



ugr | Universidad
de **Granada**

**TÍTULO. *Medicago sativa*: mejora de la
productividad y nuevos aspectos de su valor
nutritivo y funcional.**

**TITLE. *Medicago sativa*: yield improvement and
new approaches of its nutritive and functional
value.**

Doctoranda: Rosario Martínez Martínez

Departamento de Fisiología

Facultad de Farmacia

Universidad de Granada

Directores:

María López-Jurado Romero de la Cruz

Pilar Aranda Ramírez

Jesús María Porres Foulquie

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autora: Rosario Martínez Martínez
ISBN: 978-84-9125-142-2
URI: <http://hdl.handle.net/10481/40310>

La doctoranda D^a Rosario Martínez Martínez y los directores de la tesis D^a María López – Jurado Romero de la Cruz, D^a Pilar Aranda Ramírez y D. Jesús María Porres Foulquie al firmar esta tesis doctoral, declaran que el trabajo ha sido realizado por la doctoranda bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 5 de mayo de 2015.



Fdo. María López-Jurado Romero de la Cruz



Fdo. Pilar Aranda Ramírez



Fdo. Jesús M. Porres Foulquie



Fdo. Rosario Martínez Martínez

MEMORIA QUE PRESENTA PARA ASPIRAR AL GRADO DE DOCTOR EN NUTRICIÓN
HUMANA POR LA UNIVERSIDAD DE GRANADA LA LICENCIADA
D^a. ROSARIO MARTÍNEZ MARTÍNEZ.

ESTA TESIS DOCTORAL INTERNACIONAL HA SIDO REALIZADA BAJO LA DIRECCIÓN DE:

Prof. Dra. María López-Jurado Romero de la Cruz

Prof. Dr. Jesús María Porres Foulquie

Prof. Dra. Pilar Aranda Ramírez

Lda. Rosario Martínez Martínez

Aspirante al Grado de Doctor

Granada, 5 de mayo de 2015



DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA
UNIVERSIDAD DE GRANADA

**MARÍA LÓPEZ-JURADO ROMERO DE LA CRUZ, CATEDRÁTICA DE
FISIOLÓGIA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA,**

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral Internacional titulada: "***Medicago sativa: mejora de la productividad y nuevos aspectos de su valor nutritivo y funcional***", que presenta Doña Rosario Martínez Martínez al superior juicio del Tribunal que designe la Universidad de Granada, ha sido realizada bajo mi dirección durante los años 2011-2015, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autora en condiciones tan aventajadas que le hacen merecedora al Título de Doctora, siempre y cuando así lo considere el citado Tribunal.

Fdo. María López-Jurado Romero de la Cruz.

En Granada, 5 de mayo de 2015



DEPARTAMENTO DE FISILOGIA
UNIVERSIDAD DE GRANADA

**PILAR ARANDA RAMÍREZ, CATEDRÁTICA DE FISILOGÍA DE LA
UNIVERSIDAD DE GRANADA,**

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral Internacional titulada: "***Medicago sativa: mejora de la productividad y nuevos aspectos de su valor nutritivo y funcional***", que presenta Dña Rosario Martínez Martínez al superior juicio del Tribunal que designe la Universidad de Granada, ha sido realizada bajo mi dirección durante los años 2011-2015, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autora en condiciones tan aventajadas que le hacen merecedora al Título de Doctora, siempre y cuando así lo considere el citado Tribunal.

Fdo. Pilar Aranda Ramírez.

En Granada, 5 de mayo de 2015



DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA
UNIVERSIDAD DE GRANADA

JESÚS MARÍA PORRES FOULQUIE, PROFESOR TITULAR DE
FISIOLÓGIA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA,

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral Internacional titulada: "*Medicago sativa: mejora de la productividad y nuevos aspectos de su valor nutritivo y funcional*", que presenta Dña Rosario Martínez Martínez al superior juicio del Tribunal que designe la Universidad de Granada, ha sido realizada bajo mi dirección durante los años 2011-2015, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autora en condiciones tan aventajadas que le hacen merecedora al Título de Doctora, siempre y cuando así lo considere el citado Tribunal.

Fdo. Jesús María Porres Foulque.

En Granada, 5 de mayo de 2015

El trabajo de investigación que constituye esta Tesis Doctoral, titulada: **“*Medicago sativa*: mejora de la productividad y nuevos aspectos de su valor nutritivo y funcional”**, se ha financiado gracias a la ayuda recibida por el proyecto de Excelencia de la Junta de Andalucía P07-AGR-2704 *“Valoración nutritiva y funcional del polisacárido de Halomonas maura y desarrollo de este microorganismo como inoculante agrícola para cultivo en suelos salinos de leguminosas con alto valor nutritivo”* cuya investigadora principal es María López-Jurado Romero de la Cruz y ha sido realizado en el Departamento de Fisiología, Facultad de Farmacia, en el Insitituto de Nutrición y Tecnología de los alimentos “José Matáix” de la Universidad de Granada.

*“Son aquellos que aprenden a colaborar y
a improvisar los que tendrán más probabilidad de prevalecer”*

Charles Darwin

INDICE

1. INTRODUCCIÓN, OBJETIVOS Y PRINCIPALES RESULTADOS.....	1
1. INTRODUCTION, OBJECTIVES AND MAIN FINDINGS.	5
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	9
2.1. <i>Halomonas maura</i>	9
2.1.1. Las bacterias halófilas: <i>Halomonas maura</i>	9
2.1.2. Polisacáridos bacterianos: el maurano.	11
2.2. LOS SUELOS SALINOS	14
2.2.1. Suelos salinos tipo Solonchak.....	15
2.2.2. Suelos Solonchak en la provincia de Granada.	15
2.3. LAS LEGUMINOSAS.....	17
2.3.1. Valor nutricional.	17
2.3.2. Valor funcional.....	18
2.3.3. Valor agronómico y medioambiental.....	19
2.3.4. Efecto de la salinidad sobre el cultivo de leguminosas.....	21
2.4. <i>Medicago sativa</i> L.	23
2.4.1. Composición.....	24
2.4.2. Alfalfa como fuente proteica.	25
2.4.3. Alfalfa como fuente de componentes bioactivos.....	26
2.5. HIPERTENSIÓN ARTERIAL.....	33
2.5.1. Definición, prevalencia y regulación.....	33
2.5.2. Patología de la hipertensión.	39
2.5.3. Modelos animales experimentales para el estudio de la hipertensión.....	42
2.5.4. Manejo y tratamiento dietético de la hipertensión. Importancia de las leguminosas.....	46
3. MATERIAL Y MÉTODO.....	53
3.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.....	53
3.2. Cultivo de <i>Medicago sativa</i> L.	54
3.2.1. Experimentos en invernadero.....	54
3.2.1.1. Semillas y condiciones de cultivo.	54
3.2.1.2. Determinación del potencial hídrico (Ψ_w).	56
3.2.1.3. Determinación del contenido en leghemoglobina de los nódulos.	56
3.2.1.4. Determinación del peso fresco, peso seco, N, cenizas, y minerales (Ca, P, Mg y Na).....	57
3.2.2. Experimentos en campo.	58

3.2.2.1. Descripción y localización del área de estudio.....	58
3.2.2.2. Semillas utilizadas y condiciones de cultivo.	59
3.2.2.3. Análisis de suelos.	62
3.2.2.4. Determinación de productividad de <i>M. sativa</i> , contenido en N, cenizas totales y minerales Ca, P, Mg y Na.	62
3.3. Ensayos biológicos <i>in vitro</i> de las plantas de alfalfa.	62
3.3.1. Digestibilidad mineral <i>in vitro</i>	62
3.3.2. Ensayo de la peroxidación lipídica.	63
3.3.3. Extracción acetónica y preparación de los extractos.	64
3.3.3.1. Determinación de polifenoles totales.	65
3.3.3.2. Caracterización de polifenoles.	65
3.4. Ensayos biológicos <i>in vivo</i> de las plantas de alfalfa.	66
3.4.1. Ensayo de la alfalfa como fuente de proteína.	66
3.4.1.1. Diseño experimental.	66
3.4.1.1.1. Grupos experimentales.	66
3.4.1.1.2. Animales de experimentación.	67
3.4.1.1.3. Formulación de dietas experimentales.	67
3.4.1.2. Período experimental.	68
3.4.1.3. Análisis realizados.	69
3.4.1.3.1. Parámetros hemáticos y bioquímica plasmática.	69
3.4.1.3.2. Índice de transformación de alimento y coeficiente de eficacia en crecimiento.	70
3.4.1.3.3. Utilización nutritiva de Nitrógeno, minerales totales y Calcio, Magnesio y Fósforo.	70
3.4.2. Ensayo de la alfalfa como fuente de fibra.	71
3.4.2.1. Diseño experimental.	71
3.4.2.1.1. Grupos experimentales.	71
3.4.2.1.2. Animales de experimentación.	71
3.4.2.1.3. Formulación de dietas experimentales.	72
3.4.2.2. Período experimental.	73
3.4.2.3. Análisis realizados.	76
3.4.2.3.1. Determinación de la presión arterial.	76
3.4.2.3.2. Determinación de parámetros urinarios.	77
3.4.2.3.3. Prueba de tolerancia a una sobrecarga oral de glucosa.	77
3.4.2.3.4. Análisis de la composición corporal.	77

3.4.2.3.5.	Determinación de ingesta, peso corporal y peso de los órganos...	78
3.4.2.3.6.	Determinación de parámetros hemáticos.....	78
3.4.2.3.7.	Determinación de parámetros plasmáticos y urinarios.	78
3.4.2.3.8.	Actividad antioxidante en riñón y en hígado: enzimas antioxidantes.....	79
3.4.2.3.9.	Expresión génica por PCR-RT cuantitativa.	82
3.5.	Análisis estadístico.....	84
4.	RESULTADOS	87
4.1.	Cepas bacterianas.....	87
4.2.	Cultivo de <i>Medicago sativa</i> L.	88
4.2.1.	Experimentos en invernadero.....	88
4.2.1.1.	Resistencia a salinidad de <i>Medicago sativa</i> L.	88
4.2.1.2.	Cultivo de <i>M. sativa</i> en soluciones de sales Solonchak órtico.	89
4.2.1.2.1.	Determinación del peso seco de la parte aérea (SDW), peso seco de la raíz (RDW), contenido en nitrógeno y minerales totales.	89
4.2.1.2.2.	Potencial hídrico y contenido en Lb.	89
4.2.1.2.3.	Contenido en Ca, Na, Mg, P y Zn.	90
4.2.2.	Cultivo de <i>Medicago sativa</i> en campo.....	93
4.2.2.1.	Análisis de suelos.	93
4.2.2.2.	Determinación de productividad de <i>M. sativa</i>	96
4.2.2.3.	Determinación del contenido en N, minerales totales, P, Ca, Mg y Na de <i>M. sativa</i>	97
4.3.	Ensayos biológicos <i>in vitro</i> de las plantas de alfalfa.	99
4.3.1.	Ensayo de dializabilidad mineral.....	99
4.3.2.	Ensayo de la peroxidación lipídica.....	99
4.3.3.	Determinación de polifenoles totales.	100
4.4.	Ensayos biológicos <i>in vivo</i> de la alfalfa.	101
4.4.1.	Ensayo de la alfalfa como fuente de proteína.	101
4.4.1.1.	Índices de transformación de alimento y coeficiente en crecimiento. .	101
4.4.1.2.	Pesos corporales y de los órganos.....	101
4.4.1.3.	Parámetros hemáticos.....	102
4.4.1.4.	Parámetros de bioquímica plasmática.	103
4.4.1.5.	Utilización digestiva de minerales totales y utilización nutritiva de N, P, Mg y Ca.....	104
4.4.1.6.	Contenido en minerales de hueso y músculo.	107

4.4.2. Ensayo de la alfalfa como fuente de fibra.....	108
4.4.2.1. Ingesta de dieta.....	108
4.4.2.2. Peso corporal e incremento de peso.....	111
4.4.2.3. Presión arterial.....	114
4.4.2.4. Composición corporal.....	117
4.4.2.5. Balance hídrico y parámetros bioquímicos urinarios.....	119
4.4.2.6. Test de tolerancia oral a la glucosa.....	122
4.4.2.8. Parámetros hemáticos.....	125
4.4.2.9. Parámetros plasmáticos.....	127
4.4.2.10. Actividades enzimáticas antioxidantes y peroxidación lipídica.....	130
4.4.2.11. Expresión génica.....	133
5. DISCUSIÓN	139
5.1. Fase 1.....	139
5.2. Fase 2.....	149
5.2.1. Fase 2.1.....	149
5.2.2. Fase 2.2.....	158
6. CONCLUSIONES	179
6. CONCLUSIONS	182

1. INTRODUCCIÓN, OBJETIVOS Y PRINCIPALES RESULTADOS.

La Familia Leguminosae (Fabaceae), comprende de 17.000 a 19.000 especies incluyendo hierbas, arbustos y árboles, con representantes en casi todos los biomas terrestres (Lewis, 2005). Entre las características más importantes de las leguminosas se encuentran el alto contenido en proteína de su fruto y el contenido en fibra, almidón, vitaminas, minerales y componentes bioactivos (Rebello et al., 2014). Los principales efectos beneficiosos que han sido descritos relacionados con el consumo de las leguminosas han sido sobre el metabolismo glucídico, ya que son capaces de disminuir la glucemia en sangre así como la resistencia a la insulina. Han sido muchos estudios los que han descrito este beneficio, conjuntamente con otros efectos positivos sobre el metabolismo lipídico, entre los que destacan la disminución los niveles plasmáticos de colesterol total, colesterol – LDL y triglicéridos (Barrios-Ramos et al., 2012; Shahraki et al., 2011; Simão et al., 2014; Te Morenga et al., 2011; Tovar et al., 2014, Kapravelou et al., 2013).

A nivel agronómico o ecológico, otra de las propiedades más importantes de las leguminosas es su capacidad para formar asociaciones simbióticas con bacterias del suelo, mediante la que se lleva a cabo el proceso de fijación de nitrógeno ya que el 80% de la fijación biológica de nitrógeno en suelos agrícolas proviene de la interacción simbiótica entre los rizobios y las leguminosas (Peña and Pueyo, 2011a). En este sentido, *Medicago sativa* (alfalfa), forma asociaciones simbióticas con *Ensifer meliloti* y debido a su gran capacidad de adaptación es un cultivo de rotación importante, proporcionando estructura al suelo y aporte de nitrógeno. Además, *M. sativa*, es una leguminosa muy valorada como forraje debido a su alto valor nutritivo, ya que la materia verde de las plantas de alfalfa contiene del 17-22% de proteína total. Así mismo, la planta desecada no solo incluye nutrientes, sino también componentes bioactivos (Gholami et al., 2014) a los que se le han atribuido, entre otras funciones, la capacidad de disminuir la presión arterial (Kapel et al. 2006).

El rendimiento de la productividad de la alfalfa, al igual que otras muchas plantas y leguminosas, se ve reducido bajo condiciones de estrés salino (Munns and Tester,

2008), y se estima que el 20 % de la tierra irrigada en el mundo está afectada por la salinidad (Yamaguchi and Blumwald, 2005). Los suelos salinos se encuentran distribuidos por todo el planeta, estando muy bien representados en el sur de España, concretamente en el norte de la provincia de Granada los suelos Solonchak órtico (IUSS Working Group WRB, 2007) ó Xeric Calcigypsid (Soil Survey Staff, 2010).

El estrés salino, afecta mayoritariamente a los cultivos de suelos deficientes en nitrógeno, ya que se disminuye el número de rizobios que colonizan, infectan y desarrollan nódulos en la raíz (Bouhmouch et al., 2005) y por tanto la capacidad de fijación de nitrógeno (Shamseldin and Werner, 2005). Si bien, aunque la productividad de los cultivos puede disminuir, ha sido demostrado que la calidad de los mismos es susceptible a aumentar, tanto en su composición nutricional como funcional (Colla et al., 2013).

Además, ha sido descrito que la inoculación de rizobios específicos sobre leguminosas conjuntamente con distintas cepas bacterianas pueden aumentar la productividad de las plantas cuando son cultivadas bajo este tipo de estrés abiótico (Ahmad et al., 2011, 2013; Fatnassi et al., 2013). En este sentido, *Halomonas maura* es una bacteria halófila moderada que es capaz de crecer en un amplio rango de concentraciones salinas y puede fijar nitrógeno bajo condiciones microaeróbicas (Argandoña et al., 2005); incluso tiene la capacidad de sintetizar un exopolisacárido, el maurano (Arias et al., 2003).

Por todo lo anteriormente dicho, en la presente tesis doctoral, se plantearon dos fases de trabajo con los siguientes objetivos:

FASE 1. Potenciar el crecimiento, valor nutricional y funcional de la leguminosa *M. sativa*, cultivada bajo condiciones específicas de salinidad: 1) en invernadero y 2) en campo, co-inoculando la leguminosa con su rizobio específico *Ensifer meliloti* y la bacteria *Halomonas maura*.

La salinidad ejerció efectos negativos sobre las plantas de alfalfa, pero la co-inoculación de la leguminosa con las dos bacterias, cuando se cultivó bajo condiciones de invernadero promovió una mejora de la productividad, de los parámetros fisiológicos (leghemoglobina y potencial hídrico), así como un aumento

en el contenido mineral de la alfalfa, especialmente calcio y magnesio. Además aumentó su capacidad antioxidante, cuando la planta fue co-inoculada con las dos bacterias, *H. maura* y *E. meliloti*. Teniendo en cuenta estos resultados, se cultivó alfalfa en invernadero a la concentración de sales 100 mM, y con los dos tratamientos bacterianos: inoculada con *E. meliloti* o co-inoculada con *E. meliloti* y *H. maura* para obtener material vegetal suficiente para llevar a cabo la Fase 2.1.

Con respecto al experimento llevado a campo, se observó que la co-inoculación produjo un aumento de la productividad de la alfalfa, que incluso llegó hasta un 50% con respecto a las plantas que no fueron inoculadas.

FASE 2.

Fase 2.1. Ensayar *M. sativa* (inoculada con *E. meliloti* o co-inoculada con *E. meliloti* y *H. maura*) como fuente de proteína, fibra y Ca en un modelo experimental de rata Wistar en crecimiento.

En esta fase se observó que la utilización de la alfalfa como única fuente de proteína, disminuyó su digestibilidad y conllevó a una disminución del incremento de peso. Sin embargo algunos beneficios de la administración de alfalfa se observaron: disminuyó el peso del hígado, la glucosa plasmática, triglicéridos, colesterol total plasmático y se produjo un aumento de los minerales totales en músculo, y de P, Mg y Ca en hueso; así como una mejora en la utilización nutritiva de Mg. Las diferencias encontradas entre los dos tratamientos de alfalfa no fueron remarcables.

Fase 2.2. Ensayar *M. sativa*, cultivada en campo, como fuente de fibra y componentes bioactivos, en un modelo experimental de rata espontáneamente hipertensa (SHR) y su control normotenso Wistar Kyoto (WKY).

Los resultados más relevantes que se obtuvieron fueron una leve mejoría en los valores de presión arterial mediada por el consumo de alfalfa en los animales hipertensos. Así mismo, se observó una disminución del riesgo de sufrir nefrolitiasis. Además el consumo de alfalfa ejerció efectos beneficiosos en los animales que desarrollaron hipertensión como algunos parámetros del metabolismo lipídico disminuyendo el peso del hígado, los niveles plasmáticos de triglicéridos y

colesterol. Con respecto al metabolismo glucídico los niveles de glucosa plasmática disminuyeron, el área bajo la curva tras un test de tolerancia oral a la glucosa también se vió disminuido, y las enzimas Ck-MB (marcadora de daño cardíaco) y fosfatasa alcalina (marcadora de daño hepático) disminuyeron sus actividades.

Otro de los efectos positivos fue la disminución de la formación de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico que debido al desarrollo de la hipertensión se formaron en el hígado, además el consumo de alfalfa consiguió aumentar la actividad enzimática de la glutatión peroxidasa que había disminuido en el hígado de los animales hipertensos. Incluso el consumo de alfalfa aumentó la expresión génica del péptido GLP-1 en muestras de colon de los animales hipertensos.

1. INTRODUCTION, OBJECTIVES AND MAIN FINDINGS.

Leguminosae (Fabaceae) family, consists of 17.000 to 19.000 species, including a wide variety of herbs, bushes and trees, found in almost every terrestrial biomes (Lewis, 2005). Among the most important characteristics of leguminous, high protein content of their seeds, fibre content, starch, vitamins, minerals and bioactive compounds are encountered (Rebello et al., 2014). The principal beneficial effects so far described, have associated the consumption of legumes with glucose metabolism since legumes have been described to reduce plasmatic glucose as well as improve insulin resistance. There are many studies that have attributed this beneficial effect to legumes, in addition to other positive effects on lipid metabolism among which the reduction of plasma total-, LDL- cholesterol and triglycerides content have been pointed out (Barrios-Ramos et al., 2012; Shahraki et al., 2011; Simão et al., 2014; TeMorenga et al., 2011; Tovar et al., 2014, Kapravelou et al., 2013).

Another property of legumes, in an agronomic and ecologic level, is their capacity to establish symbiotic relationships with soil bacteria through which the capture of nitrogen is carried out. It is known that 80% of the biologic capture of nitrogen in agrarian soils comes from the symbiotic interaction established between the bacteria rhizobium and leguminous plants (Peña and Pueyo, 2011a). In this regard, *Medicago sativa* (alfalfa) establishes symbiotic associations with *Ensifer meliloti* and due to its high adaptability is considered a very important rotation crop, regaining soil stability and releasing nitrogen back into the soil. In addition, *M. sativa* is a highly valued legume as fodder due to its high nutritional value, since the greenery material of alfalfa contains 17-22% of its total protein content. Likewise, the dried plant not only contains nutrients but also bioactive compounds (Gholami et al., 2014) on which there have been attributed among others, hypotensive properties (Kapel et al. 2006).

The productivity performance of alfalfa, as usually occurs to other plants as well, is reduced by saline stress (Munns and Tester, 2008), and it is estimated that 20% of the irrigated soil worldwide is affected by salinity (Yamaguchi and Blumwald,

2005). Saline soils can be found all over the planet, as well as in south Spain and specifically in the north region of Granada province, where the type of Solonchakórtico soils is found (IUSS Working Group WRB, 2007) or Xeric Calcigypsid (SoilSurvey Staff, 2010).

Saline stress mostly affects crops with nitrogen deficient soils since in this kind of soils the number of rhizobium that colonize, infect and develop nodules in the raiz is decreased (Bouhmouch et al., 2005) and because of that the capacity of nitrogen fixation is also decreased (Shamseldin and Werner, 2005). Si bien, although the productivity of the cultivos is decreased, it has been demonstrated that their quality may be increased, both their nutritional and functional composition (Colla et al., 2013).

In addition, it has been reported that the inoculation of specific rhizobium on leguminous together with different strains of bacteria can increase the productivity of the plants when cultivated under this specific type of abiotic stress (Ahmad et al., 2011, 2013; Fatnassi et al., 2013). In this regard, Halomonas maura is a moderate halofila bacteria which is capable of growing under a wide range of saline concentrations, can fix nitrogen under microaerobic conditions (Argandoña et al., 2005) and is capable of synthetizing a polysaccharide called maurano (Arias et al., 2003).

For all the above mentioned, the present thesis includes two phases with their specific objectives:

PHASE 1. To favour the development and the nutritional and functional value of the legume *M. sativa*, cultivated under specific low salinity conditions: 1) in a greenhouse 2) in field, both co-inoculated with its specific rhizobium *Ensifer meliloti* and the bacteria *Halomonas maura*.

The salinity exerted negative effects on the crops of alfalfa, but the co-inoculation of the legume with both bacteria, induced an improvement of productivity, physiologic parameters of the plant (leghemoglobin and water potential) as well as an increase of the mineral content of alfalfa, especially magnesium and calcium, when cultivated in a greenhouse. In addition, the antioxidant capacity of the plant was increased after the co-inoculation of the plant with both bacteria, *H. maura* y *E.*

meliloti. Taking into consideration these results, alfalfa was cultivated in a greenhouse at a concentration of salts of 100 mM, and with both bacteria treatments: inoculated with *E. meliloti* or co-inoculated with both *E. meliloti* y *H. maura* in order to obtain sufficient material to carry out the experiments of Phase 2.

Regarding the field experiment, there was observed that co-inoculation produced an increase of the productivity of alfalfa that reached 50% in comparison to the plants that were not inoculated.

PHASE 2.

Phase 2.1. To study *M. sativa* (inoculated with *E. meliloti* or co-inoculated with *E. meliloti* and *H. maura*) as a protein, fibre and Ca source in an experimental model of growing.

During this phase, there was observed that the use of alfalfa as unique source of protein decreased its digestibility which in turn induced a decrease of weight increase. However, some beneficial effects due to the administration of alfalfa were observed: decrease of liver weight, concentration of plasma glucose, triglycerides and total cholesterol and an increase of total mineral content in muscle and of P, Mg and Ca in bone. Moreover, an improvement of the nutritional utilisation of Mg was observed. Among the two treatments of alfalfa, no remarkable differences were found.

Phase 2.2. To study *M. sativa*, cultivated in field, as a source of protein, fibre and bioactive compounds, in an experimental model of spontaneous hypertensive rats (SHR) and its corresponding normotensive control (WKY).

Among the most relevant results of the experiments of this phase was a light improvement of arterial pressure due to the consumption of alfalfa in the hypertensive animals. Likewise, a decrease of nephrolithiasis risk was observed. In addition, the administration of alfalfa produced beneficial effects in the animals that developed hypertension, reducing parameters of lipid metabolism such as liver weight as well plasmatic levels of triglycerides and cholesterol. Regarding glucose metabolism, a decrease of plasma glucose concentration and area under the curve after an oral glucose tolerance test were observed. Furthermore, the activities of the

enzymes Ck-MB (cardiac damage marker) and alkaline phosphatase (hepatic damage marker) were decreased.

Other beneficial effects of the administration of alfalfa were the reduction of thiobarbituric acid reactive species, which due to the development of hypertension was increased in liver, and the increase of the activity of glutathione peroxidase which was found decreased in the liver of hypertensive rats. Finally, the administration of alfalfa increased the genetic expression of the peptide GLP-1 in colon of the hypertensive animals.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Halomonas maura*

2.1.1. Las bacterias halófilas: *Halomonas maura*.

Las bacterias halófilas se encuentran ampliamente distribuidas por distintos biomas tanto terrestres como marinos, pudiendo localizarse en hábitats como lagos salinos y salmueras, suelos salinos, hábitats salinos fríos, hábitats salinos alcalinos, y en algunos alimentos salados (pescados, carnes y otros). También pueden encontrarse en algunos hábitats inusuales como instalados sobre plantas y animales desérticos (Ventosa et al., 1998).

A pesar de la característica que comparten estas bacterias halófilas los requerimientos y tolerancia de sales son ampliamente variables entre las distintas especies. Según Kushner y Kamekura (1988) los microorganismos pueden clasificarse en:

Tabla 1. Clasificación de los microorganismos según sus requerimientos salinos (Kushner and Kamekura, 1988)

Tipo de microorganismo	Concentración de NaCl
No halófilo	<0,2 M
Halófilo débil	0,2 - 0,5 M
Halófilo moderado	0,5 - 2,5 M
Halófilo extremo	2,5 - 5,2 M

Estos requerimientos pueden variar dependiendo de la disponibilidad de nutrientes y de la temperatura de crecimiento (Kushner, 1993). Entre las características de estas bacterias, quizás una de las más importantes es el potencial para ser utilizadas en diferentes aplicaciones industriales debido a la capacidad de producir polímeros (Ventosa et al., 1998). Incluso poseen propiedades fisiológicas que pueden facilitar su explotación con fines comerciales, ya que al crecer en altas concentraciones de sales se minimiza el riesgo de contaminación y sus requerimientos nutricionales son

simples, la mayoría pueden utilizar un gran número de compuestos como fuente de energía.

Las bacterias halófilas moderadas constituyen un grupo fisiológico heterogéneo de microorganismos que pertenecen a diferentes géneros. La familia Halomonadaceae fue propuesta como un grupo que constituía un linaje independiente dentro de la subclase de las γ -Proteobacterias, tras el trabajo que llevaron a cabo Franzmann et al., (1988) para intentar clasificar filogenéticamente a varias especies (*Halomonas subglaciescola* ACAM 12, *Deleya aesta* NCMB 1980, *Halomonas elongata* ATCC 33173 y *Flavobacterium halmophilum* NCMB 1971). Dos décadas más tarde, después del estudio filogenético llevado a cabo por de la Haba et al., (2010) sobre las secuencias génicas completas del ARNr 16S y ARNr 23S de todos los miembros de la familia, se dividió a la familia Halomonadaceae en nueve géneros. Dentro de estos se encuentran bacterias halófilas o halotolerantes como los géneros *Halomonas* (Dobson and Franzmann, 1996), *Chromohalobacter* (Ventosa et al., 1989), *Modicisalibacter* (Ben Ali Gam et al., 2007), *Cobetia* (Arahal et al., 2002a), *Salinicola* (Anan'ina et al., 2007) y *Kushneria* (Sánchez-Porro et al., 2009) y bacterias no halófilas a los que pertenecen los géneros *Carnimonas* (Garriga et al., 1998) , *Halotalea* (Ntougias et al., 2007) y *Zymobacter* (Okamoto et al., 1993).

El género *Halomonas*, tal y como fue descrito por Arahal et al., (2002b), no es monofilético sino que se encuentra separado filogenéticamente en dos grupos representados por un gran número de especies, encontrándose *H. maura* en el primero de los grupos.

Halomonas maura

Halomonas maura es una bacteria halófila moderada que fue aislada por primera vez en una salina de Asilah (Marruecos), por Bouchotroch et al., (2001). En su trabajo fueron aisladas cuatro cepas bacterianas (S-7, S-30, S-31T Y S-36) pertenecientes al género *Halomonas*. Al comparar las secuencias génicas del ARNr 16S, se observó que las cuatro cepas analizadas eran filogenéticamente distintas a otras especies del género conocidas hasta ese momento, por lo que se estableció una nueva especie que fue designada con el nombre de *Halomonas maura*. La cepa tipo

propuesta para *H. maura* fue la S-31^T. Son bacilos, Gram negativos, que suelen aparecer solos o en pares y ocasionalmente formando filamentos. Sus dimensiones son de 7,2 - 8,6 × 0,6 - 0,7 μm. Las células contienen gránulos de polihidroxialcanoato (PHA) y produce un exopolisacárido (EPS), maurano, que aparece asociado a la superficie de la célula, formando una gruesa capa alrededor de la bacteria. La bacteria es capaz de crecer en un amplio rango de concentraciones salinas (desde el 1 al 15% p/v), aunque su concentración óptima de crecimiento es de un 9 % (p/v) de sales de mar y a una temperatura de 32° C. No crece en ausencia de sales, es un organismo quimiorganotrofo y con metabolismo respiratorio, el oxígeno es el aceptor final de electrones, aunque es capaz de crecer anaeróbicamente en presencia de nitratos (Bouchotroch et al., 2001). Se han identificado los genes nifH en algunas de sus cepas, demostrando que es capaz de fijar nitrógeno bajo condiciones microaeróbicas (Argandoña et al., 2005).

2.1.2. Polisacáridos bacterianos: el maurano.

Las bacterias convierten diferentes fuentes de carbono en un diverso rango de polímeros que varían en composición química y propiedades materiales. Estos polímeros tienen varias funciones biológicas para las bacterias ya que pueden servir como materiales de reserva, estructuras protectoras y puede proporcionar ventajas bajo ciertas condiciones medioambientales. Existen cuatro tipos distintos de polímeros producidos por las bacterias: polisacáridos, poliamidas, polianhidridos inorgánicos y poliésteres (Rehm, 2010).

Los polisacáridos bacterianos pueden ser divididos en polisacáridos intracelulares, polisacáridos estructurales y polisacárido extracelulares o exopolisacáridos o exopolímeros (EPS). Los EPS se producen de dos formas: a) en forma de cápsula, donde el EPS se encuentra íntimamente asociado con la superficie celular incluso mediante uniones covalentes y b) débilmente unido a la superficie de la célula. Estos EPS proporcionan a las células bacterianas hidratación, protección frente a desecación y a depredación por protozoos, además proporcionan inaccesibilidad a los antibióticos y capacidad de adhesión a superficies para formar *biofilms* (Suresh Kumar et al., 2007). Además en algunos casos, se ha demostrado que la producción de EPS por parte de la bacteria es indispensable para que se establezca la relación

simbiótica entre las especies del género *Rhizobium* y la leguminosa específica, como es el caso de *Ensifer meliloti* (anteriormente *Sinorhizobium meliloti*) cepa 1021 y *Medicago sativa* (González et al., 1996).

Maurano

El maurano (MR), es el EPS producido por *H. maura* cepa S30 (Bouchotroch et al., 2001) y ha sido ampliamente descrito por Arias *et al.*, (2003). Según el trabajo llevado a cabo por Martínez-Cánovas et al., (2004) *H. maura* es la bacteria productora de EPS cultivable más abundante, después de haber aislado 134 cepas de 18 diferentes hábitats salinos localizados en todo el mundo, incluyendo salinas terrestres, salinas marinas y suelos.

El MR es un heteropolisacárido sulfatado, aniónico que contiene un alto contenido en ácido urónico. Las condiciones ideales de cultivo de la bacteria, para conseguir el equilibrio óptimo entre producción del exopolisacárido y viscosidad son una concentración de sales marinas de 2,5% (p/v) y 1% (p/v) de glucosa, manteniendo el cultivo en incubación durante 5 días, a 32°C y con agitación a 100 revoluciones por minuto (rpm). En estas condiciones se consiguen una producción de exopolisacárido de $3,8 \pm 0,2$ g por litro de medio ($0,39$ g/g glucosa). La composición del EPS bajo estas condiciones de crecimiento de la bacteria, es de un $65,34 \pm 0,07\%$ (p/p) carbohidratos, $2,57 \pm 0,06\%$ (w/w) proteínas, $8,14 \pm 0,09$ (p/p) ácido urónico y $0,18 \pm 0,05$ (w/w) acetilos. Su masa molecular es de 4.7×10^6 Da. Los cuatro azúcares componentes del MR son la manosa, galactosa, glucosa y ácido glucurónico. Además contiene fosfatos y una alta proporción de sulfatos. Las soluciones acuosas de MR se caracterizan por ser altamente viscosas y pseudoplásticas, viscoelásticas y con un comportamiento tixotrópico. Es estable en: un rango de pH 3 - 11, tras su liofilización, y en presencia de azúcar, sales, surfactantes y ácidos α - hidroxílicos. Además posee una alta capacidad para unir cationes (Arias et al., 2003).

Debido a todas estas características el MR ha sido considerado en diferentes aspectos de la industria farmacéutica y médica. Se ha comprobado que es un excelente componente para la encapsulación de fármacos dirigidos a enfermos

oncológicos puesto que presenta una buena biocompatibilidad y una buena capacidad de liberación de los fármacos (Sivakumar et al., 2014), gracias a la estabilidad que presenta y la efectiva liberación del fármaco bajo distintas condiciones de pH. Además al ser un material biodegradable podría ser una alternativa a otros materiales más tóxicos y su utilidad en la fabricación de matrices como soporte para material biomédico ha sido demostrada (Raveendran et al., 2013a).

A parte de su funcionabilidad en estos ámbitos, Raveendran et al., (2013b) evaluaron la capacidad antioxidante del MR en sistemas *in vitro* así como su hemocompatibilidad. Los resultados mostraron que tanto en la línea celular de fibroblasto de ratón L929, así como en homogeneizados de hígado de rata se produjo una disminución de la peroxidación lipídica, además de un ligero incremento de la actividad glutatión reductasa y superóxido dismutasa en la línea celular. Por otra parte, el EPS no indujo ruptura en los eritrocitos manteniendo su integridad.

2.2. LOS SUELOS SALINOS

Los suelos contienen normalmente una solución de sales minerales muy diluida de la que las plantas absorben sus nutrientes. Su origen es la erosión, meteorización y solubilización de las rocas de la superficie que se someten a un proceso de lavado con el agua de lluvia. Las sales causantes de la formación de suelos salinos son las fácilmente solubles (NaCl , MgCl_2 , CaCl_2 , Na_2SO_4 y MgSO_4). Por el contrario existen sales que son poco solubles y que pueden dar lugar a precipitaciones como son CaCO_3 , MgCO_3 y CaSO_4 .

Altos niveles de salinidad limitan el potencial agroecológico de los suelos y representan una importante amenaza ecológica y socioeconómica para un desarrollo sostenible. Se estima que el 20 % de la tierra irrigada en el mundo está afectada por la salinidad (Yamaguchi and Blumwald, 2005) y alrededor de 3,8 millones de hectáreas de suelos salinos se encuentran presentes en Europa. La salinidad del suelo puede ser debida a causas naturales como la evaporación, intrusión del agua marina, y a la deposición de sales provenientes del viento y la lluvia. Además de la salinidad producida de forma natural, una proporción significativa de tierra cultivada ha llegado a ser salina debido a la irrigación con aguas concentradas en sales, y ambas han provocado subidas en el nivel freático de estas sales que pueden llegar hasta la rizosfera de las plantas y concentrarse allí (Munns and Tester, 2008). Áreas con un clima seco pueden experimentar altos niveles de salinidad debido a la evaporación de aguas subterráneas que llevan las sales hasta la superficie del suelo (Yu et al., 2012).

El estrés salino es de gran importancia en las zonas áridas y semiáridas del mundo debido a su impacto en la reducción de la productividad de los cultivos ya que hay una correlación negativa entre el grado de estrés salino y el índice de crecimiento del cultivo (Munns and Tester, 2008).

La salinidad de los suelos se determina mediante la medida de la conductividad eléctrica (CE) en un extracto del suelo saturado de agua y según este método, y los daños producidos sobre los cultivos, los suelos son clasificados en:

Tabla 2. Clasificación de los suelos en función de su conductividad eléctrica. Repercusión sobre los cultivos.

CE (dSm ⁻¹)	Salinidad del suelo	Respuesta de los cultivos
<2	Ninguna	Efectos despreciables de la salinidad
2 – 4	Escasa	Sólo se restringen la producción de los cultivos más sensibles
4 – 8	Moderada	Se ven afectados los rendimientos de muchos cultivos
8 – 16	Alta	Sólo los cultivos tolerantes rinden satisfactoriamente
>16	Muy alta	Sólo los cultivos muy tolerantes rinden satisfactoriamente

2.2.1. Suelos salinos tipo Solonchak.

Los Solonchaks son suelos que tienen alta concentración de sales solubles en algún momento del año. Están ampliamente confinados a zonas climáticas áridas - semiáridas y regiones costeras en todos los climas. Aparece vegetación de pastos y/o hierbas halófitas. La extensión total de los Solonchaks en el mundo se estima en unas 260 millones ha y se encuentran más extendidos en el Hemisferio Norte, sobretodo en las partes áridas y semiáridas del norte de África. Estos suelos tienen poco valor agrícola y se suelen usar para pastoreo. La aplicación de agua de riego no sólo debe satisfacer las necesidades del cultivo, sino que debe aplicarse un exceso, por encima del requerimiento de riego, para mantener el movimiento descendente en el suelo y lavar el exceso de sales de la zona de raíces (FAO, 2007).

2.2.2. Suelos Solonchak en la provincia de Granada.

Se trata de suelos desarrollados sobre materiales que contienen sales, particularmente se ha encontrado que la más abundante es el yeso, además presentan ciertas condiciones topográficas que favorecen su evolución. Se favorece la formación de estos suelos en pequeñas llanuras que constituyen una depresión a la que afluyen las aguas de escorrentía de los suelos inmediatamente cercanos

cargadas de sales solubles. Cuando se dispone de agua de riego y queda asegurado el drenaje, estos suelos pueden ser cultivados, no obstante siempre conservan un cierto grado de salinidad que condiciona el tipo de cultivo y que provoca eflorescencias salinas en la superficie del suelo, sobre todo visibles en la época seca. Los Solonchaks órticos están distribuidos en tres áreas dentro de la provincia de Granada, una en la zona de Baza-Benamaurel, otra entre Cúllar y Galera y la tercera en los alrededores de La Malá (JJAA, 1999).

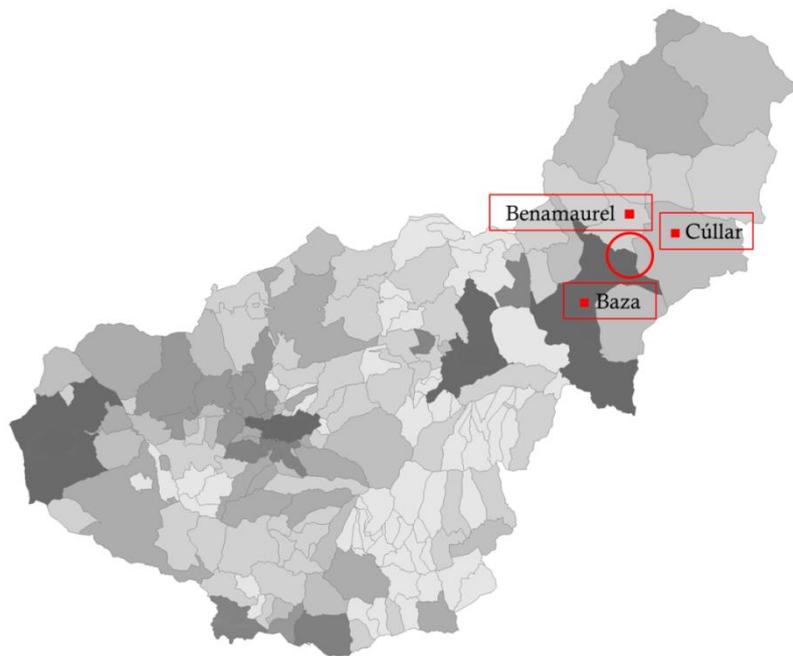


Figura 1: Localización de tres de las zonas de la provincia de Granada donde se han descrito suelos salinos tipo Solonchak: Benamaurel, Cúllar y Baza.

2.3. LAS LEGUMINOSAS.

La Familia Leguminosae (Fabaceae), comprende de 17.000 a 19.000 especies incluyendo hierbas, arbustos y árboles y juegan un importante papel ecológico, teniendo representantes en casi todos los biomas terrestres (Lewis, 2005). El fruto de las leguminosas al que se le da el nombre de legumbre, ha sido y sigue siendo junto con los cereales una importante fuente de alimento, especialmente en los países en desarrollo. Su consumo está aumentando globalmente, tanto por su alto valor nutricional, debido principalmente a alto porcentaje proteico, así como por su valor funcional resaltando su actividad como hipoglucemiante e hipocolesterolemiante (Asif et al., 2013).

2.3.1. Valor nutricional.

Entre las características nutricionales más importantes de las legumbres se encuentra su alto contenido en proteína, que se sitúa en aproximadamente un 20 %, pero varía en un amplio rango que va desde, por ejemplo, el 17 – 20% de su peso seco en guisante y judía, hasta un 38 – 40% en soja y altramuz. Debido a esta característica además de consumirse como tal, la inclusión de la proteína de legumbre en forma de harina está siendo utilizada para mejorar las propiedades nutricionales y sensoriales de algunos alimentos procesados. El contenido en fibra de las legumbres también es muy variable dependiendo del tipo de legumbre y del procesamiento al que se sometan, pero en general contiene mayor porcentaje de fibra insoluble que soluble. El almidón es el carbohidrato presente en mayor proporción en las legumbres, siendo una importante fuente de energía en la dieta humana. Además las legumbres son buenas fuentes de vitaminas, minerales y componentes bioactivos (Rebello et al., 2014).

Aunque la digestibilidad de la proteína proveniente de las legumbres es aproximadamente un 10% más baja que la proteína animal, debido fundamentalmente a la presencia de factores no nutricionales, se ha demostrado que mediante distintos procesos biotecnológicos es posible mejorar tanto la biodisponibilidad proteica como la biodisponibilidad mineral (Porres et al., 2005, 2006).

2.3.2. Valor funcional.

Además del valor nutricional de las legumbres, en las últimas décadas, el uso de las mismas por su valor funcional, bajo diferentes formas de administración, está siendo ampliamente estudiado y demostrado tanto en modelos experimentales animales como en humanos.

Los principales efectos positivos que se han encontrado han sido relacionados con el metabolismo glucídico, ya que poseen un índice glucémico bajo y son capaces de disminuir la glucemia en sangre así como la resistencia a la insulina. Han sido muchos estudios los que han descrito este beneficio conjuntamente con otros efectos positivos sobre el metabolismo lipídico, entre los que destacan la disminución los niveles plasmáticos de colesterol total, colesterol – LDL y triglicéridos (Barrios-Ramos et al., 2012; Shahraki et al., 2011; Simão et al., 2014; Te Morenga et al., 2011; Tovar et al., 2014, Kapravelou et al., 2013).

Además de los efectos anteriormente citados y que son más conocidos, otros más novedosos han sido y están siendo investigados en los últimos años. Entre estos efectos, algunos ejemplos son el aumento de la expresión de fosfoprotein kinasa activada por adenina monofosfato (pAMPk) y la disminución de la expresión de la enzima Acetil CoA carboxilasa (Gao et al., 2014); disminución de los niveles de ARNm de las citocinas factor de necrosis tumoral TNF- α y proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) (Hoo et al., 2010); disminución del peso de hígado y prevención de la esteatosis hepática (Beltrán-Debón et al., 2011); disminución de la concentración de ácido úrico en sangre e inhibición de la elevación de la enzima alanina aminotransferasa (ALT) (Dai et al., 2013), mejora de la capacidad antioxidante en plasma y actividades de enzimas antioxidantes en hígado (Kapravelou et al., 2014a), activación de la expresión de receptores activados de proliferación de los peroxisomas (PPAR α , β y γ) (Zaru et al., 2013); aumento plasmático de insulina, péptido similar al glucagón 1 (GLP-1) y disminución de los niveles de péptido Y (YY) (Jahan-mihan et al., 2012), disminución de la concentración de enzimas transaminasas en plasma aspartato aminotransferasa (AST) y ALT (Ramadan et al., 2011) etc. Nuevos efectos

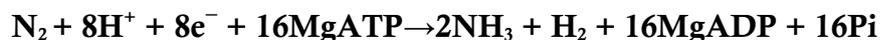
relacionados con la prevención de enfermedades como el cáncer están siendo también demostrados (Duranti, 2006).

