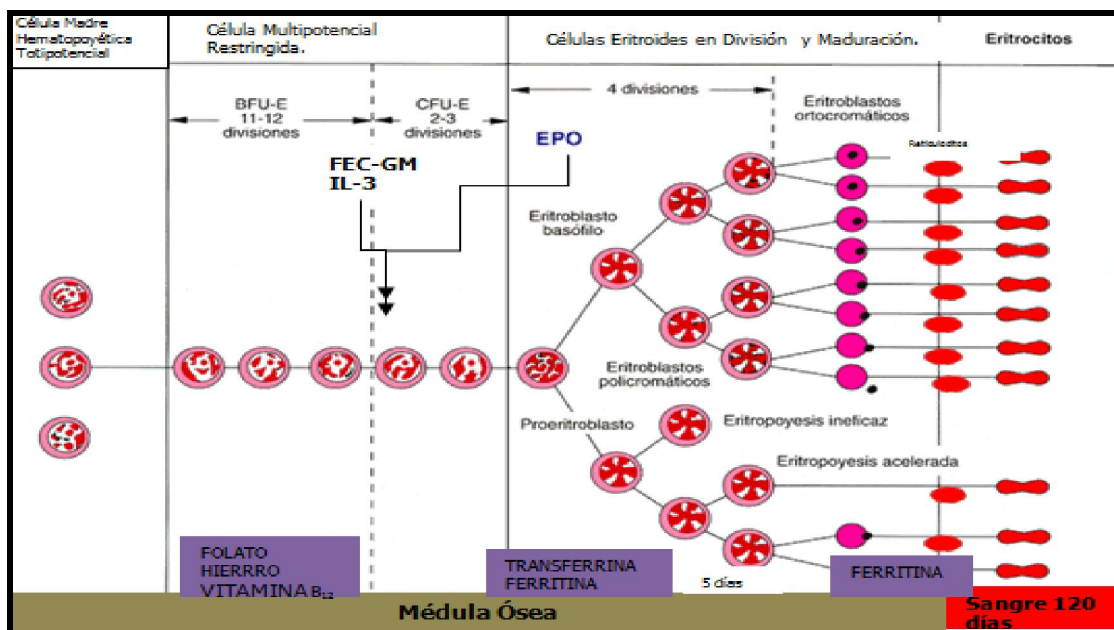


Figura 3. Fases de la eritropoyesis y citocinas participantes en su regulación.

La producción de los eritrocitos puede desviarse de la normalidad por exceso, como en la policitemia, o por disminución, como sucede en la anemia.

En sangre, la concentración de eritrocitos disminuye debido a:

- Falta de producción o producción deficiente de eritrocitos (alteraciones en la médula ósea)
- Destrucción acelerada por alteraciones morfológicas o bioquímicas de los eritrocitos (hemolisis) o por desequilibrio entre producción de nuevos elementos y eliminación de elementos viejos.
- Pérdida de sangre (hemorragias internas o externas)

1.5 Alteraciones en la eritropoyesis

Las manifestaciones morfológicas de los eritrocitos en la alteración de la eritropoyesis se agrupan en tres categorías:

- Alteraciones en el tamaño
- Alteraciones en la forma
- Alteraciones en el contenido citoplasmático de hemoglobina

Alteraciones en el tamaño o anisocitosis:

- Macrocitosis oval o redonda (aumento del tamaño)
- Microcitosis (disminución del tamaño)

Alteraciones de la forma o poiquilocitosis:

- Ovalocitos (ovalados y de tamaño normal)

- Eliptocitos (ovales y muy alargados)
- Drepanocitos (alargados, terminados en punta y doblados en forma de hoz)
- Esquistocitos (eritrocitos pequeños y fragmentados)
- Microesferocitos (pequeños, redondos y sin halo central)

Alteraciones en el contenido citoplasmático de hemoglobina (normocromía):

- Hipocromía
- Hiperchromía

Finalmente, estas alteraciones en la serie roja se relacionan con el bajo contenido de hemoglobina, que se manifiesta como transporte deficiente de oxígeno hacia los tejidos lo que origina hipoxia asociada con anemia.

2. ANEMIA

2.1 Definición

La anemia es definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como disminución en la concentración de hemoglobina (Hb) y del paquete celular de eritrocitos (hematócrito), que se encuentran por debajo del límite establecido como normal para la edad, sexo y estado fisiológico del individuo, aunque la cuenta de hematíes pueda ser normal en la sangre (WHO, 2001; Baiocchi, 2006; Bashiri y col., 2003).

Existen diferentes tipos de anemias y son clasificadas de acuerdo con:

- Su origen
- Morfología de los hematíes

- Causa de pérdidas hemáticas

En cuanto a su origen, las anemias se dividen en hiperregenerativas (periféricas) e hipo o arregenerativas (centrales). Se entiende por anemia hiperregenerativa la que se da en un paciente cuya médula ósea trata de compensar, mediante un aumento de su actividad, la disminución eritrocitaria que se produce en la periferia (generalmente por pérdidas hemorrágicas o hemólisis). Las anemias arregenerativas o centrales son las que se originan precisamente por falla en la producción de los hematíes (Lindenbaum, 1992; Hernández y Hernández, 1992).

De acuerdo con las variaciones de forma y tamaño de los eritrocitos (Harmening, 1992), determinadas por el valor analítico llamado Volumen Corpuscular Medio (VCM) las anemias se dividen en: microcíticas, normocíticas y macrocíticas (Cuadro I).

Cuadro I. Clasificación de la anemia con base en el Volumen Corpuscular Medio del eritrocito (VCM).

Clasificación de acuerdo al VCM	Asociada con:
Anemia microcítica (VCM <80 fl)	Anemia por deficiencia de hierro Hemoglobinopatías: Talasemia menor Anemia sideroblástica
Anemia normocítica (VCM 80-100 fl)	Anemias hemolíticas Aplasia medular Invasión medular
Anemia macrocítica (VCM >100 fl)	1) ORIGEN HEMATOLÓGICO Anemia megaloblástica Anemia aplásica. 2) ORIGEN NO HEMATOLÓGICO Hepatopatía crónica Hipotiroidismo, hipoxia

Las anemias también se clasifican de acuerdo con la causa que origina la pérdida de hematíes:

- **Congénitas.** La más frecuente es la esferocitosis hereditaria, que es una anemia crónica de herencia autosómica dominante con una morfología eritrocítica esférica, en la cual hay una hemólisis extravascular.
- **Adquiridas.** Son anemias hemolíticas de mecanismo autoinmune, presencia de anticuerpos sobre la membrana del eritrocito, que son los responsables de su destrucción prematura.
- **Otro tipo.** Anemia hemolítica isoimmune en la que el anticuerpo de un individuo reacciona contra los glóbulos rojos de otro individuo, como la incompatibilidad del grupo ABO y la enfermedad de Rhesus en el recién nacido.

Como observamos, la anemia es un estado patológico que puede manifestarse de manera diversa, por lo que es reconocido actualmente como un problema de salud pública generalizado, que tiene consecuencias de gran alcance no sólo para la salud humana sino también para el desarrollo social y económico.

2.2 Prevalencia

La anemia es un síndrome que se presenta tanto en la población de países desarrollados como en desarrollo. De acuerdo con la OMS en el 2001, se calculó que en el mundo había aproximadamente un total de 2,000 millones de personas anémicas (aproximadamente 30% de la población mundial) y que cerca del 50% de los casos se atribuían a la carencia de hierro (WHO, 2001). Existe también información documentada sobre los efectos de la anemia en la salud de

las mujeres embarazadas, entre ellos el incremento de riesgo de muerte materna y del niño. Además, consecuencias negativas en el desarrollo cognitivo y físico de los niños y en la productividad laboral de los adultos. (Stoltzfus, 2001).

En México, los resultados de la Encuesta Nacional de Nutrición 1999 (Rivera y col., 2001) mostraron una prevalencia de anemia del 27.7 % en el total de mujeres embarazadas de áreas urbanas. El valor más elevado, 32.3 %, correspondió a mujeres de la región norte del país (Shamah y cols., 2003). En el 2006, la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006 (INEGI, 2005) reportó una prevalencia de anemia en embarazadas mexicanas de 20.6 % y el valor más alto 42.4%, en embarazadas de 15 años de edad.

A pesar de que la anemia ha sido reconocida como un problema de salud pública, se ha reportado poco progreso y su prevalencia mundial sigue siendo elevada. Por ello, la OMS y la UNICEF recalcan la necesidad urgente de combatir la anemia y ponen de relieve la importancia de reconocer su origen multifactorial para que se elaboren programas eficaces de control.

2.3 Causas

Son tres los principales factores etiológicos de la anemia: deficiencia de micronutrientes hematopoyéticos (principalmente de hierro), disfunciones de la médula ósea y pérdida excesiva de hematíes, como ocurre en las hemorragias y en las hemólisis (Dallman, 1991).

A pesar de que la deficiencia de hierro es una de las causas principales de anemia, rara vez se presenta como causa única, ya que generalmente va precedida o se presenta conjuntamente con infecciones parasitarias (como la malaria); otras deficiencias nutricionales

(incluidas las vitaminas A y del complejo B, ácido fólico, cobre), pérdida de sangre y hemoglobinopatías (WHO, 2008; Osorio y col., 1986).

2.4 Anemia por deficiencia de hierro (ADH)

Existen múltiples factores etiológicos involucrados en la ADH, entre los cuales destacan: suministro inadecuado de hierro, absorción deficiente del mismo, pérdidas hemáticas, requerimientos elevados de hierro durante la adolescencia, embarazo y lactancia. La ADH es el resultado final de un proceso progresivo de empobrecimiento de los depósitos de hierro en el organismo, provocando que la cantidad disponible de este elemento sea insuficiente para satisfacer las necesidades individuales (Dallman y Reeves, 1984; Martins y col., 1987; Pingnon y Rochant, 1993; Martins y col., 1999; Freire, 1998).

Este empobrecimiento se inicia con las reservas de hierro en macrófagos de hígado, bazo y médula ósea, y una vez que han disminuido, el contenido de hierro plasmático se reduce y el aporte de este metal a la médula ósea es insuficiente para la generación normal de hemoglobina; por ello, la protoporfirina (precursor de la hemoglobina eritrocitaria) libre aumenta, se producen eritrocitos microcíticos, los valores de hemoglobina disminuyen y eventualmente se observan cifras anormales de eritrocitos en sangre (Ruiz, 1998). Por tanto, la función de la hemoglobina y la mioglobina en el transporte de oxígeno está alterada y en consecuencia, también el metabolismo celular y las funciones tisulares, debido a que hay una baja disponibilidad de hierro para enzimas hierro-dependientes, como las oxigenasas y nitrogenasas y disminución de los citocromos que interfieren en el transporte de electrones (Oliveira, 1990; Lynch y col., 1993).

Además de las manifestaciones propias de la anemia, se han descrito otras manifestaciones no hematológicas de la deficiencia de hierro, tales como: disminución de la capacidad de trabajo físico y de la actividad motora espontánea, alteraciones de la inmunidad celular y de la capacidad bactericida de los neutrófilos, disminución de la termogénesis, alteraciones funcionales e histológicas del tubo digestivo, falla en la movilización de la vitamina A hepática, mayor riesgo de parto prematuro, bajo peso de nacimiento y de morbilidad perinatal, menor transferencia de hierro al feto, disminución de la velocidad de crecimiento, alteraciones conductuales y del desarrollo mental y motor, velocidad de conducción más lenta de los sistemas sensoriales auditivo y visual y reducción del tono vagal (Olivares y Walter, 2003).

2.4.1 Metabolismo del hierro

La mayor parte del hierro en el cuerpo humano se encuentra en la hemoglobina de los eritrocitos (65-75 %; 2300 mg). Aproximadamente 10% está presente en la mioglobina de las fibras musculares y en otros tejidos (enzimas y citocromos; 350 mg). El hierro restante se almacena en el hígado (200 mg en forma de ferritina), en macrófagos del sistema fagocítico-mononuclear (500 mg) y en la médula ósea (150 mg). Siendo necesarios en condiciones fisiológicas 25 mg de hierro por día, utilizados por los eritrocitos inmaduros en la médula ósea para la biosíntesis del grupo hemo (Andrews, 2000; Muñoz y col., 2009).

Para compensar las pérdidas diarias de hierro debido a la descamación de las células epiteliales, pérdida de sangre, menstruación y sudor (Andrews, 2000), los adultos normalmente absorben aproximadamente de 1 a 2 mg de hierro por día en la dieta. Varios pasos están

involucrados en la absorción del hierro, incluyendo la reducción del hierro a su estado ferroso, la captación apical, almacenamiento intracelular o tráfico transcelular y liberación basolateral.

Habitualmente, la dieta contiene dos fuentes de hierro: el hierro hemínico (10%), que deriva principalmente de la hemoglobina y por tanto se encuentra en tejidos animales: carnes y pescados (hierro ferroso, Fe^{2+} ; protoporfirina IX) y el hierro no hemínico (90%) que se encuentra en vegetales (hierro férrico, Fe^{3+}), productos lácteos y huevo (Zhang y Enns, 2008; Muñoz y col., 2009).

Absorción de Hierro no hemínico. En los últimos años se han realizado avances significativos en el conocimiento de las proteínas que intervienen en la absorción intestinal del hierro y en los posibles mecanismos que la regulan. Se especula que las diferentes formas de hierro inorgánico, Fe^{3+} y Fe^{2+} , pueden seguir diferentes vías al igual que el hierro-hemo (Figura 4). La mayoría del hierro dietético se encuentra en forma férrica y es extraído de los alimentos por medio del pH ácido del estómago, pasando a ser quelado por mucina, lo que le permite mantenerse soluble en un medio menos ácido, como es el duodeno. El hierro en forma férrica es reducido a ferroso para su absorción por medio de la enzima reductasa férrica (citocromo b duodenal o Dcytb) que se encuentra en la membrana apical del enterocito, permitiendo así el transporte del mismo hacia el interior del enterocito por la acción de la molécula transportadora de metales divalentes (DMT-1), situada en la microvellosidad de la membrana. En el citoplasma este átomo de hierro es probablemente transferido a proteínas de bajo peso molecular (mobilferrina) ligadas a ATP (West y Oates, 2008); puede quedar unido a éstas, ser transferido a ferritina o en la porción basolateral de estas células, al “exportador duodenal de hierro”, identificado como ferroportina 1 (FPN 1). El transporte del átomo de hierro desde el exportador

duodenal donde se encuentra en forma Fe^{2+} , a través de la membrana, a la transferrina donde se encuentra en forma Fe^{3+} no está clarificado, debiendo existir un mecanismo de oxidación, en el que participa una molécula similar a la ceruloplasmina y que se denomina hefestina (Heph).

Absorción de Hierro hemínico. La absorción intestinal del hierro hemínico no compite con la del hierro no hemínico, ya que se absorbe por diferentes vías. La absorción intestinal de hierro hemínico involucra tres pasos:

1. Captación apical de la molécula hemo desde el lumen, probablemente por acción de la proteína hemo-transportadora 1 (HCP1).

2. Catabolismo del hemo dentro de vesículas por acción de hemo-oxigenasas HO^{-1} y HO^{-2} y su liberación en forma no hemínica, generando biliverdina

3. Salida del hierro hacia la circulación. Por otro lado, existen evidencias de que parte del hemo que entra al enterocito sale intacto por la membrana basolateral del mismo, a través del transportador del receptor del virus de la leucemia felina (feline leukemia virus subgroup C celular receptor, FLVCR) (West y Oates, 2008).

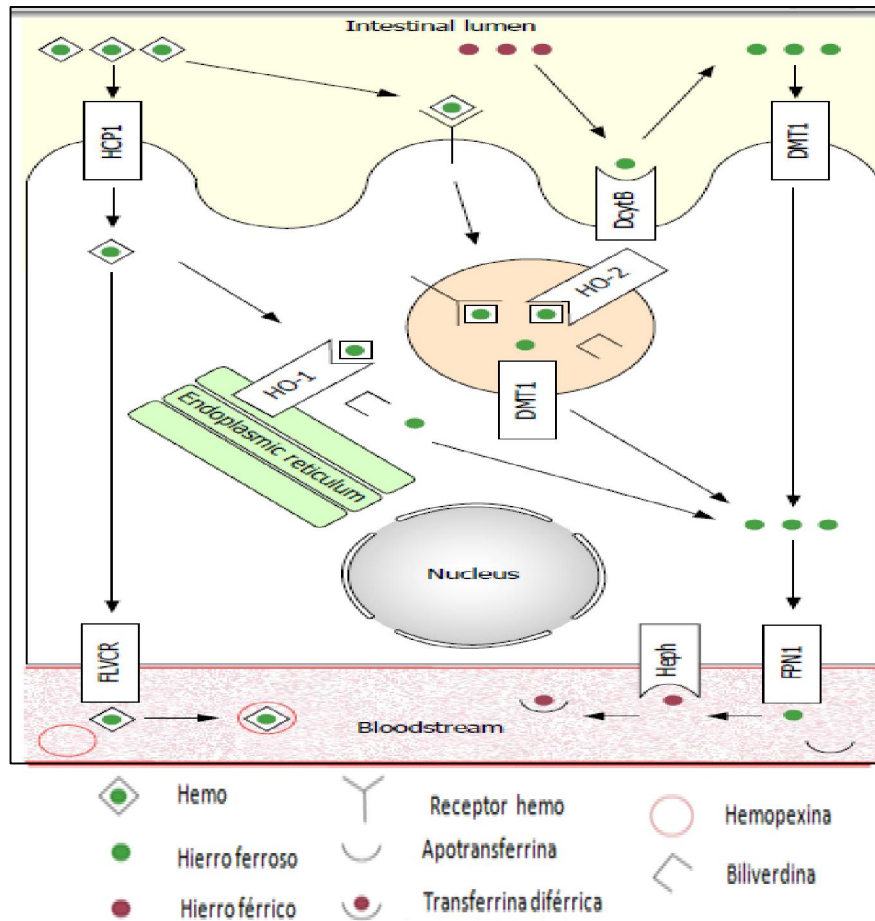


Figura 4. Modelo de las posibles vías de absorción de Fe en los enterocitos intestinales.

Transporte y almacenamiento de hierro. La molécula más importante en el transporte de hierro es la transferrina. Esta molécula no sólo es responsable de llevar hierro desde la superficie basolateral del enterocito a los tejidos periféricos, sino también de la redistribución de hierro a los diferentes compartimientos corporales y de proteger al hierro de la filtración glomerular (O'Donnell, 1997; Mark, 1995; Hagar, 2002). La proteína encargada del almacenamiento del hierro es denominada ferritina, la cual además está involucrada en su distribución a nivel celular.

Excreción. La capacidad de excreción de hierro del organismo es muy limitada. Las pérdidas diarias de hierro son de 0.9-1.5 mg/día (0.013 mg/kg/día) en los hombres adultos. De

éstos, 0.35 mg se pierden en la materia fecal, 0.10 mg a través de la mucosa intestinal (ferritina), 0.20 mg en la bilis, 0.08 mg por vía urinaria y 0.20 mg por descamación cutánea.

2.4.2 Signos y síntomas de la deficiencia de hierro

Entre los signos y síntomas clínicos de la deficiencia de hierro se encuentran la fatiga, la palidez, debilidad, mareo, dolor de cabeza, incapacidad para concentrarse o pensar, somnolencia, coiloniquia, tinnitus, irritabilidad y hábito de pica (deseo de ingerir sustancias como polvo, arcilla, hielo, almidón, sal o cartón). También pueden observarse acatisia (síndrome de las piernas inquietas), esclerótica azul, estomatitis angular y glositis (Ruiz, 2009).