Además otros efectos de las leguminosas sobre la hipertensión arterial y parámetros relacionados con ésta, se describen en el **apartado 2.5.4**.

2.3.3. Valor agronómico y medioambiental.

Una de las características más importantes de las leguminosas es la capacidad para formar asociaciones simbióticas con bacterias del suelo del orden Rizobiales de las α -proteobacterias, colectivamente denominadas como rizobios, algunas cepas de las α -proteobacterias no rizobiales (Velázquez, E., 2010) y β -proteobacterias del género *Burkholderia* (Mishra et al., 2012). Gracias a estas asociaciones se lleva a cabo el proceso de fijación de nitrógeno por las leguminosas. Hellriegel y Wilfarth demostraron en el año 1886 el origen bacteriano de esta fijación de nitrógeno que se llevaba a cabo en unas estructuras específicas desarrolladas en las raíces de las plantas leguminosas denominadas nódulos (Cheng, 2008).

Hoy día se conoce que un 80% de la fijación biológica de nitrógeno que se produce en los suelos destinados a la agricultura proviene de la interacción simbiótica entre los rizobios y las leguminosas (Peña and Pueyo, 2011a). En este proceso, el nitrógeno molecular es reducido a amonio por el complejo enzimático de la nitrogenasa, es secretado por los bacteroides que forman la simbiosis y posteriormente asimilado por la planta (Day et al., 2001). La ecuación que define este proceso es la siguiente:



(Poole and Allaway, 2000)

La interacción planta – rizobio es iniciada cuando la planta excreta flavonoides desde la raíz a la rizosfera, estos se unen a proteínas bacterianas NodD, que son reguladores transcripcionales y que activan la transcripción de diferentes genes rizobiales (genes nod). Entre estos genes hay varios que codifican enzimas necesarias para la producción de los denominados factores Nod que van a inducir

múltiples respuestas y cambios morfológicos específicos requeridos para la nodulación de la planta hospedadora (Oldroyd and Downie, 2004).

Para que se lleve a cabo el proceso de fijación de nitrógeno, la bacteria debe ser internalizada dentro de las células del córtex de la raíz de la planta hospedadora (Perret et al., 2000). Para ello la bacteria queda atrapada en el extremo curvo de un pelo radicular, expresa factores Nod y un EPS activo. Esto facilita la formación del cordón de infección (Glazebrook and Walker, 1989, Pellock et al., 2000) y este EPS activo induce el crecimiento interno de la membrana celular del pelo radicular dando lugar a una invasión bacteriana del interior del tejido de la planta.

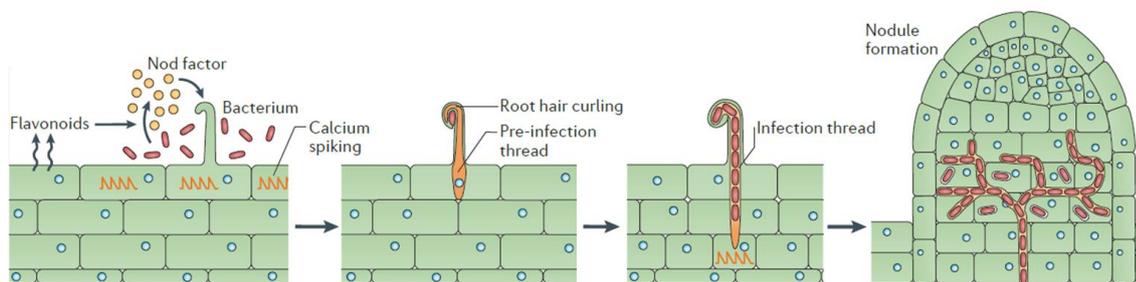


Figura 2. Señales emitidas por la planta y el rizobio que conllevan a la formación del cordón de infección y al desarrollo de nódulo donde se llevará a cabo el proceso de fijación de nitrógeno (Oldroyd, 2013).

En el caso de interacción simbiótica entre *Ensifer meliloti* y *Medicago sativa* éste produce los EPSs succinoglicano y galactoglicano, siendo más eficiente en el establecimiento de la simbiosis con esta leguminosa el succinoglicano.

Cuando la bacteria alcanza el córtex interno de la planta, cada bacteria es endocitada por una célula individualmente formando una estructura especial, el simbiosoma. La bacteria entonces deberá diferenciarse a bacteroide fijador de nitrógeno, expresar las enzimas del complejo nitrogenasa y mantener un ambiente microaeróbico (Fischer, 1994) gracias a la proteína leghemoglobina en los nódulos formados, que además proporciona un color rojo a los mismos cuando estos son funcionales (Ott et al., 2005).



Figura 3. Imagen de nódulos activos formados en la raíz de *Medicago sativa* por la inoculación con *Ensifer meliloti* 1021.

Este proceso es de gran interés tanto ecológico como agronómico, ya que debido a esta capacidad, las leguminosas pueden crecer en zonas áridas o suelos deficientes en nitrógeno, actuando como plantas pioneras en la colonización y estabilización de los suelos, mejorando su fertilidad y consecuentemente previniendo la erosión y desertificación (Peoples et al., 1995; Brockwell et al., 1995).

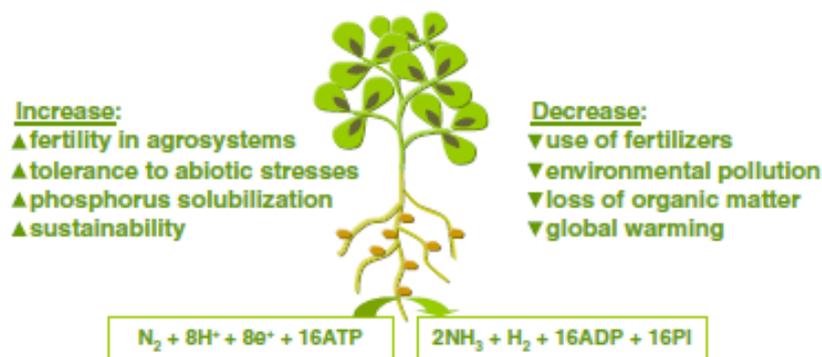


Figura 4. Beneficios de la fijación biológica de nitrógeno por las asociaciones simbióticas con leguminosas.

2.3.4. Efecto de la salinidad sobre el cultivo de leguminosas.

La salinidad del suelo ejerce un efecto deletéreo sobre los cultivos que se desarrollan sobre él, se produce una reducción o inactivación de muchas enzimas poniendo en peligro la integridad de las membranas celulares, aumentando la absorción de minerales como Na^+ y Cl^- e inhibiendo la absorción de K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} y Li^+ ; causando como consecuencia malnutrición y retrasando el crecimiento ya que se produce una ineficiente fotosíntesis e inhibición de la expansión y de la división celular (Baudhdh and Singh, 2012; Yu et al., 2012). Además, altas concentraciones de sales en un suelo de cultivo pueden causar una reducción del área foliar y del diámetro del tallo (Bhattarai and Midmore, 2009); así como un retraso en la germinación (tanto en el índice como en el porcentaje) (Muhammad J. et al., 2006) y en la floración (Wankhade and Sanz, 2013).

No todos los cultivos son sensibles a la salinidad de la misma forma sino que depende del estado de desarrollo de la planta, de la especie y del genotipo (Shelden and Roessner, 2013; Turner et al., 2013) y en general se ha descrito que los cultivos vegetales son más sensibles a la salinidad que los granos o forrajes (Shannon, M.C., 1997).

El estrés salino afecta negativamente a la productividad de las legumbres, mayoritariamente en suelos que son deficientes en nitrógeno, ya que la fijación simbiótica de nitrógeno es más sensible al estrés salino que la propia legumbre hospedadora o el rizobio de vida libre (Peña and Pueyo, 2011a).

La salinidad afecta a los pasos iniciales de establecimiento de la interacción simbiótica, produciendo una disminución de la síntesis de EPS que promueve la formación de nódulos (Lloret et al., 1998). Además disminuye el número de rizobios que colonizan, infectan y desarrollan nódulos en la raíz (Bouhmouch et al., 2005) así como la capacidad de fijación de nitrógeno (Shamseldin and Werner, 2005) puesto que disminuye el número de nódulos formados así como el peso de los mismos, incluso se produce la desintegración del citoplasma y la pérdida de rigidez de la pared celular (Peña and Pueyo, 2011b).

Se ha descrito que la inoculación de rizobios específicos sobre leguminosas conjuntamente con distintas cepas bacterianas pueden aumentar la productividad de las plantas cuando son cultivadas bajo este tipo de estrés abiótico (Ahmad et al., 2011, 2013; Fatnassi et al., 2013). Por tanto, una buena estrategia para reducir los efectos negativos que la salinidad ejerce, podría ser la co-inoculación de las leguminosas.

2.4. *Medicago sativa* L.

Medicago sativa L. (alfalfa) es una leguminosa muy valorada como forraje debido a su alto valor nutritivo. Es originaria de Asia Menor, Cáucaso Sur, Turkmenistán e Irán y es endémica de toda la Región Mediterránea, Norte de África, Oriente Medio, la mayoría de Europa, Siberia, Norte de la India y China (Michaud et al., 1988; Quiros and Bauchan, 1988). Su clasificación taxonómica:

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Orden: Fabales
Familia: Fabaceae
Subfamilia: Faboideae
Tribu: *Trifoliaceae*
Género: *Medicago*
Especie: *sativa*
Nombre binomial: *Medicago sativa* Linn.

Es una planta plurianual, herbácea, con las hojas trifoliadas y con el margen aserrado. Sus flores son de color violeta a púrpura, amarillas e incluso blancas y las inflorescencias numerosas se agrupan en racimos densos terminales. Estas flores dan lugar a semillas en vainas con forma de espiral. Con respecto a los requerimientos ambientales para su cultivo, soporta un amplio rango climático tolerando el calor e incluso una sequía moderada. Necesita terrenos profundos y permeables, con pH óptimo de 7,5. Es capaz de tolerar relativa salinidad, pero es muy sensible cuando se produce encharcamiento.

Debido a su gran capacidad de adaptación la alfalfa es un cultivo de rotación importante, proporcionando estructura al suelo y aporte de nitrógeno (220 Kg/N por ha y año), formando asociaciones simbióticas con el rizobio *Ensifer meliloti*. Su cultivo está estratégicamente potenciado ya que los cultivos persistentes en el tiempo permiten limitar los riesgos de erosión y la alfalfa como cultivo plurianual (4 ó 5 años sobre la misma superficie) presenta ventajas frente a otros cultivos como cereales, oleaginosas y proteaginosas (guisante, altramuza...) (Subyaga and Moreno, 1998).

El cultivo de la alfalfa en España se extiende por todo el territorio con una superficie muy cercana a las 250.000 has, con especial peso en el Valle del Ebro y

Castilla León. Las siembras se llevan a cabo en otoño (51%) y primavera (49%). El 95% de las mismas procede del ecotipo Aragón (AEFA, 2012).

2.4.1. Composición.

La traducción literal de la palabra alfalfa es *al-fac-facah*, que en arábico significa “padre de todos los alimentos”, aunque ha sido cultivada y utilizada principalmente como forraje para el consumo animal, está ganando mucha atención como componente en la nutrición humana y está comenzando a utilizarse directamente en forma fresca adicionada a ensaladas y otros platos de verduras o en extractos como concentrado proteico o suplemento nutricional (Stochmal et al., 2001).

La materia verde de las plantas de alfalfa contiene del 17-22% de proteína total, es rica en aminoácidos no esenciales, ácidos grasos saturados (palmítico y esteárico), monoinsaturados (oleico), poliinsaturados (linoleico, linolénico), vitamina A (β -caroteno), B1, B2, B3(PP), B5, B6, B8, B9, B12, C, D, E, K, U y minerales Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, P, K, Zn y Si, ácidos orgánicos: málico y fumárico. El contenido de fibra cruda en material verde es relativamente alto (sobre 230 – 300 g/kg de peso seco). Las fracciones de celulosa y lignina constituyen aproximadamente un 40-45% de peso seco; además de presentar pectinas (8% aproximadamente) y un 10% de hemicelulosa. La planta desecada de la alfalfa no solo incluye nutrientes, minerales y vitaminas, sino también sustancias fitoquímicas (caroteno, clorofila, cumarinas, isoflavonas, alcaloides, saponinas), metabolitos secundarios de plantas (fitoestrógenos: isoflavonas y cumestrol) y componentes no nutricionales (fitatos, L-canavanina, saponinas) (Gawel, 2012). Las saponinas, junto con los taninos, son consideradas los mayores componentes no nutricionales encontrados en la alfalfa que pueden causar una reducción en la utilización de los nutrientes, alterando la permeabilidad del intestino delgado (Kumar, 2011), pero a su vez pueden tener efectos beneficiosos sobre el metabolismo glucídico y lipídico.

Así también, debido a esta composición en compuestos bioactivos, *M. sativa* está siendo investigada en otros campos por sus propiedades funcionales como se tratará más adelante.

2.4.2. Alfalfa como fuente proteica.

En nutrición animal se han llevado a cabo numerosos estudios mostrando los efectos positivos de la utilización de la proteína de alfalfa administrada como suplemento dietético (Gawel and Grzelak, 2014); pero actualmente hay un gran interés en el estudio de las propiedades nutricionales de la alfalfa y su aplicación en nutrición humana. En general hay un gran desconocimiento del uso de esta planta en este sentido. Los concentrados de proteína, incluyendo la proteína de alfalfa, comenzaron a aplicarse como respuesta a la malnutrición que estaban sufriendo algunas poblaciones, y en las que se habían observado tanto deficiencia de ingesta calórica como deficiencias nutricionales. El uso de concentrados proteicos podía dar respuesta a muchos de los déficits nutricionales específicos encontrados. Con esta perspectiva, en el año 1993 fue creada la Asociación para la promoción de extractos foliares (APEF), en la que participaron numerosos expertos del campo de la medicina y de la agricultura, y donde se llevaron a cabo numerosos ensayos y estudios donde se realizó la suplementación de las dietas consumidas con concentrados proteicos de alfalfa.

Los principales países de acción donde se llevaron a cabo con éxito estos estudios fueron en Rumania, Nicaragua y China. Se realizaron varias pruebas de consumo de extractos foliares de la alfalfa, como suplementos nutricionales, en personas malnutridas (niños de 6 meses a 6 años, mujeres embarazadas y/o lactantes, ancianos...). Las dosis recomendadas para administración de estos concentrados proteicos fueron suplementos dietéticos de 10 g/día para niños y para adultos y mujeres embarazadas de 10 – 15 g. Los resultados más importantes que se obtuvieron fueron una mejora del crecimiento y ganancia de peso en niños, una disminución en el índice de infecciones en la población en general y un aumento de la hemoglobina, que conllevó a una remisión o desaparición de anemias, así como un aumento de los niveles de retinol séricos y un desarrollo cerebral normal (Zanin, 1998).

A partir de aquí, se estuvo trabajando para incorporar a la alfalfa dentro de los nuevos alimentos o ingredientes alimentarios, seguros para el consumo humano bajo condiciones específicas de uso. En el año 2009, se emitió el documento de

autorización para su venta y se estableció el límite de máxima cantidad recomendada a 10 g/día de extracto de proteína (European Parliament and of the Council, 2009).

Aunque ya era comúnmente usada, desde ese momento la alfalfa ha sido incorporada de distintas formas a la alimentación diaria: como puré, tortilla, té, croquetas, soufflé, sopas y ensaladas, utilizando el producto tanto crudo como cocinado. Ha sido ampliamente utilizada como alimento humano en parte de Rusia, China y América, incluso en Sur África es utilizada como un sustituto de la espinaca. En Europa, la alfalfa es principalmente consumida como brotes, crudos o cocinados, adicionados a ensaladas, sándwiches o de forma decorativa (Mielmann, 2013).

2.4.3. Alfalfa como fuente de componentes bioactivos.

La alfalfa está compuesta por numerosos compuestos bioactivos producidos de forma natural y con un claro papel biológico en la planta. Además de este papel, poseen utilidad farmacológica por la capacidad para ejercer distintos efectos a nivel tanto metabólico como sistémico sobre el organismo. Entre todos los compuestos presentes, las saponinas y las isoflavonas son las sustancias bioactivas de más alto interés encontradas en general en todas las especies del género *Medicago* y en concreto en *Medicago sativa* (Gholami et al., 2014).

Papel en la planta

Las saponinas son una clase estructuralmente diversa de glicósidos anfipáticos con un esteroide o triterpenoide, que tienen la capacidad de formar soluciones coloidales en agua y espumas estables cuando se agitan; lo que les hace ser útiles como emulsionantes y espumantes en alimentos y bebidas. Además sus propiedades farmacológicas son útiles en fitoterapia y cosmética (Osborn et al., 2011).

Entre los efectos beneficiosos que las saponinas ofrecen a la propia planta está la toxicidad que ejercen sobre muchos insectos herbívoros (Sylwia et al., 2006; Mazahery-Laghab et al., 2011) debido principalmente al sabor amargo que la acumulación de saponinas produce y del que el ácido zánhico parece ser el más

responsable. Además la acumulación de saponinas en la raíz de la alfalfa protege a la planta frente a diversos nematodos. La biomasa seca de la planta ha sido utilizada sobre suelos infectados con nematodos mejorando la producción y disminuyendo las pérdidas de cultivos ocasionadas por estos parásitos (D'Addabbo et al., 2011). Incluso se ha descrito la actividad antifúngica de las saponinas de la alfalfa frente a hongos que afectan a cultivos; Demirci y Dólar (2006) demostraron que la adición de extractos de materia seca de alfalfa reducía tanto la presencia como la severidad del hongo *Phytophthora* en cultivos de pimiento, y el ácido medicagénico fue descrito como el componente responsable de este efecto.

Efectos funcionales en el organismo.

Han sido muchos los efectos farmacológicos y los usos de *M. sativa* descritos hasta ahora, entre ellos destacan su efecto neuroprotector, hipocolesterolemia, antioxidante, antiúlceras, antimicrobiano, hipolipidémico, estrogénico, tratamiento de la aterosclerosis, enfermedades del corazón, infarto cerebral, cáncer, diabetes y síntomas de la menopausia (Bora and Sharma, 2011a). Incluso su efecto hipotensor, también ha sido descrito (Kapel et al., 2006a)

a) Actividad antifúngica.

La actividad antifúngica frente a patógenos humanos también ha sido demostrada, ya que la saponinas extraídas de las plantas de alfalfa disminuyeron el factor de virulencia de *Candida albicans*, así como el crecimiento de hifas, la adhesión y formación de biopelícula necesaria para provocar una infección (Sadowska et al., 2014). Esta actividad antifúngica también fue descrita frente a *Microsporum gypseum*, *Trichophyton interdigitales* y *T. tonsurans*, hongos que comúnmente causan enfermedades de la piel tanto en animales como humanos, ya que las saponinas de la alfalfa mostraron una fuerte inhibición del crecimiento de las tres especies de hongos (Houghton et al., 2006). El efecto como agente antimicrobiano contra un amplio espectro de bacterias y levaduras, también ha sido estudiado y el ácido medicagénico ha sido descrito como responsable de actuar sobre *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecales* (Avato et al., 2006).

b) Actividad hipocolesterolemia

Se han llevado a cabo diferentes estudios *in vivo*, para evaluar el efecto de distintos extractos provenientes de la alfalfa sobre parámetros relacionados con el metabolismo lipídico. Khaleel et al. (2005) realizaron extractos en diversos estadios vegetativos de las plantas de alfalfa y en diferentes localizaciones de cultivo que finalmente fueron administrados a conejos que consumían una dieta alta en colesterol. Los principales resultados fueron una disminución significativa en colesterol total y LDL. Además, todos los extractos de alfalfa tuvieron una actividad anti - aterosclerótica que fue observada en la normalización de secciones de aorta comparada con grupos control que no fueron administrados con los extractos. Recientemente ha sido llevado a cabo un estudio por Shi et al., (2014) en el que se administró un extracto de alfalfa con saponinas a ratas hiperlipidémicas consiguiendo efectos positivos sobre el metabolismo lipídico. Se produjo una disminución de la expresión de 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa (*Hmgcr*) y de acetil - CoA - acetil transferasa (*Acat2*), con una sobreexpresión de la colesterol 7 - α - hidroxilasa (*Cyp7a1*) y del receptor de LDL (*Ldlr*) en el hígado de los animales tratados con los extractos, de manera que los niveles de LDL plasmáticos se vieron drásticamente reducidos mientras que los de HDL aumentaron, y la excreción fecal de colesterol y ácidos biliares aumentó significativamente, mediada por la administración de extractos de alfalfa.

c) Actividad hipoglucemiantes:

Las hojas de alfalfa han sido utilizadas tradicionalmente en infusión para el tratamiento de la diabetes en el sur de África, y muchos estudios se han llevado a cabo para comprobar sus efectos en décadas anteriores. Swanston-Flatt et al., (1990) estudiaron este efecto en un modelo experimental de ratón donde la diabetes fue inducida por administración de estreptozotocina. La administración de alfalfa produjo una disminución de la glucosa basal en plasma, así como una disminución en la ingesta y peso corporal. Los efectos sobre la diabetes fueron atribuidos a la presencia de Mn en las plantas de alfalfa. Posteriormente, Gray and Flatt (1997) intentaron explicar el mecanismo de acción estudiando el transporte de glucosa y su metabolismo en músculo esquelético de ratón (con diabetes inducida o no), y la secreción de insulina en un cultivo de la línea celular BRIN-BD11. La alfalfa

administrada como una infusión en el agua de bebida, incorporada en la dieta, o en forma de extracto para la línea celular, redujo significativamente la hiperglucemia ya que la concentración plasmática de glucosa de los ratones diabéticos que recibieron alfalfa fue similar a la del grupo control no diabético. Además, el transporte de glucosa en el músculo esquelético fue mejorado; y el extracto acuoso de alfalfa estimuló la secreción de insulina en las células BRIN-BD11.

Similares resultados fueron encontrados en el estudio llevado a cabo por Al-Awadi et al., (2004), donde los extractos de alfalfa disminuyeron significativamente los niveles de glucosa sanguínea. El contenido en minerales como Zn, Se, Cu y especialmente Mn, aumentaron significativamente en páncreas, hígado y plasma comparado con el grupo de animales diabéticos no tratados. Además, la reducción o pérdida de tinción de insulina en los islotes de animales diabéticos, fue parcialmente restaurado por la administración de la alfalfa, efecto de nuevo atribuido a la presencia de Mn.

d) Actividad antioxidante, neuro y cardioprotectora:

La capacidad antioxidante y neuroprotectora de la alfalfa frente a la isquemia cerebral también ha sido descrita. En un estudio llevado a cabo por Bora and Sharma, (2011b), extractos en metanol de las plantas, fueron administrados oralmente a ratones a los que se les indujo una isquemia cerebral. Los principales efectos encontrados demostraron que el pretratamiento con estos extractos atenuó el volumen de infarto cerebral y la formación de radicales oxidrilo hasta un 54% y 50% respectivamente, además la concentración de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARs) en cerebro se vio significativamente disminuida, incluso la disminución de los parámetros bioquímicos como glutatión (GSH) y superóxido dismutasa (SOD), producida por la isquemia, fue revertida.

En un trabajo posterior realizado por Al-Dosari, (2012) se ensayó el efecto de extractos de hojas frescas de alfalfa liofilizados, dosificados oralmente, sobre la capacidad antioxidante y el efecto hepatoprotector en ratas a las que se indujo hepatotoxicidad por administración intraperitoneal de tetracloruro de carbono (CCl₄). Las conclusiones finales de este trabajo demostraron principalmente, que el

pretratamiento con alfalfa previno la elevación de AST, ALT y de la gamma glutamil transpeptidasa (γ -GT) y bilirrubina. Los niveles plasmáticos de colesterol total, LDL y LDLv disminuyeron significativamente con la adición de alfalfa, mientras que el HDL se vio aumentado, comparado con los grupos de animales tratados sólo con CCl₄. La concentración de TBARs en hígado y la inflamación evaluada histológicamente también se redujeron significativamente con la alfalfa. Todos estos efectos relacionados con la presencia de saponinas e isoflavonoides.

La polisavona es un extracto de las plantas de alfalfa que contiene polisacáridos, saponinas, flavonoides, proteína y otros factores desconocidos. Este compuesto fue ensayado en pollos administrándolo en la dieta a distintas concentraciones, y los resultados mostraron una disminución de la grasa abdominal (Dong et al., 2007) así como un aumento de la actividad SOD-t y glutatión peroxidasa (GPx) en plasma e hígado, y una disminución de los niveles de malonil - dialdehído (MDA) en plasma (Dong et al., 2011).

La actividad antioxidante de los péptidos de las hojas de alfalfa obtenidos por hidrólisis de las mismas con proteasas, fue demostrada en diferentes modelos *in vitro* donde se comprobó que existen numerosos péptidos de pequeño peso molecular que tienen la capacidad de donar electrones e hidrógeno, así como secuestrar radicales superóxido, hidroxilos y DPPH (Xie et al., 2008).

Estudios realizados sobre diferentes cultivos celulares en modelos de eritroleucemia K562 y adenocarcinoma de mama MCF-7, melanoma de ratón B16 y líneas de leucemia murina L1210 y P388, han dado como resultado en general citotoxicidad e inducción de apoptosis en células tumorales y quimiorresistentes administrando extractos de hojas de alfalfa. Estos efectos fueron atribuidos a la presencia de flavonoides en las plantas de alfalfa (Gatouillat et al., 2014).

Aunque el efecto cardioprotector de la alfalfa ha sido descrito anteriormente, un estudio reciente llevado a cabo por Gomathi et al., (2014) ha evaluado el efecto de extractos etanólicos de la alfalfa sobre ratas Wistar albinas en las que se indujo un infarto de miocardio a través de la inyección intraperitoneal de isoproterenol. Se administraron extractos de alfalfa por la misma vía y los resultados mostraron una disminución de las enzimas séricas transaminasas AST y ALT en los grupos infartados, así como de las enzimas cardíacas lactato deshidrogenasa (LDH) y

creatina kinasa (CK- MB). Además se observó un incremento de las actividades enzimáticas de catalasa (CAT), SOD y GPx en homogeneizados de tejido cardíaco y una disminución de la peroxidación lipídica. Aunque no se ha llegado a dilucidar el mecanismo que lo explicaría, estos efectos han sido atribuidos a la presencia de antioxidantes en los extractos de la alfalfa.

Los efectos positivos de la proteína y de los diferentes componentes fitoquímicos presentes en los extractos obtenidos a partir de la alfalfa han sido estudiados por muchos autores, sin embargo, poco hay descrito con respecto a los efectos de los polisacáridos de la planta. En el trabajo llevado a cabo por Wang et al., (2014), se ha demostrado el efecto protector *in vitro* de los polisacáridos de la alfalfa sobre hepatocitos después de inducir daño oxidativo con H₂O₂ sobre el cultivo, los extractos restauraron las actividades de las enzimas antioxidantes SOD y CAT, aumentando la capacidad antioxidante de los hepatocitos.

e) Actividad hipotensora:

El efecto hipotensor de la alfalfa, y en concreto de un hidrolizado industrial de concentrado de proteína blanca de la leguminosa, fue ensayado en un modelo de rata espontáneamente hipertensa (SHR). Distintas concentraciones del hidrolizado fueron estudiadas, y el efecto observado fue dosis – dependiente, siendo la de más efecto de 0,5 g/kg de peso. La administración se realizó por vía oral y la presión sanguínea fue determinada 0, 2, 4 y 6 horas después de la administración del hidrolizado. La máxima reducción de la presión sanguínea ocurrió a las 4 horas donde se observó una disminución de 29,10 mmHg (Kapel et al., 2006a).

f) Otras actividades:

Se han ensayado diferentes extractos en metanol de la parte aérea de *Medicago sativa* sobre la actividad anti-ansiolítica en un modelo experimental de ratón que sufre ansiedad y los resultados mostraron que la fracción extraída en etil- acetato, donde se detectó la presencia de flavonoides, exhibió una significativa actividad ansiolítica; estos flavonoides naturales, la mayoría de ellos presentes en las plantas de alfalfa, han sido descritos por su actividad anti-ansiolítica y se les ha atribuido estos efectos (Bora and Sharma, 2011c).

La presencia de L-canavanina, un aminoácido no proteico cuya función en la planta es el almacén de nitrógeno en la semilla de la planta, ha sido descrito como un potente antagonista que exhibe actividades antimetabólicas en muchos sistemas vivos, y ha sido descrita por producir un síndrome autoinmune como el lupus (Akaogi et al., 2006) después de la ingesta de semillas de alfalfa. Sin embargo, estudios más recientes donde los extractos de brotes de alfalfa de etil - acetato se administraron como parte de la dieta para evaluar su efecto sobre la severidad de la enfermedad de lupus eritematoso sistémico en un modelo de ratón MRL-lpr/lpr propenso a la enfermedad, mostraron una atenuación de la respuesta inflamatoria y de las citoquinas de los linfocitos reactivos, así como una disminución de la severidad de la enfermedad, un incremento de la supervivencia y de la esperanza de vida (Hong et al., 2009).

2.5. HIPERTENSIÓN ARTERIAL.

2.5.1. Definición, prevalencia y regulación.

Definición.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) establece los valores de PA normal en el adulto en 120 mmHg para la presión sistólica (PAS) y en 80 mmHg para la presión diastólica (PAD); y acepta que se alcanza la hipertensión arterial (HTA) cuando la PAS es ≥ 140 mmHg y la PAD ≥ 90 mmHg.

Otra de las definiciones más aceptada y algo más compleja, es la establecida por la Sociedad Europea de Hipertensión (SEH) y la Sociedad Europea de Cardiología (CES) (Tabla 3).

Tabla 3. Clasificación de la Presión arterial según la Sociedad Europea de Hipertensión y la Sociedad Europea de Cardiología (Mancia et al., 2013).

Clasificación	PA sistólica (mmHg)	PA diastólica (mmHg)
Óptima	< 120	< 80
Normal	120 - 129	80 – 84
Límite alto de la Normalidad	130 - 139	85 – 89
Hipertensión arterial de grado I (leve)	140 – 159	90 – 99
Hipertensión arterial de grado II (moderada)	160 - 179	100 – 109
Hipertensión arterial de grado III (grave)	≥ 180	≥ 110
Hipertensión sistólica aislada	≥ 140	< 90

Prevalencia de la hipertensión arterial.

Las enfermedades cardiovasculares son responsables de 17 millones de muertes por año (1/3 del total). Y entre ellas las complicaciones ocasionadas por la hipertensión causan 9,4 millones de muertes al año (un 45% debido a muertes por cardiopatías y un 51% por accidente cerebrovascular). En la población mundial el 40% de los adultos mayores de 25 años presentan HTA, registrándose la máxima prevalencia en África con un 46% mientras que la más baja se da en América con un 35% de la población afectada. Hay un aumento progresivo de la prevalencia de la HTA debido fundamentalmente al envejecimiento de la población y al aumento

de algunos de los factores de riesgo sobre todo de tipo comportamental (dieta poco saludable, alcohol, inactividad física, tabaco y exposición a situaciones de estrés) (WHO, 2013).

Según la Asociación de la Sociedad Española de la Hipertensión - Liga Española para la Lucha contra la Hipertensión Arterial (SEH-LELHA), la prevalencia de la hipertensión en España está cerca del 40% de la población adulta, porcentaje que se incrementa hasta el 85% en mayores de 65 años, afectando a 10 millones de personas adultas. Además se establece que entre los menores de 18 años la prevalencia está entre el 3,5% y el 5%. (SEH-LELHA, 2005).

La hipertensión arterial se puede clasificar como hipertensión arterial esencial o hipertensión secundaria.

- *Hipertensión arterial esencial o primaria (o idiopática).* Aquella que no tiene una etiología única conocida. Es la que en mayor porcentaje padece la población (aproximadamente un 95% de la población que sufre HTA es de este tipo) Aunque no se conoce su origen, si se sabe que en su desarrollo están implicados tanto factores genéticos como ambientales. Estos factores etiológicos que contribuyen a la HTA han recibido el nombre de factores hipertensinogénicos entre los que destacan (Carretero and Oparil, 2000):

1. **Obesidad.** Sobre todo, la obesidad abdominal es el principal factor que contribuye al desarrollo de la hipertensión. En el estudio Framingham, se estimó que cada 10% de peso ganado, se asoció con un incremento de 6.5 mmHg en la PSA (Ashley Jr. and Kannel, 1974).

2. **Resistencia a la insulina.** La insulina favorece la retención renal de sodio (Na^+) y el aumento del volumen intravascular, incrementa la actividad del Sistema Nervioso Simpático aumentando las resistencias periféricas y el gasto cardíaco, favorece la proliferación de las células musculares lisas, facilitando la aterogénesis y parece provocar, una alteración en el transporte transmembrana, incrementando la concentración de Ca intracelular y la resistencia vascular.

3. **Ingesta elevada de alcohol.** Aproximadamente un 10% de la hipertensión que presenta la población está asociada con la ingesta de

alcohol, estableciéndose una relación lineal entre la ingesta de alcohol y los valores de PA. Las deficiencias en Mg y Ca pueden contribuir a este incremento de la PA después de la ingesta crónica de alcohol (Kawano, 2010).

4. **Ingesta elevada de sal.** El aumento del consumo de Na⁺ conduce a un aumento de la PA ya que se produce un aumento del volumen de fluido intravascular. Además numerosos estudios han revelado que también existe una fuerte correlación entre la ingesta de sodio e hipertrofia ventricular, fibrosis miocárdica, rigidez arterial, engrosamiento de las paredes de los vasos, agregación plaquetaria anormal, pérdida de función renal y urolitiasis (Koliaki and Katsilambros, 2013).

5. **Edad.** En el envejecimiento se produce un engrosamiento y aumento de rigidez de las arterias que conducen a un aumento de las resistencias periféricas al flujo sanguíneo lo que determina un aumento de la PA. Además se produce un aumento de la permeabilidad endotelial, un aumento de la secreción de factores de crecimiento vasoconstrictores como la angiotensina II y la endotelina; mientras que hay una disminución en los factores vasodilatadores como el NO (Najjar et al., 2005).

6. **Sedentarismo.** Se ha demostrado que las intervenciones sobre el estilo de vida, incluyendo la actividad física son terapias exitosas para prevenir, tratar y controlar la hipertensión. Por ejemplo, el proceso de aumento de rigidez arterial puede ser atenuado e incluso revertido manteniendo en forma el sistema cardiorrespiratorio (Kokkinos, 2014).

7. **Estrés.** La hipertensión se caracteriza por una intensificada actividad del sistema nervioso simpático en muchos casos, además los modelos animales han establecido que el estrés psicológico induce hipertensión implicando incluso mecanismos inflamatorios y renales. Aunque faltaría esclarecer cuáles son esos mecanismos exactos, si se ha comprobado mediante varios trabajos publicadas recientemente, que la práctica de yoga, entre otras actividades de relajación, son capaces de disminuir la PA (Hagins et al., 2013; Wang et al., 2013).

8. **Ingesta baja de potasio.** En la mayoría de animales e individuos que son hipertensos se ha encontrado que existe un exceso de Na⁺ y un déficit de

K^+ . De hecho se ha propuesto, que el mayor factor medioambiental en el desarrollo de HTA no es el exceso de Na^+ o la carencia de K^+ sino la convergencia de ambos factores. Además cuando se suministra K^+ en una dieta en la que la ingesta de Na^+ es alta, se produce una disminución de la PA. El sodio retenido reemplaza al K^+ que es excretado en la orina y la depleción de K^+ promueve diversos efectos entre los que destacan el incremento tono mediado por el sistema nervioso simpático, la vasoconstricción, la estimulación del RAAS y la liberación de renina en el riñón e hipertrofia (Adrogué and Madias, 2014).

- *Hipertensión secundaria*: se establece como consecuencia de una enfermedad, una vez detectado el origen puede controlarse tratándose adecuadamente (aproximadamente el 5% de la población que sufre HTA).

Regulación de la presión arterial.

Existen precisos mecanismos de control, intrínsecos y extrínsecos, que tienden a mantener la PA en los valores normales. Estos mecanismos pueden ser a corto plazo, como mecanismos neurales de tipo reflejo y dan lugar a respuestas correctoras rápidas, instantáneas, mediadas por las fibras musculares cardíacas y vasculares; o mecanismos a más largo plazo que aparecen ante cambios crónicos, que se basan esencialmente en el ajuste del volumen sanguíneo y en los que tiene una gran importancia la función renal.

Las respuestas efectuadas a *corto plazo* están mediadas por barorreceptores arteriales y quimiorreceptores. Esta respuesta es iniciada en segundos, pero se atenúa si el cambio persiste en pocos días por procesos de adaptación sensorial o efectora. Los mecanismos a *medio plazo* requieren minutos y se desarrollan por completo en días, incluyen procesos intrínsecos, como los desplazamientos de volumen entre la sangre y el líquido intersticial al variar la presión capilar (en relación con la arterial) y los fenómenos de adaptabilidad retardada de las paredes vasculares, y extrínsecos, mediados por el sistema renina – angiotensina – aldosterona (RAAS). A *largo plazo* la regulación se ejerce sobre el volumen extracelular y, por tanto, sobre el grado de

repleción y capacidad del sistema circulatorio. Los mecanismos que tardan horas en manifestarse y resultan eficaces tras varios días, incluyen; a) la variación compensatoria del volumen de orina eliminado por el riñón en relación con los cambios de presión arterial; b) el efecto de la hormona antidiurética (ADH) en respuesta a los cambios de estimulación de los receptores de volumen atriales; y c) la acción de la aldosterona en relación con el RAAS (Barber and Ponz, 1998).

Sistema Regina – Angiotensina – Aldosterona.

La aldosterona es un mineralocorticoide que regula la concentración de Na^+ y K^+ en los líquidos extracelulares. Actúa a nivel renal, estimulando la reabsorción de Na^+ en los segmentos distales de la nefrona y contribuyendo al control del volumen del medio interno, del volumen sanguíneo y de la PA. La disminución de la PA, del gasto cardíaco, hipoperfusión renal, el descenso en la concentración de Na^+ en el líquido tubular distal o la activación de las fibras simpáticas renales determinan la liberación renina desde las células yuxtaglomerulares renales. La renina actúa enzimáticamente sobre una glicoproteína plasmática, el angiotensinógeno, convirtiéndolo en el decapeptido angiotensina I (Ang I); mediante la enzima convertidora de angiotensina (ECA), abundante en el endotelio capilar pulmonar, se convierte en angiotensina II (Ang II), un octapéptido vasoconstrictor. La Ang II, además de aumentar la actividad miogénica arteriolar, facilita la interacción neuroefectora adrenérgica sobre vasos sanguíneos y corazón, y determina la síntesis y secreción de aldosterona desde la corteza adrenal; como consecuencia se produce un incremento de la reabsorción renal de Na^+ y retención de agua y consecuentemente un aumento del volumen sanguíneo y de la PA.

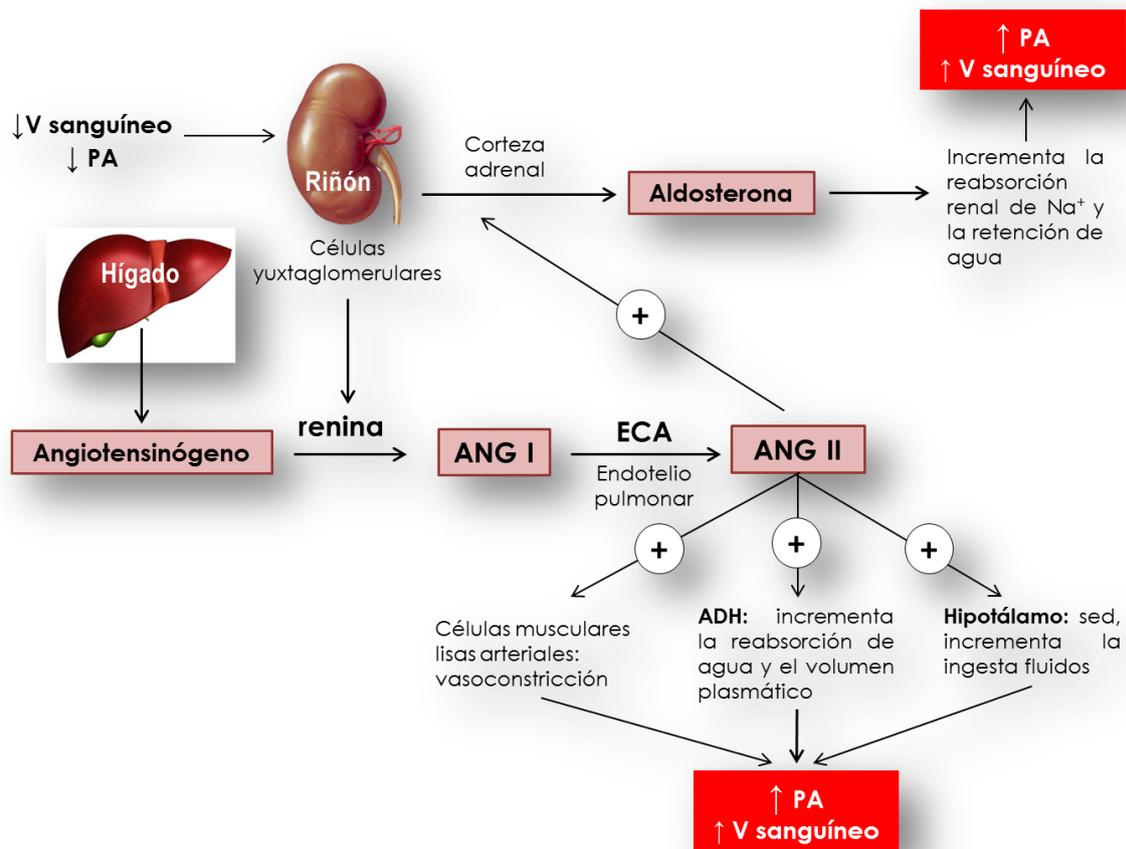


Figura 5. Papel del Sistema renina – angiotensina – aldosterona (RAAS) en la regulación del volumen sanguíneo y de la presión arterial. V: volumen; PA: presión arterial; ANG: angiotensina; ECA: enzima convertidora de angiotensina, ADH: hormona antidiurética. Modificado de Larson et al., (2012).

Hormona antidiurética o vasopresina (ADH).

La disminución del volumen extracelular, con pérdida simultánea de agua y sales, o por déficit simultáneo de sus ingresos, reduce la repleción vascular, la tensión de las paredes de los vasos y la descarga de los barorreceptores. La disminución de las señales aferentes de estos receptores conduce a la activación de las neuronas hipotalámicas secretoras de ADH, aumentando sus niveles, la reabsorción renal de agua y excretando menor volumen de orina. Si la disminución de volumen ha sido lo suficientemente grande, además de los efectos antidiuréticos, la ADH puede provocar vasoconstricción arteriolar generalizada, con el consiguiente aumento de la presión arterial, facilitando la retención de agua y de Na^+ en el organismo y la recuperación del volumen extracelular. Si el cambio que se produce es de aumento

en el volumen extracelular, habrá un aumento de las descargas de los barorreceptores, inhibición de la secreción de ADH, menor reabsorción renal de agua y mayor eliminación de orina y por tanto se tiende hacia la normalización del volumen extracelular.

Péptidos natriuréticos.

Los cambios de volumen extracelular afectan también a la liberación de los péptidos natriuréticos desde las paredes auriculares (ANP) o ventriculares (BNP), favoreciendo la excreción de sodio. Si aumenta el volumen extracelular se liberan más ANP y BNP excretando más sodio y más agua con la orina, con una reducción del volumen. Además el péptido ANP inhibe el RAAS y la secreción de aldosterona, aumenta la tasa de filtración glomerular por dilatación de la arteriola aferente y constricción de la eferente e inhibe la secreción de ADH facilitando la excreción de sodio y agua (Pastrana and García de Casasola, 2013).

Óxido nítrico.

NO es sintetizado por la óxido nítrico sintasa (NOS) a través de una serie de reacciones redox desde la L-arginina, oxígeno y NADP. Existen 4 isoformas: eNOS (endotelial), iNOS (inducible), nNOS (neural) y mitocondrial. La vida media del NO generado endógenamente es extremadamente corta y tiene una gran difusión a través de las membranas celulares. En las células, el NO estimula la conversión de GTP a GMPC regulando el balance del calcio de a través de una proteína quinasa dependiente de GMPC y provocando vasodilatación. El NO es muy reactivo con otras moléculas, incluyendo el anión superóxido y el oxígeno; los productos intermedios de estas reacciones son conocidos como especies reactivas de nitrógeno y promueven muchas reacciones que producen daños fisiopatológicos como la peroxidación lipídica, rotura de DNA y generación de nitrosaminas (Hu et al., 2013).

2.5.2. Patología de la hipertensión.

Como consecuencia de la HTA, algunos órganos específicos sufren daños dando lugar a distintas enfermedades; se ha acuñado el término específico denominado

“target organ damage” para enfermedades que involucran a órganos específicos, en este caso a la vasculatura, el corazón, el cerebro y el riñón (Rubattu et al., 2014).

Daño renal.

La hipertensión severa puede causar fallo renal progresivo que podría prevenirse si los valores de PA disminuyeran. El diagnóstico de daño renal inducido por HTA se basa principalmente en el hallazgo de una función renal afectada o en la detección de concentraciones urinarias de albúmina elevadas.

En el proceso de regulación de la PA, la mayoría de las acciones llevadas a cabo a largo plazo, recaen sobre el riñón que debe ajustar el balance de Na^+ , el volumen de fluido extracelular y el volumen sanguíneo. La efectividad del riñón en estos ajustes se mantiene durante un amplio rango de cambios en la PA y afecta fundamentalmente a la tasa de filtración glomerular y la carga de Na^+ filtrada, así como el flujo sanguíneo renal (Navar, 2005). Además un incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) contribuye a la vasoconstricción renal, la liberación de renina, la actividad del nervio renal aferente, la contracción de las arteriolas aferentes, incrementa la secreción de Ang II, de endotelina-1 y activación del receptor prostanoide tromboxano; así como disfunción endotelial y proteinuria (Araujo and Wilcox, 2014).

Daño cardiovascular.

A nivel cardíaco, se produce una hipertrofia del ventrículo izquierdo, dilatación y disfunción sistólica y diastólica de la aurícula izquierda. Además de la hipertrofia del ventrículo izquierdo, se producen modificaciones tanto de la forma como la geometría del mismo, proporcionando estas variables información acerca de la respuesta cardíaca a la hipertensión. La disfunción sistólica parece ocurrir paralelamente a los cambios morfológicos y se observa un desacoplamiento entre la relajación y la presión de llenado del corazón. Los tratamientos antihipertensivos pueden revertir, en mayor o menor medida, tanto el aumento de masa ventricular como la alteración geométrica y la disfunción diastólica (Santos and Shah, 2014).

En relación a la función vascular la elevación de la PA produce una activación de las células T, promueve la entrada de macrófagos y otras células inflamatorias en la vasculatura y el riñón, donde se liberan citoquinas; se produce vasoconstricción y

disfunción endotelial potenciado a su vez por el aumento de ROS (Dinh et al., 2014). Esta disfunción endotelial está vinculada, entre otros mecanismos, con la fibrosis vascular que da lugar a un aumento de la deposición de matriz extracelular (en particular colágeno) en las paredes de aorta, arterias mesentéricas y microvasos cerebrales, provocando un progresivo aumento de la rigidez de la pared celular de las arterias. El mecanismo por el que se produce este acúmulo de matriz extracelular está mediado por la Ang II, la aldosterona y la endotelina – 1, péptidos bioactivos que aumentan la producción de colágeno I por parte de las células del músculo liso (Intengan and Schiffrin, 2001).

Daño oxidativo.

La existencia de una estrecha relación entre radicales libres e hipertensión fue establecida por primera vez en los años 60, aunque no fue hasta décadas más tarde cuando se comenzó a investigar el papel del estrés oxidativo sobre el desarrollo de la hipertensión (Hamza and Dyck, 2014).

Como ya se ha visto, durante la HTA se produce una situación de estrés oxidativo, que afecta principalmente a riñón, cerebro, corazón y vasculatura y que emerge fundamentalmente de tres mecanismos: 1) aumento de ROS principalmente proveniente de la activación de las enzimas NADPH oxidasa, xantina oxidasa y las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial, 2) disminución de la biodisponibilidad de NO que al reaccionar con el anión superóxido se transforma en peroxinitrito, esta reacción desencadena la desaparición del efecto vasodilatador del NO y el aumento de la concentración de un potente oxidante; y por último 3) se produce un descenso de la capacidad antioxidante por disminución de la actividad enzimática antioxidante de las enzimas SOD, CAT y GPx además de disminuir la concentración de antioxidantes (Fukai and Ushio-Fukai, 2011).

Otras alteraciones asociadas a la HTA.

Existen múltiples alteraciones del organismo asociadas al desarrollo de la hipertensión y que pueden servir en algunos casos de diagnóstico acompañante a la determinación directa de la HTA. Teniendo en cuenta el carácter asintomático que

presentan la mayoría de alteraciones, se hace importante la determinación de parámetros que se relacionan con la enfermedad.

Además de la disminución del volumen de orina así como del Na⁺ excretado, otros parámetros urinarios y plasmáticos pueden presentar alteraciones. Se debería determinar hemoglobina y hematocrito, glucosa plasmática en ayunas, colesterol sérico total, cLDL, cHDL, triglicéridos séricos en ayunas, potasio y sodio séricos, ácido úrico sérico, creatinina sérica (con estimación de la tasa de filtración glomerular) y análisis de orina con examen microscópico y determinación de proteína y prueba para microalbuminuria. Todas estas determinaciones están encaminadas, además de para comprobar daño orgánico, para determinar el riesgo de empeoramiento de la enfermedad cardiovascular asociada al padecimiento de HTA.

2.5.3. Modelos animales experimentales para el estudio de la hipertensión.

Debido a la alta prevalencia de la hipertensión y al desconocimiento sobre la etiología de la hipertensión esencial, ha sido necesario el establecimiento de diferentes modelos animales experimentales que desarrollen HTA, con múltiples factores asociados al desarrollo de ésta. El uso de estos modelos ha ayudado a descubrir tanto algunas de las causas, la patofisiología, las complicaciones como el tratamiento de la hipertensión (Dornas and Silva, 2011).

Tabla 4. Modelos animales que desarrollan hipertensión utilizados en experimentación por sus similitudes con el modelo de hipertensión humana. Modificado de (Dornas and Silva, 2011)

MODELO DE HIPERTENSIÓN	Características y desarrollo del modelo
Hipertensión genética	
<i>Spontaneously hypertensive rats, SHR</i> (Okamoto and Aoki, 1963)	Derivadas del cruce entre ratas Wistar Kyoto que desarrollaron una HTA espontánea. HTA se desarrolla: 4 – 6 semanas de edad (sin intervención fisiológica, farmacológica o quirúrgica). Factores ambientales pueden afectar al desarrollo de la HTA. Similitud de la fisiopatología con la HTA esencial humana. Alteraciones estructurales en el corazón asociadas con la hipertrofia cardíaca.
<i>Stroke-prone, Spontaneously hypertensive rats, SHR-SP</i> (Okamoto et al., 1974)	Se produce por variaciones individuales de origen genético a partir del modelo SHR. Tendencia a la muerte por infarto cerebral. Modelo más utilizado por sus semejanzas al infarto cerebral en humanos.
<i>Dahl salt-sensitive rats DS</i> (Dahl et al., 1962)	Modelo seleccionado desde endocruzamientos de ratas Sprague – Dawley, el desarrollo fundamental de la HTA es con una dieta alta en NaCl. Una alimentación con contenido en NaCl normal, también da lugar a HTA. Desarrollan HTA sistémica después de ingerir una dieta rica en sal. Son insulinoresistentes incluso antes del establecimiento de la HTA.
<i>Transgenic hypertension TGR(mREN2)27</i> (Mullins et al., 1990)	Excelente modelo para estudiar el papel concreto de un gen en la patogénesis de la HTA. Desarrolla HTA “fulminante” (200 - 260 mmHg PMS) en la 5ª semana de edad. Incremento en el grosor de las arterias y arteriolas más grandes. No es un modelo representativo de la hipertensión humana, pero permite análisis de consecuencias de severidad. Permite identificación de los tipos de daño esperados desde la activación de un gen.
<i>Borderline hypertensive rat BHR</i> (Sanders and Lawler, 1992)	Modelo genético de HTA inducida ambientalmente en la primera generación entre SHR y WKY. Sistema nervioso simpático está implicado. Se produce un incremento de la concentración de norepinefrina durante un estrés medioambiental agudo. Altas concentraciones en plasma de vasopresina, hipertrofia cardíaca.
Hipertensión renal	
<i>Hipertensión renovascular Goldblatt model</i> (Goldblatt et al., 1934)	Constricción de una o ambas arterias renales: 2K1C: constricción de 1 arteria renal. Incremento de la síntesis de renina y ANG II, incrementa la resistencia periférica total y eleva la PS. 1K1C: 1 arteria renal ocluida y el riñón contralateral es extraído. Modelo ideal para el estudio del papel de la expansión del volumen en el desarrollo de la HTA. 2K2C: constricción de ambas arterias renales. Isquemia renal severa, activación del sistema renina – angiotensina y el sistema nervioso simpático, elevación de la vasopresina sérica y de la PS. Alta incidencia de infarto espontáneo, con una lesión de las pequeñas arterias y arteriolas (oclusión trombótica) similar al infarto cerebral en humanos.
<i>Hipertensión renoprival</i>	Reducción significativa de la masa de nefronas por nefrectomía o por enfermedad: glomérulo esclerosis, daño túbulo intersticial, proteinuria y progresión hasta estado final de enfermedad renal (Ledingham and Pelling, 1970)

Hipertensión endocrina

DOCA salt models
(Garwitz and Jones, 1982)

DOCA y dieta alta en sal causa incremento de la PS. Incremento de la formación de superóxidos. Retención de agua y sodio, los efectos renales son similares a humanos pero requiere grandes dosis de fármaco, reducción quirúrgica de la masa renal e ingestión de grandes cantidades de NaCl. No es un modelo muy realista para pacientes hipertensos.

Hipertensión inducida medioambiental y psicosocialmente.

Aumento de la PS por exposición a estrés: hipertensión persistente. El efecto deletéreo depende del período de exposición, duración, tipo: estímulo emocional, estrés psicosocial, inmovilización, deprivación de comida o estímulo eléctrico, ruido, luces, frío, competencia por comida y agua... Alteración del sistema hipotalámico – pituitaria – eje adrenal, sistema renina – angiotensina – aldosterona y sistema nervioso simpático.

Hipertensión neurogénica

Denervación de barorreceptores seno aórticos, SAD
(DiBona and Jones, 2001)

Permanente incremento de la PS desde un cambio neural primario.
Es el modelo de hipertensión neurogénica más usado.

Hipertensión por inhibición crónica del óxido nítrico

(Baylis et al., 1992; Ribeiro et al., 1992)

La administración oral de L-NAME promueve una HTA persistente asociada con daño renal, glomérulo – esclerosis, isquemia glomerular e infiltración intersticial y vasoconstricción por el tono simpático

Hipertensión inducida por ANG II

(Itoh et al., 1993)

La infusión de ANG II, potente vasoconstrictor de los vasos periféricos, induce crecimiento del músculo liso de los vasos sanguíneos y el corazón. Dirige a un lento desarrollo del incremento de PS en un período de 6 – 10 días.

Hipertensión inducida dietéticamente

(Kang et al., 2004; Navarro-Cid et al., 1995)

Alta ingesta de sal: disminuye niveles plasmáticos y la excreción urinaria de nitratos, incrementa la producción de superóxidos en los vasos y el riñón por la SOD, inactivación de NO en animales que mantienen un consumo alto de grasas y azúcares se relaciona con sensibilidad a la sal y se produce alta PS.
Un alto consumo de fructosa produce un modelo de síndrome metabólico con hipertensión, hiperlipidemia y resistencia a la insulina acelerando el proceso de enfermedad crónica renal.

PS: presión sanguínea; HTA: hipertensión arterial, PMS: presión media sistólica, ANG II: angiotensina II, DOCA: Acetato 11-desoxicorticosterona; L-NAME: inhibidor de la NO sintasa;

El modelo de rata espontáneamente hipertensa (SHR).

El desarrollo del modelo de rata espontáneamente hipertensa comenzó con el cruce de machos Wistar Kyoto (WKY) con valores de presión sanguínea medios - altos (145 – 175 mmHg) y hembras con relativa presión sanguínea alta (presión sistólica 130 – 140 mmHg). A través de cruces selectivos de este tipo Okamoto y Aoki, (1963) establecieron una colonia de ratas que desarrollaban hipertensión sin excepción: ratas espontáneamente hipertensas, **SHR**. El establecimiento de la cepa de ratas WKY como control fue un poco más tarde, en 1971; el grado de diferencia genética entre las cepas SHR y WKY y entre diferentes colonias de cada cepa es sustancial y comparable al máximo grado de divergencia posible entre humanos no relacionados (Johnson et al., 1992; Lezin et al., 1992).

En este modelo, la elevación de la presión sanguínea comienza alrededor de las 5 – 6 semanas de edad y la presión sistólica puede alcanzar entre 180 – 200 mmHg en el adulto. Entre las semanas 40 – 50, la cepa SHR desarrolla características de enfermedad cardiovascular con hipertrofia del corazón y de los vasos sanguíneos (Conrad et al., 1995), engrosamiento de la pared arterial con disminución del diámetro interno; incremento del diámetro externo con una disminución del lumen (Amenta and Tomassoni, 2011); esto provoca una disfunción endotelial y disfunción renal (aparece proteinuria y la liberación de creatinina se ve disminuida).

El modelo SHR es considerado un buen modelo animal para el estudio de la hipertensión esencial o primaria debido a su parecido con la hipertensión esencial humana, y siendo además el modelo animal más utilizado. Las similitudes del modelo con humanos son la predisposición genética a altos valores de presión sanguínea sin etiología específica, un incremento de la resistencia periférica total y una respuesta similar al tratamiento con fármacos (Dickhout and Lee, 1998). Otra de las ventajas del modelo es que sigue la misma progresión que en humanos, con un período prehipertensivo, un período de desarrollo y posterior mantenimiento de una presión sanguínea alta; cada período transcurre durante varias semanas, lo que además permite el estudio del modelo en estas etapas (Doggrell and Brown, 1998).

Los mecanismos por los que se desarrolla la hipertensión en el modelo SHR han sido atribuidos a alteraciones neurales y vasculares. La posibilidad de crear una cepa hipertensa 100% por endogamia selectiva demuestra que la herencia es un factor muy importante. En su trabajo Ely y Turner, (1990) llegaron a la conclusión, que la herencia de la hipertensión en la cepa SHR está compuesta de al menos dos loci genéticos, uno autosómico y otro ligado al cromosoma Y. De hecho, como en el caso de los humanos, la hipertensión se desarrolla más tempranamente en machos y llega a ser más severa que en hembras (Doggrell and Brown, 1998).

Las ventajas de este modelo es que no requiere intervenciones quirúrgicas, y una limitación es que el desarrollo del daño renal no se establece hasta los dos años de edad.

2.5.4. Manejo y tratamiento dietético de la hipertensión. Importancia de las leguminosas.

Para el tratamiento y prevención de la hipertensión arterial se han propuesto principalmente dos estrategias: el tratamiento farmacológico y cambios en el estilo de vida, particularmente la intervención dietética.

- Tratamiento farmacológico. Debe ser destinado a las personas con riesgo moderado o alto de infarto de miocardio, accidente cerebrovascular o daño renal. Los mejores fármacos antihipertensivos son los diuréticos, los betabloqueantes, calcio-antagonistas, inhibidores de la ECA y antagonistas de los receptores de A II (Kobori et al., 2007).
- Cambios en el estilo de vida. No todos los pacientes diagnosticados de hipertensión, requieren un tratamiento farmacológico. Se ha demostrado que cambios en el estilo de vida incluso pueden llegar a ser tan eficaces como los tratamientos farmacológicos. Como ya se mencionó anteriormente, existen diversos factores hipertensinogénicos sobre los que se puede actuar, entre ellos los más eficaces son la pérdida de peso, la realización de actividad física (en concreto, ejercicio aeróbico), disminuir la

ingesta de alcohol y el tabaquismo, la realización de terapias de relajación y sobre todo la intervención dietética (Frisoli et al., 2011).

Tratamiento y prevención dietética de la hipertensión.

La óptima combinación de macronutrientes y micronutrientes tienen un significativo impacto en la prevención, tratamiento y complicaciones de las enfermedades cardiovasculares. La transición desde el Paleolítico, donde la dieta estaba compuesta por bajas cantidades de Na⁺, altas cantidades de K⁺, de fibra, bajo colesterol, proteína animal magra, baja ingesta de carbohidratos refinados y una alta ingesta de frutas, vegetales, frutos secos y pescado, hasta nuestras modernas dietas ha producido una epidemia de enfermedades relacionadas con la nutrición. Aterosclerosis, enfermedad coronaria, infarto de miocardio, accidentes cerebrovasculares, insuficiencia renal, diabetes mellitus tipo II, síndrome metabólico, obesidad e hipertensión son algunas de estas enfermedades (Houston, 2005).

Son muchas las evidencias que existen, tanto estudios epidemiológicos como ensayos clínicos, demostrando que la hipertensión se encuentra estrechamente relacionada con la dieta (Lancaster et al., 2014; Chan et al., 2014; Adebawo et al., 2007; Appel et al., 1997).

Una de las dietas reconocidas mundialmente, por su capacidad para disminuir o prevenir la hipertensión es la dieta DASH (*Dietary Approaches to Stop Hypertension*). Esta dieta fue desarrollada en un estudio multicéntrico, aleatorizado, de alimentación controlada, cuyo objetivo era comprobar la eficacia de dos patrones alimentarios consumidos durante 8 semanas sobre la presión arterial (Sacks et al., 1995). El patrón dietético, que no difiere en exceso de la alimentación que ya mencionamos que era común en el Paleolítico, fue construido teniendo en cuenta los niveles de macronutrientes y micronutrientes de anteriores estudios epidemiológicos. Esencialmente este patrón dietético consistía en el consumo de productos lácteos bajos en grasa, pescado, pollo, carne magra (en general) y grasa saturada disminuida, y proteína y calcio incrementados; además altas cantidades de frutas naturales, vegetales, granos no refinados, frutos secos, nueces y semillas como fuente de K, Mg y fibra dietética. Posteriores estudios llevados a cabo por Appel et al., (1997) conjuntamente con el grupo de investigación colaborativo

DASH, llegaron a las mismas conclusiones: el consumo de este patrón disminuyó sustancialmente la presión sanguínea. Otro trabajo realizado más recientemente con 810 sujetos, entre los que el 38% de los mismos sufrían hipertensión, fue el llevado a cabo por Elmer et al., (2006); los sujetos fueron sometidos a distintas intervenciones dietéticas durante 18 meses. Entre las intervenciones destacaba la implementación de la dieta DASH, y como resultado más importante se obtuvo una reducción incluso de 15 mmHg de la presión arterial.

Al igual que la dieta DASH, el patrón de dieta Mediterránea se caracteriza por un alto consumo de frutas y vegetales, incluyendo además un alto consumo de legumbres y un consumo moderado de pescado, carne y productos lácteos. La característica más relevante quizás de la dieta Mediterránea, diferenciándose de la dieta DASH, es la presencia del aceite de oliva Virgen Extra como principal fuente de grasa. Uno de los efectos beneficiosos del consumo de una dieta adherida al patrón de dieta Mediterránea, y que ha sido ampliamente estudiado es la capacidad de reducir el riesgo de enfermedad vascular (Estruch et al., 2013). En concreto, existe un reciente ensayo aleatorizado – controlado con un gran número de participantes (7447 sujetos), donde se ha ensayado el consumo de dietas adheridas al patrón de dieta Mediterránea y su efecto a largo plazo sobre la presión arterial, la conclusión final obtenida fue la disminución de la presión sanguínea (Toledo et al., 2013).

En referencia a estos patrones dietéticos y a la disminución de la presión arterial asociada, muchos alimentos específicos han sido establecidos como los causantes de este efecto; describiéndose los componentes particulares que son capaces de ejercer este efecto así como el mecanismo de acción por el que lo producen.

Tabla 5. Fuentes alimenticias con actividades antihipertensivas/hipotensoras y sus componentes bioactivos. Modificado de (Huang et al., 2013b)

Grupo	Fuente	Componente bioactivo	Efectos			Modelo	
			Hipotensor	Anti - Hipertensivo	Inhibidor ECA	Humanos	Ratas
Nueces, Semillas y legumbres	Legumbres y sésamo	Hidrolizados pépticos, péptidos	✓	-	✓	-	-
	Guisante y amaranto	Péptidos	-	-	✓	-	-
	Avellanas, almendras, nueces y cacahuets	K, P, Mg, Fe; fibra; ácidos grasos omega-3; fitoquímicos (tocoferol, tocotrienoles y escualeno)	-	✓	-	-	-
	Soja y productos fermentados	Hidrolizados, péptidos, isoflavonas	-	✓	✓	-	✓
	Maní tubérculo	Extractos en metanol y agua.	-	✓	-	-	-
Vegetales	Amaranto, berenjena, calabaza, espinaca,	K, Ca, P; fibra; vitaminas C y E; ácido clorogénico.	✓	-	-	-	-
	Ajo	Dipéptidos	-	-	✓	-	-
	Cebolla	Flavonoides (Quercetina y antocianinas)	-	✓	-	-	✓
	Espinaca, boniato, berros	Proteína, hidrolizados, péptidos, adenosina	-	-	✓	-	-
	Tomate	Ácido gamma-aminobutírico (GABA)	-	-	-	✓	-
	Melón de invierno	Zumo	✓	-	-	-	✓
	Ñame	Proteína	-	✓	✓	-	✓
<i>Moringa oleifera</i>	Extractos en agua	-	✓	-	-	✓	
Frutas	banana, mango, papaya, piña	K, Ca, P; fibra; vitaminas C y E; ácido clorogénico	✓	-	-	-	✓
	kiwi	Extracto acuoso-etanólico	-	-	✓	-	-
	Mora indica	Zumo	-	✓	✓	-	-
	Naranja	Flavonoides glicosilados (xilosilvitexina)	✓	-	-	-	✓
	Persimon	Flavonoides (astragalina e isoquercitrina)	✓	-	-	-	✓
	Fruta de la pasión	Bioflavonoides, ácidos fenólicos y antocianinas	✓	-	-	✓	✓
	Uva	Extracto hidroalcohólico de piel de uva, resveratrol	-	✓	-	-	-
	Sorbo	Extracto metanólico	-	✓	-	-	-
Lácteos	Queso	Péptidos	-	✓	✓	-	✓

	Leche (camello, cabra, oveja y yak)	Ca; hidrolizados; péptidos	-	-	✓	✓	-
	Yogurt y leche agria	Péptidos; expolisacáridos	-	✓	✓	-	-
Carnes y aves de corral	Carne de vacuno; corazón y bazo	Hidrolizados; péptidos	-	-	✓	-	-
	Pechuga de pollo y hueso	Hidrolizados; péptidos	-	✓	✓	-	-
	Huevo	Hidrolizados; péptidos	-	✓	✓	-	✓
	Músculo de cerdo	Hidrolizados; péptidos	-	✓	-	-	-
Alimentos marinos	Pescado (bonito, salmón, sardina...)	Péptidos	-	-	✓	-	-
	Almeja	Hidrolizados; péptidos	-	-	✓	-	-
	Ostras	Hidrolizados; péptidos	-	✓	✓	-	-
	Algas	Hidrolizados; péptidos Polisacáridos	-	✓	✓	-	-
	Camarones y krill antártico	Hidrolizados; péptidos	-	-	✓	-	-
Granos	Cebada	Fibra soluble / insoluble	✓	-	-	✓	-
	Maíz	Hidrolizado α -zein	✓	-	✓	-	✓
	Avena	Péptidos	-	-	✓	-	-
	Arroz	Hidrolizado, péptidos	-	✓	✓	-	-
	Trigo	Extractos, hidrolizados, péptidos, GABA, 2-hidroxinicotinamina.	-	-	✓	-	-
Bebidas	Té verde y negro	Catequinas, flavonoids (hiperina e isoquercitrina); polifenoles, pigmentos y saponinas.	-	✓	-	-	✓
	Cacao	Flavanoles	-	✓	-	-	-
	Vino de arroz, vino blanco y tinto, vino de hongos.	Polifenoles, péptidos y resveratrol	-	✓	✓	-	-
	Sake	Péptidos	-	-	✓	-	-
	Vinagre	Extracto	-	✓	-	-	✓
Alimentos de origen microbiano	Levadura de panadero	Péptidos	-	✓	✓	-	-
	Hongos comestibles	Péptidos; triterpenos	-	-	✓	-	-
	Bacterias fermentadoras del ácido láctico	Extractos solubles en agua de mar, péptidos y exopolisacáridos	-	✓	✓	-	✓
	<i>Enterococcus faecalis</i>	Péptidos	-	✓	✓	-	-

Leguminosas y tratamiento de la hipertensión.

En el manejo dietético de la hipertensión las leguminosas pueden jugar un importante papel, ya que algunos de los distintos componentes que hasta ahora han sido descritos por su capacidad para disminuir la presión arterial, también han sido hallados en algunas de ellas:

- 1) **Péptidos.** Las legumbres han sido caracterizadas principalmente por su alto contenido proteico y su valor nutricional; pero estas proteínas además, pueden ser degradadas a través de distintos procesos y dar lugar a péptidos de pequeño tamaño (péptidos bioactivos) que son capaces de ejercer una función inhibitoria sobre la ECA. De forma natural durante la digestión, las proteínas pueden ser degradadas por la acción de las enzimas proteolíticas (pepsina, pancreatina, tripsina y quimotripsina) o bien, a través de distintos procesamientos como son la extracción mediante solventes, la fermentación microbiana y la hidrólisis enzimática. Las leguminosas donde ha sido demostrada la presencia de péptidos bioactivos con función hipotensora o antihipertensiva hasta ahora son la soja, el garbanzo, los cacahuets y la soja verde (Guang and Phillips, 2009) y alfalfa (Kapel et al., 2006b).
- 2) **Polifenoles.** Aunque los mecanismos moleculares de acción de los antioxidantes frente a la hipertensión todavía no están totalmente claros, las terapias basadas en la acción de estas moléculas han sido efectivas. Las principales vías de acción de los polifenoles son mediante la disminución de la producción de ROS, el incremento de la captura de radicales libres, o quelando metales. Además los polifenoles pueden activar y potenciar la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa (eNOS), incrementar el contenido en glutatión (GSH) e inhibir algunas enzimas productores de ROS como la NADPH oxidasa y la xantina oxidasa (Rodrigo et al., 2012). Los flavonoides extraídos de *Vigna angularis* han mostrado la capacidad de aumentar la producción de NO y consecuentemente disminuir la presión arterial (Mukai and Sato, 2009); además fueron capaces de disminuir la producción de radicales libres de oxígeno en la aorta (Mukai and Sato, 2011). En otras leguminosas como en el género *Astragalus*, se ha comprobado que los flavonoides extraídos de sus semillas son capaces de

disminuir la PAS, asociada a una disminución de Ang II mediada por la inhibición de la ECA (Li et al., 2005).

3) Ácido γ -aminobutírico (GABA). El GABA es el más común neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso; y se encuentra en abundancia en el hipotálamo. Es un conocido factor dietético caracterizado por provocar una disminución de la actividad del sistema nervioso simpático (Wardener, 2001), y además una disminución de la presión arterial (Akama et al., 2009; Hayakawa et al., 2004). A través del procesamiento mediante la fermentación y la germinación, algunos alimentos son capaces de aumentar su contenido en GABA y disminuir la presión arterial. La fermentación de la soja mediante distintos mecanismos aumenta su contenido en GABA y ejerce un efecto hipotensor en ratas hipertensas (Shizuka et al., 2004; Yamakochi et al., 2007). Además el proceso de germinación sobre judía, guisante y lenteja provocó un aumento en la concentración de GABA (Kuo et al., 2004).

3. MATERIAL Y MÉTODO

3.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.

Las células de *E. meliloti* 1021 crecieron en medio Triptona-Extracto de levadura (TY) (Beringer, 1974) (**Tabla 6**) a 30°C durante 48 h. A partir de cultivos crecidos en placa se prepararon los inóculos en medio TY líquido. *H. maura* cepa S-30 fue cultivada en medio MY (Moraine y Rogovin, 1966) (**Tabla 7**) y suplementado con una solución salina (Quesada et al., 1993) hasta una concentración final de sales del 7,5 % (p/v) (**Tabla 8**), como fue descrito por Quesada et al. (1993). Las células crecieron a 30°C durante 48 h. Para determinar el efecto del estrés osmótico sobre el crecimiento bacteriano, el número de células viables de las dos cepas bacterianas (1021 y S-30) fue determinado cultivando las bacterias en tubos con medio líquido de crecimiento, TY y MY respectivamente, y distintos volúmenes de una solución de NaCl 1 M hasta conseguir concentraciones finales de 0, 50, 100, 200 o 300 mM NaCl. Los cultivos se incubaron con agitación de 100 rpm a 30°C durante 36 h, y la densidad óptica (D.O.) se determinó mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 600 nm cada 3 h.

Tabla 6. Composición medio de cultivo bacteriano TY, (pH=7)

Triptona	5 g
Extracto de levadura	3 g
CaCl ₂ × 2H ₂ O	0.5 g
Agua	1000 mL
Agar	15 g

Tabla 7. Composición de medio de cultivo bacteriano MY 7,5 % sales

Glucosa	10 g
Malta	3 g
Extracto de levadura	3 g
Proteasa Peptona	5 g
Solución de sales*	247 mL
Agua	753 mL
Agar	20 g

**Tabla 8. *Solución de sales al 30% (p/v)
(Rodríguez-Valera y col., 1981)**

NaCl	234 g
MgCl ₂ × 6H ₂ O	41,6g
MgSO ₄ × 7H ₂ O	59,8 g
CaCl ₂ × 2H ₂ O	1,1 g
KCl	6,0 g
NaHCO ₃	0,2 g
NaBr	0,7 g
Solución 0.5 % (p/v) de	
FeCl ₃ × 6H ₂ O	0,65 mL
Agua destilada	1000 mL

3.2. Cultivo de *Medicago sativa* L.

3.2.1. Experimentos en invernadero.

3.2.1.1. Semillas y condiciones de cultivo.

Las semillas de *Medicago sativa* L. (alfalfa) cv. Aragón, suministradas por Abonos Bolívar (Granada), fueron esterilizadas en superficie sumergiéndolas en una solución de HgCl₂ al 2.5% (p/v) durante 9 min. Se lavaron completamente con agua tipo II esterilizada y se dejaron en remojo y agitación durante 2 h. Después las semillas fueron sembradas en placas Petri que contenían agar - agua al 1% (p/v) y germinadas en oscuridad a 30°C. Tres días después de la siembra, se seleccionaron plántulas uniformes y se plantaron en jarras (5 plántulas/jarra) tipo Leonard (Leonard, 1943) esterilizadas, que contenían vermiculita y solución de riego nutritiva libre de nitrógeno (Rigaud and Puppo, 1975) (Tabla 9). Para determinar la resistencia a salinidad de las plantas de alfalfa, la solución de riego fue adicionada con distintas cantidades de NaCl hasta conseguir concentraciones finales de 0, 50, 100, 150, 200, 250 y 300 mM NaCl. Para imitar las condiciones naturales de los suelos tipo Solonchak órtico la solución de riego libre de nitrógeno fue suplementada con una mezcla de sales (CaSO₄, NaCl, MgCl₂.6H₂O y NaHCO₃), (Aguilar J, 1990) hasta alcanzar concentraciones finales de 0, 50 y 100 mM (Tabla 10). En ambos casos se determinó la conductividad eléctrica de las soluciones de riego con un conductímetro Crison525 (Crison Instruments, S.A., Barcelona, España). Las plántulas fueron inoculadas en la siembra con 1 mL de inóculo de *E.*

meliloti 1021 (Inoculante E), 1 mL de inóculo de *H. maura* S-30 (Inoculante H) o una mezcla (1:1, de aproximadamente 10^8 Unidades Formadoras de Colonias/mL cada uno) de inoculante *E. meliloti* y *H. maura* (Inoculante EH). Plantas no inoculadas fueron utilizadas como control. Las plantas fueron cultivadas durante 60 días en condiciones de invernadero, hasta que llegaron al 10% de floración. Se mantuvieron en fotoperíodo de 16/8 h luz/oscuridad y temperatura de 25/18°C. La luz suplementaria fue proporcionada por lámparas incandescentes y de luz blanca (Sylvania, $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 400-700 nm) en la parte superior de las plantas.

Para la preparación de dietas experimentales, otros sets de experimentos se llevaron a cabo siguiendo el protocolo descrito anteriormente pero cultivando las plantas a una única concentración de 100 mM de solución de riego tipo Solonchak órtico e inoculando las plantas con *E. meliloti* o *E. meliloti* + *H. maura*.

Tabla 9. Medio completo para cultivo de plantas hidropónico pH=7 (Rigaud and Puppo, 1975).

K ₂ SO ₄	0.174 g / L
KH ₂ PO ₄	0.068 g / L
K ₂ HPO ₄	0.044 g / L
MgSO ₄	0.123 g / L
CaSO ₄	0.34 g / L
Secuestrene	25 mg / L
Micronutrientes (Stock)*	1 mL / L
Mo	0,11 mg/L
B	2,85 mg/L
Cu	0,2 mg/L
Zn	0,55 mg/L
Mn	3,07 mg/L

Tabla 10. Solución de riego (Rigaud and Puppo, 1975) modificada, adicionada de sales imitando las características de las sales de un suelo tipo Solonchak órtico.

[Sales]			
	50 mM	100 mM	150 mM
K₂SO₄ (g/L)	0,174		
KH₂PO₄ (g/L)	0,068		
K₂HPO₄ (g/L)	0,044		
CaSO₄ (g/L)	1,24	2,15	2,96
MgCl₂×6H₂O (g/L)	0,826	1,5	2,09
NaCl (g/L)	0,76	1,29	1,76
NaHCO₃ (g/L)	0,70	1,22	1,70
Micronutrientes (mL)	1		
Secuestrene (mg)	25		

3.2.1.2. Determinación del potencial hídrico (Ψ_w).

El potencial hídrico de las plantas fue determinado en la primera hoja totalmente expandida del meristemo apical usando una cámara C52 para las muestras conectada a un psicómetro HR-33T (Wescor, Logan UT, EEUU).

3.2.1.3. Determinación del contenido en leghemoglobina de los nódulos.

El contenido en leghemoglobina (Lb) fue determinado en nódulos frescos, como ha sido descrito previamente por Talbi et al. (2013) con pequeñas modificaciones. Esencialmente, los nódulos (0,3 g) fueron homogeneizados con 6 mL de tampón de extracción de Lb (Na₂HPO₄×2H₂O 40 mM, pH 7,4; NaH₂PO₄×H₂O 10 mM, pH 7,4; K₃Fe (CN)₆ 0,02 %; NaHCO₃ 0,1 %) suplementado al 10% (p/v) con polivinilpolipirrolidona. El homogeneizado fue centrifugado a 14.000 g a 4°C durante 20 min. Se tomaron alícuotas de 50 µL del sobrenadante, se añadieron 3,15 mL de una solución saturada de ácido oxálico (6,6 g/100 mL) y se mezclaron en tubos de cultivo Pirex® con tapón de rosca. El número de réplicas para cada muestra fue de 3 + 1; donde uno fue el blanco utilizado como control para cada muestra. Las muestras (excepto los blancos) se calentaron en un autoclave a 120 °C

durante 30 min y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. La fluorescencia de las muestras fue determinada usando un espectrofotómetro Shimadzu (ShimadzuScientific Instruments, Kioto, Japón) equipado con una lámpara de mercurio - xenón y un fotomultiplicador sensible al rojo RF-549. La longitud de onda de excitación fue de 405 nm y la de emisión de 600 nm. El contenido en Lb se obtuvo por la diferencia de fluorescencia entre las muestras calentadas y las no calentadas (controles), y esta diferencia fue proporcional al contenido de proteínas hemo. Los resultados se expresaron como mg Lb/g de nódulo fresco

3.2.1.4. Determinación del peso fresco, peso seco, N, cenizas, y minerales (Ca, P, Mg y Na).

Las plantas cosechadas (tanto la parte aérea como la raíz) fueron pesadas y posteriormente el material vegetal se secó en estufa a $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ hasta peso constante y fueron pesadas de nuevo para determinar el peso seco y el contenido en humedad. El contenido en nitrógeno de la parte aérea fue determinado mediante el método de Kjeldahl. 0,5 g de muestra, en sustancia seca, fueron digeridos con H_2SO_4 concentrado con la ayuda de un catalizador (mezcla), durante 30 min a $400\text{ }^{\circ}\text{C}$. La mezcla fue neutralizada con NaOH al 35% (p/v) y posteriormente destilada recogiendo el producto de la destilación en ácido bórico. El contenido en nitrógeno se obtuvo tras la valoración del ácido bórico, en el que se recogió el amonio, con HCl 0,1 N. Los resultados fueron expresados como g N/100 g sustancia seca. Para determinar el contenido en proteína, los resultados se multiplicaron por el factor 6,25.

Para la determinación de cenizas totales, 0,5 g de la parte aérea de las plantas en sustancia seca, fueron precalcinadas e introducidas en una mufla a $450\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta completa calcinación. El residuo obtenido fue pesado, disuelto en HCl 6N y conservado para el posterior análisis de contenido en minerales.

El contenido en calcio, magnesio y zinc fue determinado por espectrofotometría de absorción atómica utilizando un espectrofotómetro Perkin - Elmer AAnalyst 300 (EEUU). El sodio fue determinado por espectrofotometría atómica de emisión usando el mismo equipo. Para la determinación de magnesio y sodio, se añadió cloruro de lantano para evitar cualquier interferencia por parte de los iones fosfato. El fósforo fue determinado por espectrofotometría mediante el método de Chen et

al. (1956) y utilizando un espectrofotómetro Thermo Scientific™ BioMate 3S UV-Visible spectrophotometer (Shanghai, China).

3.2.2. Experimentos en campo.

3.2.2.1. Descripción y localización del área de estudio.

Las parcelas experimentales se localizaron en la provincia de Granada (SE España, 30S WG 248483). El suelo fue clasificado como Solochak órtico (IUSS Working Group WRB, 2007) y Xeric Calcigypsid (Soil Survey Staff, 2010). El relieve del terreno fue determinado mediante un clisímetro (Silva ClinoMaster, Silva, Suiza). El suelo estaba bajo la influencia antropogénica y la productividad del mismo era muy baja debido a su pobre calidad agrícola. El clima era árido, caracterizado por una precipitación media anual de 250 mm (Xeric/Aridicregimen, Soil Survey Staff, 2010) y una temperatura media anual de 14°C (Mesic Regimen, Soil Survey Staff, 2010). Los experimentos en campo fueron llevados a cabo durante las estaciones de primavera y verano de 2012. Se realizó un diseño experimental en bloques, completamente aleatorizado en el que se incluyeron 5 bloques, cada uno de ellos compuesto por 4 parcelas con unas dimensiones de 1,20 m de largo × 1,20 m de ancho. La distancia entre cada parcela y cada bloque fue de 0,80 m.



Figura 6. Imágenes aéreas de la parcela de cultivo de *Medicago sativa* localizada en Venta del Peral, Granada. (SE España, 30S WG 248483).

3.2.2.2. Semillas utilizadas y condiciones de cultivo.

Las semillas de *M. sativa* fueron suministradas por Abonos Bolívar (Granada), fueron sumergidas independientemente en una solución que contenía cada suspensión bacteriana ($\sim 10^8$ UFC/mL) al 75% y goma arábica, utilizada como agente adhesivo, al 25%. Las Semillas se mantuvieron en agitación durante 20 min, posteriormente fueron filtradas a través de cuatro capas de gasa y se dejaron secar al

aire y a temperatura ambiente durante 24 h antes de proceder a su siembra. Como control, las semillas fueron sumergidas en medio de cultivo TY suplementado con goma arábica al 25% sin ningún inoculante bacteriano. Los tratamientos utilizados fueron los siguientes: 1) Semillas sin tratamiento bacteriano (Control, CT); 2) Semillas tratadas con *H. maura* (inoculante H); 3) Semillas tratadas con *E. meliloti* (inoculante E), y 4) Semillas tratadas con *H. maura* y *E. meliloti* (inoculante EH). Las semillas (5g/parcela, aproximadamente 20 kg/ha) fueron diseminadas sobre cada parcela y cubiertas con una fina capa de suelo. Las plantas fueron regadas una vez cada dos semanas con 30 L de agua corriente/parcela y fueron cosechadas tres meses después de la siembra cuando las plantas alcanzaron el 10% de floración. La segunda cosecha de las plantas se llevó a cabo tres meses después de la primera cosecha, de nuevo cuando las plantas alcanzaron el 10% de floración.

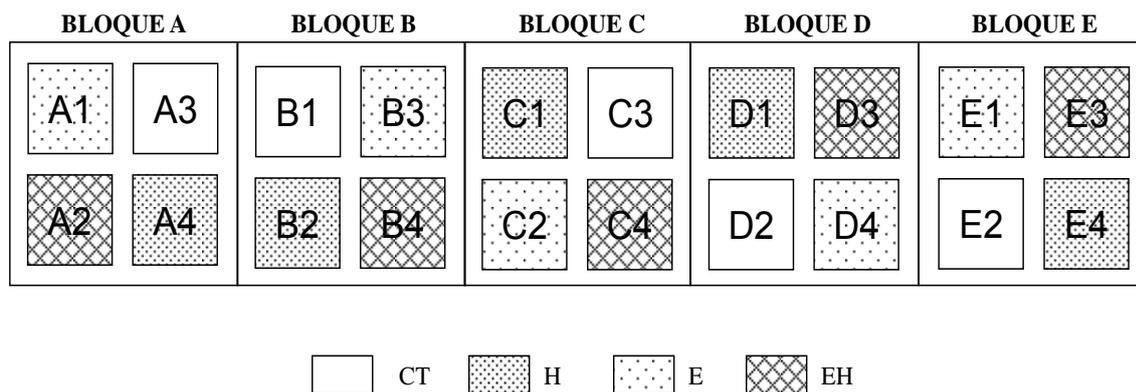


Figura 7. Diseño experimental del cultivo de *Medicago sativa* en bloques aleatorizados. Cada parcela muestra una trama distinta según el tratamiento bacteriano utilizado.



Figura 8. Imagen de la preparación del terreno de cultivo mediante la delimitación de parcelas y bloques.



Figura 9. Imagen completa de las parcelas de cultivo tras realizar la siembra de las semillas de *Medicago sativa* con los diferentes tratamientos bacterianos.

3.2.2.3. Análisis de suelos.

Se tomaron muestras de suelo de cada una de las parcelas antes de la siembra (abril de 2012) y después de la cosecha (julio de 2012) a dos profundidades distintas: 0 – 30 y 30 – 60 cm. Las muestras fueron secadas al aire, molidas y tamizadas a través de un tamiz con un tamaño de malla de 2 mm para su análisis. Para determinar el contenido en carbono orgánico, las muestras fueron molidas de nuevo y tamizadas con una malla de 0,125 mm, posteriormente fueron analizadas utilizando el método de Walkley y Black (1934) modificado por Tyurin y col. (1951). El pH fue determinado en una suspensión con agua destilada 1:1, y el contenido en equivalentes de CaCO₃ fue determinado usando el método de Barahona (1974). Finalmente, un extracto de suelo saturado con agua fue preparado de acuerdo a Allison (1973), para determinar la conductividad eléctrica usando un conductímetro Beckman Solubridge con una célula de conductividad G-0.5x2 (Beckman Instruments, Inc, USA).

3.2.2.4. Determinación de productividad de *M. sativa*, contenido en N, cenizas totales y minerales Ca, P, Mg y Na.

Las plantas de cada parcela fueron cosechadas en julio de 2012 y septiembre de 2012, secadas a 60°C y pesadas. El contenido en nitrógeno se determinó por el método de Kjeldahl; y cenizas y minerales fueron determinados como se explica en el apartado 3.2.1.4.

3.3. Ensayos biológicos *in vitro* de las plantas de alfalfa.

3.3.1. Digestibilidad mineral *in vitro*.

El método *in vitro* de Miller et al., (1981) modificado por Porres et al., (2005) fue utilizado para ensayar la dializabilidad de minerales: P, Ca y Mg de la parte aérea de las plantas de alfalfa. Las muestras de alfalfa desecadas y totalmente homogeneizadas (0,5 g) fueron adicionadas de 50 mL de HCl 0,01N y llevados hasta pH=2 añadiendo HCl 0,1N. En un tubo falcon se añadieron 10 mL de la mezcla anterior, 10 mL de HCl 0,01 N y 1 mL de solución de pepsina (P-6887, Sigma Aldrich) al 16 % (p/v) diluída en HCl 0,1 N. La mezcla se llevó a incubación

en un baño de agitación a 37 °C durante 2 h. Las muestras se prepararon en cuadruplicado; como blanco de la prueba se prepararon tubos donde se añadieron todos los componentes de la reacción a excepción de las muestras de alfalfa. Se prepararon membranas de diálisis cortadas en fragmentos de 12 – 13 cm de longitud y se mantuvieron en agua tipo I durante 12 h a 4 °C antes de su utilización. Posteriormente a cada membrana de diálisis se le añadieron HCO₃⁻ y agua tipo I hasta un volumen final de 10 mL; para compensar el pH de la mezcla de digestión, las membranas se colocaron dentro de los tubos, donde se había llevado a cabo el proceso anterior, y se mantuvieron durante 30 min a una temperatura 37°C para llevar el pH hasta 7,4. Inmediatamente después se añadieron 5 mL de una solución de pancreatina y sales biliares (2,5 de sales biliares, 0,4 g de pancreatina en 100 mL de HCO₃⁻) (Sigma-Aldrich). De nuevo, los tubos se mantuvieron durante 2 h en baño de agitación a 37 °C. Cuando acabó el proceso, tanto el contenido del interior de las membranas de diálisis (dializados), como el contenido de los tubos fuera de las membranas (retenidos) fueron conservados a -20°C hasta su posterior análisis. El contenido en Ca, P y Mg fue determinado en los dializados según el **apartado 3.2.1.4.**

3.3.2. Ensayo de la peroxidación lipídica.

Los homogeneizados de cerebro, utilizados como aceptores de radicales libres, fueron preparados a partir de ratas (250 – 300 g de peso) que fueron alojadas y mantenidas en fotoperiodo de luz/oscuridad 12/12 h y a una temperatura 22 ± 1 °C, con acceso libre a la comida y el agua. Los animales fueron anestesiados con pentobarbital y el cerebro fue extraído y homogeneizado usando el método de Oboh et al. (2007) con pequeñas modificaciones. El cerebro completo fue homogeneizado en tampón 1,15% KCl suplementado con 0,1% Tritón X-100 (en una relación 1:10, 1 g de tejido / 10 g de tampón) y centrifugado a 7.000 rpm durante 25 min a 4°C. El sobrenadante fue recogido y almacenado a - 80°C hasta su utilización. Las ratas provenían de la Unidad de Experimentación de la Universidad de Granada y el alojamiento y uso de los animales fueron llevados a cabo siguiendo las guías de la Directiva del Consejo de la Comunidad Europea (European Union Council, 2010) y del Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Granada.