2.4.3 Anemia por deficiencia de hierro durante el embarazo

En general, 52% de las mujeres embarazadas presentan anemia y más del 90% residen en países en vías de industrialización, con una prevalencia entre 40 y 76%. Estudios en siete países latinoamericanos señalan que 39% de las embarazadas padece anemia y en 48% de los casos es causado por deficiencia de hierro (Vera y col., 2009).

En México, Martínez y col., (1995) reportaron que la anemia en la mujer en edad reproductiva es más frecuente en mujeres embarazadas (18.17%) que en las no embarazadas (15.38%); con mayor incidencia en las que habitan en comunidades indígenas (24.02%) que las no indígenas (14.67%), tomando como punto de corte los valores de hemoglobina de 12.5 ± 1.6 g/dl. De acuerdo con este autor, la prevalencia de anemia en el primer trimestre del embarazo fue de 3.5 a 7.0% y aumentó a 15.6 a 55% en el tercer trimestre. En estos estudios, el estado

general de salud de la madre al inicio del embarazo fue un factor importante para la presentación de anemia durante la gestación. Los factores que predisponen a la deficiencia de hierro durante el embarazo se relacionan con el incremento en los requerimientos que expanden el volumen circulante de la madre y por el rápido crecimiento del feto y de la placenta, ya que durante el embarazo se produce aumento de los eritrocitos y el volumen plasmático para satisfacer las necesidades del útero y del feto en crecimiento.

En la investigación perinatal realizada en los últimos 40 años por autores como Bobadilla y Langer, (1990) y Núñez (1988) permite afirmar que la supervivencia infantil y el desarrollo del niño están determinados, en buena medida, por el desempeño reproductivo de la mujer; esto a su vez está relacionado con múltiples factores externos, destacando las condiciones socioeconómicas que influyeron en el estado de salud de la mujer desde su concepción y hasta la expresión de su fertilidad. La importancia de la nutrición antes y durante el embarazo determina el riesgo de retraso en el crecimiento intrauterino, ya que es mayor cuando el estado de la mujer es desfavorable antes del embarazo (delgadez, hipoalbuminemia o anemia crónica).

La repercusión de una nutrición inadecuada en la presentación clínica de la anemia está suficientemente demostrada, pero existe controversia acerca del efecto de la anemia sobre los resultados del embarazo. Algunos estudios muestran que cuando la mujer presenta anemia por deficiencia de hierro en el primero y segundo trimestres de la gestación, se produce un incremento en la tasa de parto pretérmino, bajo peso del producto nacido, óbitos fetales, retardo en el desarrollo motor y neural. El grado de afección varía dependiendo del grado de anemia. Así por ejemplo, en mujeres con deficiencia grave de hierro o anemia grave, el riesgo de prematuridad atribuible a la anemia materna va de 23 a 67%, mientras que en casos de anemia

moderada el riesgo es de 9 a 30%. Se ha demostrado que la anemia durante la gestación puede posteriormente, provocar anemia en el niño los primeros cuatro años de vida (Bobadilla y Langer, 1990; Goldenberg y col., 1997).

Estudios con animales de experimentación muestran que la anemia en el período prenatal afecta el desarrollo neurológico y en algunos casos este efecto es irreversible. La deficiencia de hierro durante el período embrionario de organogénesis en animales de investigación muestra defectos en la formación de células cerebrales. Esto puede deberse a que la anemia durante la gestación produce cambios epigenéticos en los patrones de síntesis de diversos neurotransmisores, ácidos grasos, colesterol y mielina, así como disminución en la síntesis de ADN (debido a que la ribonucleótido reductasa requiere de hierro como cofactor) y con ello la duplicación celular.

Experimentalmente, se ha demostrado que la organogénesis cardiovascular es sensible a la disponibilidad del hierro y que la deficiencia de este elemento puede alterar la programación fetal, aumentando el riesgo de hipertensión. Estudios epidemiológicos en humanos muestran la influencia de eventos en la vida temprana, incluyendo la etapa fetal que originan procesos mórbidos en la edad adulta (Sotelo, 2003).

2.4.4 Causas de anemia por deficiencia de hierro durante el embarazo

Entre las causas de anemia gestacional se encuentran las deficiencias de hierro y ácido fólico, que producen anemia megaloblástica y se asocian con defectos del tubo neural y con

menor frecuencia, la deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, la drepanocitosis o anemia de células falciformes y las talasemias.

El hierro es uno de los elementos que se necesita en mayores cantidades principalmente en el último trimestre de embarazo, período en el que los requerimientos de este mineral aumentan hasta seis veces con respecto a los de la mujer no embarazada (Letsky, 2001; Williams, 1992). Los requerimientos de hierro para todo el embarazo se estiman en 1000 mg aproximadamente, cantidad que aun en mujeres embarazadas bien nutridas, no puede ser aportada por la dieta. En estas condiciones, las reservas de hierro en el organismo son importantes debido a que la mitad de los requerimientos de hierro se obtienen de las reservas existentes de este elemento, durante el período de embarazo (Bryant y Larsen, 2009).

En países en desarrollo se ha demostrado que durante el embarazo un porcentaje considerable de mujeres carece de estas reservas. Por lo tanto, está justificado dar este mineral como suplemento dietético a toda mujer embarazada, sin considerar las necesidades y factores de riesgo individuales, aunque en la actualidad esta práctica es objeto de notable discusión (WHO, 1992).

2.4.5 Consecuencias de anemia por deficiencia de hierro sobre el desarrollo fetal

Bobadilla y Langer (1990), así como Goldenberg y col., (1997) refieren que “la anemia en la mujer en la edad reproductiva tiene particular importancia, pues afecta no sólo a la mujer, sino también al producto, presentándose un mayor riesgo de muerte fetal, malformaciones congénitas, prematurez y bajo peso al nacer”.

Como se ha mencionado, la anemia por deficiencia de hierro aumenta el riesgo de mortalidad materno-fetal, se presenta con mayor incidencia durante el primero y segundo trimestre de gestación que puede causar abortos. En el tercer trimestre del embarazo se presenta un alto índice de óbitos fetales, alta tasa de partos pretérmino, ya en la etapa postnatal, los infantes presentan bajo peso al nacer, malformaciones congénitas y retardo en el desarrollo motor y neural (Olivares y Walter, 2003; Selva, 2011; WHO, 2006).

Malformaciones congénitas. La mayoría de las malformaciones congénitas tienen causas genéticas y ambientales que actúan al mismo tiempo (Palomero G., y col, 1998), pueden ser parte de un síndrome genético, ser producidas por una sustancia teratogénica o en la mayoría de los casos por causas desconocidas (Cuadro II).

Cuadro II. Principales agentes causales de malformaciones congénitas.

Agente	Alteración	
Genético	Monogénicas	Dominante, recesivo y ligado al cromosoma X
	Cromosómicas	Número (errores de división y separación) Estructura (errores en la reparación de lesiones cromosómicas)
	Multifactorial	Delesiones, duplicaciones, inversiones, translocaciones
Ambiental	Biológicos	Infecciones, Diabetes mellitus
	Químicos	Fármacos, alcohol, tabaco, etc.
	Físicos	Radiaciones
Materno	Anatómicos	Anomalías uterinas
	Nutricionales, Edad, Número de partos, Autoinmunidad, etc.	

De acuerdo con la OMS, las anomalías congénitas abarcan las malformaciones congénitas, las deformidades y las anomalías cromosómicas, pero no se incluyen los errores innatos del metabolismo (Cuadro III) (WHO, 2008).

Cuadro III. Resumen del listado de malformaciones congénitas, deformaciones y aberraciones cromosómicas del XVII capítulo de la lista de códigos CIE-10.

(Q00-Q09) Enfermedades congénitas del sistema nervioso
(Q10-Q18) Enfermedades congénitas de los ojos, cara y cuello
(Q20-Q28) Enfermedades congénitas del sistema circulatorio
(Q30-Q34) Enfermedades congénitas del aparato respiratorio
(Q35-Q38) Malformaciones de labios, boca y paladar
(Q39-Q45) Otras malformaciones del tracto digestivo
(Q50-Q56) Malformaciones de los órganos genitales
(Q60-Q64) Malformaciones de los órganos urinarios
(Q65-Q79) Malformaciones del sistema musculoesquelético
(Q80-Q89) Otras dismorfias congénitas
(Q90-Q99) Anormalidades cromosómicas no clasificadas en otra parte

CIE-10. Clasificación Internacional de Enfermedades.

Existen malformaciones congénitas detectadas y no detectadas a simple vista; las morfológicamente visibles, como su nombre lo indica, son las que algún aspecto físico de la persona que la padece está alterado. Entre las más comunes podemos mencionar: encéfalo, cara, tronco y extremidades superiores e inferiores. Aquí se concentran las malformaciones congénitas evidenciadas en el aspecto físico.

Una de las causas por las que se pueden presentar malformaciones macroscópica y microscópicamente visibles es la anemia por deficiencia de hierro de las madres gestantes.

2.4.6 Tratamientos de anemia por deficiencia de hierro durante el embarazo

Una alternativa con gran eficacia siempre ha sido la prevención de las enfermedades. En el caso del embarazo, la alta incidencia de deficiencia de hierro pone de relieve la necesidad consumir suplementos de hierro antes y durante la gestación, debido a que existe mayor

demanda del elemento que no puede satisfacerse sin suplementos de hierro, puesto que una mujer embarazada necesita aproximadamente de 2 a 4.8 mg de hierro por día y la mujer debe consumir de 20 a 48 mg de hierro en la dieta para absorber esta cantidad de hierro al día. Así, la cantidad de hierro que se absorbe de la dieta, junto con la que se movilizó a partir de las reservas de hierro del cuerpo, generalmente son insuficientes para satisfacer las exigencias impuestas por el embarazo. Esto es cierto a pesar de que la biodisponibilidad de hierro en el tracto gastrointestinal está moderadamente aumentada durante el embarazo y la pérdida de hierro menstrual cesa. Por lo tanto, se recomienda de manera universal la suplementación de la dieta personal con hierro antes y durante la gestación (Gautam y col., 2008).

En los países en desarrollo, donde las comidas promedio pueden ser pobres en hierro, los suplementos de hierro son recomendados para mujeres antes y después del embarazo y para las adolescentes también. Las mujeres podrían entonces entrar al embarazo con reservas suficientes de hierro (Gautam y cols., 2008; UNICEF, 2006). Pero la evidencia anecdótica sugiere que la administración de hierro por vía oral a embarazadas y no embarazadas anémicas se asocia con efectos secundarios gastrointestinales, tales como náuseas y constipación. Se considera que el hierro administrado por vía intramuscular o intravenosa está asociado con reacciones alérgicas y choques anafilácticos, así como con trombosis venosa y, ocasionalmente, paro cardíaco y muerte en individuos con susceptibilidad severa (Reveiz y cols., 2001). Otra opción es administrar eritropoyetina recombinante conjuntamente con hierro.

Una alternativa popular para esta y otras patologías, es el uso de plantas recomendadas en la medicina tradicional, lo que recientemente ha sido alentado por la OMS y la UNICEF (Falade y col., 2005).

3. PLANTAS MEDICINALES

3.1 Plantas medicinales utilizadas en México para tratar la anemia.

México es un país de gran biodiversidad y abundante conocimiento en la medicina tradicional, donde los pueblos primitivos han adquirido conocimiento sobre las propiedades medicinales de las plantas, que ha acumulado y transmitido hasta nuestros tiempos, por lo que a lo largo de la historia de México (Trabulse, 1983), muchas enfermedades han sido tratadas con estos recursos. Algunos de estos padecimientos son trastornos gastrointestinales, infecciones, anemia, cáncer, diabetes e hipertensión, entre otras. En el Cuadro IV, se presentan algunas de las plantas más frecuentemente empleadas en México para el tratamiento de la anemia y de otras alteraciones hematológicas.

Cuadro IV. Plantas utilizadas en México para el tratamiento de la anemia.

Nombre científico	Nombre (s) común (es)	Usos	Referencia
<i>Agave salmania</i>	Maguey	Anemia, cáncer	Amo, 1979
<i>Beta vulgaris</i>	Betabel	Anemia	Aguilar, y col., 1994
<i>Justicia spicigera</i>	Muitle, Muicle	Cáncer, anemia	Aguilar, y col., 1994
<i>Plantago major</i>	Lantén, Llantén	Purificar la sangre,	Amo, 1979
<i>Smilax aristolochiaefolia</i>	Zarzaparrilla	Purificar la sangre, depurativa en lepra	Martínez, 1967; Baytelman, 1993.
<i>Solanum nigrum</i>	Hierba mora, quelite	Anemia, depurativo	Aguilar y col., 1994; Cano, 1997
<i>Urtica dioica</i> .	Ortiga mayor	Antioxidante, antianémica,	Villaseñor y col., 1998
<i>Urtica dioica</i> var. <i>angustifolia</i> Wedd	Ortiga, chichicastle	Anemia, asma, afecciones musculares	Argueta y col., 1994

Una de las plantas de amplia distribución mundial que es empleada en México para el tratamiento de la anemia es *Urtica dioica* L., esta planta tiene en nuestro país la variedad *angustifolia*, la cual es de mayor distribución y cuyas propiedades hematopoyéticas no se han determinado aún.

3.2 *Urtica dioica* L.

Es una planta de la familia Urticaceae, integrada por plantas herbáceas, anuales o perennes, consta de alrededor de 55 géneros y 1000 especies, que suelen florecer en zonas templadas y tropicales. Se caracteriza por tener hojas sencillas, opuestas o alternas, con estípulas y casi siempre provistas de pelos que segregan un líquido urticante. Presenta flores pequeñas en

espigas, fruto desnudo, semilla de albumen carnosos. Los géneros más frecuentes son *Urtica* y *Parietaria* (Kavalali, 2003).

El género *Urtica* incluye alrededor de 100 especies distribuidas en regiones templadas, siendo las más importantes:

- *Urtica membranacea* (ortiga), monoica o dioica.
- *Urtica urens* (ortiga menor), monoica.
- *Urtica pilulifera* (ortiga de pelotillas), monoica.
- *Urtica dioica* (ortiga mayor), dioica.

Urtica dioica L., es una planta nativa de Europa y Asia, tiene amplia variedad de aplicaciones en la medicina tradicional para tratar afecciones genitourinarias (nicturia, disuria, retención urinaria, vejiga irritable e infecciones), trastornos renales, alergias, diabetes, hemorragias internas (incluyendo el sangrado uterino), enfermedades del tracto gastrointestinal (diarrea, disentería e hiperacidez gástrica), dolor músculo-esquelético, artrosis, alopecia y anemia (Villaseñor y col., 1998; Espinosa y Sarukhán, 1997). En el Cuadro V, se mencionan los estudios farmacológicos de algunas de las propiedades medicinales de esta planta.

Cuadro V. Propiedades farmacológicas reportadas de *Urtica dioica* L.

Partes empleadas	Material de prueba (Extracto)	Actividad reportada	País	Referencia
Estructuras Aéreas	Acuoso	Antioxidante, Antibacteriana	Turquía	Gülcin y col., 2004
	Metanólico	Inmunomoduladora	Turquía	Akbay y col., 2003.
	Perfusión Acuoso	Diurética, Hipotensora Inhibidor de agregación plaquetaria	Marruecos Marruecos	Tahri y col., 2000 Mekhfi y col., 2004
Hojas	Acuoso	Antirreumático	Alemania	Sommer y Sinner, 1996
	Decocción	Hipoglucemiante	Irán	Farzami y col. 2003
Raíces	Polvo	Hiperplasia prostática en humanos	Polonia	Krzesky y cols., 1993
	Metanólico	Hiperplasia prostática en ratón	Alemania	Lichius y Muth, 1997
	Metanólico	Citotóxica	Alemania	Konrad y col., 2000

De los estudios fitoquímicos realizados con *Urtica dioica* L. se han reportado como componentes: glucopiranosidos, glicoproteínas, proteínas, flavonol glucósidos (Konrad y col., 2000), carotenoides, ácidos grasos (Guil y col., 2003), aceites esenciales, ácido fórmico y ácido acético, histamina, taninos, mucílagos, vitaminas A, B₁, B₂, C, ácido fólico y ácido pantoténico (ESCOP Monographs, 2003).

3.3 *Urtica dioica* L. variedad *angustifolia* Wedd

Urtica dioica L. es un taxón circumpolar (localizado naturalmente en el norte de Eurasia y el norte de América), pero la subespecie presente en México es distinta a la europea; aquí la planta tiene hojas angostas y se clasifica como *Urtica dioica* L. variedad *angustifolia* (**Figura 5**);

algunos autores la consideran sinónimo de *Urtica dioica* ssp. *gracilis* (Ait) Seland. (Martínez, 1979; Mondragón y col., 2009).

En México, *Urtica dioica* L. variedad *angustifolia* Wedd, es conocida popularmente como Dominguilla (Jalisco), solimán (Puebla), ortiga, chichicastle (Hidalgo) y se distribuye principalmente en Chihuahua, Distrito Federal, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Tamaulipas, Tlaxcala y Veracruz (Villaseñor y Espinosa, 1998). Esta planta alcanza entre 0.60 y 2 m de altura, con estipulas; hojas lanceoladas a ovadas, con ápice atenuado, borde aserrado, base redondeada; inflorescencias axilares en forma de espigas ramificadas. Flores dioicas, pequeñas; las plantas masculinas con un perianto de 4 segmentos y 4 estambres, las femeninas con un perianto de 4 partes. El fruto es aquenio, ovoide, color café. Se caracteriza también por estar cubierta con pelos urticantes (Espinosa y Sarukhán, 1997).



Figura 5. *Urtica dioica* var. *angustifolia* Weed

La planta se utiliza empíricamente para dolores musculares en los estados de México, Morelos y Veracruz, con menor frecuencia se emplea contra las afecciones de la piel como sarampión, caspa, caída del cabello, ronchas y llagas. Se baña a los niños con el cocimiento de las hojas para que brote el sarampión. El extracto acuoso se administra en casos de anemia, asma y escarlatina. Las hojas se frotan en la piel para aliviar los calambres. La raíz se hierve y se toma para detener las hemorragias nasales. Se utiliza también para tratar enfermedades del aparato digestivo como diarrea y disentería (Argueta y col., 1994).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

4.1 Justificación

México es un país con gran biodiversidad y tradición cultural en la medicina herbolaria, que a través de la historia, ha pasado a formar parte del conocimiento popular de generación en generación, albergado mayormente en zonas rurales y económicamente marginadas, las cuales recurren con mayor frecuencia a este tipo de recursos, debido en parte a que no cuentan con la solvencia económica para tratar diferentes patologías que requieren de tratamientos costosos. Cabe mencionar que dicha población presenta un alto índice de desnutrición y anemia. En el caso de anemia en el embarazo, se ha visto que durante los dos primeros trimestres del embarazo, la anemia por deficiencia de hierro aumenta el riesgo de parto prematuro, bebés con bajo peso al nacer, malformaciones y mortalidad materno-fetal. Para tratar la anemia en el embarazo en la medicina tradicional mexicana se utilizan diversas plantas, entre ellas destaca *Urtica dioica* L., planta que en la literatura popular es recomendada por su alto contenido en hierro (Chevallier, 1996). En estudios previos del grupo de investigación en Hematología Experimental de la UAM-Iztapalapa, se realizó un estudio preliminar en ratas anémicas preñadas a las que se les administró el extracto acuoso de *Urtica chamaedryoides* (4 g/l, como agua de uso), se reportó abatimiento del estado anémico y disminución en el número de malformaciones en los productos de gestación respecto a los del grupo de ratas sanas preñadas y al grupo de ratas anémicas preñadas y sin tratamiento alguno (Velasco, 2009). Con la presente investigación se pretende iniciar un estudio de las propiedades de *Urtica dioica* var. *angustifolia* Wedd para contrarrestar la anemia por deficiencia de hierro y sobretodo, disminuir la incidencia de malformaciones.