Como marcador de la peroxidación lipídica, las especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARs), fueron determinadas en los homogeneizados de cerebro tal y como fue descrito por Ohkawa et al. (1979) con modificaciones que a continuación se detallan: en tubos Pirex® con tapón de rosca se añadieron 100 µL de homogeneizado de cerebro, 100 µL de FeCl₃ 5 mM, 100 µL de H₂O₂ 1 mM, 1300 µL de KCl 0,15% (p/v) y finalmente se suplementaron con 150 µL de dializado, retenido de alfalfa o blanco obtenidos en el proceso de digestibilidad anteriormente mencionados (**apartado 3.3.1.**). Se realizaron cuatro réplicas por muestra. Como control se utilizaron mezclas de oxidación formadas por FeCl₃, H₂O₂ y 1450 µL de KCl 0,15%. Todos los tubos fueron incubados a 37 °C durante 1 h. La reacción fue parada por adición de 1500 µL de HCl 0,25 N; 15% ácido tricloroacético, 1,34 mM ácido dietilentriaminopenta acético (DETAPAC), 0,5 % butil hidroxitolueno (BHT), 300 µL de dodecil sulfato sódico (SDS) al 8.1% y 300 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 3%; las muestras fueron después incubadas a 75 °C durante 1 h, enfriadas a temperatura ambiente y centrifugadas a 4000 rpm durante 15 min. Finalmente, los sobrenadantes fueron recogidos y su absorbancia fue determinada a 532 nm para detectar la formación de TBARs. El porcentaje de inhibición de la peroxidación lipídica fue calculado usando la ecuación:

$$\% \text{ inhibición} = [100 - (100 * (A_1 / A_0))] / 100$$

A₀ = absorbancia del control.

A₁ = absorbancia de las diferentes muestras.

Una unidad de capacidad antioxidante (UCA) es definida como la cantidad de muestra que inhibe la formación de TBARs un 50 %. Los resultados fueron expresados como UCA/mL.

3.3.3. Extracción acetónica y preparación de los extractos.

Alfalfa cultivada sin adición de sales y alfalfa cultivada en campo clasificado como suelo Solonchak órtico fueron molidas y se pesaron 0,5 g de cada una de las muestras. Se hicieron dos extracciones a pH 2 durante 45 min con una mezcla de acetona:agua:HCl (70:30:0,1) de acuerdo a la metodología descrita por Troszýnska et al., (2002) para permitir una adecuada solubilidad de los polifenoles. Después de la extracción, las muestras fueron centrifugadas a 3500 rpm durante 15 min y el

sobrenadante fue recogido. Los sobrenadantes de las diferentes extracciones fueron mezcladas para obtener un extracto total y se mantuvieron a -20°C para determinar el contenido en polifenoles totales e identificación de los mismos. Antes de cada extracción y centrifugado, se bombeó nitrógeno a las muestras para prevenir cualquier oxidación potencial de las mismas.

3.3.3.1. Determinación de polifenoles totales.

Los polifenoles totales fueron determinados en muestras de alfalfa cultivadas en una solución sin sales adicionadas y la alfalfa cultivada en suelo salino mediante el método de Folin-Ciocalteu descrito por Dewanto et al., (2002). La curva de calibración fue diseñada basada en diferentes concentraciones de ácido gálico (en un rango desde 0 a $600\mu\text{g/mL}$). Los resultados fueron expresados como equivalentes de ácido gálico (eq ácido gálico/g de muestra). El desarrollo del proceso consistió en la mezcla de $12,5\ \mu\text{L}$ de muestra más $50\ \mu\text{L}$ de agua tipo I y $12,5\ \mu\text{L}$ del reactivo de Folin-Ciocalteu. Las muestras se mantuvieron en oscuridad durante 6 min y después se mezclaron con $125\ \mu\text{L}$ de $10\% \text{Na}_2\text{CO}_3/1\text{M NaOH}$. Después las muestras se mantuvieron en oscuridad a temperatura ambiente durante 90 min. Finalmente se midió la absorbancia espectrofotométricamente a $\lambda=760\text{nm}$; (Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Fisher Scientific, Shanghai, China).

3.3.3.2. Caracterización de polifenoles.

An Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) (ACQUITY H CLASS. WATERS) coupled by quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (SYNAP G2. WATERS) was employed for all high-resolution mass spectrometry analysis. Prior to mass spectrometry analysis, all powdered samples were dissolved in distilled water, diluted in deionized water with 0.1% of acid formic, and filtered through $0.22\ \mu\text{m}$ nylon disk filters (Millipore). $10\ \mu\text{L}$ of the final solution was injected into the chromatograph. Analytical separation of peptides and proteins was performed on an ACQUITY BEH 300 C4 analytical column ($100\text{mm} \times 2.1\text{mm}$ internal diameter, $1.7\ \mu\text{m}$). A mobile phase consisting in a gradient program combining deionized water with 0.1% of acid formic as solvent A and acetonitrile with 0.1% of acid formic as solvent B was used. The initial conditions were 95% A and 5% B. A

linear gradient was then established to reach 95% (v/v) of B at 15 min. Total run time was 25min and postdelay time 5 min. Mobile phase flow rate was 0.4mL/min.

After chromatographic separation, a high-resolution mass spectrometry analysis was carried out in positive electro spray ionization (ESI+ve). The gas used for desolvation (800 L/h) and Cone (25 L/h) was high-purity nitrogen. Spectra were recorded over the mass/charge (m/z) range 50–1200.

3.4. Ensayos biológicos *in vivo* de las plantas de alfalfa.

3.4.1. Ensayo de la alfalfa como fuente de proteína.

3.4.1.1. Diseño experimental.

3.4.1.1.1. Grupos experimentales.

Se llevaron a cabo tres experimentos en los que se ensayaron tres tipos distintos de dietas con distintas fuentes de proteína. Para ello se utilizó un modelo experimental de rata Wistar en crecimiento.

Experimento I: 8 ratas de la raza Wistar, alimentadas durante 10 días con una dieta cuya fuente de proteína provenía de caseína suplementada con metionina.

Experimento II: 8 ratas de la raza Wistar, alimentadas durante 10 días con una dieta cuya fuente de proteína provenía de la alfalfa cultivada en invernadero e inoculada con la bacteria *E. meliloti* suplementada con metionina y lisina.

Experimento III: 8 ratas de la raza Wistar, alimentadas durante 10 días con una dieta cuya fuente de proteína provenía de la alfalfa cultivada en invernadero e inoculada con las bacterias *E. meliloti* y *H. maura* suplementada con metionina y lisina.

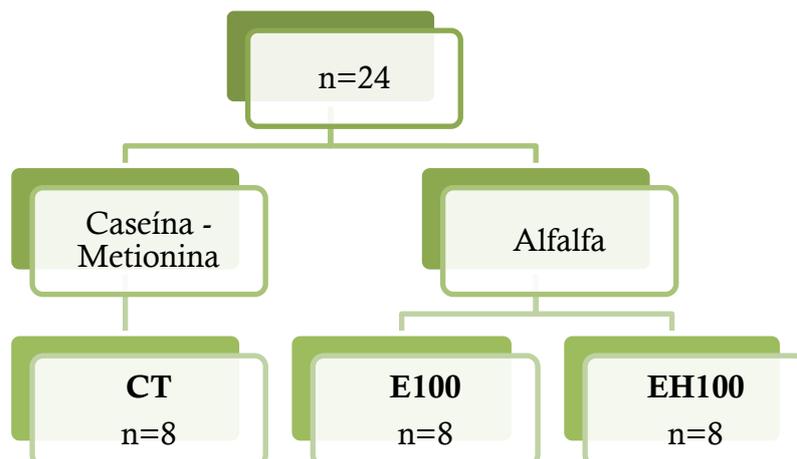


Figura 10. Distribución de los distintos grupos experimentales.

3.4.1.1.2. Animales de experimentación.

Un total de 24 ratas (12 machos y 12 hembras) de un peso de 69 ± 5 g, de la raza Wistar fueron distribuidas aleatoriamente en tres grupos de 8 animales cada uno (4 machos y 4 hembras). Cada grupo fue alimentado con una dieta al 8% de proteína proveniente de distintas fuentes. Las ratas fueron alojadas en jaulas individuales de valor biológico que permitieron la recogida de heces y orina por separado, en una habitación termostáticamente controlada (21 ± 2 °C) con humedad relativa entre el 40 - 60%, y período de luz/oscuridad de 12 h (18:00–6:00 h). Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices institucionales para el Alojamiento y Cuidado de los Animales de Experimentación (European Union Council, 2010).

3.4.1.1.3. Formulación de dietas experimentales.

Los animales fueron alimentados con las tres dietas indicadas en el apartado **3.4.1.1.1** con un contenido en proteína del 8%. Las dietas se formularon siguiendo las necesidades de nutrientes para ratas (National Research Council, 1995) y en base a los requerimientos de la AIN-93G con pequeñas modificaciones (Reeves et al., 1993). Al primer grupo se le administró una dieta control utilizando como fuente de proteína la caseína – metionina (grupo CT), el segundo grupo fue alimentado con una dieta cuya fuente de proteína fue alfalfa cultivada en invernadero, con una solución mineral de riego tipo Solonchak órtico a una concentración final de sales 100 mM e inoculada con la bacteria *Ensifer meliloti* (grupo E100). El último grupo fue alimentado con una dieta cuya fuente de proteína provenía igualmente de la alfalfa cultivada en invernadero con las mismas condiciones salinas, pero inoculada con las bacterias *Ensifer meliloti* y *Halomonas maura* (grupo EH100).

Tabla 11. Composición de la dieta experimental administrada al grupo control (CT) con un porcentaje de proteína del 8 %.

	100 g SS	100 g SF
Caseína	8,86	10,01
Metionina	0,5	0,5
Sacarosa	10	10
Grasa	7	7
Celulosa	5	5,23
Corrector mineral (Sin calcio)	3,5	3,5
Corrector vitamínico	1	1
Colina	0,25	0,25
Citrato cálcico	2,38	2,38
Almidón	61,51	69,99

*SF: sustancia fresca, **SS: sustancia seca

Tabla 12. Composición de la dieta administrada a los grupos experimentales E100/EH100 con un porcentaje de proteína del 8 %.

	100 g SS	100 g SF
Alfalfa (S100/SH100)	40,4	40,4
Metionina	0,5	0,5
Lisina	0,5	0,5
Sacarosa	10	10
Grasa	7	7
Corrector mineral (Sin calcio)	3,5	3,5
Corrector vitamínico	1	1
Colina	0,25	0,25
Almidón	36,85	40,52

*SF: sustancia fresca, **SS: sustancia seca.

3.4.1.2. Período experimental.

La duración total del experimento fue de diez días, los tres primeros formaron parte del período de adaptación y los siguientes siete días constituyeron el período experimental. Las ratas fueron sometidas a una alimentación *pair fed* (10 g/día) y tuvieron acceso libre al agua (tipo I). La ingesta fue controlada todos los días mediante pesada del comedero después de 24 h de la administración de la dieta. Se

procedió a la recogida de heces y orina en los días 2, 4 y 7 del período experimental. Los animales fueron pesados en el primer día del experimento y al final del mismo.

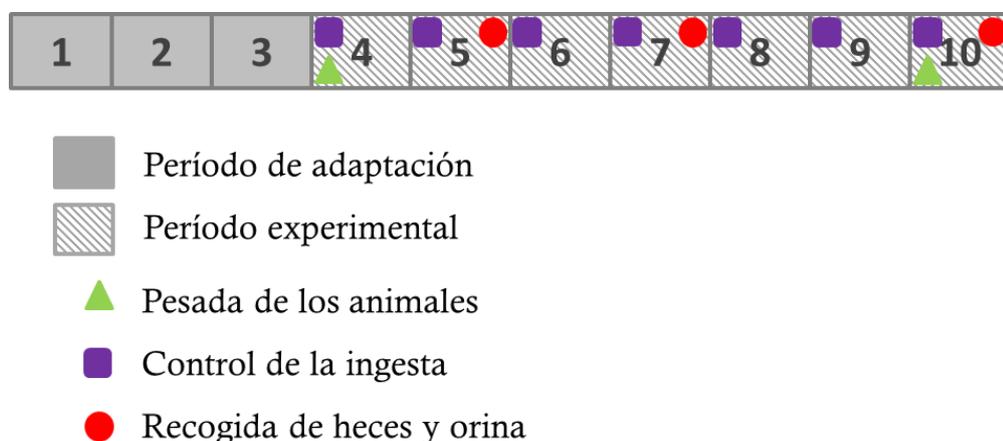


Figura 11. Diseño experimental de los diez días durante el ensayo *in vivo* de la alfalfa como fuente de proteína en un modelo experimental animal de rata Wistar en crecimiento.

3.4.1.3. Análisis realizados.

3.4.1.3.1. Parámetros hemáticos y bioquímica plasmática.

Al final de los 10 días del período experimental, los animales fueron anestesiados con ketamina – xilacina y sacrificados, la sangre fue recolectada mediante punción de la aorta abdominal sobre tubos heparinizados, una alícuota de 250 μ L fue utilizada para la determinación de parámetros hemáticos de leucocitos (WBC), hematíes (RBC), hemoglobina (HGB), hematocrito (HCT), volumen corpuscular medio (MCV), contenido medio de hemoglobina por hematíe (MCH), concentración media de hemoglobina (MCHC), plaquetas (PLT) y la amplitud de distribución eritrocitaria (RDW) mediante el sistema Automatizado Analizador Hematológico (KX-21 Automated Hematology Analyzer, Sysmex Corporation, Kobe, Japón). El resto de sangre fue centrifugado a 3500 rpm durante 15 min a 4° C. El plasma fue separado, introducido en nitrógeno líquido y conservado a – 80° C hasta su utilización. Las determinaciones que posteriormente se llevaron a cabo en plasma fueron: glucosa, colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL, triglicéridos, ácido úrico, urea, albúmina, fosfatasa alcalina (ALP), ALT/GPT,

AST/GOT, creatinina, bilirrubina total y directa, amilasa y ferritina. Estos parámetros fueron determinados mediante un Analizador Químico (Shenzhen Midray BS-200 Chemistry Analyzer, Bio-Medical Electronic) perteneciente a la unidad de bioanálisis en el Centro de Instrumentación Científica (Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada). Los diferentes órganos extraídos fueron pesados, rápidamente congelados en nitrógeno líquido y conservados a -80°C. El músculo (*longissimus dorsi*) y hueso (fémur) fueron extraídos y conservados también a -20° C y el contenido en minerales totales, así como de P, Ca y Mg fue determinado mediante la calcinación de las muestras y posterior determinación de minerales (**apartado 3.2.1.4**).

3.4.1.3.2. Índice de transformación de alimento y coeficiente de eficacia en crecimiento.

A partir de los datos obtenidos en el control de la ingesta, peso de los animales y contenido en proteína de las dietas, se determinaron los diferentes índices biológicos que se calcularon de la siguiente forma:

Índice de transformación de alimento (IT):

Ingesta (g SS/día)/Incremento de peso corporal (g/día).

Coefficiente de eficacia de crecimiento (C.E.C):

Incremento de peso (g/día)/Ingesta de proteína (g /día)

SS: sustancia seca.

3.4.1.3.3. Utilización nutritiva de Nitrógeno, minerales totales y Calcio, Magnesio y Fósforo.

El contenido en N, Ca, Mg y P fue determinado en muestras de dietas, heces y orina siguiendo el método indicado en el **apartado 3.2.1.4**. Los minerales totales fueron determinados en dietas y heces.

Posteriormente se determinó el coeficiente de digestibilidad aparente (CDA) para N, minerales totales, Ca, Mg y P; para N, Ca, Mg y P se determinó el balance y el

porcentaje de nutriente retenido / nutriente absorbido (% R/A). Se aplicaron las siguientes fórmulas para obtener los distintos índices:

$$\text{CDA: } [(I-F)/I] \times 100$$

$$\text{BALANCE: } I - (F+U)$$

$$\%R/A: [(I-(F+U))/(I-F)] \times 100$$

Donde: I=ingesta, F= excreción fecal y U= excreción urinaria.

3.4.2. Ensayo de la alfalfa como fuente de fibra.

3.4.2.1. Diseño experimental.

3.4.2.1.1. Grupos experimentales.

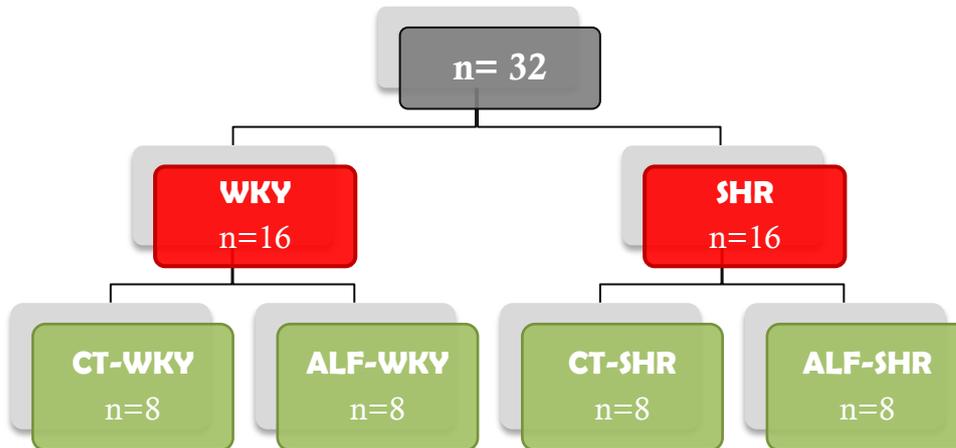
Se llevaron a cabo experimentos con cuatro grupos experimentales en los que se ensayaron dos tipos distintos de dietas con distintas fuentes de fibra: celulosa o alfalfa. Para ello se utilizó un modelo experimental de rata Wistar espontáneamente hipertensa (SHR) y su control Wistar Kyoto (WKY).

- **Grupo I:** 8 ratas de la raza Wistar Kyoto, alimentadas durante 5 semanas con una dieta cuya fuente de fibra provenía de la celulosa.
- **Grupo II:** 8 ratas de la raza Wistar Kyoto, alimentadas durante 5 semanas con una dieta cuya fuente de fibra provenía de la alfalfa.
- **Grupo III:** 8 ratas de la raza Wistar SHR, alimentadas durante 5 semanas con una dieta cuya fuente de fibra provenía de la celulosa.
- **Grupo IV:** 8 ratas de la raza Wistar SHR, alimentadas durante 5 semanas con una dieta cuya fuente de fibra provenía de la alfalfa.

3.4.2.1.2. Animales de experimentación.

Un total de 32 ratas de la raza Wistar, con una edad de 6 semanas, fueron utilizadas para este experimento. 16 ratas pertenecían a la cepa Wistar Kyoto (grupo control normotenso, WKY) y las otras 16 eran ratas espontáneamente hipertensas (grupo experimental, Spontaneously Hypertensive Rats, SHR). A su vez cada grupo de 16 ratas fue dividido en dos grupos: grupo control (CT) que

consumía una dieta cuya fuente de fibra procedía de la celulosa, y grupo experimental o alfalfa (ALF) cuya fuente de fibra procedía de la alfalfa (**Figura 12**). Los animales de experimentación fueron alojadas en una habitación termostáticamente controlada y bien ventilada ($21 \pm 2^{\circ}\text{C}$) con una humedad relativa del 40 al 60% y fueron alojados en jaulas grupales (4 animales por jaula).



- **WKY**: genotipo **normotenso**.
- **SHR**: genotipo **hipertenso**.
- **CT**: fuente de fibra **celulosa**.
- **ALF**: fuente de fibra **alfalfa**.

Figura 12. Diseño experimental del ensayo de la alfalfa como fuente de fibra en un modelo experimental animal de rata espontáneamente hipertensa (SHR) y su control Wistar Kyoto (WKY).

3.4.2.1.3. Formulación de dietas experimentales.

Las dietas se formularon siguiendo las necesidades de nutrientes para ratas (National Research Council, 1995) en base a los requerimientos de la AIN-93M (Reeves *et al.*, 1993), pero incluyendo pequeñas modificaciones como el contenido en grasa (**Tabla 13**). Previamente a la preparación de las dietas la humedad fue determinada en los distintos componentes (celulosa, almidón y caseína) así como el nivel de proteína en la caseína fue determinada por el método de Kjehdal. La alfalfa fue adicionada al 7% (7 g de alfalfa /100 de sustancia seca de dieta), para alcanzar el 5 % de fibra necesario, y debido a que aportó además 1,11 g de proteína, este valor fue rectificado de la caseína total adicionada.

Tabla 13. Composición de las dietas control y dieta alfalfa.

(g/100 g SS*)	Dieta Control (CT)	Dieta Alfalfa (ALF)
Caseína	13,29	12,18
Metionina	0,5	0,5
Sacarosa	10	10
Grasa (aceite de oliva)	5	5
Celulosa/alfalfa	5	7
Corrector mineral	3,5	3,5
Corrector vitamínico	1	1
Colina	0,25	0,25
Almidón	62,46	60,57
Composición mineral (µg/g)		
Mg	413,81	968,82
Ca	4949,59	5687,35
V	0,49	0,44
Mn	9,34	10,32
Fe	32,33	40,23
Co	0,0155	0,0312
Zn	21,29	9,04
As	0,0091	0,0277
Se	0,12	0,24

*SS: sustancia seca

El contenido en humedad y nitrógeno fue determinado en las dietas como se indica en el **apartado 3.2.1.4**. El contenido en minerales fue determinado mediante espectrofotometría de masas (ICP-MS).

La alfalfa utilizada para formular la dieta experimental cuya fuente de fibra fue la alfalfa, provenía del cultivo en terrenos salinos que se llevó a cabo como se detalla en el **apartado 3.2.2**.

3.4.2.2. Período experimental.

Los animales permanecieron tres días desde su recepción en período de adaptación a las condiciones de experimentación. La duración del período experimental fue de 5 semanas durante las que los animales fueron alimentados con las dietas experimentales al *pair fed* (20 g / día × rata) y con acceso libre al agua tipo II. La ingesta de dieta fue controlada diariamente mediante pesada. Las ratas se mantuvieron en las jaulas grupales (4 ratas/jaula) durante las cuatro primeras semanas del período experimental y la quinta semana fueron alojadas en jaulas metabólicas individuales para permitir la recogida por separado de heces y orina, así como cuantificar la ingesta de dieta y agua (tipo I) individualmente. El peso corporal fue determinado semanalmente, en el mismo día y a la misma hora después de 6 h de ayuno. La presión arterial fue determinada semanalmente también, siempre a la misma hora de la mañana. Al finalizar las cinco semanas de experimentación se determinó la composición corporal y se realizó un test de tolerancia a una sobrecarga oral de glucosa. Al día siguiente los animales fueron anestesiados y sacrificados (**Figura 13**).

	Período de adaptación			Período experimental			
Semana 1	● ▲ ▽	●	●	●	●	●	●
Semana 2	● ▲ ▽	●	●	●	●	●	●
Semana 3	● ▲ ▽	●	●	●	●	●	●
Semana 4	● ▲ ▽	●	●	●	●	●	●
Semana 5	● ▲ ● ▽	● ◆ ■	● ◆ ■	● ◆ ■	● ◆ ■	● ◆ ■	● ◆ ■
Semana 6	● ▲ ■ ▽ ◆	★ ☆	Sacrificio animales				

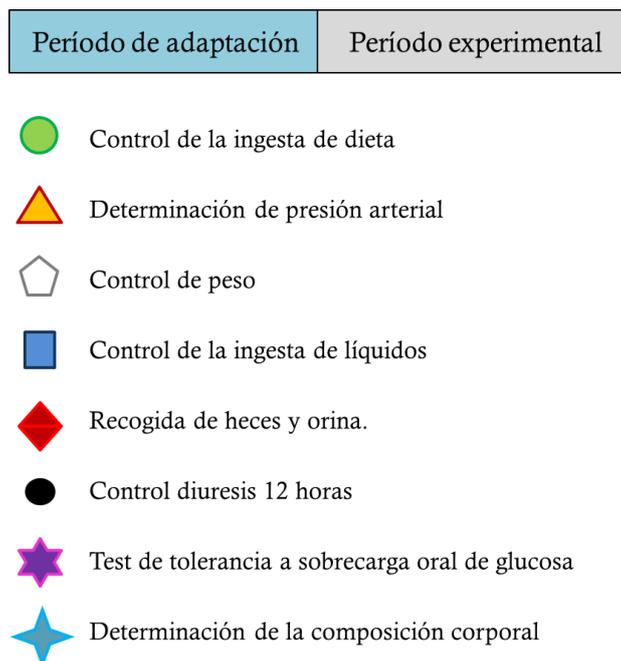


Figura 13. Esquema del desarrollo del experimento durante las 6 semanas de duración. En cada semana se muestra las actividades realizadas y los test aplicados a los animales.

3.4.2.3. Análisis realizados.

3.4.2.3.1. Determinación de la presión arterial.

La presión arterial fue determinada semanalmente mediante un método indirecto no invasivo, basado en la misma técnica de esfigmomanometría usada para determinar la presión arterial en humanos. El equipo utilizado para estas determinaciones fue LE 5007 Automatic Blood Pressure Computer, LETICA Scientific Instrument, Panlab, Barcelona, SPAIN. Está compuesto por un manguito (esfigmomanómetro) para ocluir el flujo sanguíneo así como un transductor para seguir la evolución del pulso a través del proceso. Además posee una cabina de termorregulación (LE 5650/6 Heater Scanner), en el que existen seis raíles o puestos para asociar microprocesadores. Para llevar a cabo el procedimiento, los animales se introdujeron en inmovilizadores especiales de acuerdo al peso de los animales, y se colocaron en la cabina a 37°C y se mantuvieron durante 15 min para adaptarse a estas condiciones antes de comenzar las medidas. Durante la medida, el manguito comienza a inflarse bloqueando la vena y causando un descenso constante del pulso detectado. Una vez que el pulso ha desaparecido, el manguito se desinfla automática y progresivamente hasta que el sistema detecta el momento en el que pulso comienza a reaparecer (presión sistólica). Cuando el pulso ha recuperado su valor inicial, la presión diastólica es medida y la presión media es calculada automáticamente. El pulso basal se observa de nuevo y el sistema está listo para llevar a cabo la siguiente medida. Se realizaron seis medidas por animal, y no se tomaron como medidas válidas aquellas en las que la frecuencia cardíaca superó 350 latidos por minuto. Se determinó el área bajo la curva para cada animal usando el programa Excel® por el método de los trapezoides utilizando la siguiente fórmula (Pruessner et al., 2003):

Donde:

$$AUC_G = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{(m_{(i+1)} + m_i) \cdot t_i}{2}$$

- m_i : medida
- t_i : distancia en tiempo entre medidas
- n : número total de medias.

3.4.2.3.2. Determinación de parámetros urinarios.

El volumen urinario (diuresis) fue determinado recolectando la orina excretada por los animales, individualmente, durante un período de 12 h. El pH de la orina fue determinado mediante un pH metro (Crison GLP 22, Barcelona, ESPAÑA).

3.4.2.3.3. Prueba de tolerancia a una sobrecarga oral de glucosa.

Tras mantener a los animales privados de alimento durante 8 h, se realizó una prueba de tolerancia a una sobrecarga oral de glucosa siguiendo el método previamente descrito por Pablo G. Prieto et al. (2004) con pequeñas modificaciones. Esencialmente, las ratas se sometieron a una sobrecarga oral de glucosa, mediante sonda nasogástrica, en relación a una dosis de 6,9 μmol glucosa/g de peso corporal disolviendo la glucosa en solución salina (NaCl 9%). Se determinó la glucosa sanguínea antes de la sobrecarga oral (glucosa basal) y a los 15, 30, 60, 90 y 120 min, hasta que los animales alcanzaron los valores basales. Para la extracción de sangre, se realizó una pequeña incisión en la parte más distal de la cola y se utilizó un glucómetro Bayer, Breeze[®] 2 para conocer la concentración de glucosa. Los resultados fueron expresados como las medias de cada grupo \pm el error estándar de la media. Se determinó el área bajo la curva para cada animal usando el modelo de los trapecoides con el programa Excel[®] utilizando la siguiente fórmula (Pruessner et al., 2003):

$$AUC_I = \left(\sum_{i=1}^{n-1} \frac{(m_{(i+1)} + m_i) \cdot t_i}{2} \right) - \left(m_1 \cdot \sum_{i=1}^{n-1} t_i \right)$$

Donde:

- m_i : medida
- t_i : distancia en tiempo entre medidas
- n : número total de medias.

3.4.2.3.4. Análisis de la composición corporal.

La composición corporal de los animales fue determinada después de 8 h de ayuno mediante el dispositivo EchoMRI[™] (EMS 181, Echo Medical Systems, Houston). El equipo emplea un método validado de resonancia magnética nuclear para la medición de la masa grasa, tejido magro, agua libre (agua no unida a los

tejidos, normalmente la mayoría sería orina y el plasma) y agua total (también denominada como agua total corporal, unida y no unida a los tejidos). Es un método no invasivo, preciso y exacto que realiza mediciones muy rápidas (aproximadamente 1 min para cada medida) (Kovner et al., 2010).

3.4.2.3.5. Determinación de ingesta, peso corporal y peso de los órganos.

La ingesta de los animales fue determinada diariamente por diferencia de pesada de la dieta administrada y el comedero después de la ingesta de alimento. Los animales se pesaron al comienzo de cada semana del período experimental y los distintos órganos se extrajeron y se pesaron después del sacrificio de los animales.

3.4.2.3.6. Determinación de parámetros hemáticos.

Los parámetros sanguíneos fueron determinados según **apartado 3.4.1.3.1.**

3.4.2.3.7. Determinación de parámetros plasmáticos y urinarios.

Después de la separación del plasma, se llevaron a cabo determinaciones de distintos parámetros bioquímicos como fosfolípidos, triglicéridos, colesterol total, colesterol HDL y LDL, glucosa, bilirrubina total, fósforo, ácido úrico, urea, creatinina, albúmina, AST/GOT, ALT/GPT, γ -GT, CK-MB, y fosfatasa alcalina (ALP). Las determinaciones se llevaron a cabo usando un Analizador Químico (Shenzhen Midray BS-200 Chemistry Analyzer, Bio-Medical Electronic) perteneciente a la unidad de bioanálisis en el Centro de Instrumentación Científica (Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada). En las muestras de orina recogidas durante 12 h se determinó el pH, la excreción de Na, concentraciones de glucosa, albúmina, creatinina, ácido úrico, urea, fósforo y ácido cítrico, utilizando el mismo equipo.

3.4.2.3.8. Actividad antioxidante en riñón y en hígado: enzimas antioxidantes.

Homogeneización de tejidos.

Los tejidos fueron homogeneizados siguiendo el método descrito por Oboh et al. (2007) con pequeñas modificaciones. 1 g de tejido fue homogeneizado en 10 mL de tampón fosfato 50 mM (pH 7.8) que contenía 0.1% Triton X-100 y DETAPAC 1,34 mM usando un homogeneizador Micra D-1 (ART moderne labortechnik) a 18.000 rpm durante 30 seg seguido por un tratamiento con un homogeneizador de ultrasonidos (Sonoplus HD 2070, Bandelin) al 50 % de fuerza y durante tres repeticiones de 10 seg. Los homogeneizados fueron centrifugados a 16.000 rpm, 4°C durante 40 min (BECKMAN, Allegra 64R) y los sobrenadantes fueron recogidos y utilizados para determinar tanto la actividad enzimática antioxidante de distintas enzimas como las especies reactivas del ácido tiobarbitúrico.

Determinación de la concentración de proteína.

La concentración de proteína fue determinada en los homogeneizados mediante la técnica de Lowry et al. (1951) con pequeñas modificaciones para adaptar el protocolo a microplaca de 96 pocillos (Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Fisher Scientific. Shanghai, China). Esencialmente se realizó una recta patrón con cantidades crecientes de proteína (0, 100, 200, 300, 400 y 500 µg/mL) para lo que se utilizó una solución de albúmina de suero bovino (BSA) con una concentración inicial de 1000 µg/mL. Se preparó una solución de Cu₂SO₄ (Reactivo A) al 1% (p/v), una solución de tartrato (Reactivo B) al 2% (p/v), una solución de Na₂CO₃ (Reactivo C) al 2% (p/v) y la solución de Folin-Ciocalteu en la que el reactivo se diluyó con agua tipo I en una proporción 1:4. Para el desarrollo de la reacción los reactivos se mezclaron de la siguiente forma: Reactivo A (0,01 mL) + Reactivo B (0,01 mL) + Reactivo C (1 mL) para obtener el reactivo de Cu alcalino. Se añadieron a la placa las muestras debidamente diluidas o los patrones (50 µL), posteriormente se añadieron 200 µL del reactivo de Cu alcalino y las muestras se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente. Tras la incubación se añadieron 50 µL de la solución de Folin-Ciocalteu diluida, se volvieron a incubar las muestras durante 30 min a temperatura ambiente y se hizo la lectura de la placa a

750 nm. Tanto las muestras como la recta patrón fueron determinadas por cuadruplicado. Los valores de la recta patrón se ajustan a un modelo de ecuación polinómica y los valores de absorbancia de las muestras obtenidos se extrapolaron en la recta patrón. Los resultados fueron expresados como mg proteína/mL de homogeneizado.

Actividad enzimática Superóxido dismutasa (SOD).

La actividad enzimática SOD, fue determinada en los homogeneizados de hígado y riñón mediante el método colorimétrico descrito por Ukeda et al. (1997) adaptado para un lector de microplacas (Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Ficher Scientific. Shanghai, China). Esta reacción enzimática está basada en la inhibición por la SOD de la reacción de oxidación entre los aniones superóxido, producidos por el sistema xantina/xantina oxidasa y el receptor de superóxido (2-methoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolium-5-carboxanilido (XTT). Para la determinación de la actividad enzimática SOD total, se preparó una mezcla de reacción que contenía para un volumen final de 1 mL: 740 µL de tampón fosfato 50 mM pH=7,8; 38 µL de DETAPAC 3 mM, 55 µL de XTT (0,0007 g/1 mL de tampón fosfato 50 mM) y 167 µL de xantina oxidasa (70 mU/mL). A cada pocillo de la placa se añadieron 150 µL de la mezcla de reacción, 35 µL de la muestra convenientemente diluída o 35 µL de tampón fosfato 50 mM para los controles, y finalmente 55 µL de xantina 3 mM. Se midió la absorbancia durante 15 min, a 25°C y a 492 nm y haciendo una lectura de la placa por min. Para determinar la actividad de SOD dependiente de Mn, se realizó el mismo protocolo pero las muestras fueron tratadas previamente con cianuro de potasio (KCN) 120 mM durante 30 min en hielo (concentración final de KCN 4,8 mM). La actividad de SOD dependiente de CuZn fue determinada mediante la diferencia entre la actividad de SOD total y actividad de SOD dependiente de Mn. Una unidad de actividad enzimática se define como la enzima necesaria para inhibir el 50% de la reducción de XTT.

$$\% \text{ de inhibición} = ((A_0 - A_i) / A_i) \times 100$$

A_0 = actividad del control

A_i = actividad de la muestra.

Finalmente los resultados fueron expresados como unidades de actividad antioxidante (UAA)/mg de proteína.

Actividad enzimática de la Catalasa (CAT).

La actividad enzimática de la CAT fue determinada por el método de Aebi, (1984) con pequeñas modificaciones. A cada cubeta de cuarzo se añadieron 500 μL de homogeneizado convenientemente diluido o de tampón fosfato (pH=7) para los controles, posteriormente se añadieron 250 μL de H_2O_2 60 mM en la cubeta control, se hizo autozero e inmediatamente después se adicionó la misma cantidad de H_2O_2 en las cubetas con muestras. La determinación se realizó monitorizando la desaparición de peróxido de hidrógeno en presencia de homogeneizado a $\lambda=240$ nm, a 25°C, pH= 7 en espectrofotómetro Thermo Scientific™ BioMate 3S UV-Visible spectrophotometer (Shanghai, China). Los resultados fueron expresados como μmol de H_2O_2 consumidos por min y por mg de proteína.

$$\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min} \times \text{mg proteína} = (\Delta\text{Absorbancia}/0,0394)/(\text{mg proteína /mL})$$

Actividad enzimática de Glutación peroxidasa (GPx).

La actividad enzimática de GPx se determinó mediante el método anteriormente descrito por Smith et al. (2001) con pequeñas modificaciones. Dicha técnica se basa en la oxidación de nicotin adenin dinucleótido fosfato (NADPH) por la glutación reductasa, a su vez la velocidad de reducción de la glutación reductasa se relaciona con la actividad enzimática GPx de cada muestra. Para esta determinación, se realizaron en paralelo reacciones catalizadas y no catalizadas (ambas en cuadruplicado). A las reacciones no catalizadas, en cada pocillo se añadieron 240 μL de NADPH 2mM en tampón fosfato 50 mM, 1 mM ácido etilendinitrilotetra acético (EDTA) y pH 7,4; 20 μL de homogeneizado de tejido y 10 μL de una solución de cumeno hidroperóxido 22 mM. Para las reacciones catalizadas a cada

pocillo se añadieron 240 μL de una mezcla de reacción también en tampón fosfato 50 mM, 1 mM ácido etilendinitrilotetraacético (EDTA) y pH 7,4 adicionada de acida sódica 4,3 mM, glutatión reducido 4,3 mM y NADPH 2mM, 10 μL de homogeneizado de tejido; 4,5 μL de glutatión reductasa de una solución de 0,04 mU/mL y 10 μL cumeno hidroxiperóxido. La lectura de la placa se llevó a cabo a 340 nm, a 37°C durante 4 min, realizándose la lectura cada 15 seg. Los resultados de actividad enzimática fueron expresados como nmol NADPH/min/mL, para lo que se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{nmol NADPH/min} \times \text{mg proteína} = (((\Delta\text{Absorbancia reacción catalizada} - \Delta\text{Absorbancia reacción no catalizada})/0.0062) \times (\text{volumen total pocillo/volumen muestra}))/(\text{mg proteína/mL}).$$

Determinación de TBARs.

Como marcador de la peroxidación lipídica, las especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARs) fueron determinadas en homogeneizados de hígado y riñón siguiendo el método previamente descrito por Ohkawa et al. (1979) con pequeñas modificaciones. Se añadieron a tubos Pirex® 100 μL de homogeneizado de tejido (o 100 μL de solución estándar), 100 μL de SDS al 8,1 % (p/v), 750 μL de ácido acético al 20 % (pH 3,5), 750 μL de TBA al 0,8 % (p/v) y 300 μL de agua tipo I hasta un volumen final de 2 mL. Las muestras se calentaron a 95°C durante 60 min, se enfriaron y se añadieron 1,5 mL de la mezcla orgánica butanol/piridina 15:1 (v/v). Posteriormente se agitaron y se centrifugaron a 4.000 rpm durante 10 min. La concentración de malondialdehído (MDA) fue determinada por la medida de la absorbancia a 532 nm de la capa orgánica formada y los resultados se expresaron como nmol MDA / mg de proteína. Se realizaron cuatro réplicas por muestra.

3.4.2.3.9. Expresión génica por PCR-RT cuantitativa.

Se determinó la expresión génica del péptido similar al glucagón (*gcg*), del péptido neurotensina (*nts*) y del péptido YY (*pyy*) en muestras de colon. En riñón y corazón se determinó la expresión génica del receptor del péptido similar al glucagón 1 (*glp1-r*).

Se aisló el ARN total de los diferentes tejidos. Aproximadamente 100 mg de tejido fueron introducidos en tubos especiales con una matriz de lisis (Lysing Matrix SS – 116921100, MP BIOMEDICALS) donde se añadió 1 mL de Tri-Reagent® (Sigma, Aldrich), que contenía guanidina isotiocianato, fenol y un agente solubilizante para disolver el ADN, ARN y las proteínas de las muestras lisadas. Los tejidos fueron homogeneizados en un homogeneizador FastPrep®-24 (Modelo 116004500 MP Biomedicals, EEUU). El homogeneizado fue transferido a un tubo libre de ribonucleasas (RNAsas) y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 5 min para asegurar la completa disociación de los complejos nucleoproteicos. Posteriormente se añadió a cada muestra 200 µL de cloroformo y se agitaron vigorosamente durante 15 seg. Se volvieron a incubar a temperatura ambiente de 2 - 15 min y las muestras se centrifugaron a 15.000 rpm durante 15 min a 4 °C. La mezcla se separó en tres fases: una fase acuosa superior que contenía el ARN, otra interfase que contenía el ADN y por último una fase orgánica que contenía las proteínas. La parte acuosa fue transferida a un tubo nuevo y se le añadieron 500 µL de isopropanol, las muestras se mezclaron y se mantuvieron a temperatura ambiente de 5 – 10 mins centrifugándose después a 15.000 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante fue descartado y el pellet formado se disolvió en un volumen de 50 - 200 µL con agua libre de RNAsas (Sigma, Aldrich) dependiendo del tamaño del pellet formado, y por tanto del material genético extraído.

Posteriormente, las muestras fueron tratadas con DNAsas (Ambion turboDNA-free TM kit, AM1907) para eliminar cualquier ADN presente y el ARN fue transferido a tubos libres de RNAsas para determinar la concentración y calidad del ácido nucleico mediante el índice de $A=260/A=280$ que se estableció entre 1,90 a 2,00 (NanoDrop 2000, Thermo Scientific).

Para realizar la transcripción reversa de ARN a ADNc, a un total de 1 –500 ng de ARN se le añadieron: agua libre de RNAsas hasta un volumen final de 13,75 µL y 1µL de hexadeoxinucleótidos (Random Hexamer, Promega C1181), las muestras se introdujeron en un termociclador Peltier Thermal Cycler-200 (MJ Research, Waltham, MA, USA) durante 5 min a 65 °C para desnaturalizar el ARN molde. Posteriormente se mantuvieron en hielo durante 2 min. A cada muestra se añadió 0,625 µL de nucleasa (RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor, Life

Technologies); 0,5 μ L de desoxinucleótidos trifosfato 25 mM (dNTPs, Promega); 1,25 μ L de retrotranscriptasa inversa, 5 μ L de First Buffer (250 mM Tris-HCl (pH 8,3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂) y 2,5 μ L de DTT 100 mM (SuperScript® II Reverse Transcriptase, Invitrogen™). La mezcla de reacción se llevó hasta un volumen final de 25 μ L con agua libre de ARNasas; se estableció el programa en el termociclador para llevar a cabo la reacción: 10 min a 25°C, 50 min a 42 °C y 15 min a 70°C.

A partir del cDNA obtenido, la PCR cuantitativa se llevó a cabo en el sistema 7900 HT Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems), usando cebadores/sondas (Life Technologies™) para: *actb* (*Rn00667869_m1*), *gcg* (*Rn00562293_m1*), *glp-1r* (*Rn00562406_m1*), *nts* (*Rn01503265_m1*) and *pyy* (*Rn01460420_g1*). A cada reacción (o muestra) se le añadieron 6,25 μ L de Taqman Master Mix (2X TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix, no AmpErase® UNG, que contiene la ADN polimerasa), 4,5 μ L de agua libre de ARNasas; 0,5 μ L del ADNc de la muestra correspondiente y 1,25 μ L del cebador o primer. La reacción se llevó a cabo durante 40 ciclos y siguiendo los siguientes parámetros para cada ciclo: 95 °C/20 seg para activar la ADN polimerasa; 95 °C/1 segundo para desnaturalizar las hebras de ADN y 60 °C/20 seg para permitir la alineación y extensión de los cebadores. La expresión de cada gen fue comparada con la expresión de β -actina determinada en la misma muestra. Se calculó la diferencia CT (Δ CT) para la β -actina menos el gen testado. Media, desviación estándar y error estándar de la media se calcularon desde Δ CT, y los resultados finales fueron expresados la media geométrica de $2^{-\Delta$ CT y su EEM.

3.5. Análisis estadístico.

Se realizaron diferentes tratamientos estadísticos según el diseño experimental de cada fase de trabajo y en todos los casos utilizando el programa estadístico IBM SPSS, versión 20.0.

En la determinación de la resistencia a la salinidad de *Medicago sativa*, su cultivo en una solución de riego Solonchak órtico a diferentes concentraciones salinas, y en los ensayos de dializabilidad y peroxidación lipídica, se aplicó un análisis de la

varianza (ANOVA) de una vía, y mediante el test de Duncan se analizaron diferencias significativas entre los valores medios (n=6) de los parámetros peso seco y contenido en nitrógeno ($p < 0,05$).

Los resultados del experimento del cultivo de *Medicago sativa* a 100 mM de concentración salina, fueron analizados mediante un test de la T de Student, para detectar diferencias significativas entre los dos tratamientos bacterianos (n=100).

Para el cultivo de *Medicago sativa* en campo, las diferencias en las propiedades del suelo entre los distintos bloques, y diferencias en la productividad de la alfalfa entre los distintos tratamientos bacterianos fueron analizadas mediante un análisis de la varianza (ANOVA, $p < 0,05$) y el test de Tukey fue aplicado para detectar diferencias significativas ($p < 0,05$). Además el coeficiente de correlación de Pearson fue utilizado para analizar la relación entre las variables.

En los experimentos donde se ensayó la alfalfa como fuente de proteína, se llevó a cabo un análisis de la varianza (ANOVA, $p < 0,05$); y el test de Tukey fue aplicado para detectar las diferencias significativas entre los valores medios (n=8) de los tres grupos experimentales.

En el experimento donde se ensayó la alfalfa como fuente de fibra en un modelo experimental de animal hipertenso, el efecto del fenotipo y de la dieta sobre la ingesta de dieta, el peso corporal, el incremento de peso, la presión arterial, la composición corporal, parámetros plasmáticos y urinarios, parámetros hemáticos, peso de los órganos, enzimas antioxidantes, formación de TBARs y expresión génica fue analizado mediante un análisis factorial de la ANOVA 2×2 con la dieta y el fenotipo como tratamientos. Los valores son expresados como medias grupales (n=8) y el error estándar de la media (EEM) del pool. La contribución a la varianza total (%) de cada componente de la ANOVA se expresa debajo de su p-valor. El test de Tukey fue usado para detectar diferencias entre los valores medios de los tratamientos, el nivel de significancia fue establecido en $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Cepas bacterianas.

El número de células viables de la cepa *Ensifer meliloti* 1021 (Figura 14) no fueron estadísticamente diferentes en ninguna de las concentraciones de sales ensayadas. *H. maura* S30 (Figura 15) fue incapaz de crecer en concentraciones de sal inferiores a 45 mM, pero creció a 50, 100, 200 y 300 mM.

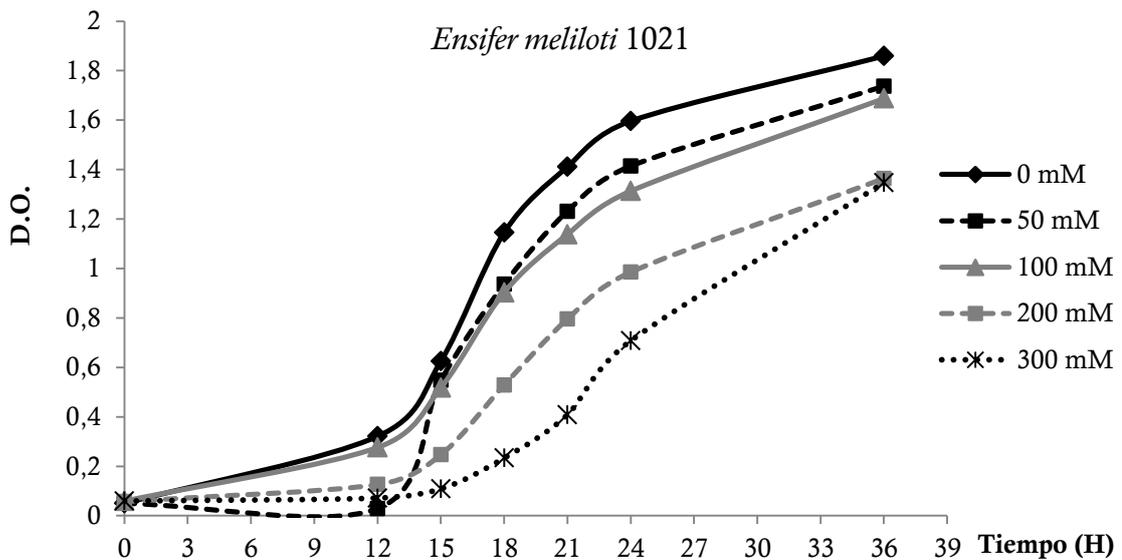


Figura 14. Curva de crecimiento de *E. meliloti* 1021 en medio de cultivo sin sales, a 50, 100, 200 y 300 mM de NaCl, durante 36 horas.

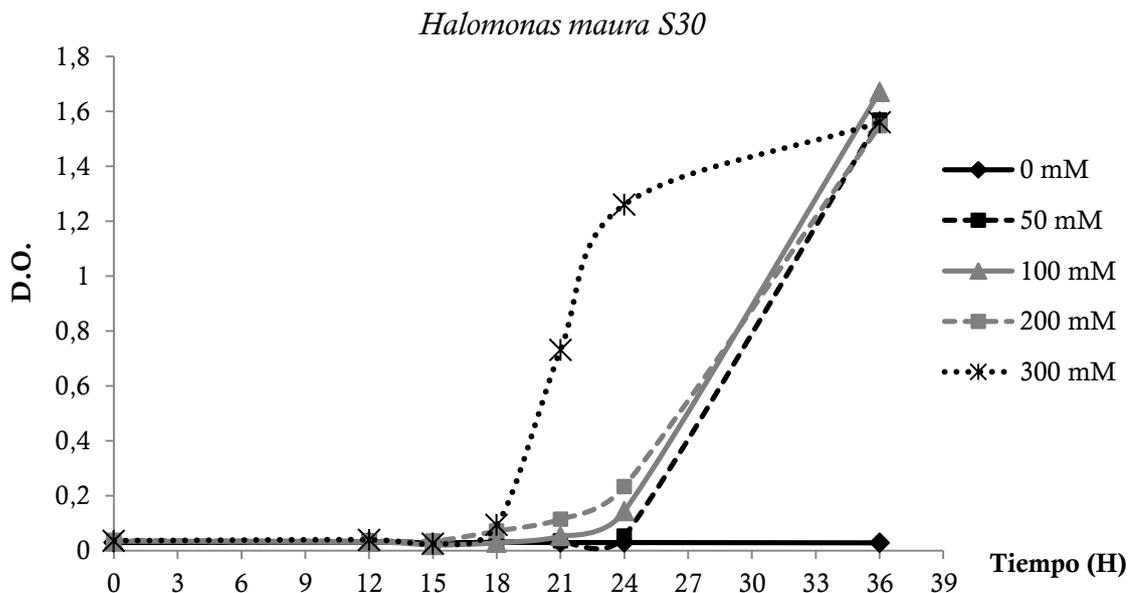


Figura 15. Curva de crecimiento de la bacteria *H. maura* S30 en medio de cultivo sin sales, a 50, 100, 200 y 300 mM de NaCl, durante 36 horas.

4.2. Cultivo de *Medicago sativa* L.

4.2.1. Experimentos en invernadero.

4.2.1.1. Resistencia a salinidad de *Medicago sativa* L.

Las plantas no inoculadas, utilizadas como control murieron en la primera Semana de experimento. El aumento de la concentración de sales en la solución de riego provocó una disminución progresiva del peso seco de la parte aérea de las plantas de alfalfa, y esta disminución fue significativa a partir de la primera concentración de sales adicionada (50 mM) (Figura 18). La concentración de nitrógeno también se vio disminuida significativamente a partir de la concentración de sales 200 mM (Tabla 14).

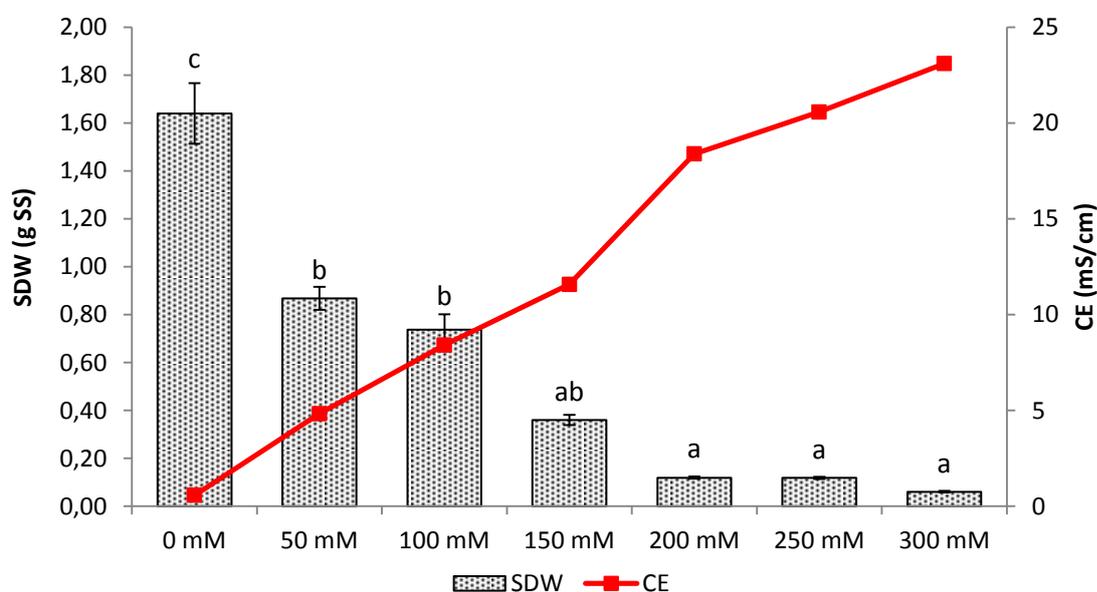


Figura 16. Peso seco de la parte aérea (SDW) de las plantas de alfalfa inoculadas con *E. meliloti* y conductividad eléctrica (CE) en las distintas concentraciones salinas utilizadas. Diferencias significativas entre tratamientos se analizaron por una ANOVA. Diferentes letras representan diferencias entre tratamientos mediante un test de Tukey ($p < 0,05$).

Tabla 14. Contenido en nitrógeno de la parte aérea de las plantas de alfalfa cultivada a distintas concentraciones de sales (NaCl).

[NaCl]	0 mM	50 mM	100 mM	150 mM	200 mM
N (g/100 g SS)	3,52 b	3,27 ab	3,12 ab	3,39 ab	2,69 a
EEM	0,257	0,258	0,268	0,284	0,257

*N: nitrógeno, SS: sustancia seca. Se representan valores medios (n=6); EEM: error estándar de la media; a,b Representan diferencias significativas entre tratamientos mediante un test de Tukey ($p < 0,05$).

4.2.1.2. Cultivo de *M. sativa* en soluciones de sales Solonchak órtico.

4.2.1.2.1. Determinación del peso seco de la parte aérea (SDW), peso seco de la raíz (RDW), contenido en nitrógeno y minerales totales.

Las plantas de alfalfa no inoculadas, e inoculadas con *H. maura* (inoculante H) murieron en la primera Semana del experimento. Aquellas plantas que fueron inoculadas con *E. meliloti* (inoculante E), tuvieron valores similares de SDW y RDW a las que fueron inoculadas con *E. meliloti* y *H. maura* (inoculante EH) cuando crecieron en una solución de riego sin sales. El peso seco de las plantas que crecieron en cualquiera de las soluciones con sales fue significativamente menor que las plantas que crecieron sin sales. Sin embargo, a 50 mM el SDW de las plantas inoculadas con inoculante EH fue significativamente mayor que las plantas inoculadas con el inoculante E (Tabla 15).

La adición de sales redujo significativamente el contenido de nitrógeno total de la parte aérea de las plantas, sin embargo cuando las plantas se co-inocularon esta reducción fue significativa tan sólo en la concentración de sales más alta (100 mM) (Tabla 15).

En cuanto a los minerales totales, la adición de sales a la solución de riego aumentó el contenido mineral en la parte aérea de las plantas, este aumento fue significativo a 100 mM en las plantas inoculadas con E y a partir de 50 mM en las plantas inoculadas con EH (Tabla 15).

4.2.1.2.2. Potencial hídrico y contenido en Lb.

La inoculación no afectó al potencial hídrico de las plantas que crecieron sin adición de sales. Para las plantas inoculadas con *E. meliloti*, el Ψ_w disminuyó significativamente al adicionar sales a la solución de riego, mientras que aquellas plantas que se inocularon con *E. meliloti* y *H. maura*, la adición de sales no tuvo ningún efecto sobre el Ψ_w (Tabla 15).

En ausencia de sales el contenido de Lb de los nódulos de las plantas tratadas con inoculante E fue significativamente mayor que en las plantas tratadas con

inoculante EH. Al adicionar sales la concentración de Lb fue reducida significativamente en las plantas inoculadas con *E. meliloti*, mientras que en las plantas co-inoculadas se aumentó significativamente este parámetro (**Tabla 15**).

4.2.1.2.3. Contenido en Ca, Na, Mg, P y Zn.

Las plantas que crecieron sin sales, tuvieron valores similares de Ca y Na. Las concentraciones de estos minerales aumentaron significativamente cuando incrementó la concentración de sales de la solución de riego independientemente del inoculante utilizado. La co-inoculación de las plantas produjo un aumento significativo de Ca con respecto a las plantas inoculadas con inoculante E en la concentración 100 mM de sales (**Tabla 15**). En ausencia de sales, el contenido en Mg fue significativamente mayor en las plantas inoculadas con *E. meliloti* comparado con las plantas co-inoculadas. La adición de sales provocó un aumento significativo en este parámetro, en las plantas co-inoculadas comparadas con las inoculadas con inoculante E (**Tabla 15**). En cuanto al P, las plantas que crecieron sin sales y tratadas con inoculante E, tuvieron valores significativamente mayores a las tratadas con inoculante EH. El incremento de la concentración de sales de la solución de riego, afectó negativamente al contenido en P disminuyéndolo significativamente independientemente del inoculante utilizado (**Tabla 15**). La concentración de Zn no se vio afectada por el tratamiento de la sal, pero a 100 mM fue significativamente superior en las plantas inoculadas con EH comparadas con las inoculadas con E (**Tabla 15**).

4.2.1.3. Cultivo de *M. sativa* en solución de sales Solonchak 100 mM.

En la **Tabla 16** se muestran los resultados de las plantas de alfalfa cultivadas a una concentración de sales 100 mM e inoculadas con *E. meliloti* o co-inoculadas con *E. meliloti* y *H. maura*. Resultados similares a los obtenidos en el experimento anterior fueron encontrados en este experimento; de modo que los parámetros de SDW, RDW, potencial hídrico, contenido en Lb, contenido en N, Ca y Mg fueron significativamente superiores en las plantas que fueron coinoculadas comparadas con aquellas que fueron inoculadas solo con *E. meliloti*.

Tabla 15. Peso seco de la parte aérea (SDW), Peso seco de la raíz (RDW), contenido total en N y cenizas, potencial hídrico (Ψ_w), contenido en leghemoglobina (Lb) en nódulos frescos, contenido en minerales Ca, P, Mg, Na y Zn de *M. sativa* cultivada en una solución mineral de sales tipo Solonchak órtico con diferentes concentraciones. Las plantas fueron inoculadas con *E. meliloti* (E), *H. maura* (H) o una mezcla 1:1 *E. meliloti* y *H. maura* (EH) y se cultivaron durante 60 días bajo condiciones de invernadero. Plantas no inoculadas fueron usadas como control.

Inoculante bacteriano	Concentración de sales (mM)	SDW (g)	RDW (g)	N total (g/100 g SDW)	Cenizas totales (g/ 100 g SDW)	Ψ_w (-Mpa)	Lb (mg/g nódulo fresco)	Ca (mg/g SDW)	Na (mg/g SDW)	Mg (mg/g SDW)	P (mg/g SDW)	Zn (μ g/g SDW)
NI	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0	1,52 c	0,93 b	3,41 b	9,22 a	- 3,55 a	13,71 b	6,31 a	0,71 a	3,22 b	3,35 c	12,72 ab
E	50	0,66 a	0,57 a	2,96 a	9,04 a	- 4,97 b	12,77 a	11,31 b	6,20 b	2,87 a	1,80 a	12,11 ab
	100	0,56 a	0,46 a	2,65 a	10,93 b	- 4,93 b	12,30 a	11,87 b	9,98 c	4,18 c	1,75 a	11,19 a
	0	1,69 c	1,01 b	3,46 b	8,81 a	- 3,46 a	11,87 a	6,28 a	0,82 a	2,74 a	2,81 b	13,94 b
EH	50	0,91 b	0,65 a	3,52 b	10,15 b	- 3,64 a	15,42 b	12,45 b	6,47 b	3,57 b	1,80 a	13,21 b
	100	0,69 a	0,64 a	2,93 a	10,44 b	- 4,08 a	14,35 b	14,09 c	9,85 c	4,61 d	1,78 a	13,37 b

*Los valores son media de n=6; los datos fueron analizados mediante una ANOVA, diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas entre los distintos tratamientos para un parámetro dado mediante el test de Duncan $p < 0,05$.

Tabla 16. Peso seco de la parte aérea (SDW), de la raíz (RDW), potencial hídrico (Ψ), contenido en leghemoglobina (Lb), nitrógeno (N), cenizas totales, fósforo, calcio y magnesio de la parte aérea de la alfalfa inoculada con *E. meliloti* o coinoculada con *E. meliloti* y *H. maura* cultivada a una concentración de sales tipo Solonchak de 100 mM.

I	SDW (g)	RDW (g)	Ψ (Mpa)	Lb (mg /g PFN)	N (g/100 g SS)	Cenizas (%)	P (mg/g SS)	Ca (mg/g SS)	Mg (mg/g SS)
N.I.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	0,64 ±0,021	0,84±0,02	-3,12±0,02	10,17±0,03	3,32±0,01	12,09±0,08	2,06±0,00	12,02±0,16	4,33±0,09
EH	0,79± 0,04***	0,90 ± 0,03*	-2,79±0,01***	11,26±0,06***	3,42±0,03*	11,39±0,38	2,02±0,04	13,79±0,34**	5,31±0,30*

Los valores representan medios (n=100)± EEM (error estándar de la media); I: inoculante; N.I: plantas no inoculadas, H: inoculante *H. maura*, E: inoculante *E. meliloti*; EH: inoculantes *E. meliloti* y *H. maura*. Diferencias significativas entre tratamientos fueron determinadas de acuerdo a un test T de Student (*p<0,05; **p<0,01, ***p<0,001)

4.2.2. Cultivo de *Medicago sativa* en campo.

4.2.2.1. Análisis de suelos.

Las propiedades del suelo pH, conductividad eléctrica (CE), materia orgánica (MO) y CaCO₃ fueron determinadas en cada una de las parcelas de cada bloque del suelo antes de proceder a la siembra de la alfalfa y en dos profundidades distintas (0 – 30 y 30 – 60 cm). Según se muestra en la **Tabla 17** todos los bloques fueron homogéneos en términos de propiedades del suelo, aunque se encontraron algunas diferencias significativas. Con respecto al pH determinado en la profundidad de 0 – 30 cm, éste fue significativamente superior en el Bloque B con respecto al bloque E. En cuanto a la CE, también se observó que el bloque C tuvo una CE significativamente superior a los bloques B y D a 30 – 60 cm. El contenido en MO en el bloque A fue significativamente inferior a la MO del bloque E en profundidad de 0 – 30 cm; y en profundidad 30 – 60 estas diferencias se siguieron manteniendo; además el bloque B también tuvo una MO significativamente inferior al bloque E. El último parámetro analizado, CaCO₃, fue significativamente superior en el Bloque B con respecto al E en profundidad 0 – 30 cm, y a 30 – 60 cm se encontraron diferencias significativas entre el Bloque A y los bloques B, C y E, siendo este parámetro superior para estos últimos bloques.

Tabla 17. Propiedades del suelo antes de la siembra de la alfalfa en cada bloque y a las dos profundidades consideradas (0-30 y 30-60 cm). Los datos se representan como medias en cada bloque (n=4). (CE: conductividad eléctrica, MO: materia orgánica).

Profundidad	pH		CE(dSm ⁻¹)		MO (%)		CaCO ₃ (%)	
	0-30	30-60	0-30	30-60	0-30	30-60	0-30	30-60
Bloque A	8,38 ab	8,50 a	21,77 a	21,65 ab	1,27 a	0,92 a	54,1 ab	55,0 a
Bloque B	8,42 b	8,48 a	21,48 a	20,93 a	1,49 ab	0,99 a	55,4 b	56,2 b
Bloque C	8,38 ab	8,40 a	22,38 a	22,78 b	1,68 bc	1,15 ab	53,9 ab	56,0 b
Bloque D	8,39 ab	8,40 a	21,75 a	21,20 a	1,67 bc	1,11 ab	54,5 ab	55,7 ab
Bloque E	8,35 a	8,40 a	22,10 a	21,93 ab	1,91 c	1,27 b	53,0 a	56,2 b

a,b,c En una misma columna indican diferencias significativas de acuerdo a un test de Tukey ($p \leq 0,05$).

La **Figura 17** muestra la evolución de los parámetros analizados en el suelo a lo largo del tiempo y en las dos profundidades estudiadas. En la **Figura 17A** se observa que el contenido en materia orgánica disminuyó con el tiempo en todos los tratamientos bacterianos, y especialmente en el perfil de 0 – 30 cm de profundidad, pero no se encontraron diferencias significativas entre el inicio del experimento y el momento de la recogida de las plantas.

El pH y la conductividad eléctrica también mostraron un comportamiento homogéneo con los distintos tratamientos en ambas profundidades de las muestras analizadas (**Figura 17B** y **Figura 17C** respectivamente). Ambas propiedades del suelo incrementaron a lo largo del tiempo en la superficie (0 - 30 cm) y disminuyeron con la profundidad (30 - 60 cm). Estas variaciones fueron estadísticamente significativas para el tratamiento CT y H donde el pH aumentó en superficie y para el tratamiento E, donde el pH disminuyó significativamente en profundidad. En cuanto a la conductividad eléctrica, en todos los tratamientos se sufrió un aumento significativo de este parámetro en el perfil 0 – 30 cm a lo largo del tiempo, y tan sólo en el tratamiento EH la disminución de la CE fue significativa en el nivel más profundo (30 – 60 cm) **Figura 17C**.

Como se muestra en la **Figura 17D**, no hubo diferencias significativas en el contenido en equivalentes de CaCO_3 ni entre tratamientos, ni por efecto del tiempo o la profundidad.

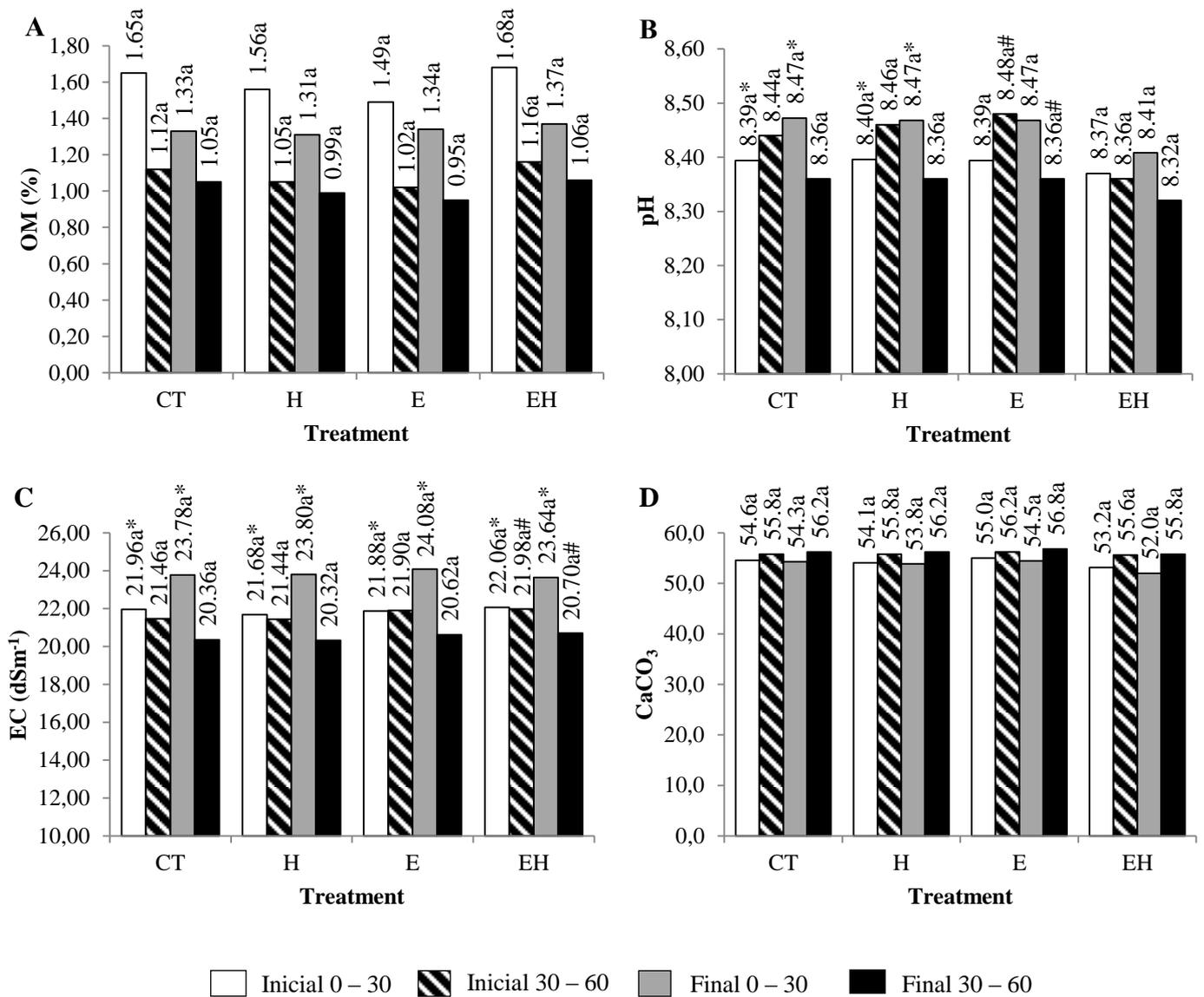


Figura 17. (A) Contenido medio en materia orgánica (MO) del suelo (%); **(B)** pH medio; **(C)** Valores de conductividad eléctrica (CE, dSm⁻¹) y **(D)** Contenido en equivalentes de CaCO₃ (%) antes de la siembra (*tiempo experimental inicial*) y después de la cosecha (*tiempo experimental final*) a dos profundidades (0-30 y 30-60 cm) para los cuatro tratamientos (CT: control; H: *H. maura*; E: *E. meliloti* y EH: *E. meliloti* + *H. maura*). *Representa diferencias estadísticamente significativas entre los valores iniciales y finales para cada tratamiento en el nivel superficie. #Representa diferencias estadísticamente significativas entre los valores iniciales y finales para cada tratamiento en el nivel profundo. Letras en minúscula representan comparaciones estadísticas entre subgrupos homogéneos usando el método de Tukey en cada punto: inicial 0 – 30 cm; inicial 30 – 60 cm; final 0 – 30 cm y final 30 – 60 cm.

4.2.2.2. Determinación de productividad de *M. sativa*.

La co-inoculación de las plantas de alfalfa incrementó significativamente la productividad de las mismas tanto en la primera cosecha realizada en julio del 2012, como en la segunda cosecha realizada en septiembre del 2012. La inoculación con H, E y EH incrementó la productividad en un 21,24, 14,33 y 53,17% respectivamente en relación a las plantas del tratamiento control en el primer corte realizado. En el segundo corte estos porcentajes fueron del 51,32% para el tratamiento H, 3,97% para tratamiento E y un 102,25% para el tratamiento EH, también con respecto al tratamiento CT y asumiendo el 100% de productividad en este tratamiento.

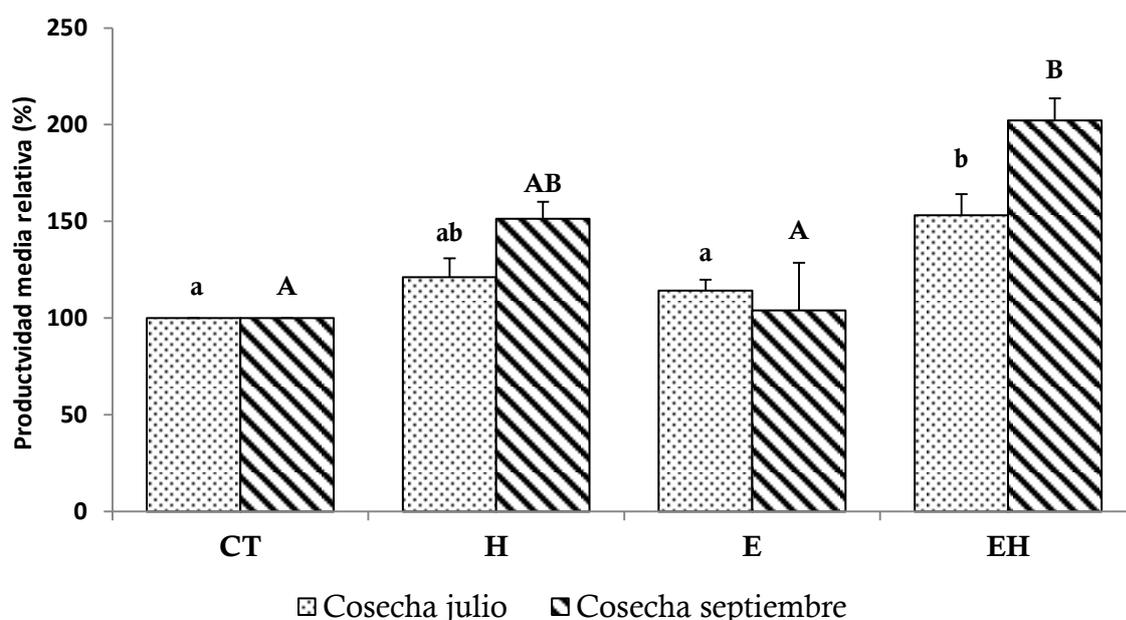


Figura 18. Productividad media relativa de las plantas de alfalfa (n=5) con los diferentes tratamientos (CT: plantas no inoculada; H: tratamiento *H. maura*; E: tratamiento *E. meliloti* y EH: tratamiento *E. meliloti* + *H. maura*) en dos cosechas consecutivas, julio y septiembre.*Letras minúsculas representan los resultados del análisis de subgrupos homogéneos usando el método de Tukey ($p < 0,05$) en la cosecha de julio; letras mayúsculas representan el mismo análisis para la cosecha de septiembre.

Se determinó la correlación entre las distintas propiedades del suelo, en el momento de la cosecha, y la productividad de la alfalfa (**Tabla 18**). El pH y la CE mostraron correlaciones negativas con la productividad, pero solo se encontraron diferencias significativas para el pH en el tratamiento H y E en el nivel de profundidad 30 – 60 cm. La MO mostró una correlación positiva con la productividad de las plantas, pero esta fue solamente significativa en el tratamiento CT y en el nivel más profundo (30 – 60 cm). El CaCO₃ mostró un patrón de correlación más variado pero ninguna correlación significativa fue encontrada.

Tabla 18. Coeficiente de correlación de Pearson estimado entre las distintas propiedades del suelo y la productividad de la primera cosecha.

Treatments	CT		H		E		EH	
	0-30	30-60	0-30	30-60	0-30	30-60	0-30	30-60
Depth								
pH	-0,572	-0,873	-0,522	-0,991**	-0,760	0,901*	-0,819	-0,708
Sig.	0,314	0,053	0,367	0,001	0,136	0,037	0,090	0,181
CE	-0,080	-0,705	-0,090	-0,156	-0,314	-0,009	-0,121	0,369
Sig.	0,898	0,183	0,885	0,802	0,607	0,988	0,847	0,541
MO	0,848	0,883*	0,143	0,078	0,821	0,083	0,509	0,712
Sig.	0,069	0,047	0,819	0,900	0,089	0,894	0,381	0,177
CaCO₃	-0,733	0,848	-0,205	0,512	-0,753	0,740	0,161	0,481
Sig.	0,159	0,070	0,741	0,377	0,142	0,152	0,795	0,412

CT: tratamiento control, H: tratamiento *H. maura*, E: tratamiento *E. meliloti*, EH: tratamiento *E. meliloti* + *H. maura*. CE: conductividad eléctrica, MO: materia orgánica.

Sig: p valor. *Representa correlación significativa entre la productividad de la alfalfa y las distintas propiedades del suelo (*p<0,05; **p<0,01).

4.2.2.3. Determinación del contenido en N, minerales totales, P, Ca, Mg y Na de *M. sativa*.

Primera cosecha. No se encontraron diferencias significativas en el contenido en N, cenizas totales, P, Ca y Mg de la parte aérea de las plantas de alfalfa entre los cuatros tratamientos bacterianos utilizados. Con respecto al contenido en Na se encontraron diferencias entre el tratamiento E y EH, siendo este parámetro significativamente mayor en las plantas inoculadas con el inoculante E (**Tabla 19**).

Segunda cosecha. El contenido en nitrógeno, Mg y Na fue similar para todos los tratamientos. Las cenizas totales fueron significativamente superiores en el grupo CT comparado con los tratamientos E y tratamiento EH. El contenido en P fue significativamente mayor en el tratamiento EH comparado con los tratamientos CT y H, y por último el contenido en Ca fue significativamente superior en el tratamiento H comparado con el tratamiento EH (Tabla 19).

Tabla 19. Contenido en N, cenizas totales, P, Ca, Mg y Na de la parte aérea de las plantas de alfalfa cultivadas en suelo Solonchak correspondiente a los cuatro tratamientos bacterianos y en dos cosechas consecutivas (julio y septiembre de 2012).

Primera cosecha (julio 2012)						
TRATAMIENTO	N total	Cenizas	P	Ca	Mg	Na
CT	2,79 a	13,25 a	1,19 a	24,68 a	10,49 a	0,702 ab
H	2,82 a	13,38 a	1,19 a	25,29 a	10,94 a	0,747 ab
E	2,72 a	13,12 a	1,22 a	24,53 a	11,32 a	0,816 b
EH	2,74 a	12,89 a	1,21 a	24,08 a	10,85 a	0,611 a
EEM	0,051	0,793	0,37	0,264	0,809	0,026
Segunda cosecha (septiembre 2012)						
	N total	Cenizas	P	Ca	Mg	Na
CT	2,63 a	15,07 b	0,94 a	25,46 ab	13,39 a	0,818 a
H	2,64 a	14,17 a	1,10 ab	24,67 ab	11,68 a	1,022 a
E	2,64 a	14,17 a	1,10 ab	24,67 ab	11,68 a	1,022 a
EH	2,55 a	14,20 a	1,20 b	23,33 a	11,61 a	0,818 a
EEM	0,029	0,087	0,755	0,853	0,884	0,040

*N total y cenizas totales son expresados en g/100 g SS (sustancia seca); P, Ca, Mg y Na están expresados en mg/g SS. Los resultados se expresan como valores medios (n=5). EEM: error estándar de la media. a,b representan diferencias significativas según un análisis de subgrupos homogéneos utilizando el test de Tukey ($p < 0,05$).

4.3. Ensayos biológicos *in vitro* de las plantas de alfalfa.

4.3.1. Ensayo de dializabilidad mineral.

En ausencia de sales, el porcentaje de Ca, P y Mg dializable fue significativamente mayor en las plantas tratadas con inoculante E comparado con las tratadas con inoculante EH (**Tabla 20**). El incremento en la concentración de sales condujo a una significativa disminución en el porcentaje de minerales dializables extraídos de las plantas de alfalfa inoculadas con E. El tratamiento con sal, mejoró el porcentaje de dializabilidad de Ca, disminuyó el de fósforo y no afectó al porcentaje de dializabilidad de Mg en las plantas tratadas con el inoculante EH (**Tabla 20**).

Tabla 20. Dializabilidad de Ca, P y Mg de la parte aérea de las plantas de alfalfa crecidas en solución de sales Solonchak órtico a diferentes concentraciones. Las plantas fueron inoculadas con *E. meliloti* (E) o *E. meliloti* y *H. maura* (EH). Valores son expresados como porcentajes de mineral dializado.

Inoculante	Concentración de sales (mM)	Ca (%)	P (%)	Mg (%)
E	0	44,90 b	83,81 a	96,40 a
	50	61,34 a	44,35 c	100,00 a
	100	39,09 c	31,26 d	63,66 c
EH	0	29,19 e	62,44 b	71,35 b
	50	34,93 d	58,53 b	73,79 b
	100	37,25 cd	31,83 d	76,12 b

Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas como resultado del análisis de subgrupos homogéneos utilizando el test de Tukey ($p < 0,05$).

4.3.2. Ensayo de la peroxidación lipídica.

La capacidad antioxidante en dializados y retenidos determinada mediante la capacidad de inhibición de la peroxidación lipídica, fue similar en las plantas que crecieron en ausencia de sales independientemente del inoculante bacteriano, a excepción de los dializados de EH, donde fue significativamente inferior (**Tabla 21**). En presencia de 50 mM de sales, las plantas tratadas con inoculante E tuvieron una capacidad antioxidante similar a las plantas que crecieron en ausencia de sales, pero a 100 mM la capacidad antioxidante incrementó significativamente. La co-inoculación incrementó significativamente la capacidad antioxidante de las plantas de alfalfa, en los dializados y en los retenidos, cuando estas fueron cultivadas tanto a 50 mM como a 100 mM (**Tabla 21**).

Tabla 21. Capacidad antioxidante de dializados y retenidos de la parte aérea de las plantas de alfalfa crecidas en solución de sales Solonchak órtico a diferentes concentraciones. Las plantas fueron inoculadas con *E. meliloti* (E) o *E. meliloti* y *H. maura* (EH). Valores expresados como unidades de capacidad antioxidante (UCA/mL).

Inoculante	Concentración de sales (mM)	Dializados	Retenidos
	Blanco	4,54 b	5,99 b
E	0	3,41 ab	5,48 b
	50	3,80 ab	3,78 a
	100	20,61 d	29,20 d
EH	0	2,98 a	5,58 b
	50	13,85 c	16,02 c
	100	19,75 d	30,16 d

Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas como resultado del análisis de subgrupos homogéneos utilizando el test de Tukey ($p < 0,05$).

4.3.3. Determinación de polifenoles totales.

El contenido en polifenoles totales, fue significativamente superior en las plantas que crecieron en un suelo Solonchak, comparado con las plantas que crecieron en condiciones de invernadero sin adición de sales ($p < 0,01$) (Tabla 22).

Tabla 22. Contenido en polifenoles totales de los extractos de la parte aérea de *Medicago sativa* cultivada en condiciones de invernadero sin sales o en suelo Solonchak órtico. Los valores representan medias ($n=8$) \pm EEM (error estándar de la media).

	0 mM (0,6 dS/m) [†]	Solonchak (23 dS/m) [†]
$\mu\text{g EAG/mL}$	634,17 \pm 28,08	787,08 \pm 26,48**

**Representa diferencias significativas mediante un test de T de Student ($p < 0,01$). EAG: equivalentes de ácido gálico. [†]Los valores entre paréntesis representan el nivel de salinidad sobre la que las plantas crecieron, expresada como conductividad eléctrica.

4.4. Ensayos biológicos *in vivo* de la alfalfa.

4.4.1. Ensayo de la alfalfa como fuente de proteína.

4.4.1.1. Índices de transformación de alimento y coeficiente en crecimiento.

La ingesta diaria de alimento, expresada en valor absoluto, fue significativamente menor en los grupos cuya fuente de proteína fue la alfalfa, al expresar los resultados como valores relativos (g de dieta ingerida/ 100g de peso corporal), no se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos experimentales; sin embargo, el incremento de peso diario y el coeficiente en crecimiento (C.E.C.) fueron significativamente inferiores en los grupos que consumieron las dietas cuya fuente de proteína provenía de la alfalfa, mientras que el índice de transformación (I.T) del alimento fue significativamente superior en estos grupos experimentales (Tabla 23).

Tabla 23. Ingesta, incremento de peso e índices biológicos de crecimiento determinados en los tres grupos experimentales. Los valores son expresados como medias grupales (n=8).

	Ingesta (g SS/día)	Ingesta (gSS/100g peso)	Δ Peso (g/día)	C.E.C.	I.T.
CT	9,03 b	10,44 a	3,74 b	4,96 b	2,45 a
E100	7,55 a	10,70 a	0,97 a	1,41 a	6,21 b
EH100	7,85 a	10,77 a	1,25 a	1,75 a	5,51 b
EEM	0,28	0,37	0,25	0,33	0,35

#a,b Representan diferencias significativas entre los tres grupos experimentales de acuerdo a un análisis de subconjuntos homogéneos mediante el test de Tukey (p<0,05).

CT: fuente de proteína caseína; E100: fuente de proteína alfalfa inoculada con *E. meliloti*; EH100: fuente de proteína alfalfa inoculada con *E. meliloti* y *H. maura*.

4.4.1.2. Pesos corporales y de los órganos.

El peso final de los animales fue significativamente superior en el grupo que consumió la dieta control, compuesta por caseína como fuente proteica. Estos animales además tuvieron un peso del hígado expresado como g/100 g de peso corporal, significativamente superior. El consumo de alfalfa se asoció con un

aumento significativo en el peso de los órganos cerebro y riñón; y también aumentó significativamente el peso del ciego y del colon comparado con el grupo CT, mientras que el peso del bazo fue significativamente superior en el grupo CT.

Tabla 24. Pesos corporales y de los distintos órganos de los animales de los tres grupos experimentales. El peso final es expresado en g y el peso de los órganos es expresado en g/100 g de peso corporal. Los valores son expresados como medias grupales (n=8).

	Peso final	Hígado	Cerebro	Riñón	Ciego	Colon	Corazón	Bazo
CT	99,81 b	5,27 b	1,56 a	0,41 a	0,33 a	0,48 a	0,55 a	0,33 b
E100	73,57 a	3,89 a	2,13 c	0,55 b	0,61 b	0,83 b	0,59 a	0,27 a
EH100	77,71 a	4,17 a	1,93 b	0,56 b	0,54 b	0,92 b	0,57 a	0,27 a
EEM	2,48	0,21	0,06	0,02	0,05	0,07	0,03	0,01

#a,b Representan diferencias significativas entre los tres grupos experimentales de acuerdo un análisis de subconjuntos homogéneos mediante el test de Tukey ($p < 0,05$). CT: caseína fuente de proteína; E100: fuente de proteína alfalfa inoculada con *E. meliloti*; EH100: fuente de proteína alfalfa inoculada con *E. meliloti* y *H. maura*.

4.4.1.3. Parámetros hemáticos.

Los parámetros hemáticos analizados se mantuvieron muy homogéneos entre los distintos grupos experimentales ya que solo encontramos diferencias significativas en el volumen corpuscular medio (MCV) donde los animales alimentados con la dieta control tuvieron unos valores superiores comparados con el grupo E100, y en la concentración de hemoglobina corpuscular media (MCHC), en la que el grupo EH100 tuvo valores significativamente superiores al grupo CT. RDW y PLT no pudieron determinarse correctamente.

Tabla 25. Parámetros hemáticos analizados en los tres grupos experimentales. Los valores son expresados como medias grupales (n=8)

	WBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	RBC ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	HGB (g/dL)	HCT (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)
CT	6,65 a	7,77 a	13,39 a	44,39 a	57,11 b	17,54 a	30,65 a
E100	5,00 a	8,12 a	13,76 a	44,67 a	55,13 a	17,00 a	30,85 ab
EH100	6,34 a	7,70 a	13,58 a	42,24 a	55,81 ab	17,61 a	31,58 b
EEM	0,84	0,222	0,486	1,166	0,571	0,262	0,293

#a,b Representan diferencias significativas entre los tres grupos experimentales de acuerdo un análisis de subconjuntos homogéneos mediante el test de Tukey ($p < 0,05$). CT: caseína fuente de proteína; E100: fuente de proteína alfalfa inoculada con *E. meliloti*; EH100: fuente de proteína alfalfa inoculada con *E. meliloti* y *H. maura*

4.4.1.4. Parámetros de bioquímica plasmática.

La utilización de la alfalfa como fuente de proteína (independientemente de la inoculación de las plantas) produjo una disminución significativa en los niveles plasmáticos de glucosa, triglicéridos, colesterol total, LDL y HDL, así como de bilirrubina total. La disminución de colesterol fue más acusada en el grupo que consumió la alfalfa co-inoculada, siendo significativamente inferior la concentración plasmática de colesterol comparado con los animales del grupo E100. Sin embargo, el uso de la alfalfa dio lugar a un aumento significativo de los valores de ambas transaminasas (ALT/GPT y AST/GOT) comparados con el grupo CT.

Tabla 26. Parámetros plasmáticos determinados en los tres grupos experimentales. Los valores se expresan como medias grupales (n=8).

Fuente de proteína	Caseína-Met	Alfalfa		
Parámetros	CT	E100	EH100	EEM
Glucosa (mg/dL)	154,78 b	131,56 a	128,33 a	6,122
Triglicéridos (mg/dL)	105,70 b	39,49 a	45,31 a	7,509
Colesterol (mg/dL)	124,24 c	109,05 b	92,94 a	4,186
LDL colesterol (mg/dL)	13,13 b	9,29 ab	8,43 a	1,558
HDL colesterol (mg/dL)	52,44 b	32,38 a	28,28 a	3,57
Ácido úrico (mg/dL)	2,02 a	1,51 a	1,73 a	0,268
Urea (mg/dL)	2,27 a	5,4 a	9,25 a	5,032
Albúmina (g/dL)	3,00 a	3,00 a	3,25 a	0,133
Fosfatasa alcalina (U/L)	308,57 a	251,25 a	245,43 a	16,709
ALT/GPT (U/L)	34,85 a	52,50 b	48,29 b	3,985
AST/GOT (U/L)	158,71 a	221,66 b	226,53 b	10,201
Creatinina (mg/dL)	0,25 a	0,21 a	0,33 a	0,051
Bilirrubina total (mg/dL)	0,19 b	0,14 a	0,13 a	0,022
Bilirrubina directa (mg/dL)	0,03 a	0,09 a	0,07 a	0,035
Amilasa (U/L)	648,47 ab	608,69 a	735,10 b	44,891
Ferritina (mg/L)	0,12 a	0,03 a	0,11 a	0,036

#a,b Representan diferencias significativas entre los tres grupos experimentales de acuerdo un análisis de subconjuntos homogéneos mediante el test de Tukey ($p < 0,05$). CT: caseína fuente de proteína; E100: fuente de proteína alfalfa inoculada con *E. meliloti*; EH100: fuente de proteína alfalfa inoculada con *E. meliloti* y *H. maura*

4.4.1.5. Utilización digestiva de minerales totales y utilización nutritiva de N, P, Mg y Ca.

La composición de las dietas experimentales se presenta en la **Tabla 27**. El contenido proteico fue igual en las tres dietas ajustadas al 8% de proteína. El contenido en cenizas, Ca y Mg fue significativamente mayor en las dietas experimentales formuladas con la alfalfa, mientras que el contenido en Mg fue similar aunque significativamente superior en la dieta formulada con la alfalfa inculada con *E. meliloti*.