4.2 Hipótesis

En la medicina tradicional mexicana *Urtica dioica* var. *angustifolia* Wedd se utiliza para el tratamiento de la anemia. Por lo tanto, cultivos de células hematopoyéticas y ratones hembra preñadas y anémicas expuestas a los extractos de la planta deberán restablecer su actividad hematopoyética.

4.3 Objetivos

4.3.1 Objetivo general

- Determinar la capacidad de la decocción de *Urtica dioica* L. variedad angustifolia Wedd para restablecer la hematopoyesis *in vitro* e *in vivo*.

4.3.2 Objetivos particulares

- Determinar el efecto de la decocción de *Urtica dioica* L. variedad angustifolia Wedd sobre la proliferación de células hematopoyéticas *in vitro*.
- Establecer un esquema óptimo para la inducción de anemia por deficiencia de hierro en ratones hembra.
- Determinar la capacidad de la decocción de *Urtica dioica* L. variedad angustifolia Wedd para contrarrestar la anemia en ratones hembra preñadas.
- Determinar el efecto de la decocción de la planta sobre la tasa de malformaciones macroscópicas en los productos gestados de ratones hembra con anemia inducida.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Material

5.1.1 Productos biológicos y reactivos

- Ácido tricloroacético (J. T. Baker)
- Azul tripan al 0.4 % en amortiguador de fosfatos pH 7.4 (Sigma Chem.)
- Cloroformo (J.T. Baker)
- Diclorometano (J. T. Baker)
- Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Chem.)
- Hexano (J.T. Baker)
- Hidróxido de sodio (J.T. Baker)
- Medio RPMI-1640 (In vitro, S.A.)
- Metanol absoluto (J.T. Baker)
- Sulforrodamina (Sigma Chem.)
- Suero fetal de bovino (In vitro, S. A.)
- Suero de ternera neonato (In vitro, S.A.)
- TRIS-Base (J. T. Baker)

Todos los productos químicos fueron de grado analítico.

5.1.2 Aparatos y equipo

- Agitador de pipetas (Kavitron, California EUA)
- Analizador hematológico automático KX-21N (Sysmex)

- Campana de flujo laminar horizontal (Industrias Figursa)
- Campana de flujo laminar vertical (Industrias Figursa)
- Incubadora con entrada para CO₂ (Lab-Line)
- Invertoscopio (ZEISS)
- Lector de ELISA (BioTek)
- Rotavapor (Büchi)

5.1.3 Material biológico

- Animales de experimentación.

Se emplearon ratones hembra y macho *Mus musculus*, de la cepa CD₁ de 8 a 9 semanas de edad, del Bioterio UAM-Iztapalapa, en condiciones controladas, con agua y alimento. Los animales fueron cuidados y tratados de acuerdo con los estatutos del CICUAL (Comité Institucional para el Uso y Cuidado de los Animales de Laboratorio), de la norma oficial mexicana para la producción y mantenimiento de animales de laboratorio (NOM-062-200-1999).

- Material vegetal

La planta se adquirió en el mercado Sonora de la Cd. de México. Se preparó un ejemplar para su identificación en el Herbario de Plantas Medicinales del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS y fue autenticada como *Urtica dioica* L. variedad *angustifolia* Wedd, bajo el número de registro IMSSM 15-645.

5.2 Métodos

5.2.1 Preparación de la decocción de *Urtica dioica* L. variedad *angustifolia* Wedd

La planta se dejó secar a temperatura ambiente protegida del sol y polvo, se seleccionaron las partes aéreas, se pulverizaron en un molino mecánico y se pesaron 200 g del material pulverizado, los que se colocaron en 1200 ml de agua destilada y se calentaron a ebullición durante 15 min. Posteriormente, la mezcla obtenida se filtró con gasa y papel Whatman No. 42, se eliminó el agua mediante evaporación en baño María hasta obtener un extracto seco que se guardó en congelación hasta su uso.

Para evaluar la actividad con ensayos *in vitro* de diferentes fracciones de la decocción, estas fueron obtenidas previamente por partición. Para ello se disolvieron 2 g de la decocción en 200 ml de agua; a esta solución se le adicionaron 200 ml de hexano, la mezcla se agitó, se dejó en reposo y la capa superior (orgánica) se separó; al residuo acuoso se le adicionaron 200 ml de diclorometano, repitiendo este proceso con metanol. En cada caso los disolventes orgánicos se eliminaron por rotoevaporación y el residuo acuoso por evaporación en Baño de María. Se prepararon concentraciones de 1, 10 y 100 µg/mL de la *decocción* y las *fracciones*.

5.2.2 Ensayos *in vitro*

Se realizó un estudio *in vitro* para evaluar la capacidad de la *decocción* de *Urtica dioica* L. var. *angustifolia* Weed y de las fracciones obtenidas por partición, para estimular la proliferación de células de bazo y células de médula ósea de ratones hembra sanas y de ratones hembra con anemia por deficiencia de hierro inducida (Variante tres, mencionada más adelante). En estos

ensayos se emplearon además cultivos testigos de eritropoyesis con concentraciones de 5, 10 y 20 $\mu\text{g/mL}$ de sulfato ferroso (Cuadro VI y VII).

Cuadro VI. Distribución de los cultivos de células de bazo de ratones hembra sanas y ratones hembra anémicas por tratamiento.

TRATAMIENTOS	
1	Control Negativo: Dimetilsulfóxido (DMSO)
2	Decocción de la planta
3	Fracción Hexánica
4	Fracción Diclorometánica
5	Fracción Metanólica
6	Residuo Acuoso
7	Sulfato ferroso (5, 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$)
8	Control Positivo: <i>Phytolacca americana</i>

Cuadro VII. Distribución de los cultivos de células de médula ósea de ratones hembra sanas y ratones hembra anémicas por tratamiento.

TRATAMIENTOS	
1	Control Negativo: Dimetilsulfóxido (DMSO)
2	Decocción de la planta
3	Fracción Hexánica
4	Fracción Diclorometánica
5	Fracción Metanólica
6	Residuo Acuoso
7	Sulfato ferroso (5, 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$)
8	Control Positivo: <i>Medio condicionado</i> *

Para los ensayos de actividad hematopoyética *in vitro*, los ratones hembra se sacrificaron por dislocación cervical. Se aislaron el fémur y el bazo en condiciones de esterilidad, al primero se le inyectó a través del canal medular 1 ml de medio de RPMI-1640 complementado con 10% de suero de ternera de neonato inactivado por calentamiento. En el caso del bazo, éste se disgregó mecánicamente con pinzas y tijeras en medio RPMI-1640; en ambos casos las células se recibieron en un tubo de plástico, la suspensión celular se dispersó mediante pipeteo y con ella se llenaron pipetas de Thoma hasta la marca de 0.5 y se llevó hasta la marca de 11 con solución de Turk (dilución 1:20). Las pipetas con la suspensión celular se agitaron

mecánicamente tres minutos con un agitador de pipetas (Kavitron, California EUA) y se llenaron ambos lados de un hemocitómetro, se dejó en reposo en ambiente húmedo durante 10 minutos y se contaron las células nucleadas totales en el homocitómetro por microscopía de luz en campo claro. También se determinó la viabilidad celular con azul de tripano al 0.2 % (Vives y Aguilar, 1997).

La concentración celular se ajustó a $4.0 \times 10^6/\text{mL}$ con solución salina fisiológica (SSF) y 0.1 ml de esta suspensión se adicionó a una mezcla de 0.6 ml de medio RPMI-1640, 0.2 ml de suero de ternera de neonato inactivado por calentamiento y 0.1 ml del material de prueba. Posteriormente, 0.5 ml de la mezcla anterior se depositó en placas multipozos (Nunc) de 132 X 88 mm e incubaron 72 y 48 horas para médula ósea y bazo, respectivamente, a 37°C en una incubadora con humedad relativa de 90% y 5% de CO₂. En todos los casos, se incluyeron cultivos testigos negativos libres del material de prueba y cultivos testigos positivos con medio condicionado de bazo para el cultivo de médula ósea y con extracto de *Phytolacca americana* (mitógeno) 1:320, para el cultivo de bazo, respectivamente (*El medio condicionado es el sobrenadante de un cultivo de bazo de 48 horas estimulado con *Phytolacca americana*) (Jackson y col., 1990). Al concluir la incubación, las células se fijaron y tiñeron paralelamente con otras placas que contenían la concentración inicial de células, mismas que fueron mantenidas en refrigeración (control inicial), durante el periodo de incubación de las placas con células y el material de prueba. Como indicador de proliferación celular se cuantificaron las proteínas celulares por la técnica de Sulforrodamina B. Cada muestra se ensayó por triplicado al menos en cuatro ocasiones. La cuenta celular de los controles sanas libres del extracto, se consideró como el 100% de proliferación y contra ella se compararon los cultivos tratados con el material de

prueba. Para conocer la significancia estadística de estos resultados se aplicaron el análisis de varianza y la prueba de Tukey Kramer, mediante el programa estadístico NCSS 2007.

5.2.3 Ensayos *in vivo*

Inicialmente se trabajó con 50 ratones hembra CD₁ sanas de 9 semanas de edad de 30 a 40 g de peso corporal. Se realizaron tres variantes de inducción de anemia por deficiencia de hierro: En la primera se extrajeron a diez ratones hembra 0.2 ml de sangre del plexo venoso orbital (seno venoso detrás del globo del ojo derecho), anestesiando previamente con xilazina (Pisa, Méx.) (0.2 ml) cada tres días durante 15 días. En los días 0 y 15, se les realizaron citometrías hemáticas para confirmar estado de salud inicial y anemia, respectivamente. Se empleó para ello un analizador automático KX-21N (Sysmex, Japón). El día 17 del experimento, los ratones hembra se pusieron en cruce. El día 34 del experimento, que corresponde al 19 de gestación, las hembras fueron anestesiadas, sangradas y sacrificadas para la extracción de los fetos. Se hicieron citometrías hemáticas; en el caso de los fetos se consideró el número de éstos, su talla y peso, así como el número y grado de malformaciones morfológicamente visibles. Se realizó el mismo procedimiento para las siguientes dos variantes de inducción de anemia, pero en estos casos se extrajeron 0.35 y 0.5 ml de sangre, respectivamente. Se trabajó paralelamente con dos lotes testigos de 20 ratones hembra sanas, de los cuales sólo diez fueron cruzados. Estos dos lotes fueron valorados hematológicamente únicamente el día 34 del experimento; aunado a esto se realizaron las determinaciones correspondientes a los fetos. Para determinar las diferencias significativas entre las tres variantes de inducción de anemia se realizó la prueba de Tukey

Kramer, con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$ y utilizando el programa estadístico NCSS 2007.

5.2.3.1 Actividad hematopoyética

Para el desarrollo del trabajo se seleccionó la variante tres de inducción de anemia, que consistió en extraer 0.5 ml de sangre con la metodología antes mencionada. Para esta parte se utilizaron 60 ratones hembra que se distribuyeron en seis grupos con diez ratones cada uno.

Cuadro VIII. Distribución de ratones hembra anémicas de acuerdo con el tratamiento.

LOTE	TRATAMIENTOS
I	Agua destilada como agua de uso
II	Decocción como agua de uso (4 g/L)
III	Decocción vía intragástrica (0.3 g/Kg)
IV	Sulfato ferroso vía subcutánea (0.2 g/kg)

Cuadro IX. Distribución de ratones hembra sanas de acuerdo con el tratamiento.

LOTE	TRATAMIENTOS
V	Agua destilada como agua de uso
VI	Decocción como agua de uso (4 g/L)

A los grupos II y VI, se les suministró la decocción de la planta como agua de uso, durante la gestación. El grupo III fue tratado con la decocción vía intragástrica los días 6, 10 y 14 de la gestación. El grupo IV fue tratado con sulfato ferroso los días 6 y 10 (Cuadro VIII y IX). Los grupos I y V tuvieron acceso al agua destilada durante la gestación. Después que los ratones hembra preñados anémicas o sanas fueron tratados, éstos fueron anestesiados, sangrados y sacrificados; se realizaron valoraciones hematológicas y se extrajeron los fetos para observar y determinar el número, talla y peso de los mismos, así como también si presentaban malformaciones morfológicamente visibles, el número y tipo de malformación.

6. RESULTADOS

6.1 Actividad hematopoyética *in vitro*

En la Figura 6 se muestra el efecto que tienen las concentraciones 1, 10 y 100 $\mu\text{g/mL}$ de la decocción de la planta y sus fracciones sobre la proliferación de células de bazo de ratón sano, así como el efecto de sulfato ferroso (FeSO_4) a las concentraciones de 5, 10 y 20 $\mu\text{g/mL}$, en comparación con cultivos testigos con *Phytolacca americana* y DMSO, respectivamente, a la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$.

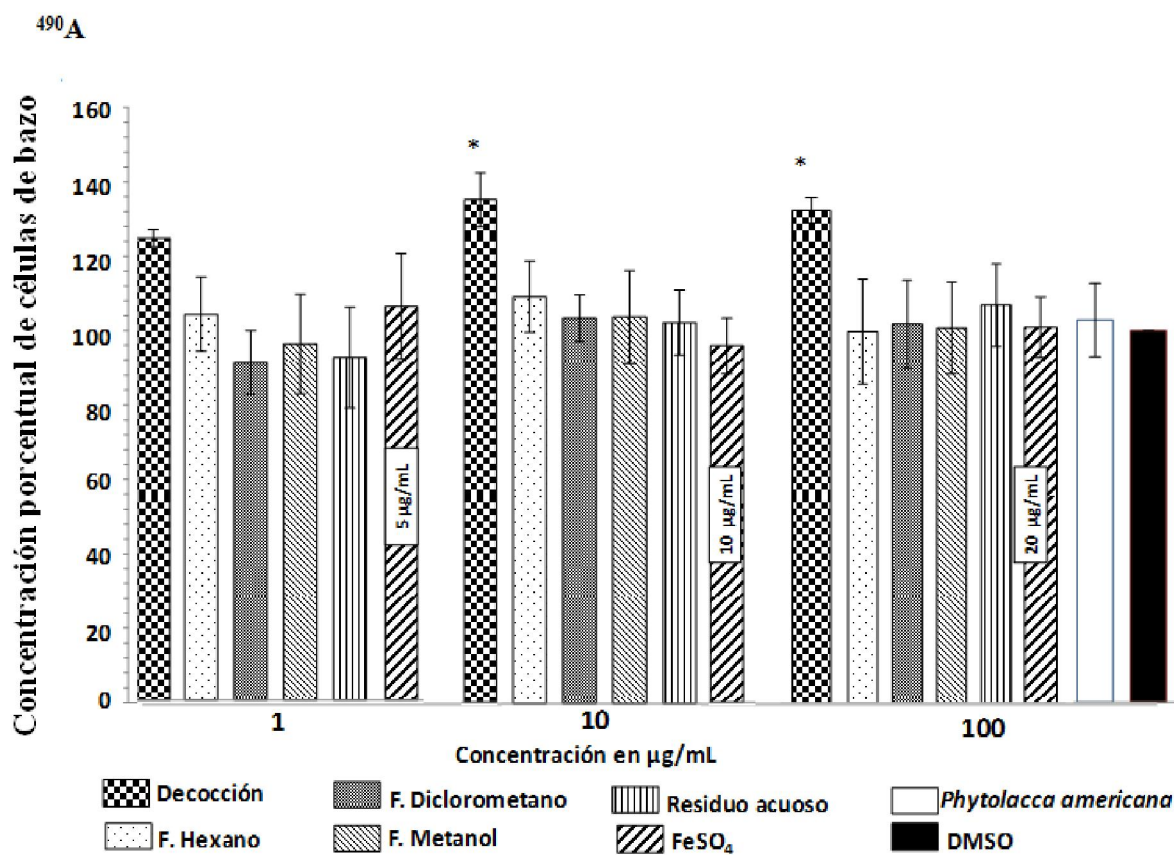
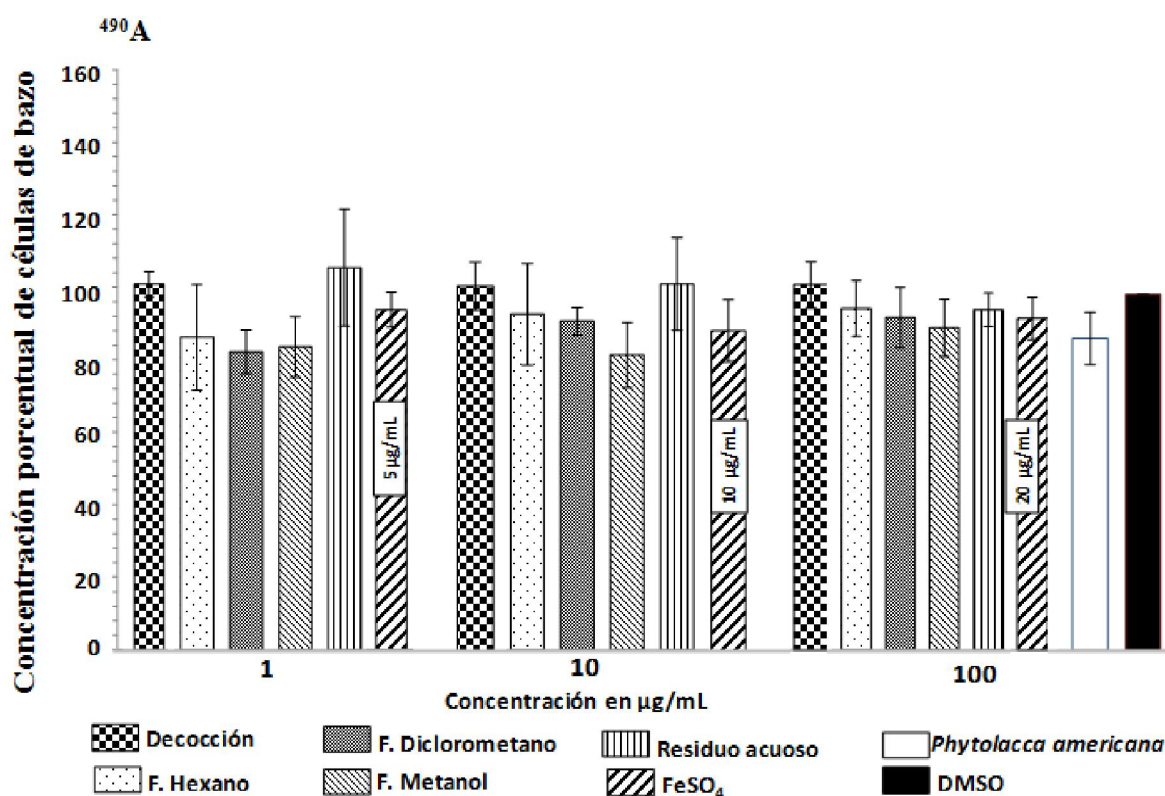


Figura 6. Efecto de los extractos de *Urtica dioica* L. var. *angustifolia* Wedd sobre la proliferación de células de bazo de ratones hembra CD_1 sanas, $n=4$, Media \pm E.E. * $p<0.05$

Como se observa, únicamente la decocción de la planta estimuló la proliferación celular de manera significativa ($p=0.05$) en las concentraciones de 10 y 100 $\mu\text{g/mL}$, mientras que las fracciones en ninguna de las concentraciones empleadas mostró actividad estimulante respecto al grupo testigo y al grupo tratado con sulfato ferroso.

En la Figura 7 se muestra que los materiales de prueba a las mismas concentraciones en células de bazo de ratón anémico no presentaron actividad estimulante significativa sobre la proliferación celular, ya que se comportaron en forma similar a los testigos. Tampoco las células



de bazo de ratón anémico tratadas con hierro tuvieron actividad estimulante.

Figura 7. Efecto de los extractos de *Urtica dioica* L. var. *angustifolia* Wedd sobre la proliferación de células de bazo de ratones hembra CD_1 anémicas, $n=4$, Media \pm E.E. * $p<0.05$

Por otro lado, el efecto de la decocción de la planta y sus fracciones sobre la proliferación de células de médula ósea femoral de ratones hembra sanas, se muestra en la Figura 8. Se observa que ninguna de las muestras estimuló significativamente la proliferación celular respecto al cultivo testigo. La decocción a la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mostró tendencia a incrementar la proliferación celular con valores hasta de 120%, pero tal incremento no es estadísticamente significativo. Sin embargo, la fracción de diclorometano a la concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, tuvo efecto inhibitorio con respecto al testigo de DMSO, lo cual si es estadísticamente significativo ($p < 0.05$).

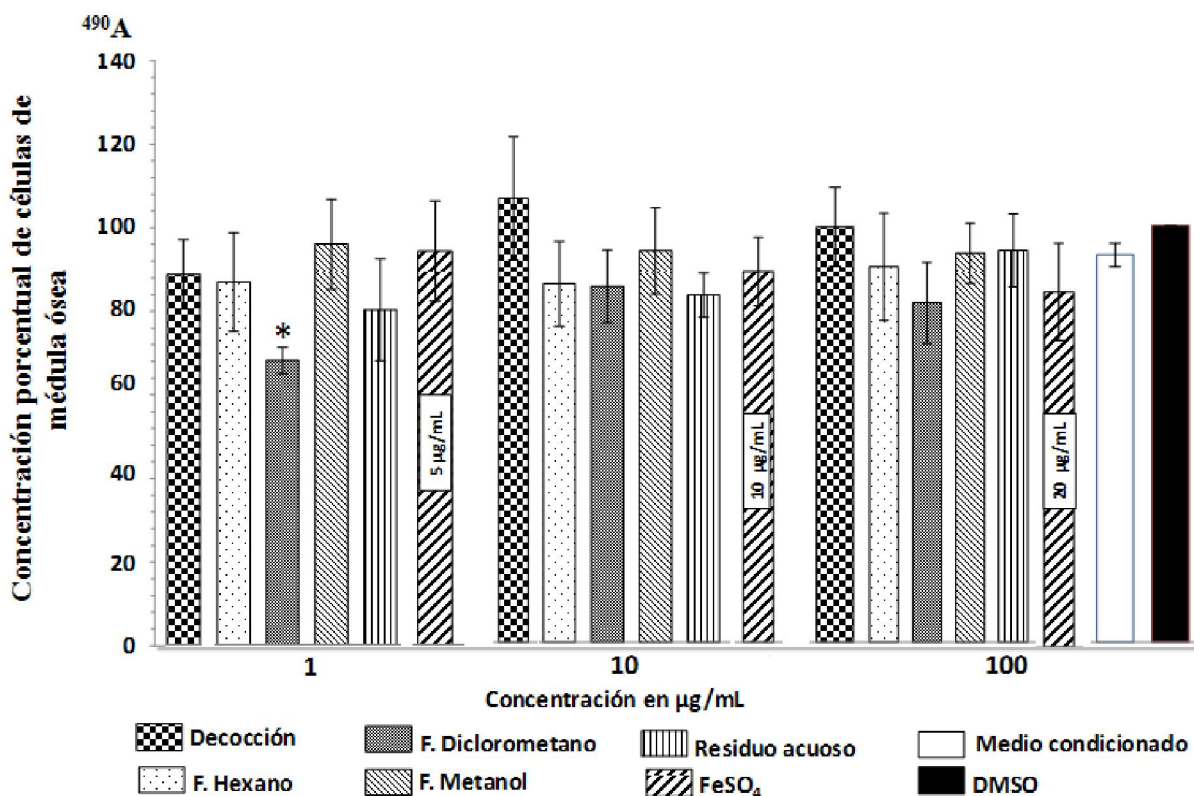


Figura 8. Efecto de los extractos de *Urtica dioica* L. var. *angustifolia* Wedd sobre la proliferación de células de médula ósea de ratones hembra CD₁ sanas, n=4, Media \pm E.E. * $p < 0.05$

En la Figura 9 observamos que las fracciones y el sulfato ferroso, no estimularon la proliferación celular, mientras que la decocción en sus diferentes concentraciones y el residuo acuoso a 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ alcanzaron valores mayores del 100% de proliferación celular, pero no son estadísticamente significativos.

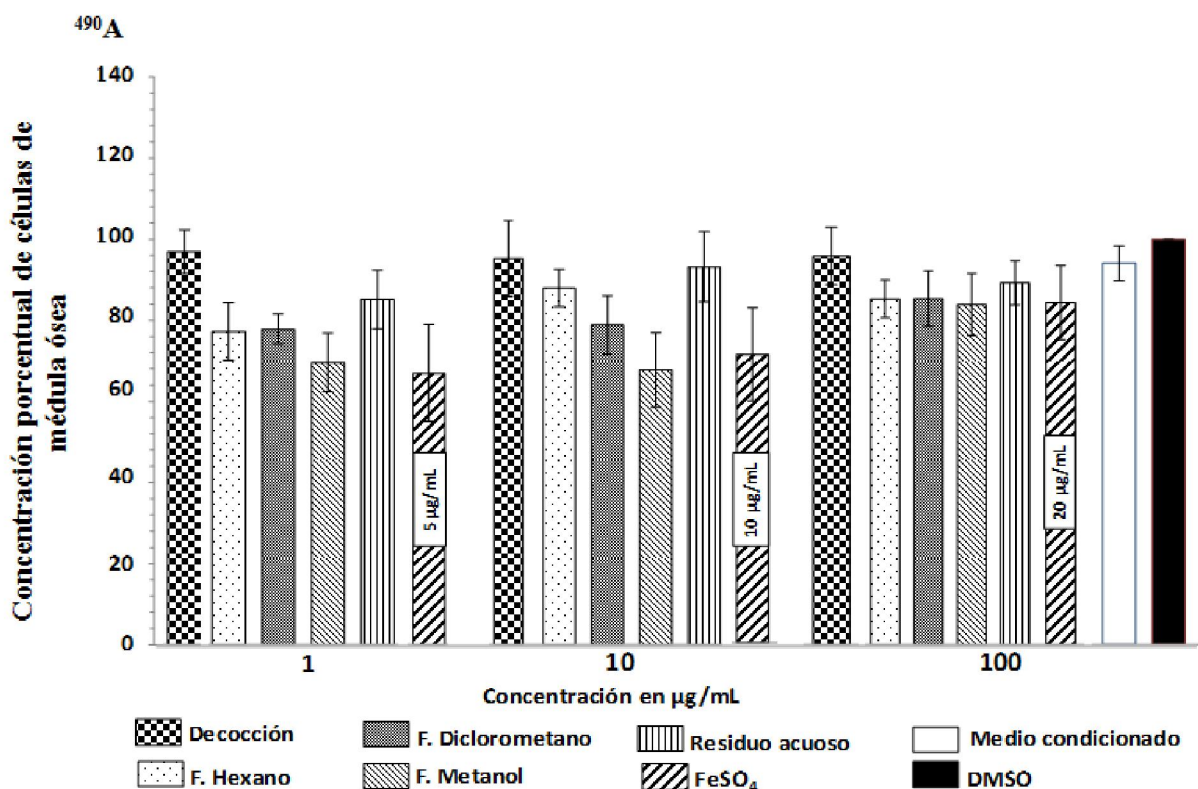


Figura 9. Efecto de los extractos de *Urtica dioica* L. var. *angustifolia* Wedd sobre la proliferación de células de médula ósea de ratones hembra CD_1 anémicas, $n=4$, Media \pm E.E. * $p<0.05$

De acuerdo con estos resultados, sólo la decocción de la planta tiende a estimular la proliferación de células de bazo y médula ósea, pero únicamente en células de bazo de ratón sano tiene significancia estadística. En el caso del hierro se puede observar que no tuvo efecto sobre la proliferación en ninguna de las concentraciones empleadas de acuerdo con la prueba de Tukey Kramer, mediante el programa estadístico NCSS con una $p<0.05$.

6.2 Inducción de anemia

Como ya se mencionó, se establecieron tres variantes de inducción de anemia extrayendo 0.20, 0.35 y 0.5 ml de sangre a tres lotes experimentales de diez ratones hembra CD₁, respectivamente. Los resultados de las citometrías hemáticas realizadas los días 0, 15 y 34 del experimento reportan: concentración de eritrocitos, de hemoglobina y hematócrito.

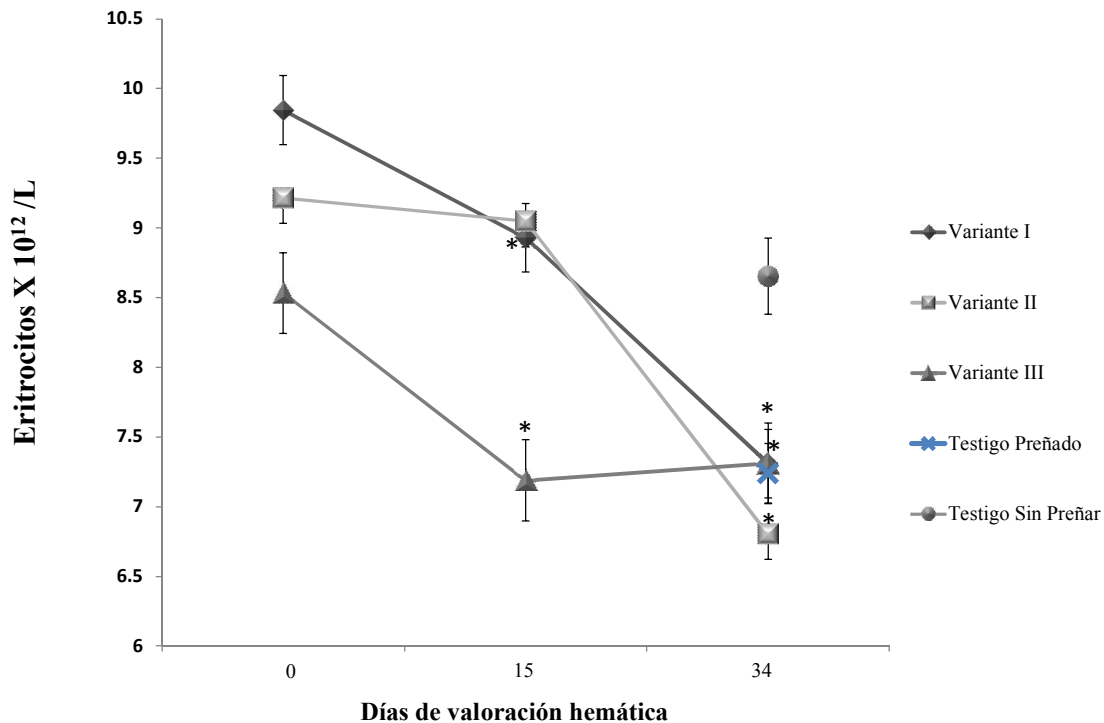


Figura 10. Concentración de eritrocitos de ratones hembra de acuerdo con la variante de inducción de anemia. n =10, Media \pm E.E. *p<0.05, 0 = Día inicial de inducción de anemia, 15= Día final de inducción de anemia y, 34= Día 19 de gestación y día final del experimento.

En la Figura 10, se muestra la concentración de eritrocitos para cada una de las variantes, se observa que se logró disminuir significativamente la concentración de eritrocitos al día 15 del experimento, lo que significa que se indujo anemia antes de la preñez y que ésta se mantuvo hasta el último día del experimento (día 34), que corresponde al día 19 de gestación de los 21

días en los que habitualmente se lleva a cabo. En cuanto a los ratones hembra sanas gestantes (testigo preñado) al día 34 presentaron disminución en la concentración de eritrocitos similar a los ratones hembra anémicas.

En la Figura 11 se muestra el comportamiento de la concentración de hemoglobina de acuerdo con cada variante de inducción de anemia, se aprecia que la concentración de hemoglobina disminuyó significativamente al día 34 del experimento sólo en las variantes I y II. Mientras que en la variante III, no disminuyó la concentración de hemoglobina entre los días 15 y 34, respecto al grupo de ratones hembra sanas gestantes (testigo sano preñado).

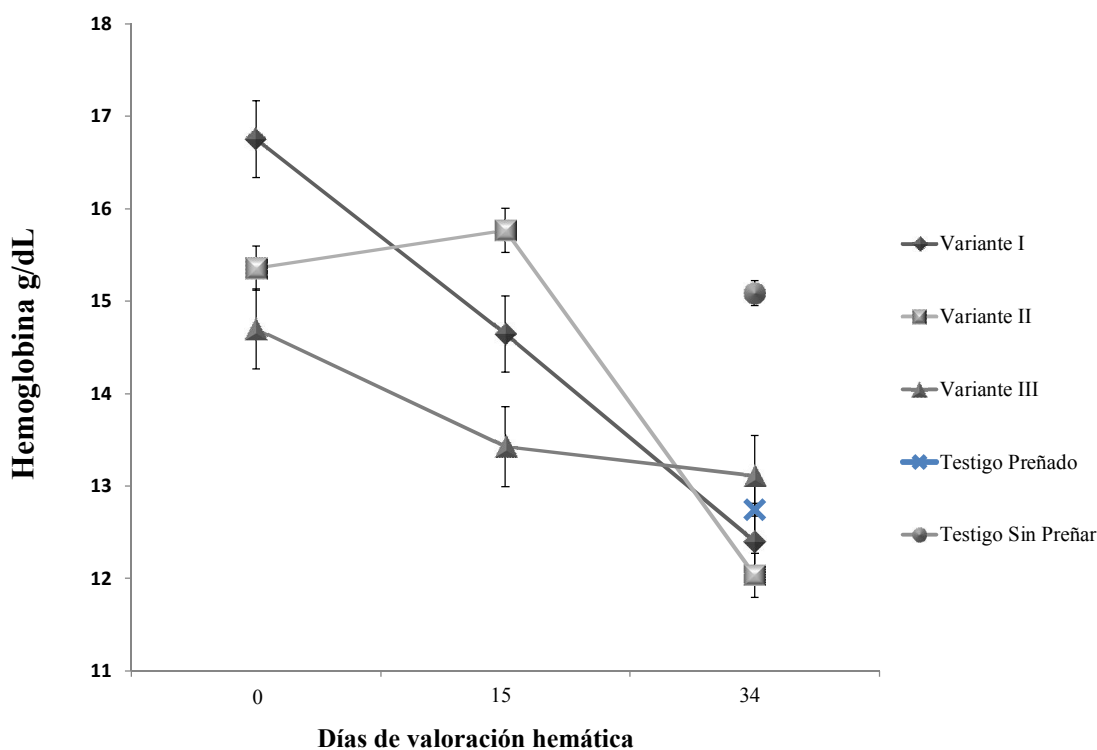


Figura 11. Concentración de hemoglobina en ratones hembra de acuerdo con la variante de inducción de anemia. n=10, Media \pm E.E. *p<0.05, 0= Día inicial de inducción de anemia, 15= Día final de inducción de anemia, 34= Día 17 de gestación y día final del experimento.

Adicionalmente se determinó el hematócrito para cada una de los ratones hembra de cada variante, Figura 12. En los ratones hembra de las variantes I y II, el hematócrito disminuyó significativamente al día 34, no así la variante III, con la que no se encontraron diferencias significativas en el hematócrito antes de la gestación, sin embargo, al día 34 fueron significativamente inferiores respecto a los testigos sanas sin preñar.

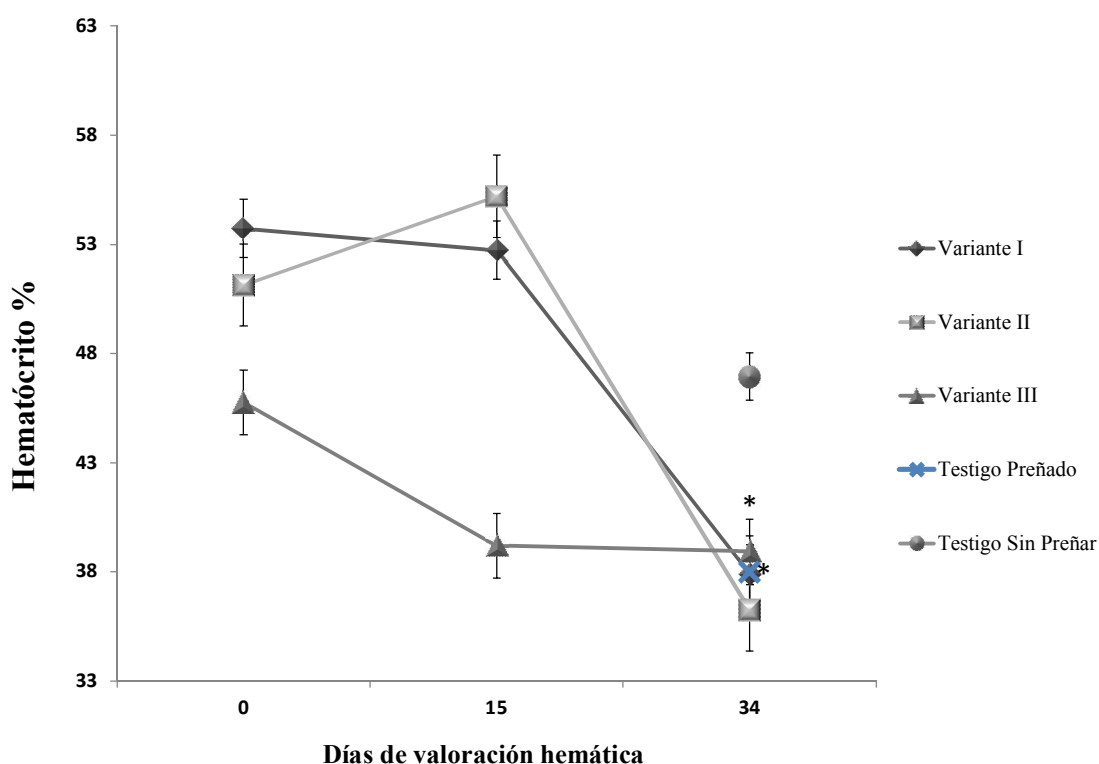


Figura 12. Hematócrito en ratones hembra anémicas de acuerdo con la variante de inducción de anemia antes y después de la preñez. n= 10, Media \pm E. E. * $p < 0.05$, 0= Día inicial de inducción de anemia, 15= Día final de inducción de anemia y, 34= Día 17 de gestación y final del experimento.

No obstante que mediante citometría hemática automatizada no se observan diferencias significativas entre las variantes de sangrado empleadas, se puede afirmar que con los esquemas uno y dos se observó el cuadro típico de anemia por deficiencia de hierro que se manifiesta por

microcitocis. Por otro lado, en cuanto a los fetos, observamos diferencias significativas entre las variantes respecto al grado de malformaciones que estos presentaban, lo que se obtuvo es lo siguiente:

1. Número de fetos por hembra.

En el Cuadro X se muestra el número de fetos por hembra de acuerdo con la variante de inducción de anemia, en el cual se observa que la Variante III tuvo menor número hembras preñadas y que estas tuvieron a su vez menor número de fetos que los demás grupos.

Cuadro X. Número de fetos por hembra de acuerdo con la variante de inducción de anemia

Variante de Inducción de anemia	Número de ratones hembra preñadas	% de hembras preñadas	Número de fetos por hembra
I	9 de 10	90	12
II	9 de 10	90	12
III	7 de 12	58	10
Testigo	5 de 8	62	12

2. Talla de los fetos.

En la Figura 13 se presenta la talla de los fetos de acuerdo con la variante de inducción de anemia, se puede notar que los ratones hembra de la variante III tuvieron mayor talla que las otras variantes, lo cual fue estadísticamente significativo mediante la prueba de Tukey Kramer (programa estadístico NCSS 2000), pero no fue diferente del grupo testigo.