Tabla 27. Composición de las dietas experimentales ensayadas. Los datos de proteína y cenizas son expresados en porcentaje. Los datos de P, Ca y Mg son expresados como mg/100 g de sustancia seca.

	Proteína	Cenizas	P	Ca	Mg
CT	8,35 a	2,64 a	2,42 a	4,84 a	0,46 a
E100	8,87 a	5,85 b	2,87 b	5,66 b	2,70 b
EH100	8,84 a	5,86 b	2,40 a	5,88 b	2,86 c
EEM	0,193	0,15	0,156	0,157	0,05

EEM: error estándar de la media. a,b Representan diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales como resultado de un análisis de subconjuntos homogéneos mediante un test de Tukey ($p < 0,05$)

Nitrógeno: el nitrógeno ingerido fue significativamente mayor en el grupo de animales que consumieron la dieta compuesta por caseína como fuente de proteína comparado con el grupo de animales que consumieron la dieta E100; la excreción fecal fue significativamente superior en los grupos de animales que consumieron alfalfa como fuente de proteína no encontrándose diferencias en el nitrógeno urinario entre los distintos grupos; esto conllevó a un coeficiente de digestibilidad aparente, balance y nitrógeno retenido en función del absorbido significativamente mayor en el grupo control con respecto a los grupos que consumieron alfalfa. (**Tabla 28**).

Cenizas totales: la ingesta, la excreción fecal y la absorción de cenizas totales fue significativamente superior en los animales a los que se les administraron las dietas con alfalfa comparados con el grupo de animales que consumieron caseína. Sin embargo el CDA fue significativamente superior en el grupo CT (dieta de caseína-

metionina) comparado con los grupos de animales que se alimentaron con las dietas compuestas por alfalfa (**Tabla 28**).

Fósforo: el fósforo ingerido fue significativamente inferior en el grupo EH100 con respecto a los otros dos grupos, mientras que el fósforo fecal aumentó significativamente en los grupos de animales a los que se les administró alfalfa. El fósforo urinario fue significativamente diferente en los tres grupos experimentales de forma que el grupo CT fue el que menor P excretó, seguido del grupo EH100 y por último el grupo E100. El fósforo absorbido, CDA y Balance siguieron el mismo patrón ya que estos parámetros fueron significativamente inferiores en el grupo EH100, seguidos del grupo E100 y por último el grupo CT que alcanzó los valores significativamente más altos. Por último, el R/A fue significativamente superior en el grupo que consumió caseína, manteniéndose similar en los grupos que consumieron alfalfa (**Tabla 28**).

Magnesio: la ingesta de magnesio fue significativamente superior en los grupos a los que se les administró alfalfa, y significativamente superior en el grupo donde la alfalfa estaba co-inoculada. La excreción en heces, orina y el Mg absorbido, así como el balance fueron significativamente superiores en los grupos a los que se les suministró alfalfa en comparación con el grupo que consumió caseína; mientras que el CDA fue significativamente superior en el grupo CT con respecto a los otros dos grupos. El R/A fue significativamente superior en los animales que ingirieron la dieta donde la alfalfa fue co-inoculada comparado con el grupo CT (**Tabla 28**).

Calcio: no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la ingesta de calcio. Sin embargo la excreción fecal del mismo fue significativamente superior en los grupos de animales que consumieron la dieta con alfalfa. La excreción urinaria fue significativamente inferior en el grupo EH100 y comparado con el grupo CT. Tanto el Ca absorbido, como el CDA y el balance fueron significativamente superiores en el grupo de animales que consumieron la dieta cuya fuente de proteína era la caseína, mientras que no se encontraron diferencias en el R/A (**Tabla 28**).

Tabla 28. Utilización digestiva de cenizas totales y utilización nutritiva de nitrógeno, fósforo, magnesio y calcio de los tres grupos experimentales. Los valores representan valores medios grupales (n=8).

		Ingesta (mg/día)	E. Fecal (mg/día)	E. Urinaria (mg/día)	Absorción (mg/día)	CDA (%)	Balance	R/A (%)
Cenizas totales	CT	238,52 a	40,40 a	-	198,12 a	83,06 b	-	-
	E100	441,75 b	130,60 b	-	311,15 b	70,44 a	-	-
	EH100	459,80 b	151,85 b	-	307,96 b	67,58 a	-	-
	EEM	16,30	15,73	-	0,82	2,91	-	-
N	CT	120,70 b	6,86 a	15,82 a	113,84 b	94,32 b	98,03 b	86,10 b
	E100	107,16 a	31,08 b	19,49 a	76,08 a	71,76 a	58,33 a	75,40 a
	EH100	110,92 ab	33,10 b	16,51 a	77,82 a	69,37 a	61,31 a	77,66 a
	EEM	3,94	2,44	1,72	2,11	0,95	2,06	1,57
P	CT	21,90 b	3,73 a	0,94 a	18,17 c	82,96 c	17,23 c	94,85 b
	E100	21,64 b	5,08 b	3,09 c	16,55 b	76,50 b	13,46 b	81,22 a
	EH100	18,83 a	5,56 b	2,61 b	13,27 a	70,81 a	10,66 a	80,31 a
	EEM	0,7	0,47	0,18	0,5	1,82	0,52	1,27
Mg	CT	4,17 a	1,08 a	2,38 a	3,08 a	73,99 b	0,70 a	24,92 a
	E100	20,42 b	12,95 b	5,27 b	7,47 b	36,65 a	2,49 b	32,33 ab
	EH100	22,46 c	13,85 b	5,23 b	8,61 b	39,19 a	3,38 b	40,20 b
	EEM	0,787	1,126	0,382	0,578	4,019	0,551	4,584
Ca	CT	43,79 a	13,67 a	5,28 b	30,12 b	68,79 b	24,84 b	82,35 a
	E100	42,73 a	24,12 b	4,26 ab	18,61 a	43,63 a	15,28 a	82,05 a
	EH100	46,11 a	25,66 b	3,32 a	20,44 a	44,97 a	16,19 a	79,23 a
	EEM	1,622	2,213	0,459	1,429	3,793	1,319	2,016

EEM: error estándar de la media. a,b Representan diferencias significativas para un mismo parámetro entre grupos experimentales como resultado de un análisis de subconjuntos homogéneos mediante un test de Tukey ($p < 0,05$).

4.4.1.6. Contenido en minerales de hueso y músculo.

El contenido en *cenizas totales* del músculo fue significativamente superior en los animales que consumieron la dieta con alfalfa, independientemente de la procedencia de la misma. No se encontraron diferencias significativas en el contenido de minerales en hueso (Tabla 29).

El contenido de P en hueso fue significativamente superior en los animales que consumieron la dieta de alfalfa que fue inoculada con las dos bacterias, con respecto a los otros grupos; mientras que en músculo este aumento en P fue significativo para los animales que consumieron alfalfa inoculada con *E. meliloti* comparado con el grupo que consumió caseína (Tabla 29).

El contenido en Mg del hueso fue significativamente superior en los grupos de animales que se alimentaron con las dietas de alfalfa (Tabla 29).

Por último, el contenido en Ca de hueso fue significativamente superior en el grupo de animales que consumieron alfalfa co-inoculada con las dos bacterias con respecto a los dos grupos restantes. En músculo, el contenido en Ca aumentó significativamente en los dos grupos de animales que consumieron la dieta cuya fuente de proteína procedía de la alfalfa, indistintamente de los inoculantes utilizados (Tabla 29).

Tabla 29. Contenido de fósforo, magnesio y calcio en hueso (fémur) y músculo (longissimus dorsi) de los tres grupos experimentales. Los datos muestran valores medios grupales (n=8).

	Cenizas totales (g)		P		Mg		Ca	
	Hueso	Músculo	Hueso	Músculo	Hueso	Músculo	Hueso	Músculo
CT	48,84 a	4,61 a	89,88 a	9,66 a	3,54 a	1,15 a	174,47 a	0,19 a
E100	46,34 a	6,16 b	88,78 a	12,03 b	4,09 b	1,18 a	169,96 a	5,14 b
EH100	49,03 a	5,64 b	95,48 b	11,06 ab	4,09 b	1,19 a	184,91 b	4,11 b
EEM	1,26	0,32	1,816	0,558	0,148	0,093	5,194	0,668

Los valores son expresados en mg/g sustancia seca (SS). EEM: error estándar de la media. a,b Representan diferencias significativas entre grupos experimentales como resultado de un análisis de subconjuntos homogéneos mediante un test de Tukey ($p < 0,05$).

4.4.2. Ensayo de la alfalfa como fuente de fibra.

4.4.2.1. Ingesta de dieta.

La ingesta de dieta de los cuatro grupos experimentales se representa en la **Figura 19** y en la **Tabla 30**. Durante los primeros 16 días los cuatro grupos de animales, que permanecían alojados en jaulas grupales, tuvieron una ingesta similar. A partir de este día se observó que la ingesta en los grupos normotensos, independientemente de la dieta administrada, fue superior a la de los grupos hipertensos (**Figura 19**).

Se observó el mismo patrón cuando los animales fueron trasladados en el día 28 del período experimental a jaulas metabólicas individuales. Este efecto del fenotipo sobre la ingesta de dieta estuvo presente hasta el final del período experimental. Se observó un efecto significativo de la dieta en los días 31, 34 y 35 del período experimental, de manera que tanto los animales normotensos como los animales hipertensos, que consumieron la dieta cuya fuente de fibra era la alfalfa, tuvieron una ingesta de alimento mayor. Un efecto significativo de la interacción fenotipo × dieta fue encontrado en el día 34, ya que mientras en las ratas normotensas la dieta ingerida fue similar, en los grupos hipertensos, aquellos animales que consumieron alfalfa tuvieron una ingesta de dieta significativamente superior al grupo hipertenso que consumió la dieta formulada con celulosa (**Tabla 30**).

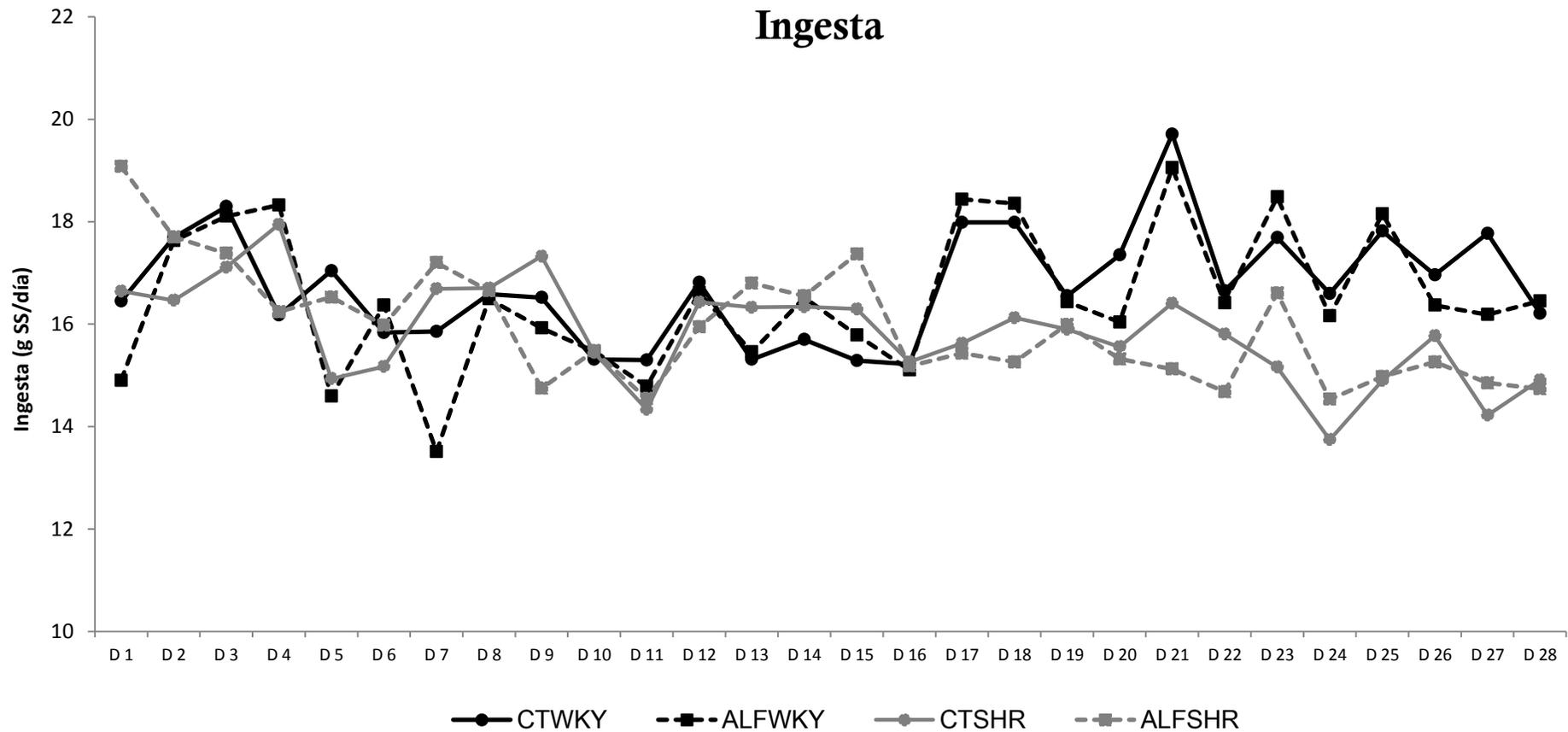


Figura 19. Ingesta de los cuatro grupos experimentales alojados en jaulas grupales durante cuatro Semanas del período experimental. La ingesta se representa en g de sustancia seca (SS) ingeridos al día. D: día del experimento.

Tabla 30. Efecto del fenotipo y de la dieta administrada sobre la ingesta de alimento de los cuatro grupos experimentales durante la Semana de alojamiento en jaulas individuales. Los datos mostrados son valores medios grupales (n=8).

	WKY		SHR		EEM	R ²	Efecto		
	CT	ALF	CT	ALF			Fenotipo	Dieta	Fenotipo×dieta
ID29	14,96 a	15,88 a	14,72 a	15,95 a	0,941	0,087	p=0,899	p=0,118	p=0,822
ID30	17,99 b	17,69 b	14,24 a	15,65 a	0,62	0,635	p<0,0001 (56,6%)	p=0,218	p=0,062
ID31	17,80 c	18,55 c	11,75 a	13,66 b	0,684	0,831	p<0,0001 (77,6%)	p=0,010 (4,6%)	p=0,242
ID32	17,74 b	18,17 b	14,37 a	14,38 a	0,568	0,740	p<0,0001 (73,5%)	p=0,583	p=0,611
ID33	18,44 b	18,39 b	10,73 a	12,38 a	0,765	0,855	p<0,0001 (83,1%)	p=0,151	p=0,127
ID34	18,11 c	18,08 c	10,53 a	12,35 b	0,535	0,920	p<0,0001 (88,7%)	p=0,021 (1,7%)	p=0,026 (1,6%)
ID35	16,27 b	18,02 b	10,53 a	12,35 a	0,742	0,823	p<0,0001 (74,9%)	p=0,002 (7,3%)	p=0,949

a,b,c Representan diferencias significativas entre grupos experimentales para cada parámetro según un análisis de subgrupos homogéneos mediante el test de Tukey (p<0,05). Los valores entre paréntesis representan el % en que cada factor contribuye a la variación total del test de la ANOVA.

4.4.2.2. **Peso corporal e incremento de peso.**

En relación al peso corporal, se observó un efecto del fenotipo durante todo el período experimental, ya que los animales hipertensos tuvieron un peso inferior al de los animales normotensos (Tabla 31). Además en las semanas I y II se observó un efecto significativo de la interacción fenotipo \times dieta, reflejado en el mayor peso de los animales de fenotipo hipertenso que consumieron alfalfa, mientras que en los animales normotensos aquellos que consumieron celulosa como fuente de fibra tuvieron un peso mayor.

Cuando los resultados se expresaron como incremento de peso semanal, se observaron resultados similares. El efecto significativo del fenotipo sobre el incremento de peso estuvo presente durante todas las semanas del período experimental, siendo menor este parámetro en los grupos hipertensos. En la primera semana además, se observó un efecto significativo de la dieta, resultando en un incremento de peso menor en aquellos animales a los que se les administró la dieta formulada con alfalfa. Y en las dos últimas semanas del período experimental, los animales de fenotipo normotenso que consumieron alfalfa tuvieron un incremento de peso mayor que los que consumieron celulosa, sin embargo en los animales de fenotipo hipertenso esta tendencia fue inversa, lo que se vio reflejado en un efecto significativo de la interacción fenotipo \times dieta.

Tabla 31. Efecto del fenotipo y de la dieta sobre los pesos corporales de los cuatro grupos de animales durante todo el período experimental. Los datos se expresan en medias grupales (n=8).

	WKY		SHR		EEM	R ²	Efectos		
	CT	ALF	CT	ALF			Fenotipo	Dieta	Fenotipo × dieta
Peso I	185,06 b	187,04 b	164,43 a	177,89 b	4,9	0,484	p<0,001 (34,1%)	p=0,034 (9,2%)	p=0,108
SEM1	218,50 b	212,23 b	195,33 a	208,23 ab	4,91	0,46	p<0,001 (29,5%)	p=0,348	p=0,010 (14,7%)
SEM2	245,29 c	236,24 bc	213,94 a	226,95 ab	5,845	0,53	p<0,001 (40,6%)	p=0,635	p=0,013 (12,0%)
SEM3	269,69 c	260,16 bc	237,61 a	243,83 ab	6,91	0,495	p<0,001 (44,4%)	p=0,737	p=0,119
SEM4	282,48 b	279,49 b	238,83 a	243,29 a	6,49	0,732	p<0,001 (72,5%)	p=0,873	p=0,429
SEM5	306,21 b	312,16 b	248,95 a	253,10 a	6,961	0,834	p<0,001 (82,8%)	p=0,314	p=0,856

a,b,c Representan diferencias significativas entre grupos experimentales para cada parámetro mediante un análisis de subgrupos homogéneos mediante el test de Tukey (p<0,05). Los valores entre paréntesis representan el % en que cada factor contribuye a la variación total del test de la ANOVA. SEMn: semana del período experimental.

Tabla 32. Efecto del fenotipo y de la dieta sobre el incremento de peso semanal de los animales. Los valores representan medias grupales (n=8).

	WKY		SHR		EEM	R ²	Fenotipo	Efectos	
	CT	ALF	CT	ALF				Dieta	Fenotipo×dieta
Δ PESO 1	4,77 b	3,71 a	3,97 ab	3,79 ab	0,26	0,209	p=0,178	p=0,023 (15,2%)	p=0,101
Δ PESO 2	3,82 b	3,43 ab	2,42 a	2,67 a	0,283	0,299	p<0,001 (34,0%)	p=0,799	p=0,261
Δ PESO 3	3,61 b	3,42 b	2,87 ab	2,41 a	0,194	0,416	0,001 (39,6%)	p=0,110	p=0,503
Δ PESO 4	1,82 b	2,76 c	0,19 a	0,00 a	0,215	0,796	p<0,001 (73,6%)	p=0,135	p=0,009 (5,3%)
Δ PESO 5	3,39 b	4,08 b	2,10 a	1,40 a	0,237	0,721	p<0,001 (65,1%)	p=0,996	p=0,007 (8,0%)

a,b,c Representan diferencias significativas entre grupos experimentales para cada parámetro según un análisis de subgrupos homogéneos mediante el test de Tukey (p<0,05). Los valores entre paréntesis representan el % en que cada factor contribuye a la variación total del test de la ANOVA.

4.4.2.3. Presión arterial.

El efecto del fenotipo y de la dieta sobre los componentes de la presión arterial se presenta en la **Tabla 33**.

El efecto del fenotipo sobre todos los componentes de la presión arterial (presión sistólica, presión diastólica y presión media) fue significativo durante todo el período experimental, ya que ésta fue mayor en los animales hipertensos comparados con los normotensos.

En la cuarta Semana, se observó un efecto significativo de la dieta sobre la PAD y la PAM, disminuyendo sus valores en los animales que consumieron alfalfa con fenotipo hipertenso.

También se observó la influencia significativa que la interacción fenotipo × dieta tuvo en diferentes tiempos del período experimental y sobre los distintos componentes de la PA. En la Semana 2 el efecto se observó sobre la PAS y en las Semanas 2,4 y 5 sobre la PAD y la PAM. Los animales de fenotipo hipertenso que consumieron alfalfa disminuyeron los valores de PAS, PAD y PAM, mientras que los animales normotensos que consumieron alfalfa o bien aumentaron estos valores o los mantuvieron, en comparación con los animales que consumieron celulosa como fuente de fibra.

Cuando los datos se representaron como el área bajo la curva de las presiones arteriales durante todo el período experimental, se observó que el consumo de alfalfa disminuyó significativamente el área bajo de la curva en los animales hipertensos que se alimentaron de alfalfa en comparación con los que se alimentaron de celulosa (**Figura 20**).

Tabla 33. Efecto del fenotipo y de la dieta sobre la presión sistólica, diastólica y media de los cuatro grupos experimentales al inicio del experimento y durante todas las Semanas de duración.

		WKY		SHR		Efectos				
		CT	ALF	CT	ALF	EEM	R ²	Fenotipo	Dieta	Fenotipo× dieta
Presión sistólica	Inicial	101 a	96 a	140 b	140 b	3,494	0,913	p<0,001 (90,7%)	p=0,391	p=0,302
	S 1	104 a	97 a	151 b	146 b	5,392	0,851	p<0,001 (83,7%)	p=0,130	p=0,861
	S 2	108 a	112 a	155 b	146 b	3,703	0,899	p<0,001 (87,7%)	p=0,428	p=0,027 (2,0%)
	S 3	120 a	117 a	155 b	151 b	4,56	0,802	p<0,001 (79,3%)	p=0,289	p=0,911
	S 4	116 a	116 a	166 b	163 b	4,454	0,892	p<0,001 (89,1%)	p=0,631	p=0,688
	S 5	114 a	115 a	163 b	155 b	3,292	0,931	p<0,001 (91,7%)	p=0,440	p=0,319
Presión diastólica	Inicial	79 a	79 a	109 b	109 b	3,7	0,825	p<0,001 (82,4%)	p=0,993	p=0,820
	S 1	81 a	75 a	118 b	114 b	5,257	0,793	p<0,001 (77,8%)	p=0,180	p=0,687
	S 2	82 a	89 a	126 b	118 b	3,471	0,889	p<0,001 (84,9%)	p=0,721	p=0,004 (3,9%)
	S 3	91 a	95 a	127 b	126 b	4,814	0,775	p<0,001 (76,8%)	p=0,639	p=0,446
	S 4	89 a	89 a	144 c	129 b	3,97	0,914	p<0,001 (86,8%)	p=0,014 (2,1%)	p=0,009 (2,4%)
	S 5	83 a	89 a	137 b	133 b	4,092	0,906	p<0,001 (88,9%)	p=0,736	p=0,033 (1,7%)
Presión media	Inicial	86 a	85 a	116 b	119 b	2,335	0,932	p<0,001 (92,7%)	p=0,514	p=216
	S 1	89 a	82 a	129 b	125 b	5,029	0,832	p<0,001 (81,7%)	p=0,136	p=719
	S 2	91 a	97 a	136 b	127 b	3,265	0,907	p<0,001 (87,3%)	p=0,630	p=0,003 (3,4%)
	S 3	101 a	102 a	136 b	134 b	4,472	0,800	p<0,001 (79,8%)	p=0,958	p=0,575
	S 4	98 a	98 a	151 c	138 b	3,31	0,936	p<0,001 (90,2%)	p=0,012 (1,6%)	p=0,009 (1,8%)
	S 5	93 a	97 a	148 c	138 b	3,23	0,914	p<0,001 (91,8%)	p=0,196	p=0,005 (1,9%)

a,b,c Representan diferencias significativas entre grupos experimentales para cada parámetro según un análisis de subgrupos homogéneos mediante el test de Tukey ($p<0,05$). Los valores entre paréntesis representan el % en que cada factor contribuye a la variación total del test de la ANOVA.

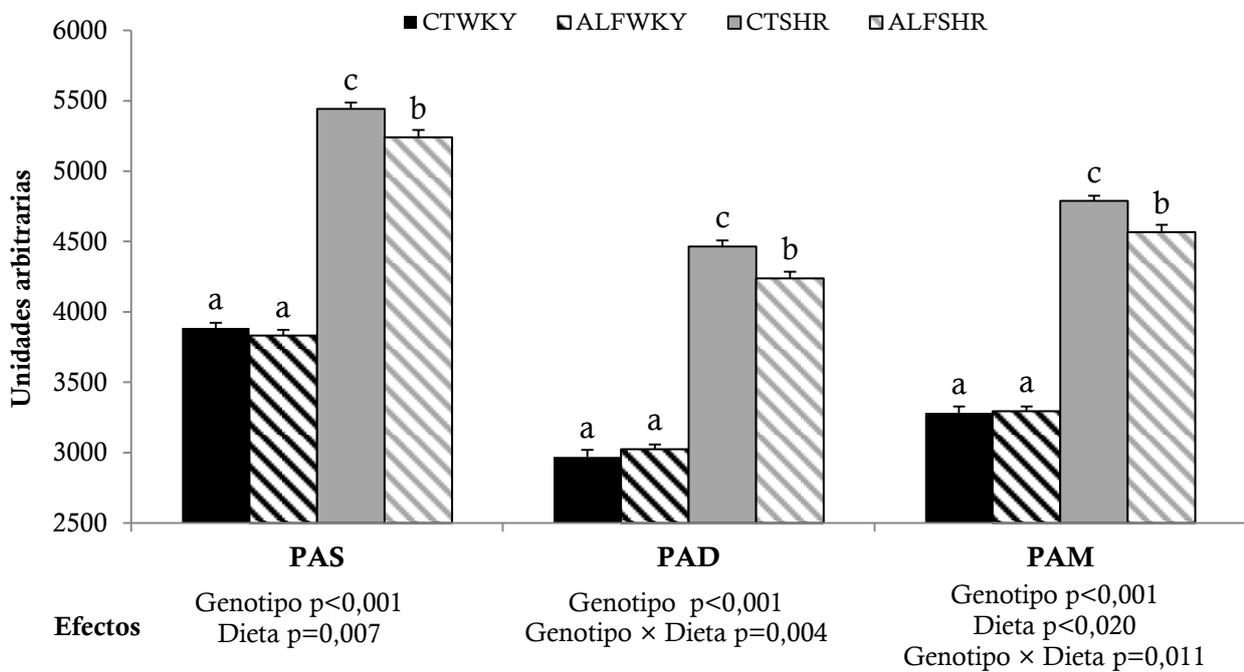


Figura 20. Áreas bajo la curva de la presión arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) y media (PAM) determinada durante las cinco Semanas de duración del período experimental. Las barras representan valores medios grupales ($n=8$) y el error estándar de la media. a,b,c Representan diferencias significativas entre grupos mediante el análisis de subgrupos homogéneos por el test de Tukey ($p < 0,05$).

4.4.2.4. Composición corporal.

El efecto del fenotipo y de la dieta sobre los parámetros de composición corporal se representa en la **Tabla 34**.

Se observó un efecto del fenotipo sobre la masa grasa, de manera que los animales normotensos tuvieron una masa grasa superior a la de los animales hipertensos. El porcentaje de masa magra y contenido en agua total de los animales fue similar en los cuatro grupos experimentales.

Tabla 34. Efecto del fenotipo y de la dieta sobre los parámetros de composición corporal. Los valores de masa magra, masa grasa y agua total son expresados en valores absolutos y en porcentaje en función del peso corporal de los animales; son valores medios grupales (n=8).

	WKY		SHR		EEM	R ²	Efecto		
	CT	ALF	CT	ALF			Fenotipo	Dieta	Fenotipo×dieta
Peso (g)	306,21 b	312,16 b	248,95 a	253,10 a	6,96	0,834	p<0,001 (82,7%)	p=0,314	p=0,856
Masa grasa (g)	37,95 bc	44,77 c	27,79 a	29,42 ab	3,42	0,533	p<0,001 (46,3%)	p=0,092	p=0,293
Masa grasa (%)	12,34 ab	14,29 b	11,19 a	11,61 a	1,03	0,275	p=0,014 (17,9%)	p=0,118	p=0,302
Masa magra (g)	254,96 b	255,81 b	209,17 a	210,46 a	5,95	0,807	p<0,001 (80,7%)	p=0,801	p=0,960
Masa magra (%)	83,32 a	81,99 a	83,98 a	83,32 a	1,79	0,044	p=0,439	p=0,440	p=0,795
Agua total	215,20 b	217,22 b	176,69 a	177,38 a	5,29	0,797	p<0,001 (79,6%)	p=0,720	p=0,861
Agua total (% masa magra)	84,39 a	84,92 a	84,51 a	84,26 a	0,68	0,035	p=0,582	p=0,775	p=0,436

a,b,c Representan diferencias significativas entre grupos experimentales para cada parámetro según un análisis de subgrupos homogéneos mediante el test de Tukey (p<0,05). Los valores entre paréntesis representan el % en que cada factor contribuye a la variación total del test de la ANOVA.

4.4.2.5. Balance hídrico y parámetros bioquímicos urinarios.

El efecto del fenotipo y de la dieta sobre los diferentes parámetros bioquímicos y de balance hídrico determinados se presenta en la **Tabla 35**.

La ingesta de agua, diuresis, sodio y ácido cítrico excretados por orina, así como el aclaramiento de creatinina se vieron significativamente afectados por el fenotipo, ya que estos valores disminuyeron en los animales de fenotipo hipertenso comparado con los animales normotensos. Además el fenotipo también tuvo un efecto significativo sobre la concentración de albúmina, creatinina, ácido úrico y fósforo urinario de modo que estos parámetros aumentaron en los grupos de animales hipertensos comparados con los grupos normotensos (**Tabla 35**).

El sodio excretado en orina se vio significativamente afectado por la dieta, de modo que en el grupo de animales normotensos este parámetro fue superior en los animales que consumieron la alfalfa como fuente de fibra. Además los niveles de ácido cítrico y glucosa excretados por la orina también fueron superiores en los grupos de animales cuya dieta estaba formulada con alfalfa. El ácido úrico y la fosfatúria se vieron afectados por la dieta, siendo inferiores en los animales hipertensos que consumieron alfalfa comparados con los que consumieron celulosa como fuente de fibra (**Tabla 35**).

El efecto de la interacción fenotipo \times dieta fue significativo para los parámetros de pH, sodio, creatinina, ácido úrico, fósforo y ácido cítrico excretados. El pH disminuyó en los animales normotensos que consumieron alfalfa, mientras que en los hipertensos que consumieron alfalfa este valor aumentó. El sodio excretado aumentó en el grupo normotenso que ingirió alfalfa comparado con el que ingirió celulosa, mientras que para los grupos hipertensos estos valores se invirtieron siendo mayor la excreción de sodio en los animales que consumieron celulosa. La creatinina en orina aumento en los animales normotensos que consumieron alfalfa, mientras que en los hipertensos el consumo de esta dieta hizo que la concentración de creatinina disminuyera. El ácido úrico excretado aumentó en los animales que consumieron alfalfa con fenotipo normotenso, mientras que en el grupo hipertenso que consumió esta dieta ete valor disminuyó en comparación con el grupo hipertenso que consumió celulosa. El efecto de la interacción fenotipo \times dieta sobre

la fosfaturia se vio reflejado en la disminución que este parámetro sufrió en el grupo de ratas hipertensas que consumieron alfalfa con respecto a las que consumieron celulosa, no encontrándose diferencias entre los grupos normotensos. Con respecto a la excreción de ácido cítrico, ésta fue mayor en los animales que consumieron alfalfa, y este efecto fue más acusado para aquellos con fenotipo hipertenso (Tabla 35).

Tabla 35. Efecto del fenotipo y de la dieta sobre el balance hídrico y los parámetros bioquímicos urinarios de los cuatro grupos experimentales. Los valores representan medias grupales (n=8).

	WKY		SHR		EEM	R2	Fenotipo	Efectos	
	CT	ALF	CT	ALF				Dieta	Fenotipo × dieta
Volumen (mL/12 H)	3,35 b	3,12 b	0,57 a	0,86 a	0,389	0,751	p<0,001 (74,30%)	p=0,928	p=0,346
pH	6,68 ab	6,57 ab	6,11 a	7,09 b	0,311	0,265	p=0,915	p=0,058	p=0,019 (16,30%)
Ingesta agua (mL)	20,60 b	20,51 b	17,93 ab	16,39 a	1,112	0,424	p<0,001 (38,4%)	p=0,309	p=0,366
Diuresis (mL/24 H)	7,92 b	7,54 b	3,72 a	4,80 a	0,7	0,649	p<0,001 (61,5)%	p=0,482	p=0,149
Balance hídrico	12,37 a	13,43 a	14,48 a	12,72 a	1,105	0,132	p=0,376	p=0,658	p=0,082
Na (mg)	8,11 b	22,10 c	1,42 a	0,45 a	2,382	0,790	p<0,001 (53%)	p=0,001 (11,2%)	p<0,001 (14,8%)
Glucosa (mg/dL)	41,69 a	48,28 a	30,28 a	51,54 a	9,078	0,186	p=0,532	p=0,039 (13,7%)	p=0,264
Albúmina (g/dL)	0,035 a	0,062 a	0,185 b	0,205 b	0,017	0,844	p<0,001 (82,2%)	p=0,061	p=0,752
Creatinina (mg/dL)	86,43 a	102,18 a	316,54 b	272,79 b	16,039	0,911	p<0,001 (89,5%)	p=0,227	p=0,014 (1,9%)
Cl Cr (mL/min)	5,48 b	6,25 b	0,53 a	0,50 a	0,692	0,693	p<0,001 (67,6%)	p=0,601	p=0,569
Ácido úrico (mg/dL)	3,20 a	5,99 ab	17,38 c	1,79 a	1,145	0,879	p<0,001 (14,8%)	p<0,001 (24,3%)	p<0,001 (50,0%)
Fósforo (mg/dL)	6,33 a	2,43 a	592,66 c	268,75 b	52,829	0,857	p<0,001 (66,5%)	p<0,001 (9,8%)	p<0,001 (9,4%)
Ácido cítrico (mg/L)	1402 b	1715 b	561 a	2117 c	98,879	0,827	p=0,035 (3%)	p<0,001 (55,2%)	p<0,001 (24,4%)

a,b,c Representan diferencias significativas entre grupos de animales para cada parámetro mediante un test de subgrupos homogéneos por el test de Tukey (p<0,05). Los valores entre paréntesis representan el % en que cada factor contribuye a la variación total del test de la ANOVA. Cl Cr: aclaramiento renal de creatinina.

4.4.2.6. Test de tolerancia oral a la glucosa.

En la última semana del período experimental los animales se sometieron a un test de tolerancia oral de glucosa. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 21** y el efecto del fenotipo y de la dieta sobre el área bajo de la curva se muestra en la **Tabla 36**.

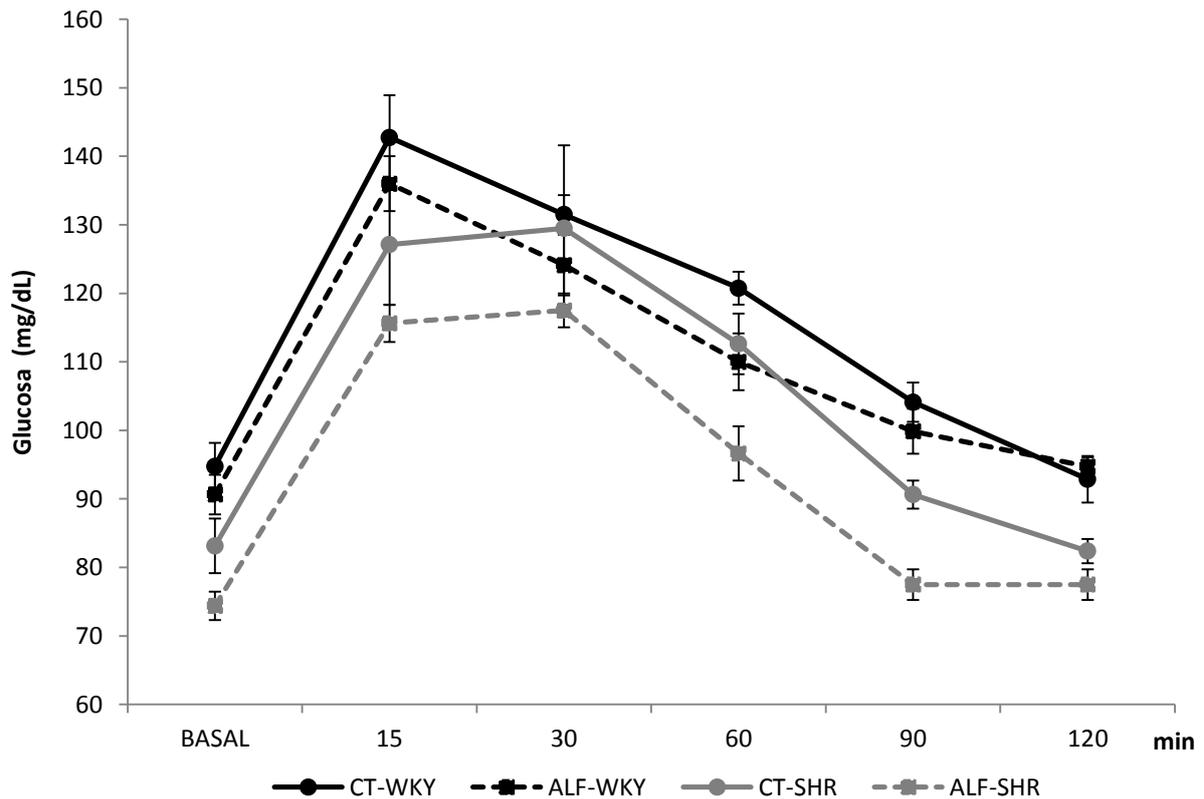


Figura 21. Test de tolerancia oral a una sobrecarga de glucosa. La concentración sanguínea de glucosa fue determinada antes y tras 15, 30, 60, 90 y 120 min de la sobrecarga oral de glucosa.

Tras realizar el test, los resultados fueron finalmente expresados y representados como el área bajo la curva de cada uno de los grupos experimentales (**Tabla 36**). El fenotipo tuvo un efecto significativo sobre este parámetro de manera que en los animales hipertensos este parámetro fue superior. Además, los grupos que se alimentaron de las dietas con alfalfa tuvieron un área bajo la curva menor que los grupos que consumieron celulosa como fuente de fibra, lo que se vio reflejado en el potente y significativo efecto de la dieta.

Tabla 36. Efecto de la dieta y del fenotipo sobre los valores del área bajo la curva de un test de tolerancia oral a la glucosa. Los valores representan medias grupales (n=8).

	WKY		SHR		Efectos				
	CT	ALF	CT	ALF	EEM	R ²	Fenotipo	Dieta	Fenotipo ×dieta
Area bajo la curva (UA)	2958 b	2151 a	3748 c	2515 ab	198,7	0,562	p=0,007 (13,2%)	p<0,001 (41,21%)	p=0,293

a,b,c Representan diferencias significativas entre grupos experimentales para cada parámetro según un análisis de subgrupos homogéneos por el test de Tukey (p<0,05). Los valores entre paréntesis representan el % en que cada factor contribuye a la variación total del test de la ANOVA. UA: unidades arbitrarias.

4.4.2.7. Pesos de los órganos.

La influencia de la dieta y del fenotipo de los animales sobre el peso de los órganos se representa en la **Tabla 37**.

El fenotipo influyó significativamente en el peso del hígado, el bazo, corazón, colon y ciego. El hígado, bazo, corazón y ciego tuvieron un peso mayor en los animales de fenotipo hipertenso comparado con los normotensos; mientras que el peso del colon fue inferior en los animales hipertensos.

La dieta tuvo un efecto significativo sobre el peso del corazón, el colon y el ciego, de forma que en el peso del corazón y del colon, la inclusión de la alfalfa en la dieta provocó una disminución de estos parámetros, mientras que en el ciego la administración de alfalfa dio lugar a un aumento de su peso.

Se observó un efecto significativo de la interacción fenotipo × dieta sobre el peso del hígado, debido a que en los animales de fenotipo normotenso el consumo de la fibra de alfalfa provocó un aumento, mientras que en los grupos de animales hipertensos, el consumo de esta dieta disminuyó el peso de este órgano.

Tabla 37. Efecto del fenotipo y de la dieta sobre el peso de los distintos órganos. Los valores se expresan en g órgano / 100 g de peso como medias grupales (n=8).

	WKY		SHR		EEM	R ²	Efectos		
	CT	ALF	CT	ALF			Fenotipo	Dieta	Fenotipo × dieta
Hígado	2,58 a	2,86 a	3,36 b	2,75 a	0,136	0,563	p=0,002 (18,3%)	p=0,093	p<0,001 (33,2%)
Cerebro	0,64 a	0,62 a	0,68 a	0,70 a	0,048	0,117	p=0,081	p=0,952	p=0,528
Bazo	0,19 a	0,18 a	0,22 b	0,20 ab	0,01	0,349	p=0,001 (29,8%)	p=0,159	p=0,757
Corazón	0,33 b	0,30 a	0,39 c	0,39 c	0,011	0,783	p<0,001 (71,0 %)	p=0,016 (5,0 %)	p=0,102
Riñón	0,34 a	0,33 a	0,33 a	0,32 a	0,009	0,116	p=0,316	p=0,127	p=0,714
Colon	0,30 b	0,26 ab	0,25 a	0,24 a	0,012	0,452	p=0,001 (30,1%)	p=0,018 (12,2%)	p=0,243
Ciego	0,15 a	0,16 ab	0,20 b	0,24 c	0,015	0,607	p<0,001 (49,5%)	p=0,033 (7,1%)	p=0,096

a,b,c Representan diferencias significativas entre grupos experimentales para cada parámetro según un análisis de subgrupos homogéneos or el test de Tukey (p<0,05). Los valores entre paréntesis representan el % en que cada factor contribuye a la variación total del test de la ANOVA

4.4.2.8. Parámetros hemáticos.

El efecto del fenotipo y de la dieta sobre los parámetros hemáticos analizados se representan en la **Tabla 38**.

Los valores de WBC, MCV, plaquetas y RDW se vieron influenciados por el efecto del fenotipo, siendo superiores los valores de estos parámetros en los grupos hipertensos. Sobre el MCHC y MCH el efecto del fenotipo se vio reflejado en una disminución de estos parámetros en los grupos hipertensos en comparación con los grupos normotensos (**Tabla 38**).

Se un observó un efecto significativo de la dieta sobre sobre el MCV que fue menor en los animales que consumieron alfalfa.

Además, también se encontró un efecto significativo de la interacción fenotipo × dieta sobre los parámetros de leucocitos y hematocrito. En los animales de fenotipo normotenso la adición de alfalfa a la dieta provocó una disminución en el número de leucocitos y en el % de hematocrito, mientras que en los animales de fenotipo hipertenso tanto los leucocitos como el % de hematocrito se vieron aumentados al consumir la misma dieta (**Tabla 38**).

Tabla 38. Efecto del fenotipo y de la dieta sobre los parámetros hemáticos. Los datos representan valores medios grupales (n=8).

	WKY		SHR		EEM	R ²	Efectos		
	CT	ALF	CT	ALF			Fenotipo	Dieta	Fenotipo*dieta
WBC (×10 ³ /μl)	3,76 b	2,69 a	3,98 bc	4,84 c	0,342	0,590	p<0,001 (35,1%)	p=0,670	p<0,001 (23,6)
RBC (×10 ⁶ /μl)	10,94 a	9,80 a	10,63 a	10,58 a	0,461	0,192	p=0,482	p=0,079	p=0,103
HGB (g/dL)	17,90 a	16,75 a	16,43 a	16,68 a	0,804	0,125	p=0,183	p=0,435	p=0,228
HCT (%)	54,70 a	50,47 a	53,76 a	55,55 a	1,902	0,227	p=0,135	p=0,374	p=0,033 (13,9%)
MCV (fL)	51,09 ab	50,51 a	51,61 b	51,46 b	0,22	0,514	p<0,001 (38,8%)	p=0,028 (9,4%)	p=0,184
MCH (pg)	16,73 b	17,09 b	15,44 a	15,75 a	0,29	0,609	p<0,001 (57,1%)	p=0,111	p=0,904
MCHC (g/dL)	32,75 b	33,86 b	29,95 a	30,60 a	0,616	0,654	p<0,001 (59,9%)	p=0,053	p=0,600
PLT	306,63 a	428,50 ab	470,13 ab	561,00 b	84,794	0,249	p=0,020 (16,3%)	p=0,087	p=0,798
RDW	28,26 a	28,49 ab	28,60 ab	28,75 b	0,171	0,235	p=0,020 (16,7%)	p=0,133	p=0,759

a,b,c Representan diferencias significativas entre grupos experimentales para cada parámetro según un análisis de subgrupos homogéneos or el test de Tukey (p<0,05). Los valores entre paréntesis representan el % en que cada factor contribuye a la variación total del test de la ANOVA.

4.4.2.9. Parámetros plasmáticos.

Se determinaron parámetros relacionados con el metabolismo lipídico y glucídico, así como marcadores de funcionalidad renal y enzimas plasmáticas relacionadas con daño hepático y cardíaco.

El efecto del fenotipo y de la dieta sobre los parámetros bioquímicos plasmáticos se presenta en la **Tabla 39**.

En cuanto a los parámetros relacionados con el *metabolismo lipídico y glucídico*, se observó un significativo efecto del fenotipo sobre la concentración de fosfolípidos, colesterol total, c-HDL, c-LDL, glucosa y P siendo estos parámetros menores en los grupos de animales de fenotipo hipertenso. La bilirrubina directa también se vio influenciada por el fenotipo, siendo su concentración superior en los animales hipertensos.

El fenotipo influyó sobre todos los *marcadores renales* determinados; creatinina, albúmina, urea, ácido úrico y sobre las *enzimas plasmáticas* AST, ALT, γ -GT y CK-MB, siendo superiores sus valores en los animales hipertensos comparados con los normotensos.

El efecto significativo de la dieta fosfolípidos, triglicéridos, colesterol, glucosa plasmática y bilirrubina total resultó en una disminución de estos parámetros en los animales que consumieron las dietas con alfalfa, en comparación a los grupos que consumieron las dietas con celulosa, mientras que el P aumentó en los animales que se alimentaron con la dieta de alfalfa.

Con respecto a los marcadores renales, la urea fue el parámetro sobre el que la dieta ejerció un efecto significativo aumentando en los animales que consumieron alfalfa con fenotipo hipertenso.

El efecto significativo de la dieta también se observó sobre las enzimas plasmáticas marcadoras de daño hepático, ALT y AST, que aumentaron en los grupos experimentales a los que se les administró alfalfa, al contrario de lo que ocurrió con la enzima fosfatasa alcalina y Ck-MB donde la inclusión de alfalfa en la dieta provocó una disminución de este parámetro en los grupos hipertensos.

La interacción fenotipo \times dieta influyó significativamente sobre la concentración plasmática de triglicéridos, colesterol y c-HDL que aumentaron en los animales normotensos que consumieron alfalfa, mientras que disminuyeron en los animales hipertensos que consumieron la misma dieta, comparados con los animales que se alimentaron con las dietas formuladas con celulosa. Esta interacción también influyó significativamente sobre los niveles de glucosa plasmática de manera que se produjo una disminución en los animales a los que se les administró alfalfa, siendo este efecto mucho más acusado en los animales hipertensos.

El efecto significativo de la interacción fenotipo \times dieta se vio reflejado en marcadores renales como el ácido úrico, que aumentó en los animales normotensos que recibieron alfalfa, mientras que el consumo de esta planta por parte de los animales hipertensos provocó una disminución. La urea y creatinina plasmáticas en los animales de fenotipo normotenso a los que se les administró la dieta formulada con alfalfa se vieron disminuidas, de forma inversa a lo que ocurrió cuando se suministró la misma dieta a los animales hipertensos ya que aumentaron estos parámetros. Con respecto a las enzimas transaminasas ALT y AST, el efecto de la interacción se observó en un aumento de sus concentraciones en los animales a los que se les adicionó la dieta con alfalfa, siendo más acusado este efecto en el fenotipo hipertenso. Para el marcador cardíaco Ck-MB y la enzima fosfatasa alcalina la inclusión de alfalfa provocó una disminución en este parámetro, siendo más potente este efecto en los animales hipertensos.

Tabla 39. Efecto del fenotipo y de la dieta sobre los distintos parámetros plasmáticos determinados. Los datos representan valores medios grupales (n=8).

	WKY		SHR		EEM	R ²	Efectos		
	CT	ALF	CT	ALF			Fenotipo	Dieta	Fenotipo × dieta
Fosfolípidos (mg/dL)	132,35 c	125,80 c	106,56 b	87,18 a	4,976	0,782	p<0,001 (65%)	p=0,001 (10,5%)	p=0,079
Triglicéridos (mg/dL)	52,20 b	57,20 bc	73,58 c	30,97 a	7,174	0,562	p=0,636	p=0,001 (21,5%)	p<0,001 (34,4%)
Colesterol (mg/dL)	72,71 c	73,68 c	58,46 b	48,64 a	3,033	0,771	p<0,001 (68.5 %)	p=0,049 (3,5%)	p=0,018 (5,2%)
HDL (mg/dL)	27,97 c	30,50 c	17,55 b	12,99 a	1,524	0,865	p<0,001 (80,9%)	p=0,355	p=0,003 (5,2%)
LDL (mg/dL)	34,30 b	31,74 b	7,95 a	6,33 a	1,644	0,947	p<0,001 (94%)	p=0,083	p=0,692
Glucosa (mg/dL)	297,23 b	287,30 b	300,30 b	116,73 a	12,220	0,920	p<0,001 (27%)	p<0,001 (36%)	p<0,001 (29%)
Fósforo (mg/dL)	6,01 ab	6,86 c	5,24 a	6,41 bc	0,307	0,516	p=0,009 (13,6%)	p<0,001 (37,1%)	p=0,458
Ácido úrico (mg/dL)	0,51 a	0,68 ab	0,82 b	0,67 ab	0,072	0,393	p=0,008 (18%)	p=0,810	p=0,004 (21,1%)
Urea (mg/dL)	18,12 a	17,85 a	19,46 a	37,94 b	1,201	0,934	p<0,001 (37,5%)	p<0,001 (27,1%)	p<0,001 (28,8%)
Creatinina (mg/dL)	0,09 a	0,07 a	0,50 b	0,64 c	0,050	0,876	p<0,001 (83,9%)	p=0,104	p=0,025 (2,5%)
Albúmina (g/dL)	3,10 a	3,12 a	4,12 b	4,20 b	0,038	0,982	p<0,001 (97,9%)	p=0,067	p=0,339
Bilirrubina total (mg/dL)	0,14 b	0,08 a	0,15 b	0,08 a	0,017	0,467	p=0,822	p<0,001 (50,8%)	p=0,463
AST-GOT (U/L)	44,82 a	48,61 a	82,65 b	122,37 c	7,219	0,843	p<0,001 (67,1%)	p<0,001 (10,2%)	p=0,001 (7,0%)
ALT-GPT (U/L)	12,26 a	15,68 a	22,61 b	38,46 c	2,369	0,838	p<0,001 (56,6%)	p<0,001 (19,0%)	p=0,001 (8,0%)
Fosfatasa Alcalina (U/L)	188,19 a	184,50 a	216,73 b	166,46 a	9,335	0,515	p=0,433	p<0,001 (28,9%)	P=0,001 (21,5%)
Gamma GT (U/L)	0,47 a	0,55 a	1,70 b	1,25 a	0,203	0,469	P<0,001 (42,3%)	p=0,371	p=0,218
CK-MB (U/L)	187,08 a	176,42 a	256,79 c	210,93 b	7,365	0,834	p<0,001 (59%)	p<0,001 (17,4%)	p=0,002 (6,8%)

a,b,c Representan diferencias significativas entre grupos experimentales para cada parámetro según un análisis de subgrupos homogéneos por el test de Tukey (p<0,05). Los valores entre paréntesis representan el % en que cada factor contribuye a la variación total del test de la ANOVA.

4.4.2.10. Actividades enzimáticas antioxidantes y peroxidación lipídica.

El efecto del fenotipo y de la dieta sobre las distintas actividades enzimáticas antioxidantes y el marcador de peroxidación lipídica (TBARs) son presentados en la **Tabla 40**.

Riñón. En las determinaciones llevadas a cabo en el riñón, se observó un efecto significativo del fenotipo sobre la actividad de la enzima SOD-Mn y la actividad de la enzima GPx que fueron inferiores en los animales hipertensos. Además en la actividad enzimática GPx, se encontró un efecto significativo de la dieta, ya que este parámetro fue superior en los animales hipertensos que consumieron alfalfa comparado con los que consumieron celulosa. Por último el efecto significativo de la interacción fenotipo \times dieta se vio reflejado en el aumento de las actividades enzimáticas SOD-Mn, SOD-Cu/Zn y CAT que provocó la adición de alfalfa en las dietas en los animales de fenotipo normotenso, mientras que en los animales hipertensos que consumieron la misma dieta estos parámetros se vieron disminuidos. En la actividad GPx, el efecto de la interacción se observó por un aumento más acusado de esta actividad en los animales hipertensos alimentados con alfalfa en comparación con el normotenso que consumió la misma dieta (**Tabla 40**).

Hígado. Las actividades enzimáticas SOD-Mn, SOD-Cu/Zn y CAT se vieron disminuidas en los animales hipertensos, mientras que la concentración de TBARs aumentó en estos animales, resultando en un efecto significativo del fenotipo sobre estos parámetros. El efecto significativo de la dieta estuvo presente en las actividades SOD-Mn, la actividad GPx y la concentración de TBARs, en los dos primeros casos la adición de alfalfa a la dieta provocó un aumento de sus actividades; mientras que los TBARs disminuyeron cuando los animales se alimentaron con alfalfa y eran de fenotipo hipertenso. El efecto significativo de la interacción fenotipo \times dieta se encontró sobre las actividades enzimáticas SOD-Mn, SOD-Cu/Zn, GPx y la concentración de TBARs. Para la actividad SOD-Mn este efecto se vio reflejado en el aumento más acusado de este parámetro por el consumo de alfalfa en el grupo de animales normotensos en comparación con el grupo hipertenso. En el caso de la enzima SOD-Cu/Zn, este efecto resultó en la disminución de la actividad enzimática en el grupo de animales normotenso que

consumió alfalfa, mientras que en el grupo hipertenso que consumió esta leguminosa se produjo un aumento de la actividad enzimática. Mientras, que para la actividad GPx, el efecto de la interacción fenotipo \times dieta se observó por el aumento más marcado que propició el consumo de alfalfa en los animales hipertensos comparados con los normotensos. Y por último, la inclusión de la alfalfa en la dieta provocó una disminución en la formación de TBARs en el hígado, esta disminución sólo ocurrió en los animales hipertensos resultando en un efecto significativo de la interacción fenotipo \times dieta.

Tabla 40. Efecto del fenotipo y de la dieta sobre las actividades enzimáticas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) dependiente de manganeso y dependiente de Cu/Zn, catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y especies reactivas del ácido tiobartibúrico (TBARs) en riñón e hígado.

		WKY		SHR		Efecto				
		CT	ALF	CT	ALF	EEM	R2	Fenotipo	Dieta	Fenotipo × dieta
RIÑÓN	SOD-Mn (UAA/ mg proteína)	87,05 b	93,24 b	65,87 a	61,38 a	2,718	0,899	p<0,001 (85,9%)	p=0,666	p=0,011 (3,5%)
	SOD-Cu/Zn (UAA/ mg proteína)	137,27 ab	145,99 ab	151,26 b	133,75 a	6,099	0,296	p=0,842	p=0,322	p=0,006 (29,2%)
	CAT ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ proteína)	222,55 a	239,28 ab	260,56 b	210,05 a	13,568	0,376	p=0,654	p=0,094	p=0,002 (34,3%)
	GPx (nmol NADPH/min/mg proteína)	44,26 c	44,65 c	13,27 a	23,75 b	2,265	0,926	p<0,001 (86,8%)	p=0,003 (3,8%)	p=0,005 (3,3%)
	TBARs (nmol MDA/mg proteína)	12,61 a	9,94 a	11,07 a	10,78 a	1,087	0,267	p=0,653	p=0,070	p=0,138
HÍGADO	SOD-Mn (UAA/ mg proteína)	84,83 b	105,90 c	30,52 a	34,66 a	3,158	0,967	p<0,001 (91,1%)	p<0,001 (3,8%)	p=0,001 (1,7%)
	SOD-Cu/Zn (UAA/ mg proteína)	331,62 b	314,51 b	143,45 a	149,83 a	7,948	0,973	p<0,001 (96,7%)	p=0,348	p=0,046 (0,4%)
	CAT ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ proteína)	467,48 b	440,37 ab	439,46 ab	412,19 a	19,075	0,231	p=0,046 (11,9%)	p=0,054	p=0,995
	GPx (nmol NADPH/min/mg proteína)	9,91 b	11,37 b	5,54 a	16,39 c	1,290	0,72	p=0,723	p<0,001 (45,5%)	p<0,001 (26,4%)
	TBARs (nmol MDA/mg proteína)	10,43 a	10,96 a	38,49 c	24,82 b	2,325	0,876	p<0,001 (72,2%)	p<0,001 (7,1%)	p<0,001 (8,2%)

a,b,c Representan diferencias significativas entre grupos experimentales para cada parámetro según un análisis de subgrupos homogéneos mediante el test de Tukey ($p<0,05$). Los valores entre paréntesis representan el % en que cada factor contribuye a la variación total del test de la ANOVA. UAA: unidades de actividad antioxidante.

4.4.2.11. Expresión génica.

Expresión génica en colon:

- *Proglucagon (gcg)*.

El efecto del fenotipo y de la dieta sobre la expresión génica de *gcg* se presenta en la **Figura 22**; se observó un efecto significativo del fenotipo sobre la expresión génica de *gcg* ya que en los grupos hipertensos a expresión de este gen fue inferior. Además se observó un efecto significativo de la interacción fenotipo × dieta, puesto que en los animales de fenotipo hipertenso, cuando se les administró alfalfa como fuente de fibra esta expresión aumentó en comparación al grupo de animales hipertenso que consumió celulosa como fuente de fibra; mientras que este efecto no fue observado en los grupos de animales normotensos.

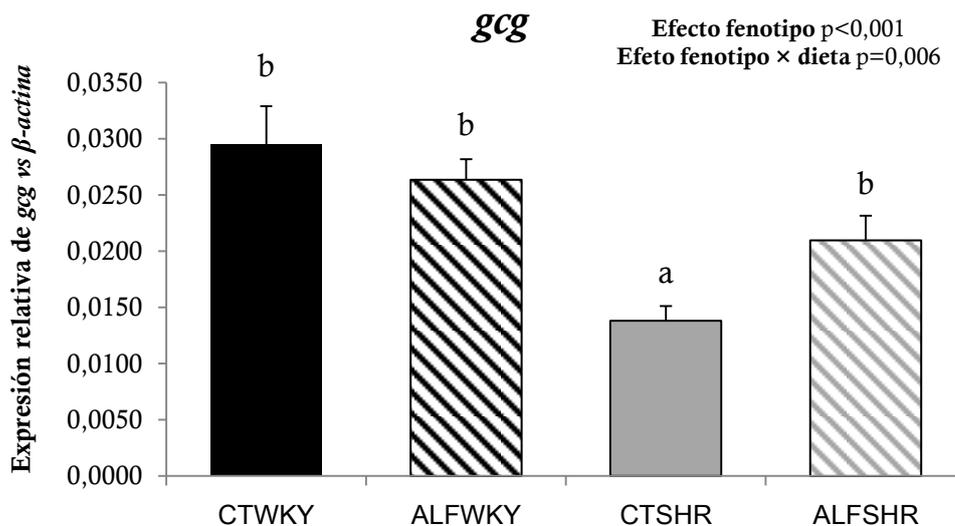


Figura 22. Expresión relativa de *gcg* en muestras de colon. Los datos representan la media geométrica (geomean) + EEM de los valores de $2^{\Delta Ct}$ (n=8). a,b Representan diferencias significativas entre grupos mediante un análisis de subgrupos homogéneos por el test de Tukey sobre los datos ΔCt (p<0,05).

- *Neurotensina (nts)*

El efecto del fenotipo y de la dieta sobre la expresión génica de *nts* se representa en la **Figura 23**; la administración de alfalfa produjo una disminución de la expresión de *nts* lo que se refleja en el efecto significativo de la dieta. También se observó un efecto significativo de la interacción fenotipo × dieta ya que la disminución de la expresión de *nts* fue más acusada en el grupo de animales normotensos que consumió alfalfa comparado con el grupo de animales hipertensos que consumió la misma dieta.

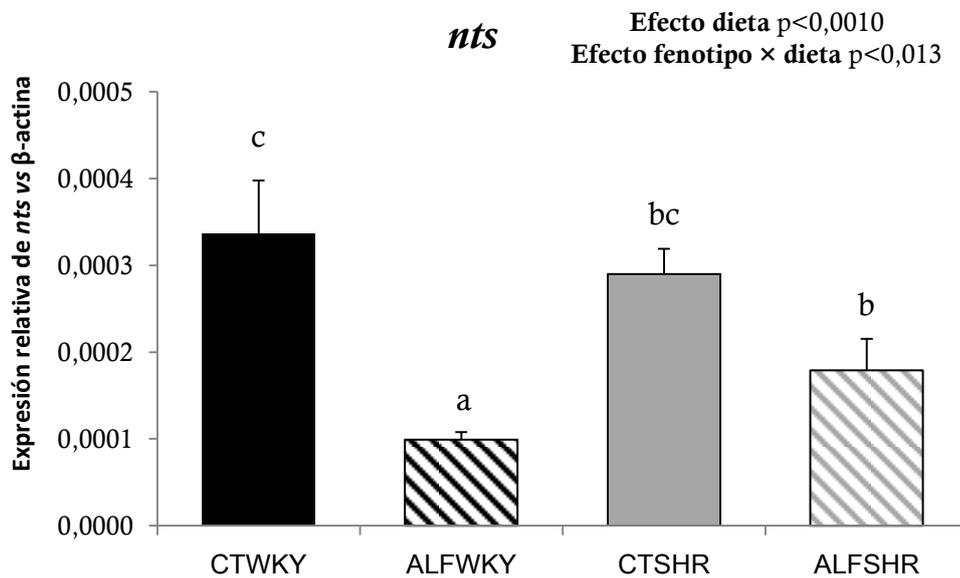


Figura 23. Expresión relativa de *nts* en muestras de colon. Los datos representan la media geométrica (geomean) + EEM de los valores de $2^{\Delta Ct}$ ($n=8$). a,b Representan diferencias significativas entre grupos mediante un análisis de subgrupos homogéneos por el test de Tukey sobre los datos ΔCt ($p < 0,05$).

- **Péptido Y (*pyy*).**

El efecto del fenotipo y de la dieta sobre la expresión de *pyy* se representa en la **Figura 24**. El fenotipo tuvo un efecto significativo sobre la expresión de *pyy*, de forma que los animales hipertensos disminuyeron su expresión en comparación con los grupos de animales normotensos. Además se observó un efecto significativo de la interacción fenotipo × dieta ya se produjo una disminución de la expresión en los animales que consumieron alfalfa frente a los que consumieron celulosa como fuente de fibra, siendo esta disminución más acusada en los animales normotensos en comparación a los hipertensos.

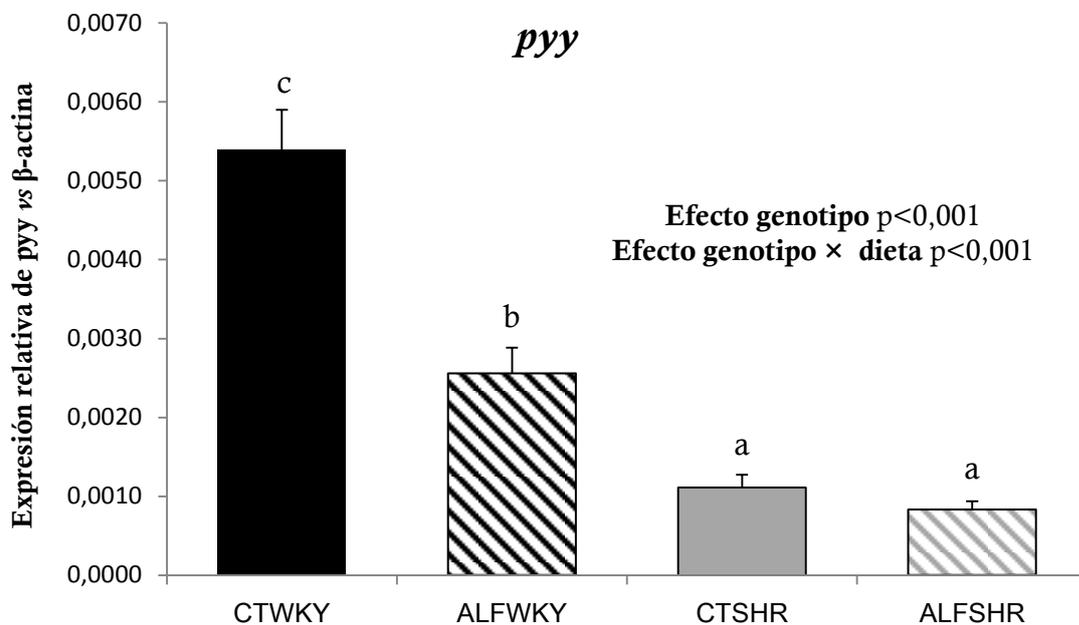


Figura 24. Expresión relativa de *pyy* en muestras de colon. Los datos representan la media geométrica (geomean) + EEM de los valores de $2^{\Delta Ct}$ (n=8). a,b Representan diferencias significativas entre grupos mediante un análisis de subgrupos homogéneos por el test de Tukey sobre los datos ΔCt ($p < 0,05$).

Expresión génica en riñón:

- **Receptor del péptido similar al glucagón 1 (*glp1-r*).**

El efecto del fenotipo y de la dieta sobre la expresión génica de *glp1-r* se representa en la **Figura 25**. Se observó un efecto significativo del fenotipo ya que los animales hipertensos mostraron una expresión menor comparada con los animales normotensos.

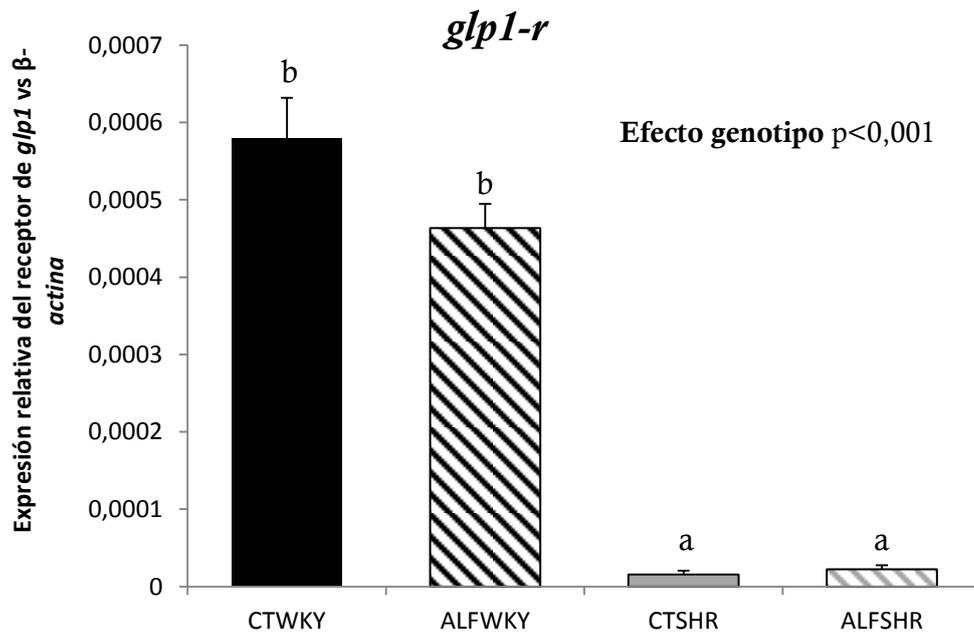


Figura 25. Expresión relativa del receptor del péptido similar al glucagón 1 (*glp-1*) en muestras de corazón. Los datos representan la media geométrica (geomean) + EEM de los valores de $2^{\Delta Ct}$ (n=8). a,b Representan diferencias significativas entre grupos mediante un análisis de subgrupos homogéneos por el test de Tukey sobre los datos ΔCt (p<0,05).

Expresión génica en corazón:

- **Receptor del glucagón similar al péptido 1 (*glp1-r*) en corazón.**

El efecto del fenotipo y de la dieta sobre la expresión génica del receptor del péptido similar al glucagón se representa en la **Figura 26**. Se encontró un efecto significativo del fenotipo sobre la expresión de *glp1-r*, esto se vio reflejado en los menores valores observados en los animales de fenotipo hipertenso.

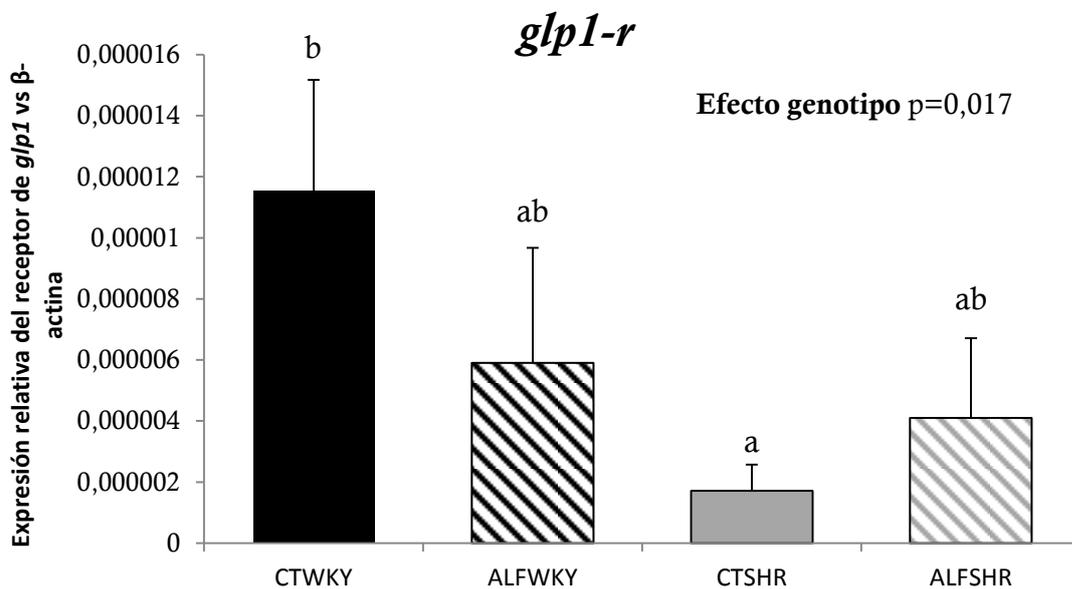


Figura 26. Expresión relativa del receptor del péptido similar al glucagón 1 (*glp-1*) en muestras de corazón. Los datos representan la media geométrica (geomean) + EEM de los valores de $2^{\Delta Ct}$ (n=8). a,b Representan diferencias significativas entre grupos mediante un análisis de subgrupos homogéneos por el test de Tukey sobre los datos ΔCt ($p < 0,05$).

5. DISCUSIÓN

5.1. Fase 1.

El objetivo de esta fase fue estudiar como se podría potenciar el crecimiento y el valor nutricional, de la leguminosa *M. sativa*, bajo condiciones de salinidad co-inoculándola con su rizobio específico *E. meliloti* presente de forma natural en los suelos y una bacteria halófila moderada, *H. maura*.

En primer lugar comprobamos mediante ensayos de resistencia a la salinidad que *E. meliloti* es capaz de crecer hasta una concentración salina de 300 mM de NaCl, y que *M. sativa* puede mantener una productividad aceptable hasta 75 mM cuando es inoculada con *E. meliloti* cepa 1021, (Domínguez-Ferreras et al., 2009); por tanto este modelo simbiótico fue seleccionado para intentar revertir los efectos deletéreos que el estrés salino promueve sobre esta simbiosis, y específicamente sobre la planta. Además, se incluyó un tercer componente, *H. maura*; una bacteria halófila moderada, que presenta ciertas características que ofrecen un gran interés para su uso en agronomía ya que produce grandes cantidades de un exopolisacárido, el maurano, y es capaz de fijar nitrógeno en condiciones microaeróbicas. Por todo esto, el primer objetivo que se planteó fue investigar si la inoculación de *M. sativa* con *E. meliloti* 1021 y *H. maura* S-30 podría potenciar el crecimiento de la planta bajo condiciones de salinidad típicas de suelos Solonchak presentes en el Sureste de España, en concreto en el Norte de la provincia de Granada; y si además esta co-inoculación conjuntamente con la composición específica de estos suelos, podría mejorar tanto la propiedades nutricionales como funcionales de las plantas de alfalfa.

En un primer estadio, se desarrollaron una serie de experimentos en invernadero, donde las plantas crecieron sobre un cultivo hidropónico regando las plantas con una solución nutritiva adicionada con las sales típicas que se hallan en los suelos Solonchak, a dos concentraciones salinas de 50 mM y 100 mM, e inoculando las plantas con *E. meliloti* o co-inoculándolas con *E. meliloti* y *H. maura*.

Como cabía esperar, el estrés salino provocó una disminución del crecimiento de las plantas, del contenido en nitrógeno, del potencial hídrico y del contenido en Lb;

la co-inoculación de *M. Sativa*, mejoró estos parámetros en comparación con las plantas inoculadas solo con *E. meliloti* (Figura 27 y Figura 28).

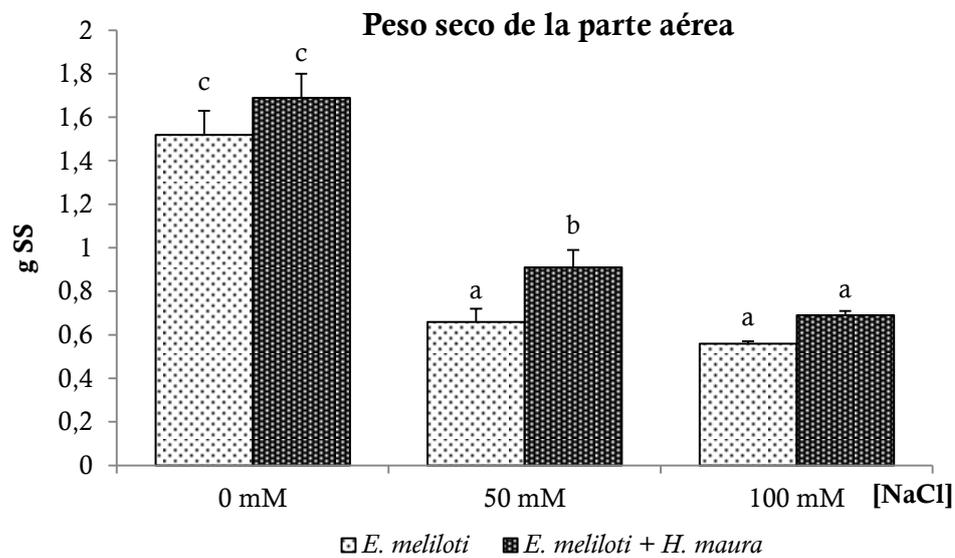


Figura 27. Peso seco de la parte aérea de las plantas de alfalfa cultivada a distintas concentraciones de sales e inoculada con *E. meliloti* o *E. meliloti* y *H. maura*. a, b Representan diferencias significativas entre grupos experimentales para cada variable según un análisis de subgrupos homogéneos utilizando el test de Duncan ($p < 0,05$). SS: sustancia seca.

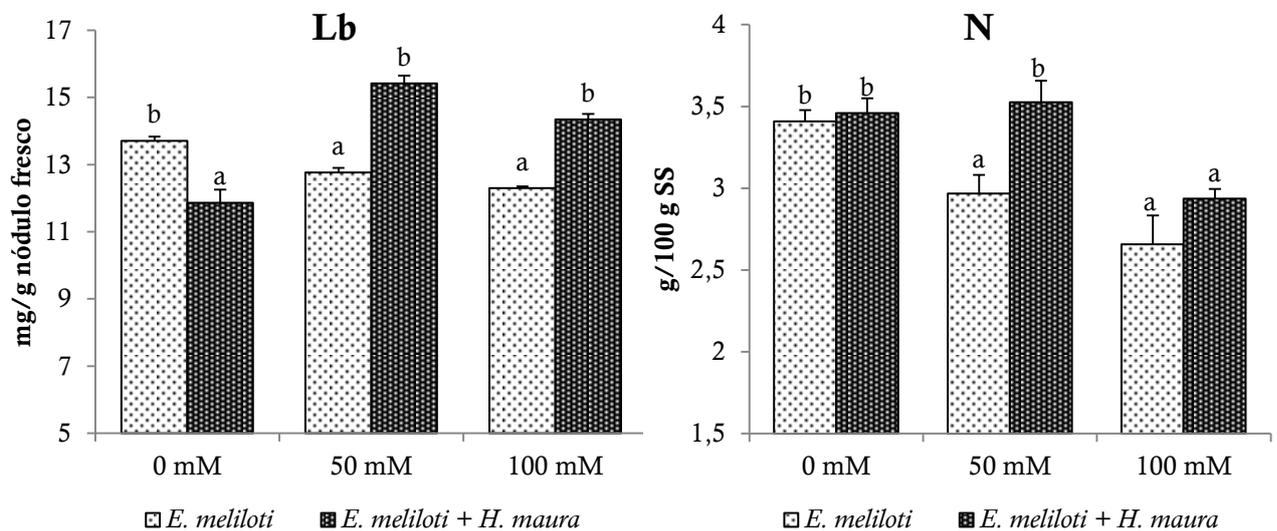


Figura 28. Concentración de Lb (leghemoglobina) de los nódulos de alfalfa y contenido en nitrógeno de la parte aérea de las plantas de alfalfa cultivada a distintas concentraciones de sales y con dos inoculantes distintos. a, b Representan diferencias significativas entre grupos de plantas ($n=6$) según un análisis de subgrupos homogéneos utilizando el test de Duncan ($p < 0,05$). SS: sustancia seca.

Además, aunque el contenido mineral en la parte aérea de las plantas de alfalfa incrementó concomitantemente al aumento de la concentración de sales de la solución de riego, el efecto positivo de la co-inoculación se vió reflejado en el aumento de minerales totales y en el mayor aumento de algunos de estos minerales, Ca y Mg (

Figura 29).

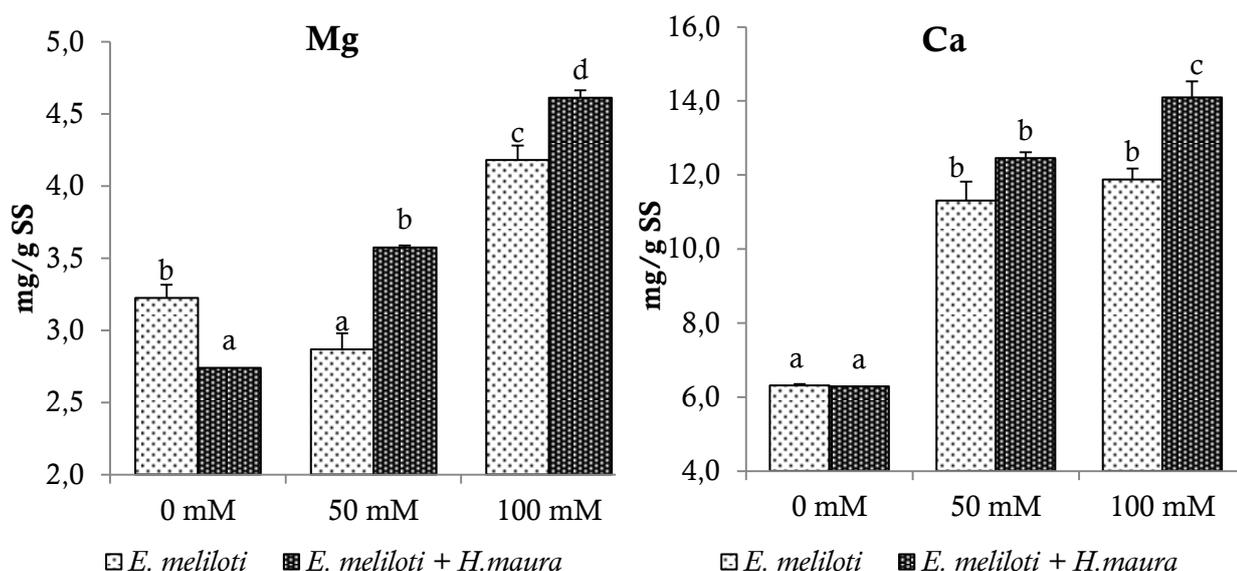


Figura 29. Concentración de Mg y Ca en la parte aérea de las plantas de alfalfa cultivada a distintas concentraciones salinas e inoculadas con dos inoculantes distintos. a, b Representan diferencias significativas entre grupos de plantas (n=6) según un análisis de subgrupos homogéneos utilizando el test de Duncan ($p < 0,05$). SS: sustancia seca.

Tras la recogida de estas plantas se procedió a la realización de experimentos de biodisponibilidad mineral *in vitro*, para valorar en una primera aproximación, su nivel de absorción. En general se observó que el aumento de la salinidad de la solución de riego provocó una disminución de la biodisponibilidad de los minerales.

Después de la obtención de estos resultados, y teniendo en cuenta que a la concentración salina 100 mM se obtuvo el mayor contenido mineral de Ca y Mg, un nivel proteico elevado (aproximadamente del 19%), y que además las plantas mantuvieron una productividad rentable y unos parámetros fisiológicos de

potencial hídrico y Lb mejorados con la co-inoculación, se eligió esta concentración salina para cultivar alfalfa, obtener suficiente biomasa e incluyéndola en dietas Semisintéticas como fuente de proteína y calcio. Este cultivo se realizó bajo condiciones de invernadero y se preparó alfalfa inoculada con *E. meliloti* y alfalfa inoculada con *E. meliloti* y *H. maura*; obteniendo resultados similares al experimento anterior y corroborándolos por tanto. A partir de estos experimentos, se prepararon dos tipos de dieta, E100 (fuente de proteína y minerales proveniente de la alfalfa inoculada con *E. meliloti* cultivada a 100 mM) y EH100 (fuente de proteína y minerales proveniente de la alfalfa inoculada con *E. meliloti* y *H. maura* a 100 mM); más adelante se discutirán los resultados de estos experimentos *in vivo* ensayando la leguminosa en un modelo experimental de rata Wistar en crecimiento.

El siguiente paso después de la realización de los experimentos en invernadero, era trasladar estos experimentos a campo, en un suelo Solonchak. Se investigó la zona Norte de Granada donde se encuentran este tipo de suelos y tras la elección de una finca y realizar una toma de muestras y análisis de sus propiedades edafológicas se corroboró su clasificación como Solonchak órtico (IUSS Working Group WRB, 2007) y Xeric Calcigypsid (Soil Survey Staff, 2010). Posteriormente se procedió a la elección de la zona de cultivo dentro del polígono, comprobando que la inclinación del terreno en todas las parcelas de cultivo era nula. Tras este proceso, se delimitaron cinco bloques que se dividieron en 4 parcelas cada uno, donde se aplicó un tratamiento aleatorizado para llevar a cabo la siembra de las Semillas de alfalfa que correspondían a los cuatro tratamientos bacterianos utilizados: CT, H, E y EH. Se verificó que todas las parcelas de cultivo donde se iban a aplicar los distintos tratamientos bacterianos, eran homogéneas en relación a sus propiedades edafológicas (**Tabla 17**).

Los resultados en los experimentos en campo demostraron de nuevo, que la alfalfa que fue co-inoculada con *E. meliloti* y *H. maura* aumentó su producción en comparación al resto de tratamientos, incluyendo a las plantas inoculadas solo con *E. meliloti* (**Figura 18**). Aunque con estos experimentos no podemos dilucidar cuál sería el mecanismo, el efecto de la mejora del crecimiento de las plantas tanto en condiciones de invernadero como en las condiciones de campo, pueden ser atribuidas a la producción de maurano y/o a la movilización de los nutrientes

desde el suelo hacia la planta. El maurano está compuesto por ácido glucurónico, manosa, galactosa y glucosa (Arias et al., 2003) y todos ellos o sus productos metabólicos podrían actuar como nutrientes de la planta. En los experimentos en campo, la más alta productividad alcanzada con el tratamiento EH comparada con el tratamiento E, donde las plantas de alfalfa pueden disponer de otras fuentes de nitrógeno, además de su rizobio, sugiere que la presencia de *H. maura* tuvo la mayor influencia sobre el desarrollo de la planta, o bien mejorando las condiciones de la rizosfera a través de la excreción de maurano o debido al efecto cooperativo entre ambas bacterias.

En las condiciones experimentales de invernadero el mayor contenido de N en las plantas co-inoculadas, fue debido principalmente a que estas plantas tuvieron un contenido en Lb superior, lo que sugiere que la funcionalidad de los nódulos fue más alta en estas plantas y por tanto dio lugar a una mayor fijación y asimilación de nitrógeno. Además, como ya se conoce, *H. maura* es capaz de fijar N₂ (Argandoña et al., 2005) y podría haber incrementado la biodisponibilidad de N para las plantas en la rizosfera. Aunque en los experimentos en campo, no se observaron diferencias entre tratamientos en cuanto al contenido en N, sí se observó un aumento de la productividad en el tratamiento EH, y ya que la materia seca se correlaciona fuertemente con la fijación de nitrógeno, la biomasa de la planta puede ser usada como un criterio de efectividad de la simbiosis del rizobio (Moawad et al., 1998; Zahran, 2009) por lo que este aumento de producción es el reflejo de una mayor efectividad simbiótica. Un incremento de la productividad, similar a nuestros resultados ha sido estudiado en otras leguminosas, Sivaramaiah et al., (2007) observaron un incremento en la efectividad de la simbiosis en plantas de garbanzo cuando se co-inocularon con cepas distintas del género *Bacillus*. Hungria et al., (2013) encontraron una mejora en el crecimiento de las plantas de soja y de judía cuando se co-inocularon con *Rhizobia* y *Azospirilla*. Además, ha sido descrito por Ahmad et al., (2011) que la co-inoculación de las plantas de *Vigna radiata*, soja verde, por varios rizobios fue más efectiva que cuando estas eran inoculadas con una sola bacteria, mejorando la nodulación y el crecimiento de las plantas reduciendo así el efecto inhibitorio de la salinidad.

Mientras que en los experimentos que se llevaron a cabo en el invernadero, la alfalfa inoculada con *H. maura* no creció muriendo en las primeras Semanas del experimento, las plantas en campo tratadas con el mismo inoculante crecieron sin problemas. Este resultado en invernadero se debió a la carencia de N en las soluciones de riego, así como a la falta de nodulación en las raíces de las plantas. Sin embargo en campo, las plantas tratadas con *H. maura* mostraron nodulación, posiblemente debido a la infección por rizobios nativos del suelo; y además la productividad de estas plantas fue mayor que la conseguida por el inoculante E solo, lo que indica que *H. maura* favoreció la asimilación del nitrógeno proporcionado o bien desde el suelo o desde la fijación simbiótica por los rizobios nativos.

Ya que el potencial hídrico es un indicador de turgor en la planta y este parámetro disminuye en diferentes situaciones de estrés, el hecho de que en condiciones de invernadero este parámetro no se viera afectado por la salinidad en las plantas co-inoculadas, indica que estas tuvieron una mejor resistencia al estrés salino. La producción del EPS podría mejorar la resistencia de la planta hacia el estrés osmótico, favoreciendo la agregación del suelo (Davey and O'toole, 2000); además ha demostrado que puede incrementar la retención de agua en el intestino grueso (Martínez et al., 2011) por lo que, el maurano, podría estar involucrado en la retención de agua en la rizosfera.

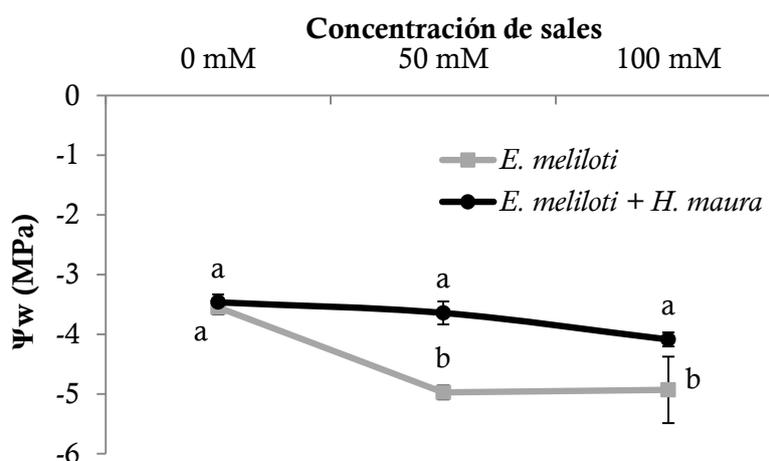


Figura 30. Potencial hídrico (Ψ) de las plantas de alfalfa cultivadas en invernadero bajo distintas concentraciones de sales e inoculadas con dos inoculantes distintos. a, b Representan diferencias significativas entre grupos de plantas (n=6) según un análisis de subgrupos homogéneos utilizando el test de Duncan ($p < 0,05$). SS: sustancia seca.

Tras la cosecha de la alfalfa en el campo, se determinaron de nuevo las propiedades edafológicas, y se compararon con las mismas propiedades antes de la siembra de la alfalfa. El pH y la CE en todas las parcelas de los distintos tratamientos, incrementaron en la superficie y disminuyeron con la profundidad a lo largo del tiempo. Esto revela que la movilidad de las sales solubles, está asociada al frente de humedad que concentra las sales en la superficie cuando las condiciones climáticas favorecen la desecación del suelo. Esto produce el ascenso por capilaridad de la solución del suelo que arrastra las sales y las acumula sobre la superficie (Porta et al., 2003). Por el contrario, el contenido en equivalentes de CaCO₃ no mostró diferencias significativas a lo largo del tiempo, debido principalmente a su baja solubilidad. Como se muestra en la **Figura 17A**, el contenido en M.O. del suelo disminuyó tanto en la superficie como en profundidad a lo largo del período experimental. Esta disminución, especialmente acusada en el nivel superficial, es debida principalmente al arado que precedió a la siembra de las plantas y que favoreció la mineralización de la materia orgánica (Ashagrie et al., 2007). La M.O. del suelo juega un importante papel en el mantenimiento de la productividad debido a su influencia en numerosas propiedades del suelo, provisión de energía y sustratos y el favorecimiento de la diversidad biológica (Wendling et al., 2010). La correlación entre el contenido de materia orgánica del suelo y la productividad para todos los tratamientos fue positiva (**Tabla 18**), como se esperaba. Sin embargo los valores más altos de productividad se observaron en los tratamientos H y EH (**Figura 18**), donde precisamente los coeficientes de correlación entre materia orgánica y productividad fueron los más bajos. Esto sugiere que en los suelos salinos el efecto de la inoculación con *H. maura* fue más relevante incrementando la productividad que el contenido en materia orgánica del suelo por sí mismo. Por lo que el cultivo de la alfalfa en suelos áridos salinos, co-inoculándola con *E. meliloti* y *H. maura* podría ser incorporado a las prácticas agrícolas y así ayudar a mejorar la fertilidad del suelo.