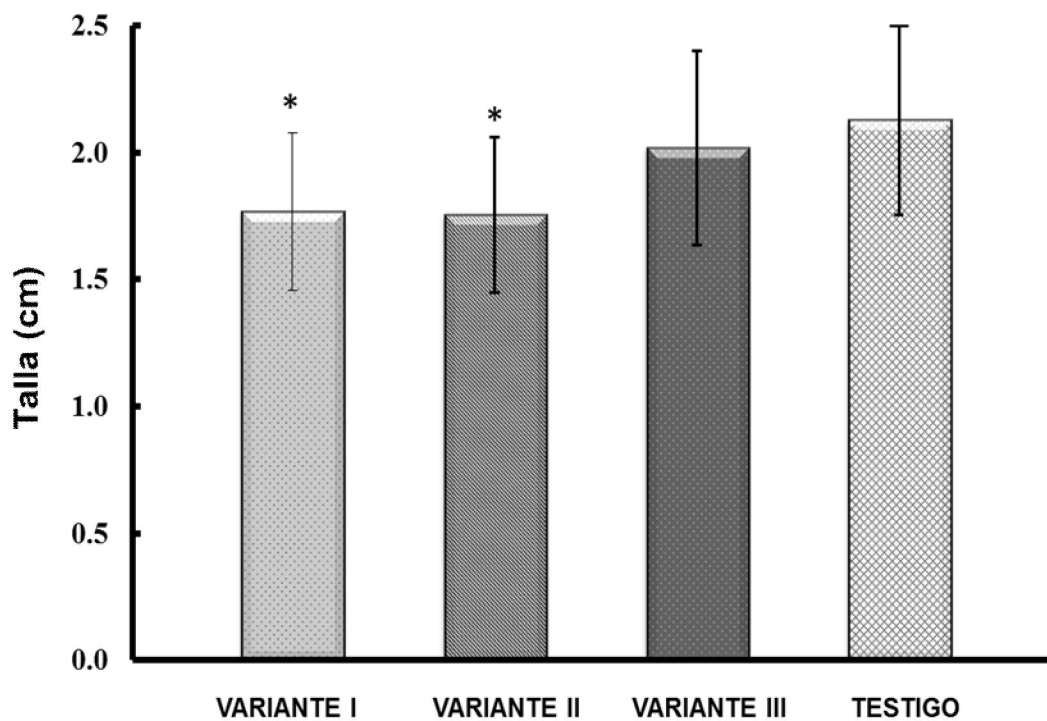


Figura 13. Talla de los fetos de acuerdo con la variante de inducción de anemia. D.E. $p < 0.05$

3. *Peso de los fetos*

Los fetos de la variante III tuvieron mayor peso que los fetos de las variantes I y II, lo cual fue estadísticamente significativo.

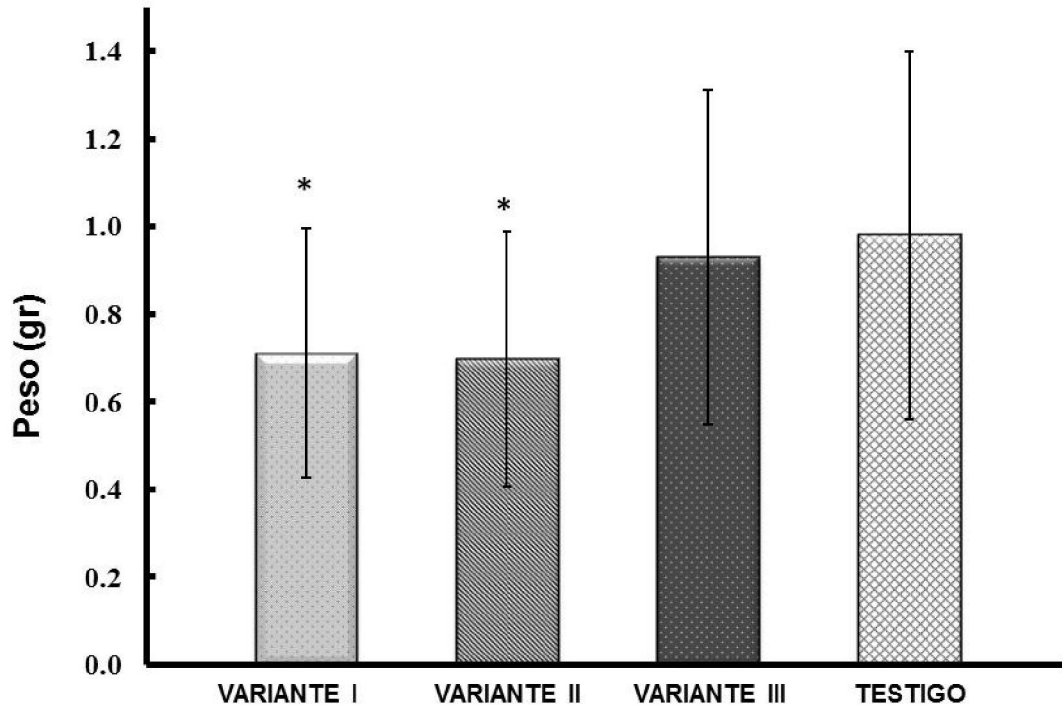


Figura 14. Peso de los fetos de acuerdo con la variante de inducción de anemia. D.E. $p < 0.05$

4. Malformaciones fetales

En la Figura 15 se muestra el número fetos que presentaron al menos una malformación morfológicamente visible de acuerdo con cada variante de inducción de anemia. Se observa además que conforme se aumentó el volumen de sangrado, aumentó también el número y grado de malformaciones fetales, ya que en los fetos de los ratones hembra de la variante III, las malformaciones fueron de mayor dimensión y por lo tanto más visibles, comprometiendo en algunos casos la vida de los fetos (Figura 16).

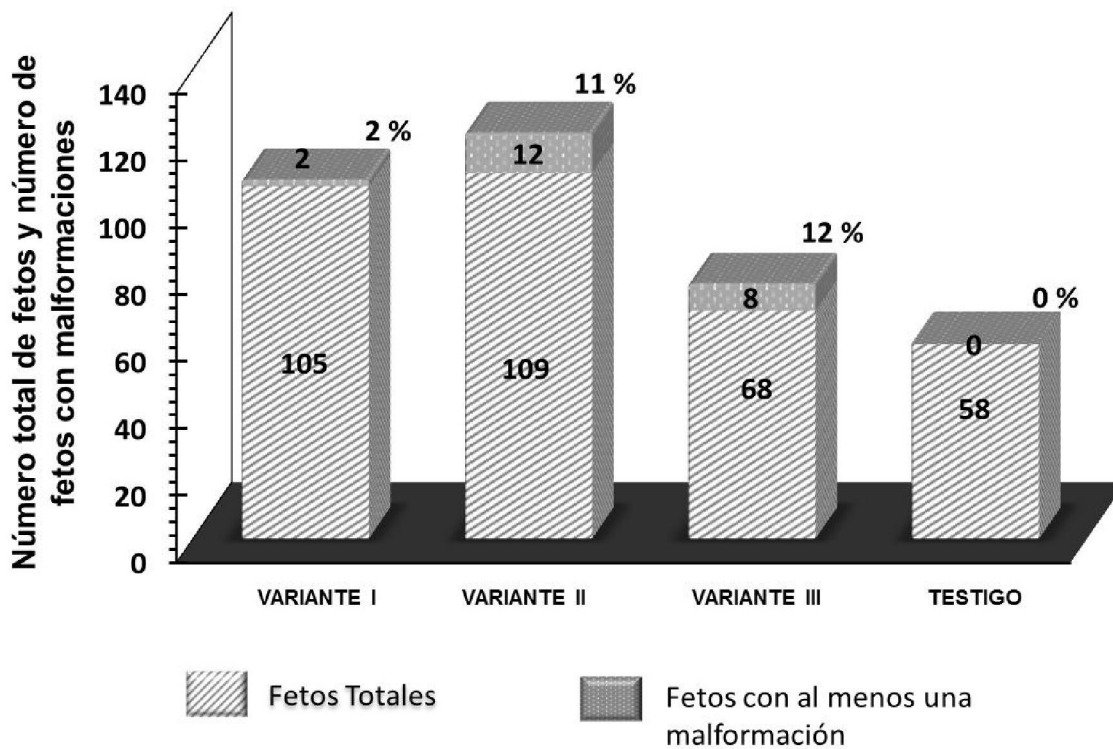


Figura 15. Tasa de malformaciones fetales de acuerdo con la variante de inducción de anemia.

Con las variantes I y II, las malformaciones con mayor incidencia fueron las que afectan las extremidades. En tanto que en la Variante III, las malformaciones más comunes fueron también las que afectaban las extremidades, pero además los fetos presentaron cianosis, con tendencia a mayor tamaño que los fetos del testigo sano y con desarrollo incompleto del cuerpo en algunos casos.

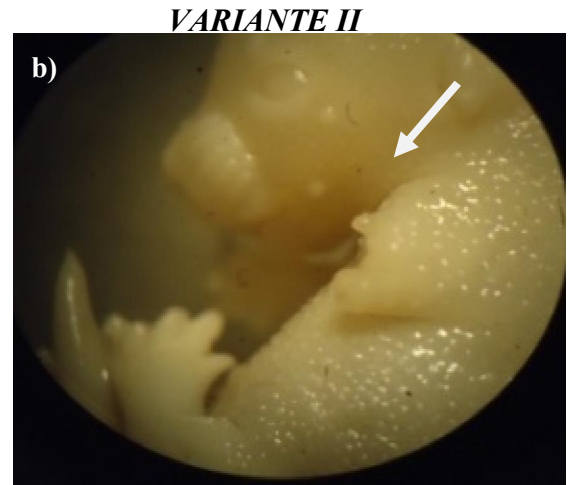
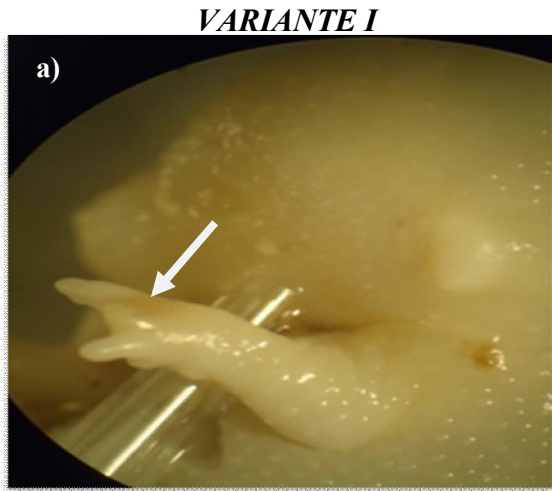


Figura 16. Algunas malformaciones presentadas de acuerdo con la variante de inducción de anemia. a) Feto con hipodactilia, b) Focomelia en la extremidad superior izquierda, c) Cianosis, d) Ausencia completa de miembros superiores y cabeza y e) Feto sano.

En la segunda etapa del trabajo se determinó si estas malformaciones podrían evitarse mediante el tratamiento de las madres anémicas gestantes con la decocción de *Urtica dioica* L. variedad angustifolia Wedd.

6.2.1 Actividad hematopoyética *in vivo*

En virtud de que la variante III produjo el mayor número de malformaciones y las más extensas, se seleccionó ésta para la siguiente etapa del trabajo.

Se determinó la concentración de plaquetas, leucocitos, eritrocitos y parámetros eritroides, los días 0, 15 y 34 del experimento. Los ratones hembra con anemia inducida fueron tratados con; a) decocción de la planta como agua de uso, b) administración de la decocción de la planta vía intragástrica (0.3 g/Kg) y c) sin tratamiento. Se incluyeron dos grupos testigos sanas, a uno de ellos se le administró la decocción de la planta (4 g/L) como agua de uso, mientras que el otro se dejó sin tratamiento alguno.

En las siguientes figuras se muestran los valores de la citometría hemática automatizada realizada los días 0, 15 y 34 de sangrado, para cada uno de los tratamientos de los ratones hembra gestantes anémicas y sanas; a excepción del grupo de ratones hembra anémicas tratados con la decocción de la planta, la muestra del día 0 no fue suficiente por lo que no se muestra.

En la Figura 17 se muestra la concentración de leucocitos de los ratones hembra con anemia y sanas, tratados y no tratados. Se observa que en los ratones hembra anémicas tratados con la decocción de la planta vía intragástrica y los ratones hembra anémicas no tratado, al día 15 del experimento aumentó significativamente la concentración de dichas células, pero al día

del sacrificio la concentración disminuyó por debajo de los valores iniciales en ambos grupos. Comparando los valores de leucocitos de los ratones hembra anémicas tratados y sanas al día 34 del experimento, no hay diferencias significativas entre los grupos.

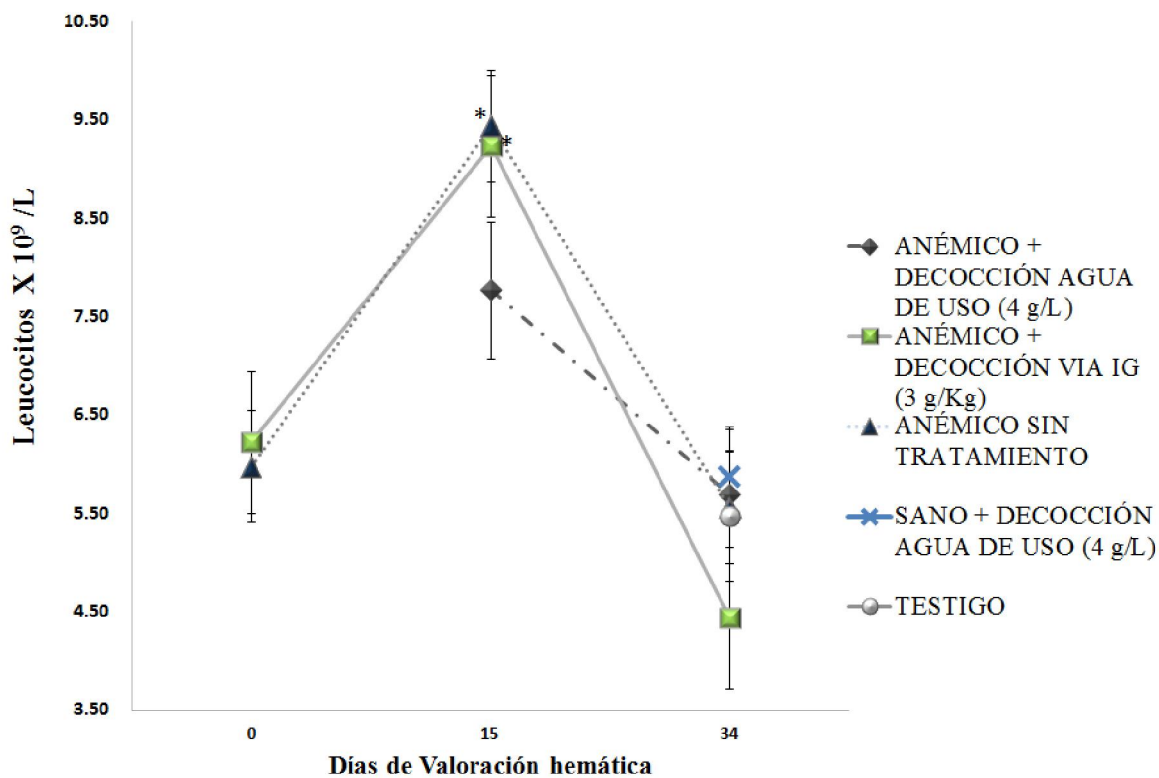


Figura 17. Concentración de leucocitos en ratones hembra anémicas gestantes bajo diferentes tratamientos. n=10 Media \pm E.E. *p<0.05, 0= Día inicial de inducción de anemia, 15= Día final de inducción de anemia y 34= Día 17 de gestación y final del experimento.

En la Figura 18 se muestra la concentración de plaquetas de los ratones hembra anémicas y sanas, tratados y no tratados, donde se observa que no hubo diferencias entre los tratamientos.

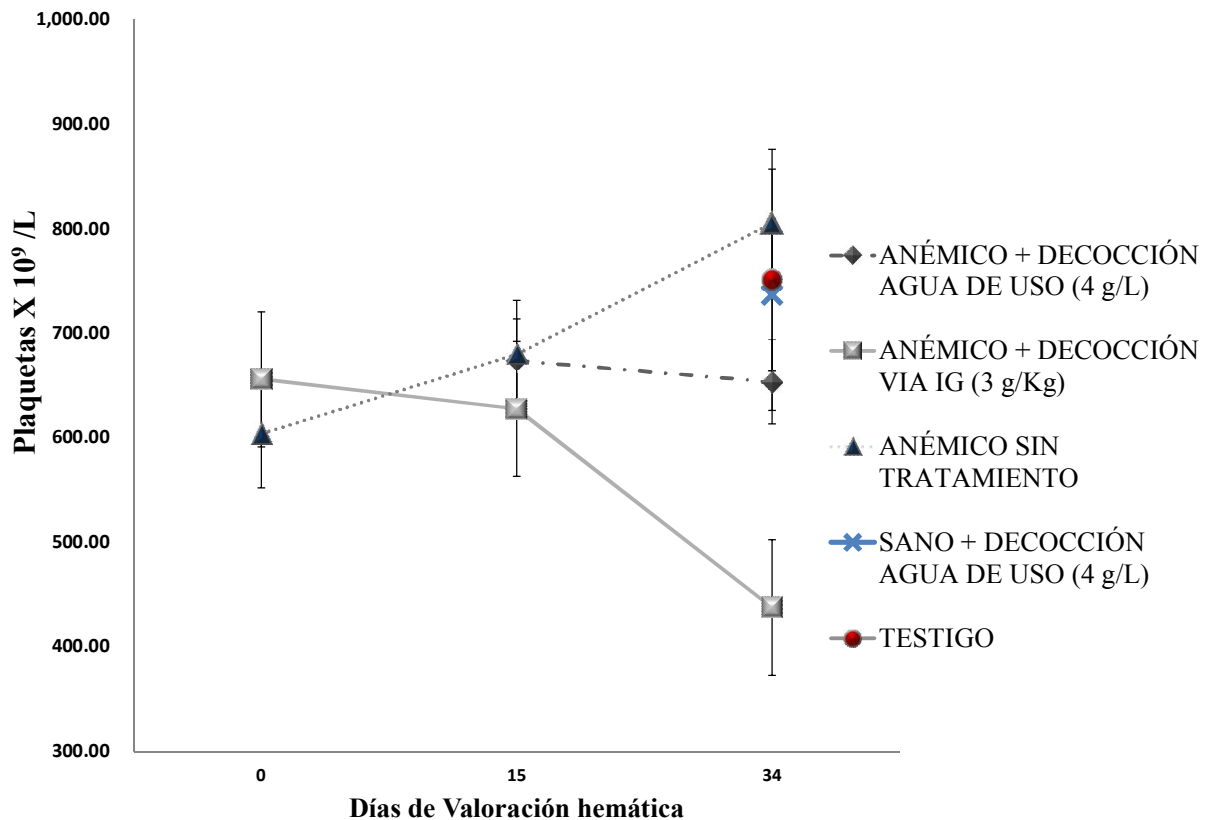


Figura 18. Concentración de plaquetas en ratones hembra anémicas gestantes bajo diferentes tratamientos. n=10 Media \pm E.E. *p<0.05, 0 = Día inicial de inducción de anemia, 15= Día final de inducción de anemia y 34= Día 17 de gestación y final del experimento.

En la Figura 19 se observa que al día 15, la concentración de eritrocitos disminuyó significativamente únicamente en el grupo de ratones hembra anémicas sin tratamiento; al día 34 se observa que disminuyó significativamente la concentración de dichas células únicamente en el grupo de ratones hembra anémicas tratados con la decocción vía intragástrica comparando con el día inicial del experimento. Al comparar los valores al día 34 entre los ratones hembra anémicas y sanas observamos que no hay diferencias significativas.

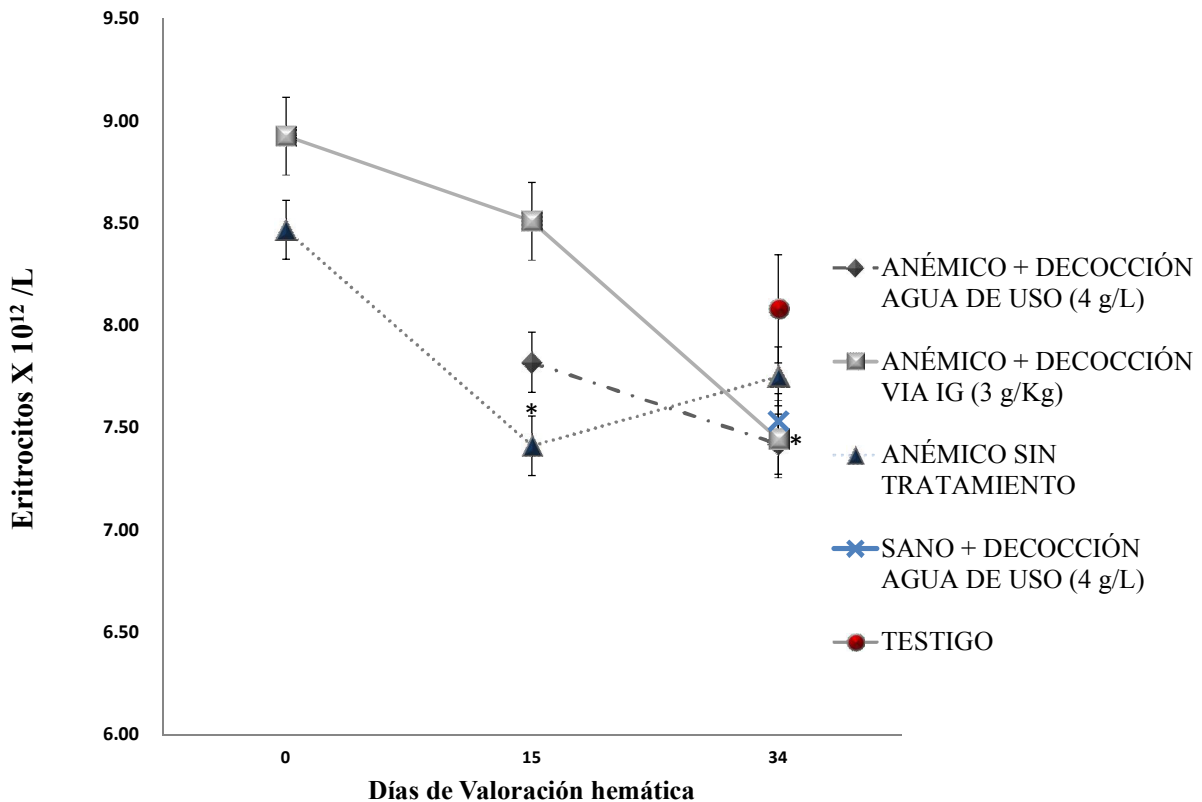


Figura 19. Concentración de eritrocitos en ratones hembra anémicas gestantes bajo diferentes tratamientos. n=10 Media \pm E.E. *p<0.05, 0=Día inicial de inducción de anemia, 15= Día final de inducción de anemia y 34= Día 17 de gestación y final del experimento.

En la Figura 20 observamos que la concentración de hemoglobina en ratones hembra a los que se les indujo la anemia disminuyó al día 15 del experimento, valor que no es estadísticamente significativo; sin embargo al día 34 bajó aún más la concentración entre estos ratones hembra comparando con el día inicial. Al comparar la concentración de hemoglobina entre los ratones hembra anémicas y sanas al día 34, no hubo diferencias significativas.

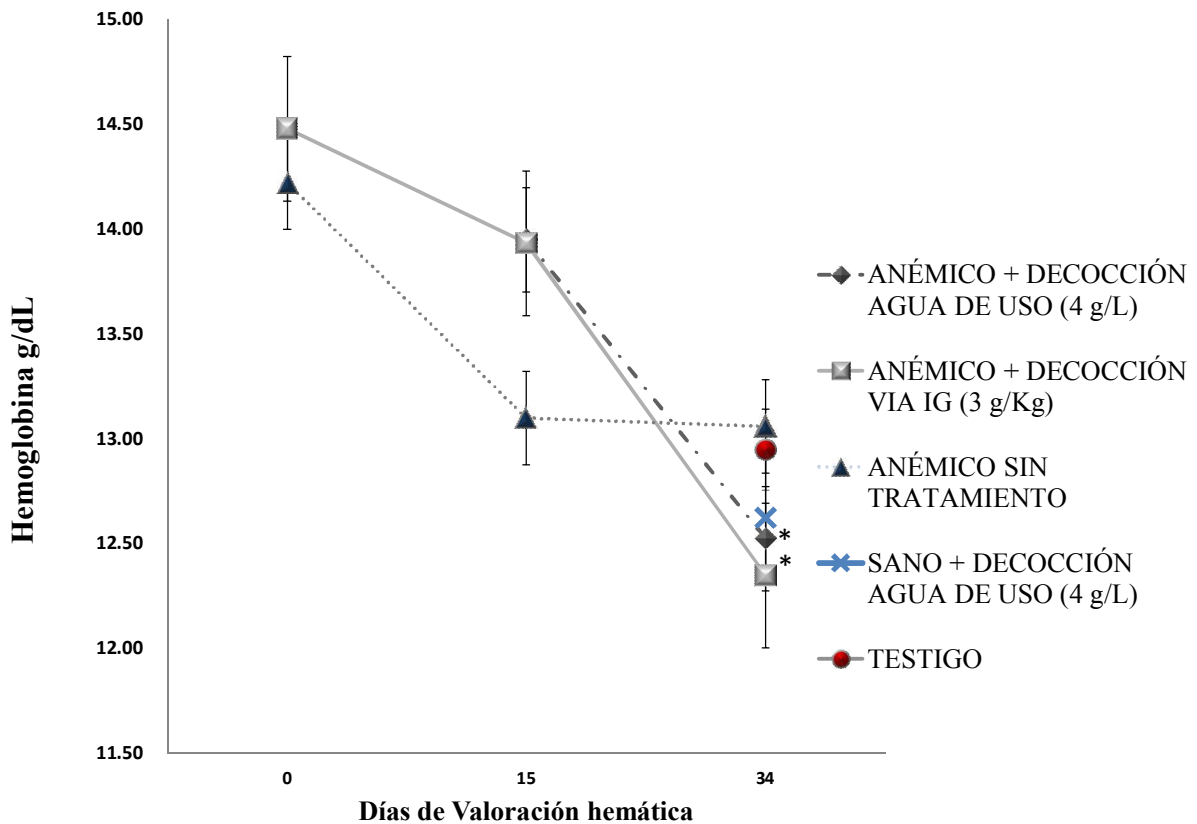


Figura 20. Concentración de hemoglobina en ratones hembra anémicas gestantes bajo diferentes tratamientos. n=10 Media \pm E.E. *p<0.05. 0= Día inicial de inducción de anemia, 15= Día final de inducción de anemia y 34= Día 17 de gestación y final del experimento.

En la Figura 21 observamos el valor del hematócrito, el cual disminuyó al igual que la concentración de eritrocitos y hemoglobina en los ratones hembra a los que se les indujo anemia, al comparar los valores del hematocrito al día 34 entre los grupos anémicas y sanas, no hay diferencias significativas.

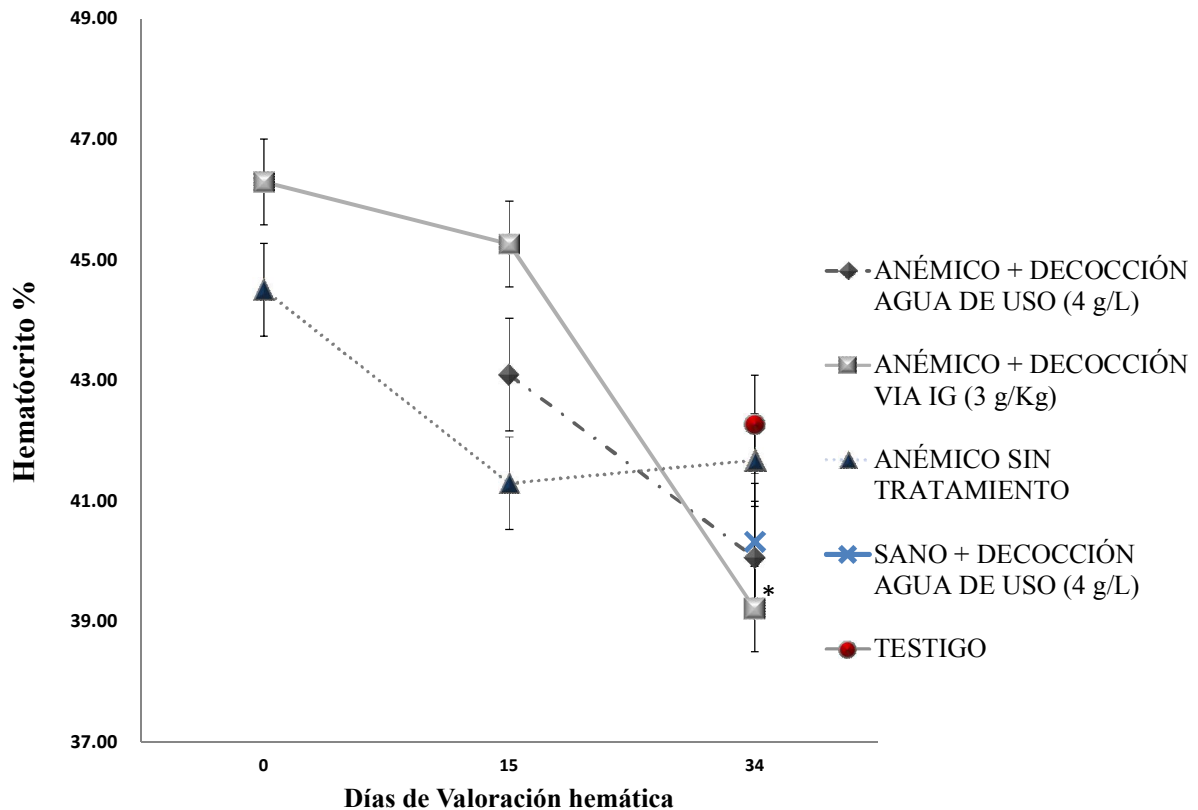


Figura 21. Hematócrito en ratones hembra anémicas gestantes bajo diferentes tratamientos. n=10 Media \pm E.E. *p<0.05. 0= Día inicial de inducción de anemia, 15= Día final de inducción de anemia y 34 = Día 17 de gestación y final del experimento.

6.2.2 Efecto de la decocción de *Urtica dioica* L. var. *angustifolia* Wedd sobre el desarrollo de malformaciones de fetos provenientes de ratones hembra con anemia inducida por la Variante III

Otro objetivo del trabajo fue determinar el efecto de la decocción de la planta sobre la tasa y grado de malformaciones en los productos gestados. Para esto se determinó el número de fetos promedio por hembra, (Cuadro XI), talla (Fig. 22) y peso (Fig. 23), así como el número de malformaciones morfológicamente visibles (Fig. 24).

1. Número de fetos por hembra.

En el Cuadro XI se muestra el número de fetos por hembra de cada uno de los grupos de ratones hembra anémicas y sanas, respecto al tratamiento administrado durante la preñez.

Cuadro XI. Número de fetos por hembra de acuerdo con el tratamiento

Grupos	Número de ratones hembra preñadas	% de hembras preñadas	Tratamiento	Dosis	Número promedio de fetos por hembra
Anémicas	7 de 10	70	Decocción agua de uso	4 g/L	14
	7 de 10	70	Decocción vía ig	0.3 g/Kg	13
	9 de 10	90	Sin tratamiento	-	13
Sanas	7 de 10	70	Decocción agua de uso	4 g/L	13
	5 de 10	50	Sin Tratamiento	-	13

Como se observa en el cuadro anterior, no hay diferencias entre el número de fetos por hembra entre los grupos; sin embargo, en el grupo de ratones hembra anémicas tratados con la decocción como agua de uso, se presentó el caso de un ratón que sólo tuvo dos fetos (el número de fetos por hembra varió de dos a 19 fetos), los cuales a su vez tuvieron peso y talla elevada (1.8 g y 2.7 cm, respectivamente), en comparación con los demás fetos del mismo grupo la cantidad fue mayor, pero de menor peso (Figuras 22 y 23).

2. Talla de los fetos.

En la Figura 22 se muestra que no hubo diferencias significativas en la talla que presentaron los fetos de ratones hembra anémicas tratadas y no tratadas, aunque los fetos de los ratones hembra anémicas sin tratamiento tuvieron menor tamaño que los fetos de los otros grupos.

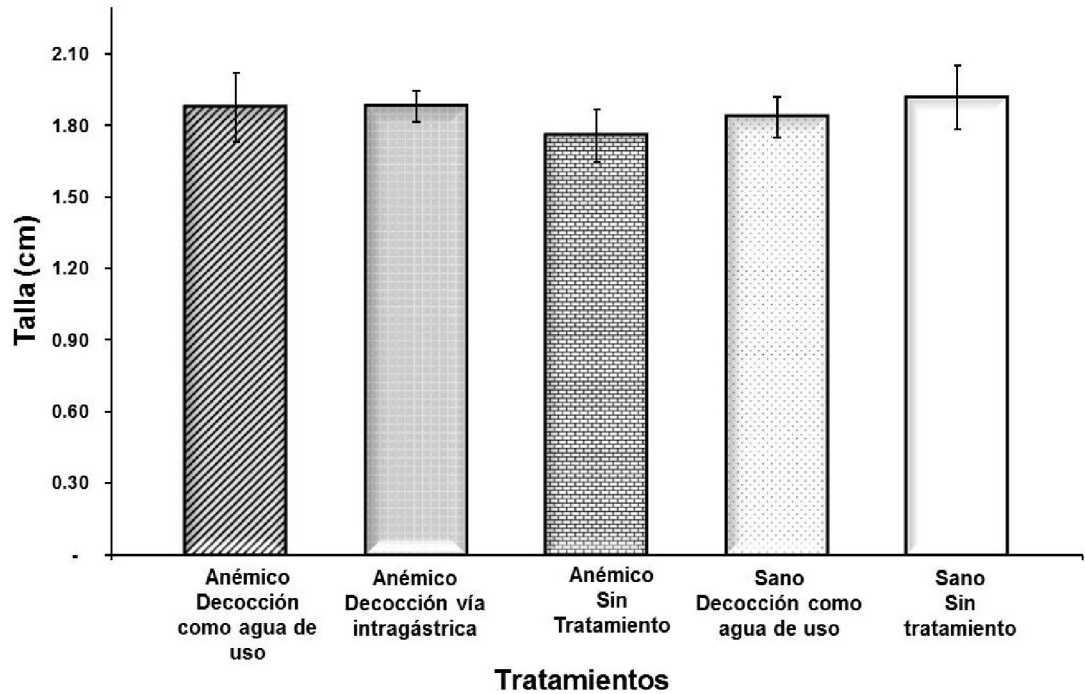


Figura 22. Talla promedio de fetos de hembras con anemia inducida mediante la Variante III bajo diferentes tratamientos.

3. *Peso de los fetos*

De igual manera que con la talla, el peso de los fetos de los ratones hembra anémicas tratados con la decocción como agua de uso, es menor que el de los fetos de los ratones hembra a los que se les administró vía intragástrica la decocción, sin embargo al compararlos con el grupo anémico sin tratamiento el peso es mayor en los tratados. Al comparar los grupos de ratones hembra anémicas (con y sin tratamiento) se observa que el peso de los fetos es menor al de los fetos de los ratones hembra sanas.

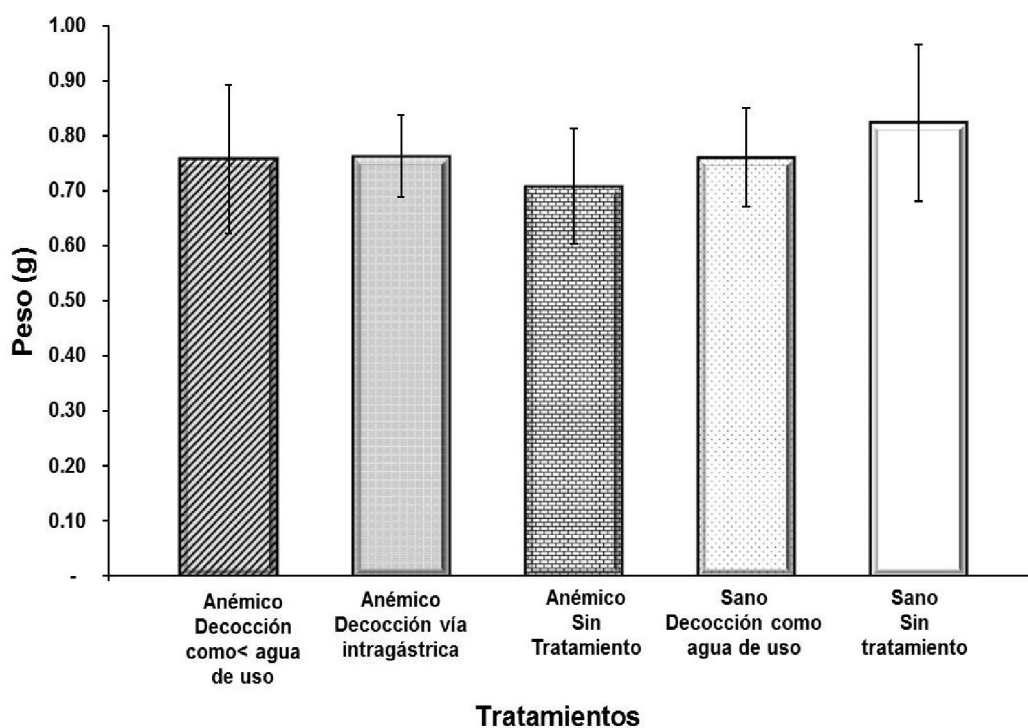


Figura 23. Peso promedio de fetos de hembras con anemia inducida mediante la Variante III bajo diferentes tratamientos.

4. *Malformaciones fetales*

En la Figura 24 observamos que los fetos de los ratones hembra anémicas tratados con la decocción de la planta como agua de uso y los que no recibieron tratamiento fueron los únicos que presentaron malformaciones congénitas, mientras que los fetos de los ratones hembra anémicas tratados con la decocción de la planta administrada vía intragástrica y los fetos de los ratones hembra sanas tratados y sanas no tratados no presentaron ninguna malformación. En las Figuras 25 y 26 observamos algunas de las malformaciones fetales más frecuentes presentes en los grupos antes mencionados.

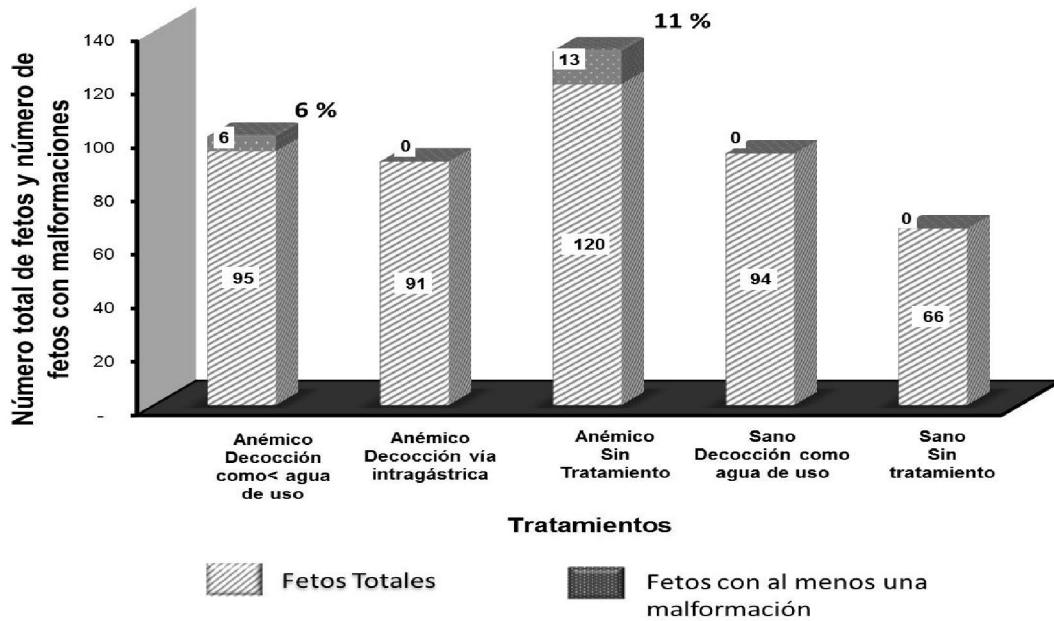


Figura 24. Tasa de malformaciones de fetos de hembras con anemia inducida mediante la Variante III bajo diferentes tratamientos.

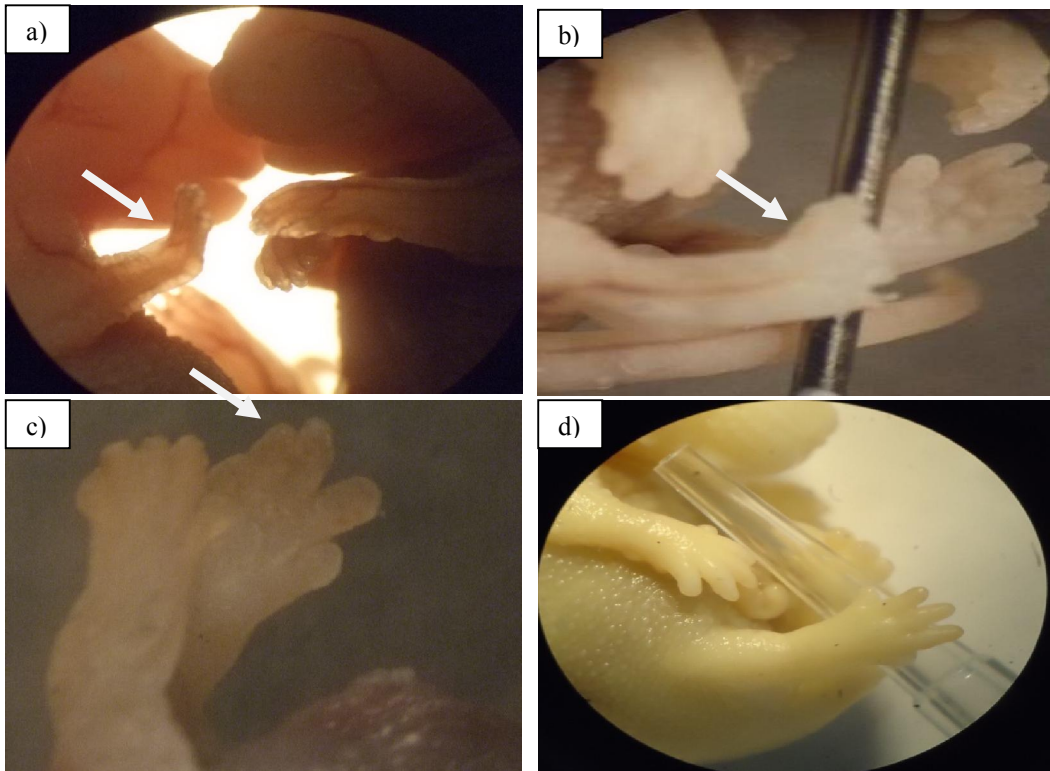


Figura 25. Algunas malformaciones congénitas de los fetos de ratones hembra anémicas tratadas con la decocción de la planta administrada como agua de uso. a) Phocomelia tipo II, b) sinfalangismo en la pata inferior derecha, c) macrodactilia y d) sano

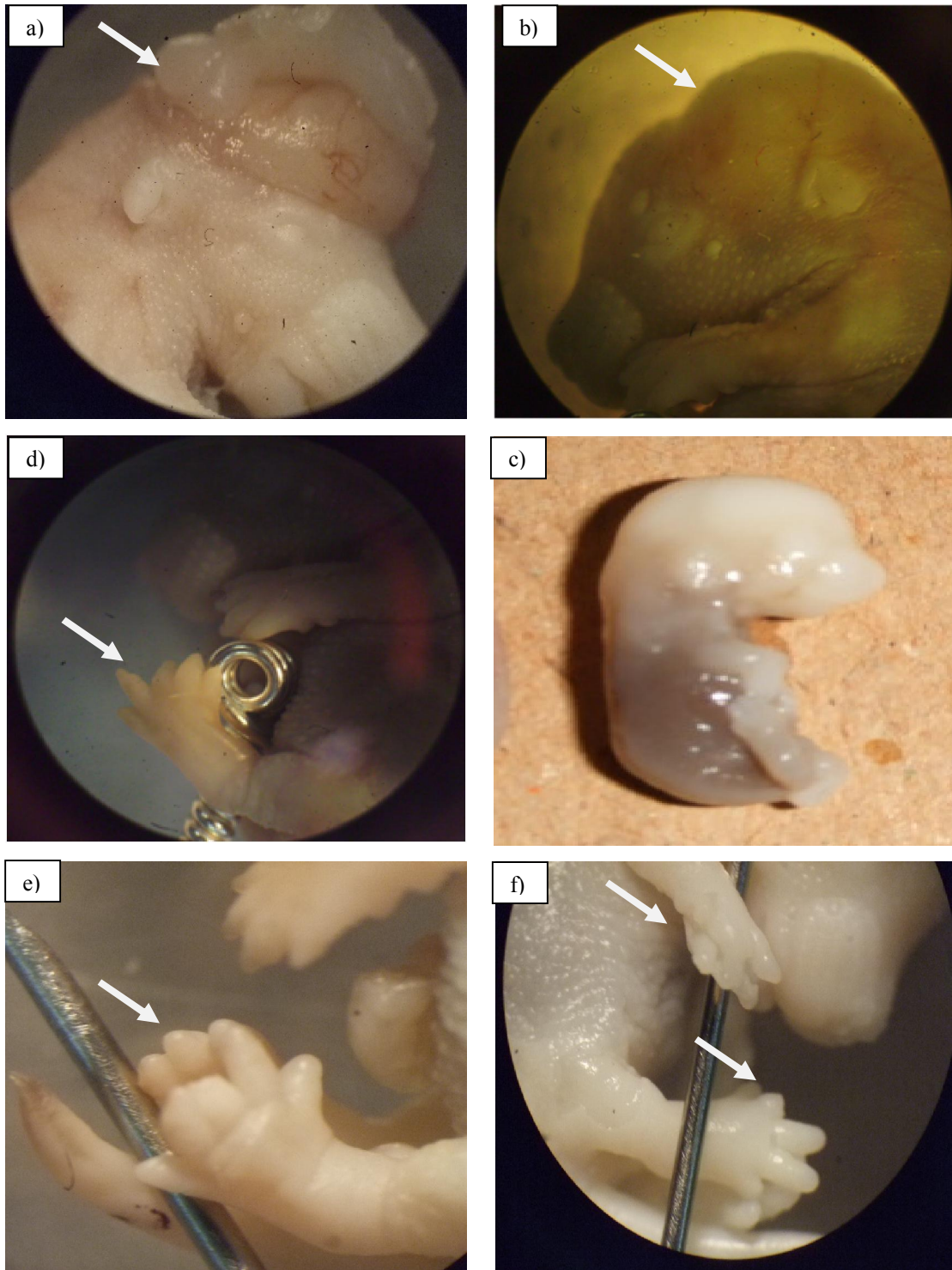


Figura 26. Algunas malformaciones de los fetos de ratones hembra anémicas sin tratamiento. a-b) tipo de holopresencefalia, c) acondroplasia, d-f) sinostosis, sindactilia, f) duplicación de la mano superior derecha.

7. Discusión

Urtica dioica L. variedad *angustifolia* Wedd es una planta ampliamente distribuida en México, recomendada para tratar diversos padecimientos, entre ellos los que afectan la sangre, particularmente anemia en mujeres embarazadas (Martínez, 1979; Mondragón y cols., 2009). Cabe mencionar que no se tienen registros científicos en los que se describan las propiedades que tradicionalmente se le atribuyen o que pudiera compartir con algunas plantas de su género, como es el caso de *Urtica dioica* L., planta ampliamente estudiada en Europa y Asia, de la cual se reportan las siguientes propiedades biológicas: antioxidante, antibacteriana, citotóxica, inmunoestimulante, entre otras; la planta también es recomendada para tratar la anemia, pero tampoco se tienen reportes científicos de tal actividad (Gülcin y cols., 2004; Basaran y col., 1997). De los estudios fitoquímicos realizados con *Urtica dioica* L. se han reportado como componentes: glucopiranosidos, glicoproteínas, proteínas, flavonol glucósidos (Konrad y col., 2000), carotenoides, ácidos grasos (Guil y col., 2003), aceites esenciales, ácido fórmico y ácido acético, histamina, taninos, mucílagos, vitaminas A, B₁, B₂, C, ácido fólico y ácido pantoténico (ESCOP Monographs, 2003).

Con base en la revisión bibliográfica de la planta y científica del género *Urtica*, se propuso determinar: 1) la actividad hematopoyética de los extractos de la planta en cultivos de células hematopoyéticas provenientes de ratones hembra anémicas; 2) establecer un esquema de inducción de anemia y determinar el efecto de la anemia sobre ratones hembra preñadas y sus productos y 3) la actividad de la decocción de la planta sobre la hematopoyesis de ratones hembra hembra preñadas con anemia por deficiencia de hierro y su efecto sobre la tasa de malformaciones fetales.

Ensayos in vitro.

Al determinar el efecto de los extractos hexánico, diclorometánico, metanólico, el residuo acuoso y la decocción de la planta sobre los cultivos de células de bazo y de médula ósea de ratones hembra anémicas, en los cultivos de células de bazo de ratón sano, se observó que con la mayoría de los materiales de prueba no hubo diferencias significativas. Sin embargo, la decocción de la planta y el residuo acuoso mantuvieron la concentración celular en niveles normales y en algunos casos superaron el valor del cultivo testigo de células de bazo de ratones hembra sanas, lo cual podría atribuirse a un efecto sumatorio estimulante de la decocción en la proliferación de estas células, que provocó un incremento de 40% en la celularidad con las concentraciones de 10 y 100 μg de la decocción, respecto a los valores normales (Gregory y col., 1976). En contraparte y no obstante que los ratones hembra a los que se les indujo anemia presentaron algunos de los signos característicos de ésta, como son: fatiga, palidez, debilidad, confusión motora, adinamia, alopecia, irritabilidad (Ruiz, 2009), no se observó efecto estimulante de la decocción ni de ningún otro de los materiales utilizados en cultivo de bazo, lo cual puede explicarse de la manera siguiente: Primero, que al haber sangrados previos, como mecanismo endógeno de compensación homeostática, existe una sobreproducción de eritrocitos conocida como rebote, el cual tiende después del quinto día de sangrado a disminuir para restablecer los valores normales de eritrocitos y masa eritroide circulante, lo que haría innecesaria la acción eritropoyética de la planta. Aunado a ello está el hecho de que el bazo no repone la masa eritroide en casos de estrés hematopoyético, sino que esto lo efectúa la médula ósea (Ploemacher y col., 1984; Abraham y col., 1989).

En los cultivos de células de médula ósea de ratón sano, ninguno de los materiales de prueba estimuló significativamente la proliferación celular. Sin embargo la decocción de la planta en sus diferentes concentraciones tiende a estimular la proliferación celular. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, pero de igual forma que con las células médula ósea de ratón sano, la decocción de la planta en sus diferentes concentraciones junto con el residuo acuoso a la concentración de 10µg/mL, sobrepasaron los valores del grupo testigo. En este caso, es necesario mencionar que no obstante que no se muestran diferencias estadísticamente significativas, en los cultivos de médula ósea de ratones hembra anémicas, la médula de éstos últimos resultó hipoplásica, lo que se manifestó en menor viscosidad de la muestra, concentración celular y tiempo de coagulación prolongado por deficiencia en la producción de plaquetas en los ratones (Mergenthaler y Dörmer, 1990).

Ensayos in vivo.

En virtud de que la variante III produjo el mayor número de malformaciones y las más extensas, se seleccionó ésta para evaluar la capacidad de *Urtica dioica* L. variedad angustifolia Wedd para restablecer la hematopoyesis y abatir el índice de malformaciones en los productos de gestación.

Al observar los valores de la citometría hemática de los ratones hembra sanas al día 34, éstos también presentaron disminución en la concentración de eritrocitos estadísticamente significativa, pero de igual forma que con la concentración de hemoglobina y valor del hematocrito no hubo diferencias significativas; esto nos informa que durante el embarazo se presenta anemia fisiológica, donde los niveles de hierro se agotan por las demandas del producto de gestación y la madre (Bryant y Larsen, 2009). Con los resultados obtenidos, podemos

observar que en el caso de los ratones hembra anémicas a diferencia de las sanas, disminuyó la cantidad de fetos (12 y 10, respectivamente, Cuadro X), los fetos de las hembras anémicas de la variante III de inducción de anemia tuvieron mayor peso y tamaño que las variantes I y II, incluso llegaban a superar los valores de las hembras sanas. Un aspecto importante es que con la variante III de inducción de anemia, los fetos presentaron mayor número de malformaciones y fueron las más graves, lo cual puede atribuirse a la deficiencia de hierro, ya que este elemento es crucial para el transporte del oxígeno por medio de la hemoglobina a los tejidos en ausencia de éste, se ve comprometida la proliferación, la diferenciación, procesos como la mielogénesis, las funciones del sistema inmunológico, el metabolismo: la absorción y la biotransformación (Ghosh, 2006)

Mediante la Variante III de inducción de anemia, se probó el efecto de la decocción de la planta sobre los ratones hembra anémicas que posteriormente fueron preñadas y el efecto de la anemia sobre los fetos.

Los datos indican que al día 15 de sangrado hay un incremento promedio del 35% en la concentración de leucocitos, incremento que pudiera ser compensatorio a los sangrados previos, sin embargo, al día 34 se presenta recuperación a los niveles casi normales y dado que hay desarrollo de fetos, esta recuperación de leucocitos puede atribuirse a un mecanismo homeostático en el caso de las anémicas sin tratamiento, o bien a un efecto de la decocción de la planta, a la que algunos autores le han determinado actividad leucopoyética (Akbay y col., 2003), así como también actividad mitogénica sobre los linfocitos T (Basaran y col., 1997). Ambos han sido descritos para *Urtica dioica* L., pero no para esta variedad, capacidades que comparte con otros miembros del género *Urtica*.

Por otro lado se observó que la planta no tiene efecto trombopoyético, ya que las plaquetas al final del experimento se encuentran en baja concentración. Esto se presenta en todos los grupos. Sin embargo, en los ratones no tratados con la planta, puede considerarse que la hematopoyesis está dirigida a la recuperación de la madre, mientras que en los ratones tratados con la decocción de la planta, la recuperación parece estar orientada hacia la formación de fetos sanos, más que a la recuperación de la madre. Puede considerarse que la planta tiene actividad mitogénica que se aprecia mejor en los fetos de las madres tratadas con la planta ya que como resultado de ello, los fetos logran un desarrollo sin malformaciones visibles, en tanto que los fetos de madres anémicas sin tratamiento presentan malformaciones de mayor magnitud, que pueden incidir y generar fetos incompletos, cianóticos o con alteraciones visibles, en las extremidades anteriores y posteriores, en el encéfalo. Es importante resaltar que con esta variedad de *Urtica dioica* L., no se observan malformaciones en fosas nasales, como lo reportaron Velasco y col., 2009, para *Urtica chamaedroides*.

Todos los grupos presentaron baja concentración de eritrocitos al día final del experimento, paradójicamente, el grupo anémico sin tratamiento presentó valores similares a los controles sanas, sin embargo aunque esto pudiera representar una recuperación homeostática del nivel de eritrocitos, esta respuesta está vinculada con la recuperación de la madre más que con el desarrollo de los fetos, ya que en este lote es donde se presenta el mayor número de malformaciones que de llegar a término hubiesen nacido muertos o con una vida deletérea. El mismo comportamiento se observa con los parámetros eritroides: concentración de hemoglobina y hematócrito, orientado todo esto a la recuperación de la madre .

Debido a que se trabajó con un extracto crudo, no es posible señalar a un grupo o familia de compuestos como responsables de la recuperación de los ratones hembra anémicas preñadas y sobre todo de la disminución en la tasa de malformaciones en los productos de gestación. Sin embargo, el análisis fitoquímico preliminar que se realizó con la decocción presentó compuestos polifenólicos y flavonoides. Se ha reportado que los flavonoides y sus derivados dentro de las plantas se encuentran la mayoría de las veces, ligados a moléculas de carbohidratos. A este tipo de combinación núcleo flavonoide básico más una o varias unidades de carbohidratos, se les denomina glucósidos, y cuando no tienen ligadas moléculas de carbohidratos se las denomina agliconas flavonoides (Marcano y Hasegawa, 2002). Estos carbohidratos son los que determinan la célula blanco y el efecto que va a tener este flavonoide sobre la proliferación celular, ya que encontramos que algunos flavonoides como la genisteína inhiben de forma selectiva a la familia de proteínas tirosininasas, necesarias para la fosforilación de sustratos que a su vez acompañan la proliferación celular particularmente linfocitos T (Akiyama y col., 1987; Nynca y col., 2013). Debido a que en nuestro preparado es una solución acuosa y que en ella pueden ser solubles los flavonoides glicosilados, es posible que la actividad estimulante de los flavonoides actué en las hembras preñadas que recibieron la decocción de la planta y que los flavonoides presentes en ésta, estimulen la proliferación celular para lograr fetos sin malformaciones o bien o contribuir a disminuir la tasa de estas respecto a los fetos provenientes de ratones no tratados.

En la medicina tradicional se hace referencia al uso y efectividad de esta planta contra la anemia por su alto contenido de hierro, lo cual no se ha confirmado experimentalmente. En nuestro experimento se utilizó sulfato ferroso como control para la eritropoyesis (administrado vía subcutánea 0.2g/kg), en este grupo el número promedio fue de 15 fetos por hembra y no se

observaron malformaciones fetales. Estos resultados no se muestran debido a que el número de la muestra al final del experimento disminuyó de diez hembras preñadas a cinco, sólo se tuvieron resultados de la citometría hemática del día 15, donde se observó que disminuyó la concentración de eritrocitos significativamente, lo cual indica que se logró inducir la anemia en este grupo. Sin embargo, es importante resaltar que de 73 fetos provenientes de madres anémicas, ninguno presentó malformaciones fetales, lo cual puede atribuirse al sulfato ferroso, ya que como se sabe el hierro es importante para la fisiología celular en general (Collard, 2009). Particularmente en la gestación, el organismo de la mujer demanda una mayor cantidad de hierro, principalmente en el último trimestre del embarazo, período en el que los requerimientos de este mineral aumentan hasta seis veces con respecto a los de la mujer no embarazada, a las necesidades de hierro de la madre se agregan los requerimientos de hierro para el desarrollo y crecimiento de los tejidos fetales, donde más del 80% de los requerimientos de hierro durante el embarazo son destinados para el crecimiento exponencial del feto y la placenta (Kalaivani, 2009, Levy y col., 2005). Ante esta situación, las fuentes alimentarias no alcanzan a cubrir los requerimientos diarios de hierro, por lo que el riesgo de desarrollar anemia se incrementa, lo cual está relacionado con alto índice de partos prematuros, óbitos fetales, bebés de bajo peso al nacer, en niños se ve afectado el desarrollo cognitivo, etc. Como resultado, la suplementación con hierro durante el embarazo es una práctica común en todo el mundo.

8. Conclusiones

- La decocción de la planta no tiene efecto hematopoyético *in vitro* sobre las células de bazo y de médula ósea de ratón anémico.
- La decocción de la planta como agua de uso no contribuye a recuperar la hematopoyesis plenamente en ratones hembra preñadas anémicas.
- La decocción de la planta evita el desarrollo de malformaciones en los productos gestados de ratones hembra preñadas anémicas.
- La administración de la decocción por vía intragástrica es más efectiva para evitar las malformaciones que la administración como agua de uso.
- La administración de la decocción por vía intragástrica evitó el desarrollo de malformaciones en forma similar al sulfato ferroso administrado vía subcutánea.

BIBLIOGRAFÍA

- Abraham NG, Nelson JC, Ahmed T, Konwalinka G, Levere RD. (1989). Erythropoietin controls heme metabolic enzymes in normal human bone marrow culture. *Exp Hematol.* 17(8): 908-13.
- Aguilar A, Camacho JR, Chino S, Jácquez O, López ME. (1994). Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. IMSS. México.
- Akbay P, Basaran AA, Undeger U, Basaran N. (2003). *In vitro* immunomodulatory activity of flavonoid glycosides from *Urtica dioica* L. *Phytother Res.* 17: 34-37
- Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M, Fukami Y. (1987). Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem.* 262: 5593–5595
- Amo S. (1979). Plantas Medicinales del Estado de Veracruz. Instituto Nacional de Investigación sobre Recursos Bióticos (INIREB). Xalapa, Veracruz. México.
- Andrews NC. (2000). Iron homeostasis: insights from genetics and animal models. *Nat Rev Genet.* 1: 208-17.
- Argueta VA, Cano MA y Rodarte ME. (1994). Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana I. Instituto Nacional Indigenista. p. 413.
- Baiocchi N. (2006). Anemia por deficiencia de hierro. *Rev. Peruana Pediatría.* **59**: 20-27.
- Basaran AA, Ceritoglu I, Undeger U, Basaran N. (1997). Immunododulatory activities of some Turkish medicinal plants. *Phytother Res.* 11: 609-611.
- Bashiri A, Burstein E, Sheiner E, Mazor M. (2003). Anemia during pregnancy and

- treatment with intravenous iron: review of the literature. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 10: 2-7.
- Baytelman B. (1993). *Acerca de plantas y curanderos. Etnobotánica y antropología médica del Estado de Morelos. Instituto Nacional de Antropología e Historia. México.*
- Bobadilla J, Langer A. (1990). La mortalidad infantil en México, un fenómeno de transición. *Rev Mex Sociol.* 1: 111-131.
- Bryant C y Larsen S. (2009). Anaemia in pregnancy. *Blood.* 11 (3): 17 -18
- Cáceres CJR, Flores BJ, Hernández MJ, López MR y cols. (1999). Las citocinas en la hematopoyesis y el sistema inmunológico: mecanismos celulares y moleculares. Ed. Plaza y Valdés. México. 15-52.
- Cano ALM. (1997). *Flora medicinal de Veracruz. Inventario etnobotánico. Universidad Veracruzana. México.*
- Chevallier A. (1996). *The encyclopedia of medicinal plants. DK Publishing Inc. New York.* 145
- Civin CI, Gore SD. (1993). Antigenic analysis of hematopoiesis: a review. *J Hematother.* 2:137-144
- Collard KJ. (2009). Iron homeostasis in the neonate. *Pediatrics.* 123:1208–1216
- Dallman PR, Reeves JD. (1984). Laboratory diagnosis of iron deficiency. In: Stekel A, editor. *Iron nutrition in infancy and childhood. New York: Raven Press.* 11-43.
- Dallman PR. (1991) Hierro. In: Organización Panamericana de Salud/Instituto

- Internacional de Ciencias de la Vida, editor. Conocimientos actuales sobre nutrición. Washington: OPAS. 277-88.
- ESCOP Monographs. (2003). The Scientific Foundation for Herbal Medicinal Products. Ed. Thieme. Stuttgart, 2.^a ed. 521-527.
- Espinosa FJ, Sarukhán J. (1997). Manual de malezas del Valle de México. Claves, descripciones e ilustraciones. Universidad Nacional Autónoma de México. Fondo de Cultura Económica. México, D. F.
- Falade OS, Otemuyiwa IO, Oladipo A, Oyedapo OO, Akinpelu BA, Adewusi SR. (2005). The chemical composition and membrane stability activity of some herbs used in local therapy for anemia. J Ethnopharmacol. 102: 15-22.
- Farzami B, Ahmadvand D, Vardasbi S, Majin FJ, Khaghani S. (2003). Induction of insulin secretion by a component of *Urtica dioica* leave extract in perfused Islets of Langerhans and its *in vivo* effects in normal and streptozotocin diabetic rats. J. Ethnopharmacol. 89: 47-53
- Freire Wb. (1998). Iron-deficiency anemia: Paho/Who Strategies To Fight It. Salud Pública Mex. 40(2):199-205.
- Gautam CS, Saha L, Sekhri K, Saha PK. (2008). Iron deficiency in pregnancy and the rationality of iron supplements prescribed during pregnancy. Medscape J Med. 10: 283.
- Greer JP, Foerster J, Rodgers GM, Pataskevas F, Glader B, Arber DA, Jr. Means RT. (2009). Wintrobe's Clinical Hematology. Philadelphia: Lipincott, Williams and Wilkins. p. 79-98; 117-121; 779-830.

- Gregory CJ, Tepperman AD, McCulloch EA y col. (1976). Erythropoietin progenitors capable of colony formation in culture: response of normal and genetically anemic W/W^w mice to manipulations of erythron. *J Cell Physiol.* 84:1-12.
- Goldenberg RL, Tsunenobu T, DuBard MA, Johnston KE, Cooper RL y Gutiérrez RM, Ortíz BB, Chassin A, Carrillo GA, Jaloma CJ y Fierro MML. (1997). Prevalencia de anemia en mujeres con embarazo normal de una población urbana. *Rev. Med. Hospital General de México.* 1(60), 12428.
- Ghosh K. (2006). Non haematological effects of iron deficiency - A perspective. *Indian J Med. Sci.* 60:1:30-37.
- Guil, GJL, Reboloso FM, Isasa, ME. (2003). Fatty acids and carotenoids from Stinging Nettle (*Urtica dioica* L.). *J. Food Composition and Analysis.* 16:111-119
- Gülçin I, Lifrevioglu O I, Oktay M, Buyukokuroglu ME. (2004). Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). *J. Ethnopharmacol.* 90: 205-215.
- Hagar W, Theil E, Vivhinsky E. (2002). Pediatric Hematology. Diseases of iron metabolism. *Pediatr Clin North Am.* 49: 893-899.
- Harmening DM. (1992). *Clinical hematology and fundamentals of hemostasis.* F. A. Davis Co. 2nd Edition. Philadelphia. pp. 54-91.
- Hernández N, Hernández GMT. (1992). Enfermedades del sistema eritrocitario Anemias. En: Farreras Valentí P Rozman C, ed. *Medicina interna.* 12^o edición. Barcelona: Ediciones Doyma. 1617-1657.

- INEGI. Censo de Población y Vivienda, 2005. Disponible en: <http://inegi.gob.mx>
- Jackson CW, Steward SA, Chenaille JP, Ashmun RA, McDonald TP. (1990). An analysis of megakaryocytopoiesis in the C3H mouse: an animal model whose megakaryocytes have 32N as the modal DNA class. *Blood* 76: 690-696.
- Kalaivani K. (2009). Prevalence & consequences of anaemia in pregnancy. En: *Indian J Med Res.* 627-633
- Kavalali GM. (2003). An introduction to *Urtica* (botanical aspects). In: Kavalali (Ed.). *Urtica. Therapeutic and nutritional aspects of Stinging Nettle. Medicinal and aromatic plants—Industrial Profiles.* Taylor and Francis Co. London. p. 1-11.
- Konrad L, Muller HH, Lenz C, Laubinger H, Aumuller G, Chius JJ. (2000). Antiproliferative effect on human prostate cancer cells by a stinging nettle root (*Urtica dioica*) extract. *Planta Med.* 66. 44-47.
- Krzeski T, Kazon M, Borkowski A, Kuczera J. (1993). Combined extracts of *Urtica dioica* and *Pygeum africanum* in the treatment of benign hyperplasia: double-blind comparison of two doses. *Clinical Therapy.* 6:1011–1020.
- Letsky EA. (2001). Maternal anaemia in pregnancy, iron and pregnancy a haematologist's viewpoint. *Fetal and Maternal Medicine Review.* 12(3):159 75.
- Levy A, Fraser D, Katz M, Mazor M, Sheiner E. (2005). Maternal anemia during pregnancy is an independent risk factor for low birthweight and preterm delivery. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 122(2):182-6.
- Lichius JJ, Muth C. (1997). The inhibiting effect *Urtica dioica* root extracts on experimentally induced prostatic hyperplasia in the mouse. *Planta Med.* 63(4):

307-310

Lindenbaum J. Estudio de las anemias. (1992). Ed. Cecil tratado de medicina interna.

19º edición. Filadelfia: W. B. Saunders Company. 1: 955-965.

Lluis V, Lluis J. (1997). Manual de técnicas de laboratorio en Hematología. Masson.

2ª ed. Madrid, España.

Lynch RS, Hurrell RF, Bothwell TH. (1993). Iron EDTA for Food Fortification

International nutritional anemia consultative group (INACG). 1-49.

Marcano D, Hasegawa M. (2002). Fitoquímica orgánica. 2da. ed. Consejo de

Desarrollo Científico y Humanístico. Venezuela. p. 127

Mark W. (1995). Regulación del metabolismo del hierro. Deficiencia de hierro en la

infancia. Anales Nestlé.53:1-11.

Marshall A, Lichtman TJK, Uri S, Kenneth K, Josef TP. (2010). Williams

Hematology. Ed. McGraw-Hill Companies. 4-19

Martínez SH, González CT, Flores MR, Rivera DJ, Lezama MA, Sepúlveda AJ.

(1995). Anemia en la mujer en edad reproductiva. Salud Pública Méx 37: 108-119.

Martínez M. (1967). Las plantas medicinales de México. 6ª edición. Ediciones Botas.

México.

Martínez M. (1979). Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas.

Fondo de Cultura Económica. México, D.F.

Martins IS, Alvarenga AT, Siquetra A A, Szarfarc SC, Lima PD. (1987) As

determinações biológica e social da doença: um estudo de anemia ferropriva.

- Rev. Saude Publica 21(2), 73-89.
- Martins IS, Meléndez GV, Cervato A M. (1999). Estado nutricional de grupos mentosociais da área metropolitana de São Paulo, Brasil. Cad. Saúde Publica. 15(1), 71-78.
- Mckenzie S. (2000). Hematología clínica. 2da ed. Ed. Manual moderno. México, DF. 146-329.
- Mekhfí H, El MH, Legssyer A, Bnouham M, Aziz M, Atmani F, Remmal A, Ziyat A. (2004). J. Ethnopharmacol. 94: 317-322.
- Mergenthaler HG, Dörmer P. (1990). Hemopoiesis in human micro long-term bone marrow culture with preformed extracellular matrix. Haematologica. 75(1):12-6.
- Mondragón PJ, Heike V, Tenorio LP (2009). Malezas de México, Ficha – *Urtica dioica*. Fecha de acceso: 22-Mzo-2011. Disponible en:
<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/urticaceae/urtica-dioica/fichas/pagina1.htm>
- Muñoz M, Villar I, García-Erce JA. (2009). An update on iron physiology. World J Gastroenterol. 7: 4617-26.
- Nynca A, Nynca J, Wąsowska B, Kolesarova A, Kołomycka A, Ciereszko RE. (2013). Effects of the phytoestrogen, genistein, and protein tyrosine kinase inhibitor-dependent mechanisms on steroidogenesis and estrogen receptor expression in porcine granulosa cells of medium follicles. Domest Anim Endocrinol. Jan;44(1):10-8. doi: 10.1016/j.domaniend.2012.07.002. Epub 2012 Aug 10.
- Nuñez U. (1988). La placenta de madres desnutridas. Salud Pú. Méx. 30: 54-67.

- O'Donnell AM, Viteri FE, Carmuega E. (1997). Deficiencia de hierro, desnutrición oculta en América Latina. Buenos Aires Argentina. CESNI. 13-30.
- Olivares GM y Walter KT. (2003). Consecuencias de la deficiencia de hierro. Rev. Chi Nutr. [Online]. 2003, Vol.30, N.3 [Citado 2013-02-10], Pp. 226-233. Disponible en: Disponible En:
<http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182003000300002&lng=es&nrm=iso>. Issn 0717-7518. Doi: 10.4067/S071775182003000300002.
- Oliveira I. (1990). Anemia por deficiência de ferro. In: Figueira F, Ferreira OS, Alves JGB, Instituto Materno Infantil de Pernambuco, editors. Nosologia Geral. Rio de Janeiro: MEDSI. 543-8.
- Osorio SG, Liendo PF, Anguita CT, Ríos LE, Gutiérrez CJ, Vargas PL. (1986). Hematología, diagnóstico y Terapéutica. Ed. Mediterráneo. 25-32.
- Palomero G, Vásquez M, Vega J, Naves F, Rodríguez C. (1998). Lecciones de embriología. Asturias, Servicio de Publicaciones de la Universidad de Oviedo. p. 282-296
- Pignon JM y Rochant H. (1993) Anémies chroniques outils et démarche diagnostiques. La Revue du Patricien. 43(11): 1342-1348.
- Ploemacher RE, Brons RH, Nikkels PG. (1984). The response of Slj/+ mice to experimental manipulation of the erythron. Exp Hematol. 12(10):753-8.
- Revez L, Gyte GML, Cuervo LG. (2001). Tratamientos para la anemia ferropénica en el embarazo. Cochrane Database Syst Rev. 2: CD003094.

- Rifkin R, Marks A, Bank A, Kaplan K, Ellison R, Lindeanbaum J. (1988). Hematología clínica. Interamericana - Mc Graw Hill. 3ra Ed. México, D. F.
- Rivera DJ, Shamah LT, Villalpando HS, González CT, Hernández PB, Sepúlveda J. (2001). Encuesta Nacional de Nutrición 1999. Estado nutricional de niños y mujeres en México. Cuernavaca Morelos, México: Instituto Nacional de Salud Pública.
- Ruiz AG. (1998). Fundamentos de hematología. 2ª. edición, México, D.F., Ed. Médica Panamericana. p. 45-49.
- Ruiz AG. (2009). Fundamentos de hematología, 4ª. edición. México D.F., Ed. Médica Panamericana. p. 33-35
- Selva PJ. (2011) Anemia en el embarazo. Rev Hematol Mex.12(Supl. 1): S28-S31
- Shamah LT, Villalpando S, Rivera JA, Mejía F, Camacho M, Monterubio E. (2003). Anemia in Mexican women: A public health problem Salud Pública Mex. 45:S499-S507.
- Sommer RG, Sinner B. (1996) ID3 23 in the therapy of rheumatic disease. Do you know the new cytokine antagonists? *Therapiewoche*. 46:44-49.
- Sotelo E. (2003). Tesis: Correlación de las reservas de ferritina materna y neonatal. Universidad de Colima, Col.
- Stoltzfus RJ. (2001). Iron-deficiency anemia: reexamining the nature and magnitude of the public health problem. Summary: implications for research and programs. J. Nutr. 131(Suppl.2): 697S–701S.
- Tahri A, Yamani S, Legssyer A, Aziz, Mekhfi H, Bnouham M, Ziyyat A. (2000). Acute diuretic, natriuretic and hypotensive effects of a continuous perfusion of

- aqueous extract of *Urtica dioica* in the rat. J. Ethnopharmacol. 73: 95-100.
- Theml H, Diem H y Haferlach T. (2004). Color Atlas of Hematology: Practical Microscopic and Clinical Diagnosis. Thieme Medical Publishers. New York. 1-8
- Torok-Strob B. (1988). Cellular interactions. Blood. 72: 373-385
- Trabulse E. (1983). Historia de la ciencia de México. CONACYT/Fondo de Cultura Económica. México.
- Tsiftoglou AS, Vizirianakis IS, Strouboulis J. (2009). Erythropoiesis: model systems, molecular regulators, and developmental programs. IUBMB Life. 61(8):800-30. Review.
- UNICEF. (2006). Organización Panamericana de la Salud Situación de Deficiencia de Hierro y Anemia. Panamá, República de Panamá. Ministerio de Salud Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia. Disponible en:
(UNICEF).<http://www.unicef.org/panama/spanish/Hierro.pdf>. [Citado 2010-02-06]
- Velasco LR, Yescas MMA, Gallegos CA, Arritia CLM, Zamora GR, Tapia AR. , Cols. (2009). Empleo de *Urtica chamedryoides* (Chichicastle) en el tratamiento de ratas con anemia ferropénica y su efecto sobre los productos de gestación. Bioquímica. 34: 76.
- Vera L, Quintal R, González R, Vázquez G. (2009). Prevalencia de anemia ferropénica en mujeres embarazadas rurales en Valladolid, Yucatán, México. Ginecol Obstet Mex. 77: 544-549.
- Villaseñor RJ, Espinosa G. (1998). Catálogo de malezas de México. Universidad

- Nacional Autónoma de México. Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario.
Fondo de Cultura Económica. México, D.F.
- Vives CJL y Aguilar BJL. (1997). Manual de técnicas de laboratorio en hematología.
Masson. 2ª edición. Madrid, España.
- West AR, Oates PS. (2008). Mechanisms of heme iron absorption: current questions
and controversies. *J Gastroenterol Hepatol.* 23: 150-8.
- Williams MD, WhebyMS. (1992). Anemia in pregnancy. *Medical Clinics of North
America.* 76:631-47. [MedLine: 1992252444].
- Wintrobe MM. (1981). *Clinical Hematology.* 8th ed. Philadelphia. Lea & Febiger.
1981, p. 35
- World Health Organization. (1992). The prevalence of anaemia in women: a tabulation
of available information.
- World Health Organization. (2001). Iron deficiency anaemia assessment, prevention,
and control: a guide for programme managers. United Nations Children's Fund,
United Nations University, World Health Organization. Ref no.
WHO/NHD/01.3. 114
- World Health Organization. (2006). Mortalidad fetal, neonatal y perinatal. Situación de
Salud en las Américas.[fecha de acceso 15 de agosto de 2008].URL d Disponible
en: [http://www.nacerlatinoamericano.org/_Archivos/_Menu-
principal/05_Preguntas/Temas/Respuesta/agosto/MortMaternaInfantilPerinatal.p
df](http://www.nacerlatinoamericano.org/_Archivos/_Menu-principal/05_Preguntas/Temas/Respuesta/agosto/MortMaternaInfantilPerinatal.pdf)
- World Health Organization. (2008). Worldwide prevalence of anaemia 1993–2005:

WHO global database on anaemia. Disponible en:

http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241596657_eng.pdf

Zhang AS, Enns CA. (2008). Iron homeostasis: recently identified proteins provide insight into novel control mechanisms. *J Biol Chem.* 9: 711-5.