Otro de los efectos que se observó con la co-inoculación de las plantas de alfalfa en condiciones de invernadero, fue el aumento en la concentración de Ca y Mg. Según estos resultados, *H. maura* potenció la absorción de los minerales mejorando el valor nutritivo de la alfalfa. Este enriquecimiento podría radicar en la acción

combinada de las dos bacterias con los exudados derivados de las raíces de la alfalfa. Debido a su composición química, el maurano podría formar complejos con cationes como el Ca y el Mg (Arias et al., 2003), favoreciendo su solubilización, siendo estos más disponibles para su absorción por la planta o bien algunos de sus metabolitos o componentes, podrían contribuir a la movilización y absorción de minerales del suelo. Este efecto ha sido descrito concretamente en relación a la absorción del fósforo por las raíces de otra leguminosa, *Cicer arietinum*, co-inoculando con otras bacterias, *Rhizobium* F75 y *Bacillus polymaxa* H5, esta última con la capacidad de incrementar los niveles de fosfato soluble en el suelo (Alagawadi and Gaur, 1988). Además, la presencia de exudados por parte de la raíz en los que hay cantidades limitadas de citratos, malato y succinato, involucrados en la solubilización del hierro, aluminio y fosfato, podrían haber favorecido este incremento de minerales (Lipton et al., 1987).

Sin embargo en los experimentos realizados en campo, este efecto potenciador de la absorción de minerales no se observó, debido principalmente a que la concentración de sales de estos suelos, determinada en CE, superó en el doble a la salinidad alcanzada en las condiciones de invernadero, lo que pudo ocasionar una absorción de minerales del suelo elevada enmascarando el efecto de las bacterias en este sentido (**Tabla 19**).

El último ensayo biológico realizado sobre las plantas de alfalfa cultivadas a distintas concentraciones de sales en invernadero fue la capacidad antioxidante en los dializados y retenidos de la parte aérea de las plantas de alfalfa, así como el contenido en polifenoles totales de plantas de alfalfa cultivadas bajo condiciones controladas de invernadero y sin adición de sales, y plantas de alfalfa cultivadas en un suelo Solonchak. En el primer caso se observó un incremento de la capacidad antioxidante, tanto de los dializados como de los retenidos, con el incremento de las concentraciones de sales en las que las plantas crecieron (**Figura 32**). Ha sido ampliamente estudiado, y se sabe que el contenido en sustancias antioxidantes, en concreto polifenoles, de una planta depende de muchos factores, entre ellos, factores abióticos y medioambientales como es el nivel de salinidad sobre el que la planta se desarrolla. En la determinación de polifenoles totales llevada a cabo sobre las plantas de alfalfa observamos que hubo un aumento en esta concentración de

polifenoles en aquellas plantas que se desarrollaron bajo unas condiciones CE de 23 dS/m, en comparación con aquellas que crecieron en 0,6 dS/m (**Figura 31**).

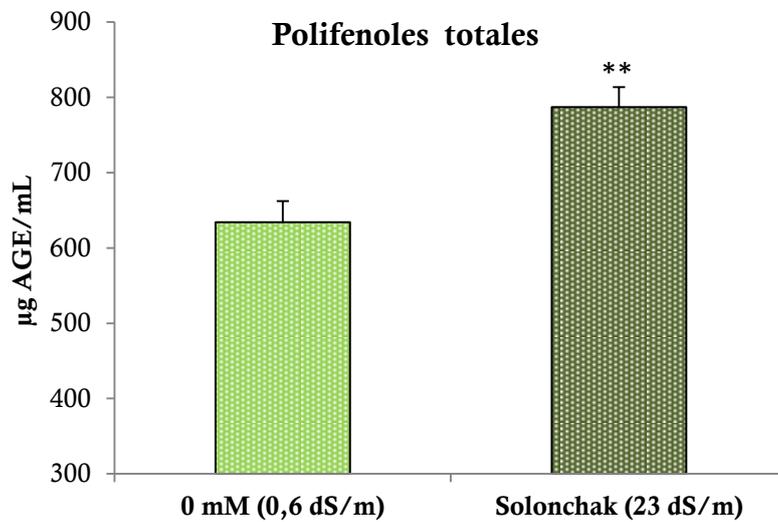


Figura 31. Contenido en polifenoles totales de la parte aérea de las plantas de alfalfa cultivada en invernadero sin adición de sales y en suelo Solonchak. **Representan diferencias significativas según un test de T de Student ($p < 0,01$).

En un trabajo reciente llevado a cabo por Colla et al., (2013) se observó que el aumento de la concentración de NaCl en la solución de riego de alcachofa y cardo, aumentó el contenido en polifenoles de la parte aérea de estos dos vegetales. Esto demuestra que la capacidad de inhibir la peroxidación lipídica puede ser atribuida a la presencia de componentes antioxidantes, entre ellos polifenoles, que protegen contra la acción oxidante del hierro, o bien quelándolo y previniendo así la producción de radicales hidroxilo y la propagación de la peroxidación lipídica, o bien atrapando radicales libres formados en la reacción (Fraga and Oteiza, 2002). Además, se observó que la co-inoculación mejoró la capacidad antioxidante tanto en los dializados como en los retenidos; esta mejora de la capacidad antioxidante ha sido descrita en la parte aérea de *Trigonella foenum-graecum*, otra especie de leguminosa, inoculada con la rizobacteria promotora del crecimiento *B. lentimorbus* cepa NRRL B-30488 (Nautiyal et al., 2008). Basándonos en nuestros resultados es posible que la alfalfa incluida en la dieta humana puede exhibir ambos efectos: un efecto sistémico debido a su componente absorbible (dializado) y también un efecto local en el tracto digestivo debido a los componentes no absorbibles (retenidos).

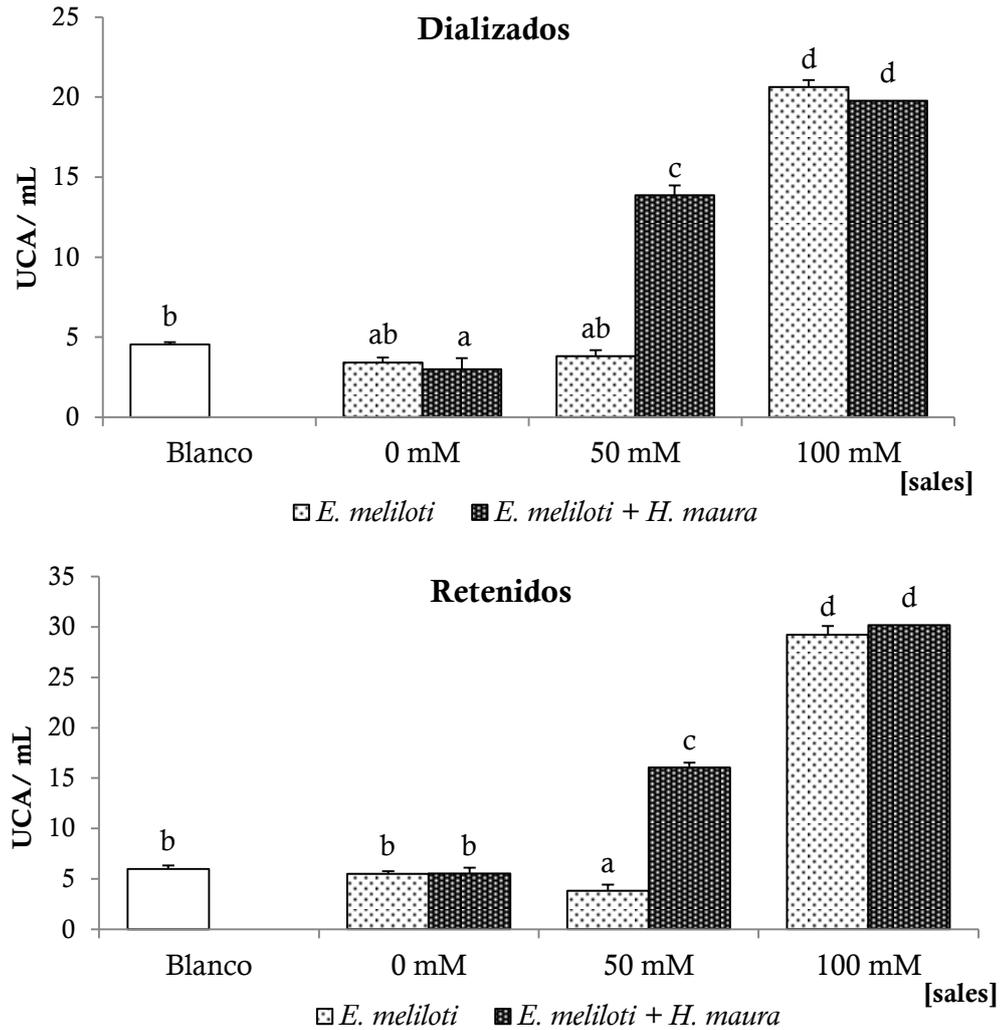


Figura 32. Capacidad antioxidante de dializados y retenidos de la parte aérea de las plantas de alfalfa crecida a distintas concentraciones de sales tipo Solonchak órtico. Las plantas fueron inoculadas con *E. meliloti* o con *E. meliloti + H. maura*. a,b,c,d Representan diferencias significativas entre tratamientos según un análisis de subgrupos homogéneos utilizando el test de Tukey ($p < 0,05$). UCA: unidades de capacidad antioxidante.

A continuación se planteó la Fase 2 que consistió en el uso de esta alfalfa cultivada bajo condiciones de salinidad, ensayándola en modelos experimentales animales: 1) como fuente de proteína, fibra y calcio en un modelo experimental de rata Wistar en crecimiento, y 2) como fuente de fibra y de componentes bioactivos en un modelo experimental de rata espontáneamente hipertensa (SHR).

5.2. Fase 2.

5.2.1. Fase 2.1.

Efecto de Medicago sativa como fuente de proteína en un modelo experimental de rata Wistar en crecimiento.

En vista de los resultados obtenidos en la Fase 1, se llevó a cabo un experimento *in vivo* para evaluar la utilización nutritiva de la alfalfa obtenida en cultivo bajo condiciones de salinidad en invernadero; como ya se indicó, aunque la alfalfa es una leguminosa forrajera mayoritariamente utilizada en nutrición animal, está despertando un interés cada vez mayor para su uso en nutrición humana; por lo que es interesante su ensayo previo en modelos experimentales animales.

El cultivo controlado de alfalfa en invernadero nos permitió obtener muestras de alfalfa con una mejora del contenido en nitrógeno, Ca y Mg. Por lo que nos dirigimos a comprobar si este incremento de la composición nutricional también se asoció a una mejora de la utilización nutritiva de estos componentes.

Para esto, se diseñaron unas dietas experimentales en las que la fuente de proteína correspondió exclusivamente a esta leguminosa, evitando así efectos cruzados de la adición de otras fuentes proteicas. En el establecimiento de los requerimientos nutricionales en relación a la proteína, hay que tener en cuenta la composición aminoacídica, su digestibilidad, la edad del animal y su estado fisiológico, por lo que se procedió a la suplementación de la dietas control con metionina y las dietas de alfalfa con lisina y metionina y se alcanzó el nivel proteico del 8% seleccionado, apropiado para ratas en crecimiento (Burns et al., 1982). El aporte de alfalfa necesario para llegar hasta el nivel proteico del 8% seleccionado como óptimo, bajo nuestras condiciones experimentales para ensayar la calidad proteica de la dieta, cubría además el aporte de fibra y Ca necesario para nuestro modelo experimental de rata en crecimiento, por lo que no se añadió a las dietas ni otra fuente de fibra ni de calcio.

En estas condiciones experimentales, se encontró una evolución del peso corporal distinto para los animales que consumían las diferentes dietas. Se consideró más correcto expresar la ingesta de dieta en valores relativos a 100 g de peso, para así poder comparar entre grupos y eliminar la dispersión de valores que habría ocasionado el peso de los animales, ya que los animales más grandes lógicamente

consumen una mayor cantidad de dieta. De esta manera se observó que la ingesta de alimento fue similar en los tres grupos experimentales; si bien esta ingesta similar no se correlacionó con valores similares de C.E.C. e I.T. sino que estos empeoraron en los grupos de animales que consumieron la alfalfa (**Figura 33**), reflejando así un menor aprovechamiento del alimento ingerido y de la proteína en particular; a pesar de que se ajustó el contenido en aminoácidos limitantes como metionina y lisina para conseguir una calidad proteica similar a la de la caseína (Balde et al., 1993). Esta disminución de la digestibilidad de la proteína pudo deberse a la presencia de saponinas en la alfalfa, ya que estas pueden actuar a nivel del tracto digestivo modificando la permeabilidad intestinal e impidiendo la absorción de nitrógeno, así como a la presencia de lignina que dificultó la digestibilidad de la planta (Kumar, 2011).

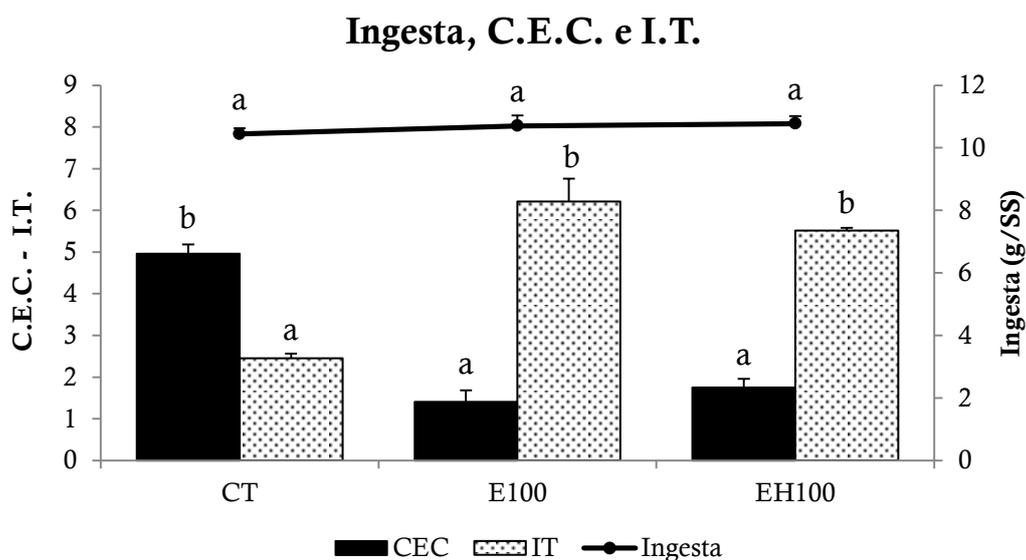


Figura 33. Ingesta, coeficiente en crecimiento (C.E.C.) e índice de transformación (I.T.) de los animales de los tres grupos experimentales. Los datos se expresan como medias grupales (n=8) y error estándar de la media (EEM). a, b Representan diferencias significativas entre grupos experimentales para cada variable según un análisis de subgrupos homogéneos utilizando el test de Tukey ($p < 0,05$). SS: sustancia seca.

En cuanto al peso de los órganos, es conocido que el consumo de leguminosas se asocia a un menor tamaño del hígado tal y como ha sido descrito por Kapravelou et al., (2014b) donde este menor tamaño se vio reflejado en cambios del contenido en grasa, agua y glucógeno de este órgano. Bajo nuestras condiciones experimentales el menor peso del hígado (**Figura 34**), se asoció a un descenso de los parámetros plasmáticos relacionados con el metabolismo glucídico y lipídico, como glucosa,

triglicéridos, colesterol total, LDL y HDL (**Figura 35**). Landers et al., (2008) describieron en un modelo experimental de ave, que el consumo de alfalfa disminuía el peso del hígado y el nivel de triglicéridos plasmáticos, coincidiendo con nuestros resultados.

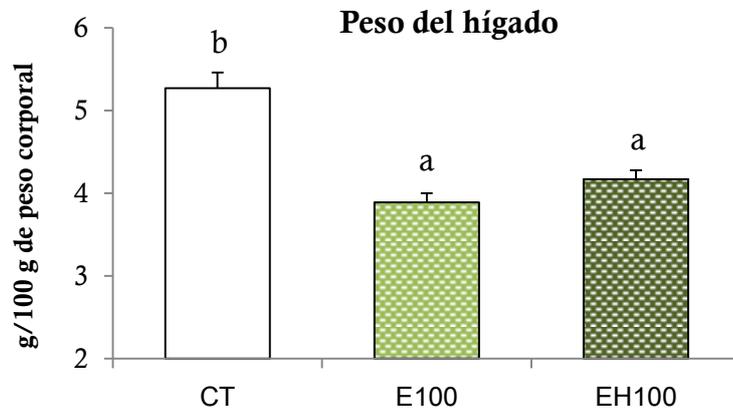


Figura 34. Peso del hígado expresado en g/100 g de peso corporal. Los datos se expresan como medias grupales (n=8) y error estándar de la media (EEM). a, b Representan diferencias significativas entre grupos experimentales para cada variable según un análisis de subgrupos homogéneos utilizando el test de Tukey ($p < 0,05$).

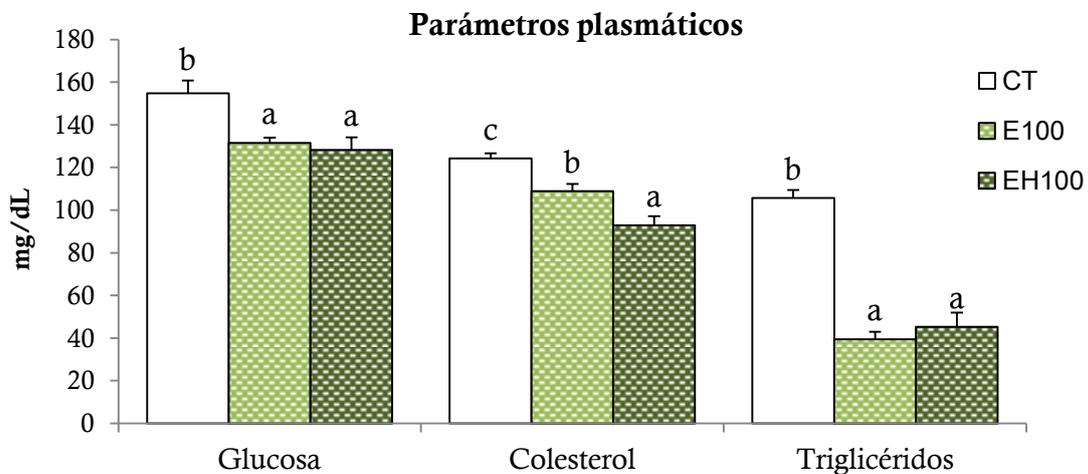


Figura 35. Concentración de glucosa, colesterol y triglicéridos plasmáticos. Los datos se expresan como medias grupales (n=8) y error estándar de la media (EEM). a, b, c Representan diferencias significativas entre grupos experimentales para cada variable según un análisis de subgrupos homogéneos utilizando el test de Tukey ($p < 0,05$).

En este efecto regulador del metabolismo glucídico y lipídico es importante considerar el efecto de la fibra aportada en la alfalfa. La disminución de los niveles plasmáticos de colesterol pudo relacionarse con la alta capacidad de adsorción de ácidos biliares por parte de la alfalfa, concretamente la fibra de alfalfa, y la consiguiente disminución de la absorción intestinal de colesterol como fue descrito por Cassidy et al., (1981). Es conocido que la alta ingesta de fibra y su fermentación, producen un efecto de hipertrofia en el ciego y el colon (Knapp et al., 2013); este efecto fue descrito por Frankel et al., (1994) y se atribuyó a la producción de ácidos grasos de cadena corta que tienen efectos tróficos sobre ambos tejidos. Además ha sido descrito que una alta producción de ácidos grasos de cadena corta mejora el metabolismo glucídico disminuyendo la producción hepática de glucosa (Weickert and Pfeiffer, 2008), lo que podría explicar los menores valores de este parámetro en los animales que consumieron alfalfa.

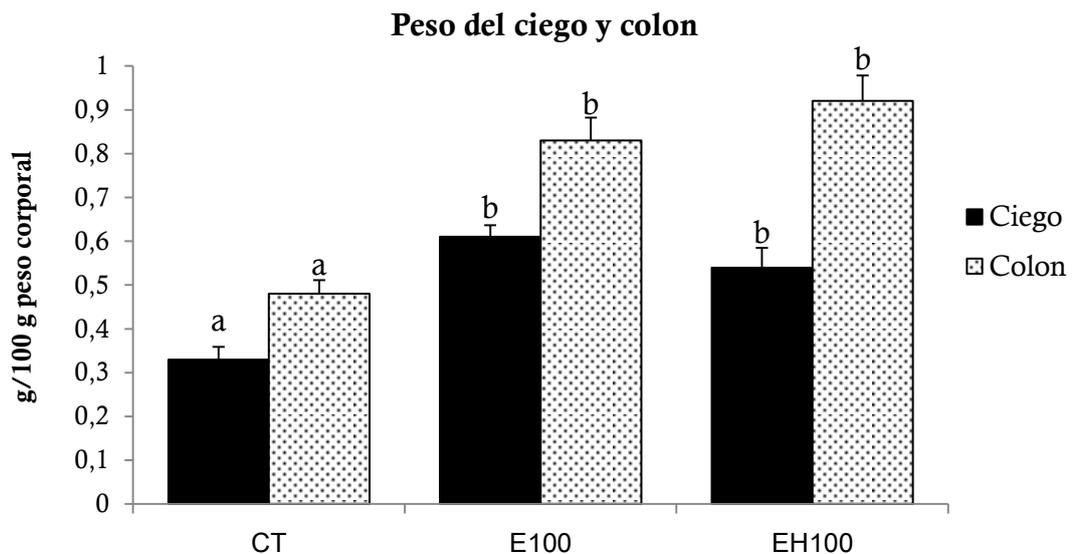


Figura 36. Peso del ciego y del colon de los tres grupos experimentales (expresados como g /100 g de peso corporal). Los datos se expresan como medias grupales (n=8) y error estándar de la media (EEM). a, b Representan diferencias significativas entre grupos experimentales para cada variable según un análisis de subgrupos homogéneos utilizando el test de Tukey (p<0,05).

Por otra parte, observamos un aumento en los parámetros relacionados con daño hepático como la actividad de las enzimas transaminasas ALT y AST (**Figura 37**). Aunque no se han descrito las causas exactas de esta peor funcionalidad hepática puede atribuirse al efecto de los componentes comunes presentes en la alfalfa y en otras leguminosas, donde también ha sido encontrado un aumento de las

actividades de las enzimas transaminasas por su consumo como *Tephrosia cinerea* (Riet-Correa et al., 2013), *Piliostigma thonningii* (Awhin et al., 2013) y *Cajanus cajan* (Nwaogu and Emejulu, 2010).

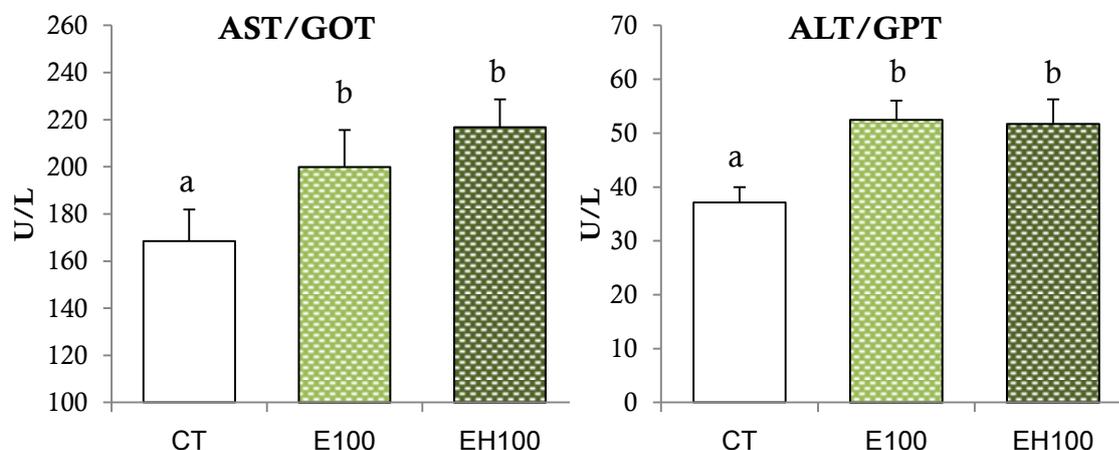


Figura 37. Actividades de las enzimas plasmáticas AST/GOT y ALT/GOT de los tres grupos experimentales. Los datos se expresan como medias grupales (n=8) y error estándar de la media (EEM). a, b Representan diferencias significativas entre grupos experimentales para cada variable según un análisis de subgrupos homogéneos utilizando el test de Tukey ($p < 0,05$).

En relación a otros órganos como cerebro y riñón, es probable que el aumento de estos órganos en los grupos de animales que consumieron alfalfa (E100 y EH100), especialmente en el caso del cerebro, pueda deberse al mayor grado de desarrollo que en estos estadios iniciales del crecimiento de los animales tiene este órgano. Como los resultados se han expresado en g /100 g de peso del animal es posible que se produzca un artificio de cálculo. El peso del cerebro no se correlaciona de la misma forma que los demás órganos con el peso corporal, de manera que como ya hemos indicado, el mayor crecimiento se produce en los primeros estadios y su tamaño es más independiente del tamaño del peso corporal que otros órganos. En cuanto a la hipertrofia que se produce a nivel renal, podemos relacionarla con el extenso trabajo regulador de este órgano sobre los distintos nutrientes.

En relación al peso del bazo, se observó una disminución en los grupos que consumieron alfalfa, la dieta administrada con alfalfa tuvo un alto contenido en fibra; en el trabajo llevado a cabo por Sun et al., (1994), se describió como el consumo de dietas con alto contenido en alfalfa, y en otros forrajes, una disminución del peso de hígado así como de bazo en comparación con dietas con tres veces menor contenido en forraje.

En relación a la utilización nutritiva, el ensayo de la alfalfa como fuente proteica puso de manifiesto una peor utilización nutritiva del nitrógeno reflejada en menores índices de absorción neta, CDA, balance y de % R/A. Como ya se mencionó, atribuible a una peor digestibilidad intrínseca por razones estructurales de la proteína de alfalfa y a la presencia de componentes no nutricionales que interfieren en la absorción de aminoácidos. A pesar de que la calidad proteica fue calculada químicamente, debe existir algún tipo de imbalance aminoácidico que tiene como resultado que la proteína no se utilice plenamente con fines estructurales sino que se desvía en parte hacia otras funciones no plásticas, lo que redunda en un peor % R/A y se refleja en un menor incremento de peso.

En resumen, la utilización nutritiva de la proteína se vio afectada en primer lugar por una peor digestibilidad, que da lugar a menores niveles de absorción neta y de balance; y en segundo lugar por una menor utilización metabólica reflejada en un menor R/A, ambos factores contribuyeron a su vez a una menor ganancia de peso por parte de los animales que consumieron la alfalfa.

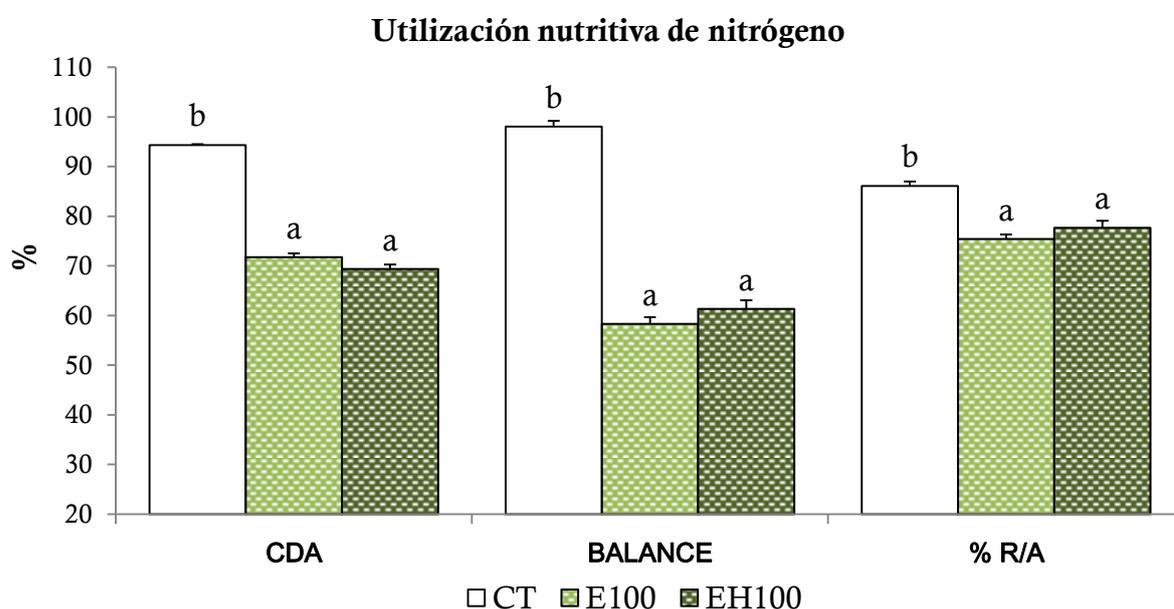


Figura 38. Coeficiente de digestibilidad aparente (CDA), balance y porcentaje de retenido en función del absorbido (% R/A) del nitrógeno. Los datos se expresan como medias grupales (n=8) y error estándar de la media (EEM). a, b Representan diferencias significativas entre grupos experimentales para cada variable según un análisis de subgrupos homogéneos utilizando el test de Tukey ($p < 0,05$).

Desde el punto de vista nutritivo, uno de nuestros resultados más relevante se relaciona con el contenido y utilización nutritiva de los minerales de la alfalfa

cultivada en condiciones de salinidad; ya que la leguminosa supuso un importante aporte de minerales totales que condujeron además, a una mayor absorción neta.

Entre los distintos minerales ensayados, merece especial mención el Mg cuya ingesta fue 5 veces superior en los grupos de animales alimentados con alfalfa, incluso se incrementó por efecto de la inoculación de las plantas con las dos bacterias y, a pesar de que se produjo una alta excreción fecal (probablemente asociada a la elevada ingesta y al contenido en fibra de las dietas), acompañada de una elevada excreción urinaria de Mg, el balance y el % R/A fueron más altos en relación a los animales que consumieron la dieta control. Este mayor balance dio lugar a su vez, a un mayor almacenamiento del mineral en el hueso independientemente del inoculante de la alfalfa utilizado. La homeostasis del Mg^{2+} depende de la acción combinada del intestino, el riñón y además del hueso. Aproximadamente del 50 – 60 % del magnesio corporal se almacena en el hueso, donde se ha comprobado que tiene la función de inducir la formación de osteoblastos, resultando su deficiencia en la disminución de la formación de masa ósea y en el incremento de la secreción de citoquinas proinflamatorias en ratas (Baaij et al., 2015). Por todo esto, el aumento de Mg en hueso se considera un indicador de mejora salud ósea.

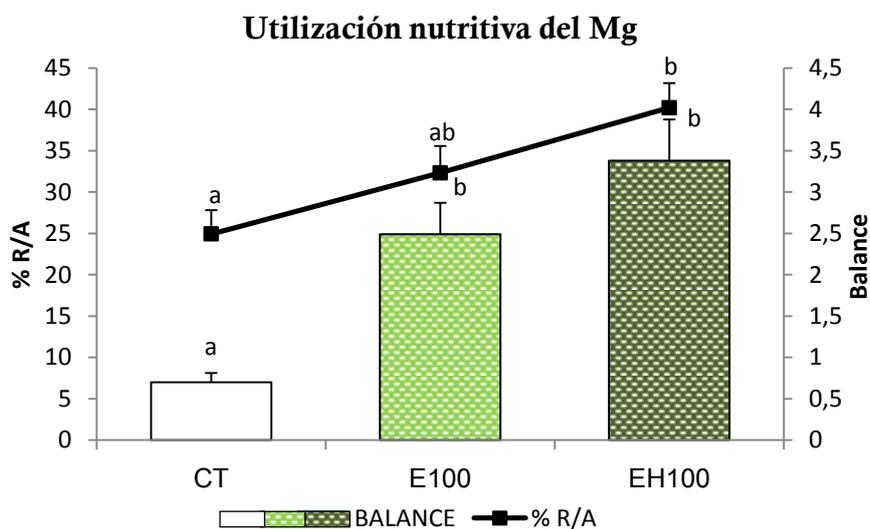


Figura 39. Balance y porcentaje de Mg retenido en función del absorbido. Los datos se expresan como medias grupales (n=8) y error estándar de la media (EEM). a, b Representan diferencias significativas entre grupos experimentales para cada variable según un análisis de subgrupos homogéneos utilizando el test de Tukey (p<0,05).

De forma similar a lo que ocurrió con el Mg la utilización digestiva de Ca y P disminuyó en los animales que consumieron alfalfa comparado con los animales que consumieron caseína; produciéndose en estos minerales un peor balance. Los valores de % R/A permanecieron similares para el Ca en los tres grupos experimentales independientemente de la dieta que consumieron, lo que indicó que para mantener la homeostasis del Ca la regulación hormonal estricta de este mineral a cargo de la hormona PTH, permitió una eficiente reabsorción renal de Ca acompañada de una mayor excreción urinaria de P (Peacock, 2010).

A pesar del menor balance, el mantenimiento de la homeostasis del Ca no afectó al contenido de este mineral en el hueso, ya que no se produjo una disminución sino que se vio incluso aumentado en aquellos animales que consumieron la alfalfa inoculada con las bacterias *E. meliloti* y *H. maura*, al igual que ocurrió con el P.

Este mantenimiento del contenido mineral en hueso, se vio además acompañado de un mayor contenido en minerales totales, en P y en Ca del músculo (Aranda et al., 1987). Como se pudo observar, a corto plazo no solo se mantuvo el contenido en Ca del hueso sino que además aumentó (**Figura 40**).

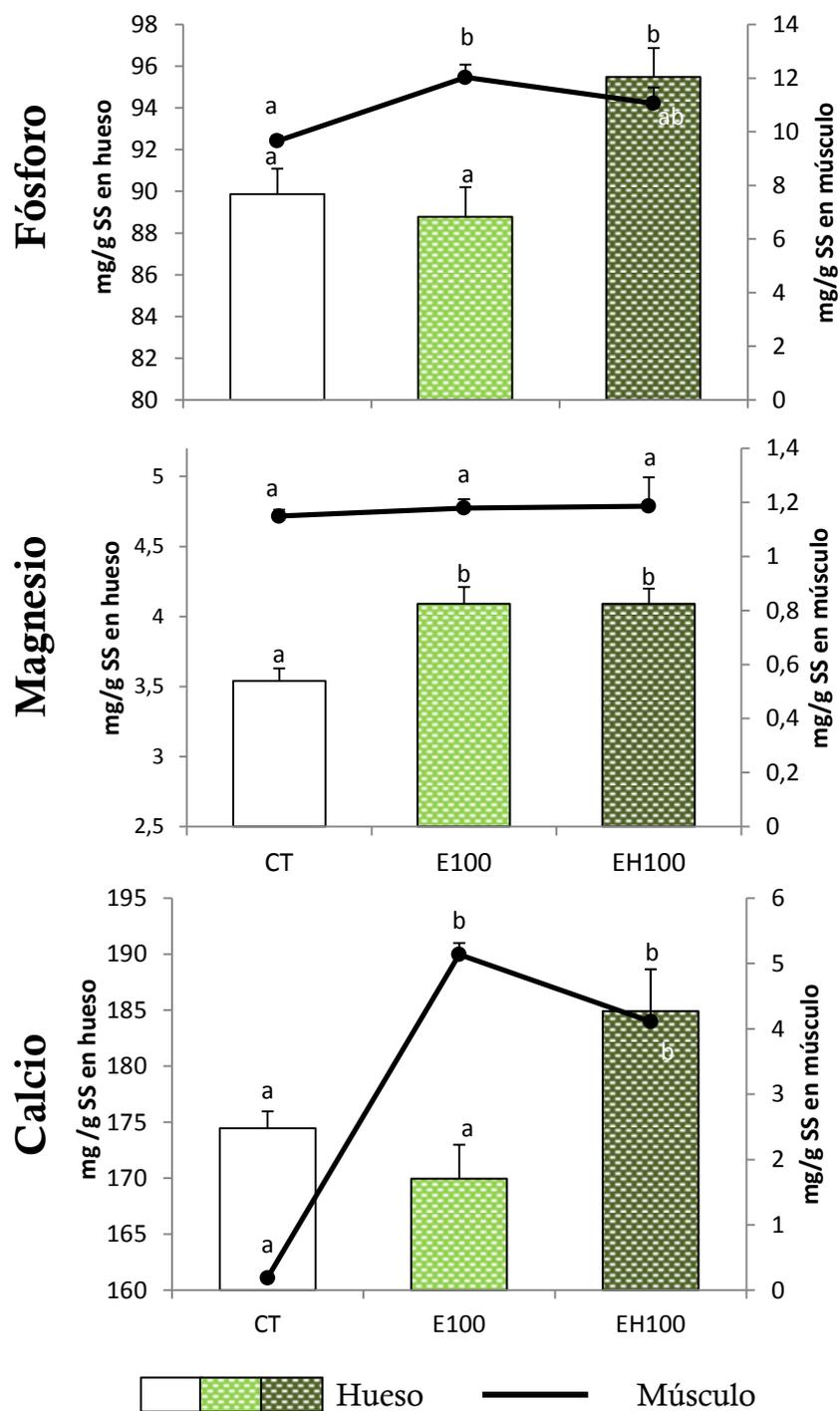


Figura 40. Contenido en fósforo, magnesio y calcio de hueso (fémur) y músculo (longísimus dorsi). Los datos se expresan como medias grupales (n=8) y error estándar de la media (EEM). a, b Representan diferencias significativas entre grupos experimentales para cada variable según un análisis de subgrupos homogéneos utilizando el test de Tukey ($p < 0,05$).

5.2.2. Fase 2.2.

Ensayo de la alfalfa como fuente de fibra y compuestos bioactivos en un modelo experimental de rata espontáneamente hipertensa (SHR).

Tras llevar a cabo los experimentos anteriores utilizando la alfalfa como fuente de proteína, comprobamos que el consumo de alfalfa en alto porcentaje, a pesar de haber promovido resultados positivos sobre el metabolismo glucídico, lipídico y mineral, no resultó en el aprovechamiento proteico esperado. Por lo que basándonos en el incremento en el contenido de polifenoles totales de la alfalfa cultivada en un suelo Solonchak, y conociendo que la proteína de la alfalfa está compuesta por polipéptidos bioactivos con función hipotensora (Kapel et al., 2006a), se procedió al ensayo de esta leguminosa en un modelo experimental de rata espontáneamente hipertensa (SHR) y su control normotenso Wistar Kyoto (WKY), adicionando la alfalfa a las dietas en un porcentaje del 7% para satisfacer el contenido de fibra recomendado y suplementar la dieta con los componentes bioactivos de la planta.

Este experimento comenzó en la sexta Semana de edad de los animales, edad que es considerada pre-hipertensiva y momento a partir del que empieza a desarrollarse la hipertensión (Pinto et al., 1998), por lo que en estas condiciones experimentales se nos permitiría comprobar el efecto preventivo a través de la alfalfa adicionada a la dieta. El experimento transcurrió durante cinco Semanas, hasta que los animales alcanzaron las 11 Semanas de edad; período en el que pudimos determinar Semanalmente tanto la ingesta de alimento, como el peso de los animales y la presión arterial de los mismos.

Ingesta, peso y composición corporal.

Durante el período experimental se observó que la ingesta de los animales de fenotipo hipertenso disminuyó con respecto a los animales normotensos (**Figura 19** y **Tabla 30**), conllevando paralelamente a un menor incremento de peso corporal de estos animales (**Figura 41**). Aunque este menor incremento de peso pudo deberse principalmente a la menor ingesta de dieta, en numerosos trabajos el efecto del fenotipo sobre el peso de los animales ha sido descrito (Erejuwa et al., 2011; Sanada et al., 2012; Simão et al., 2011; Sundaram et al., 2013); en todos ellos el peso de los

animales de fenotipo SHR fue inferior a sus controles normotensos WKY incluso sin haber diferencias en cuanto a la ingesta. Aunque no se conoce cuál es el mecanismo ni las causas de estos menores pesos corporales; parece que existe una disminución de la eficiencia energética en el modelo SHR, ya que se ha comprobado que esta cepa es incluso resistente a la ganancia de peso a través de las intervenciones dietéticas de alto contenido en grasa (Oliveira et al., 2009).

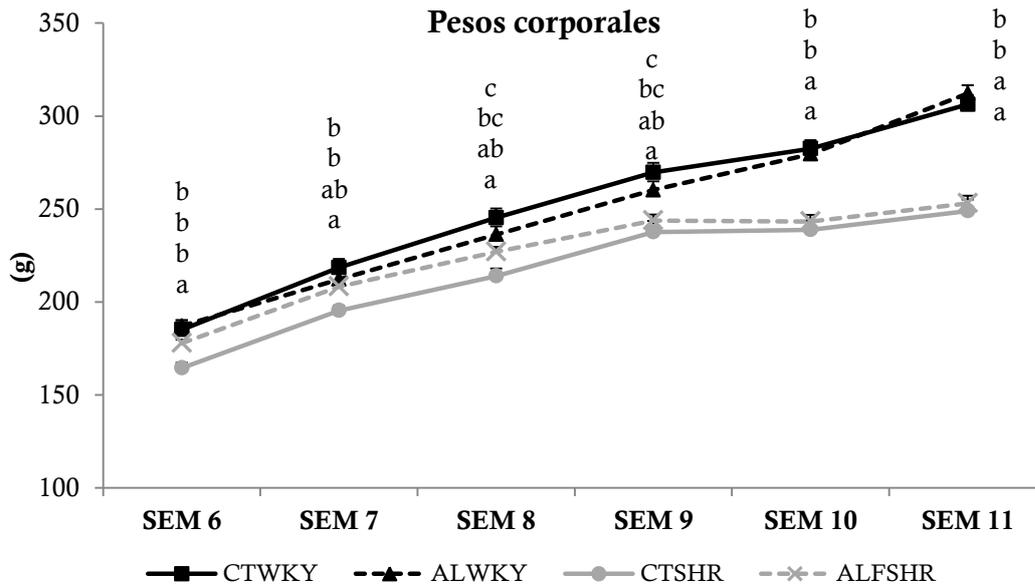


Figura 41. Pesos corporales de los animales de los cuatro grupos experimentales. Los valores representados son las medias grupales \pm EEM. a,b,c Representan diferencias significativas entre grupos mediante un análisis de subgrupos homogéneos a través del test de Tukey ($p < 0,05$). EEM: Semanas de edad de los animales.

Además, no solo se observó una disminución del peso corporal, sino que incluso los animales de fenotipo SHR tuvieron una disminución en el contenido de masa grasa (Tabla 34). En otros estudios realizados en pacientes hipertensos y sobre modelos animales experimentales se han obtenido resultados diferentes a los nuestros, mostrando que al inhibir la ECA y por tanto disminuir la presión arterial, se producía una disminución de la masa corporal y en concreto de la masa grasa (Mathai et al., 2008). Sin embargo, resultados similares a los que nosotros hemos obtenido en nuestras condiciones experimentales han sido descritos por Lu et al., (2011) donde los animales hipertensos SHR tuvieron menor masa grasa en comparación con sus controles WKY. Aunque la hipertensión está relacionada en un alto porcentaje de casos con una acumulación de grasa, y en especial grasa abdominal, este no parece ser el caso para la cepa SHR.

Presión arterial

Con respecto a la presión arterial, el modelo experimental siguió la pauta esperada de modo que los animales hipertensos tuvieron una valores de PA superiores a los animales normotensos durante todo el experimento. El efecto de la adición de alfalfa a las dietas se observó solo para los animales hipertensos, donde se produjo una leve pero significativa disminución de los valores de PAS, PAD y PAM (**Figura 42**). Esta disminución puede deberse a una o varias causas hasta ahora conocidas. Kapel et al., (2006a) desarrollaron hidrolizados proteicos de plantas de alfalfa y describieron su efecto inhibitorio sobre la enzima convertidora de angiotensina (ECA) mediante la acción de la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenada, más comúnmente conocida con el nombre de RuBisCo, y que consitituye aproximadamente el 65% (p/p) del total de la proteína blanca de alfalfa. Esta actividad hipotensora, fue comprobada en el mismo modelo experimental *in vivo* utilizado en este estudio (SHR), donde se obtuvieron reducciones de presión arterial sistólica de hasta de 29 mmHg a una dosis de hidrolizado de 0,5 g/kg peso corporal (Kapel et al., 2006b). Además, otro de los posibles mecanismos implicados en la disminución de la PA asociada al consumo de alfalfa, podría ser la presencia de flavonoides en la parte aérea de esta planta. Especialmente, la quercetina, que hemos caracterizado en las muestras de *M. sativa* utilizada en este experimento, ha sido ampliamente descrita en una revisión bibliográfica publicada recientemente por Larson et al., (2012) donde se detallan los mecanismos de acción de este flavonoide y las posibles vías de actuación: 1) inhibiendo a la ECA, 2) disminuyendo la expresión en la corteza suprarrenal y en los vasos sanguíneos del receptor AT-1 de la Ang II, por tanto disminuyendo la secreción y liberación de aldosterona y promoviendo la relajación de las células arteriales del músculo liso y 3) inhibiendo la formación de peroxinitritos a partir de NO, consecuentemente aumentando su biodisponibilidad y su efecto vasodilatador. Todos los mecanimos mencionados son factores indiscutibles que contribuyen a la disminución de la PA.

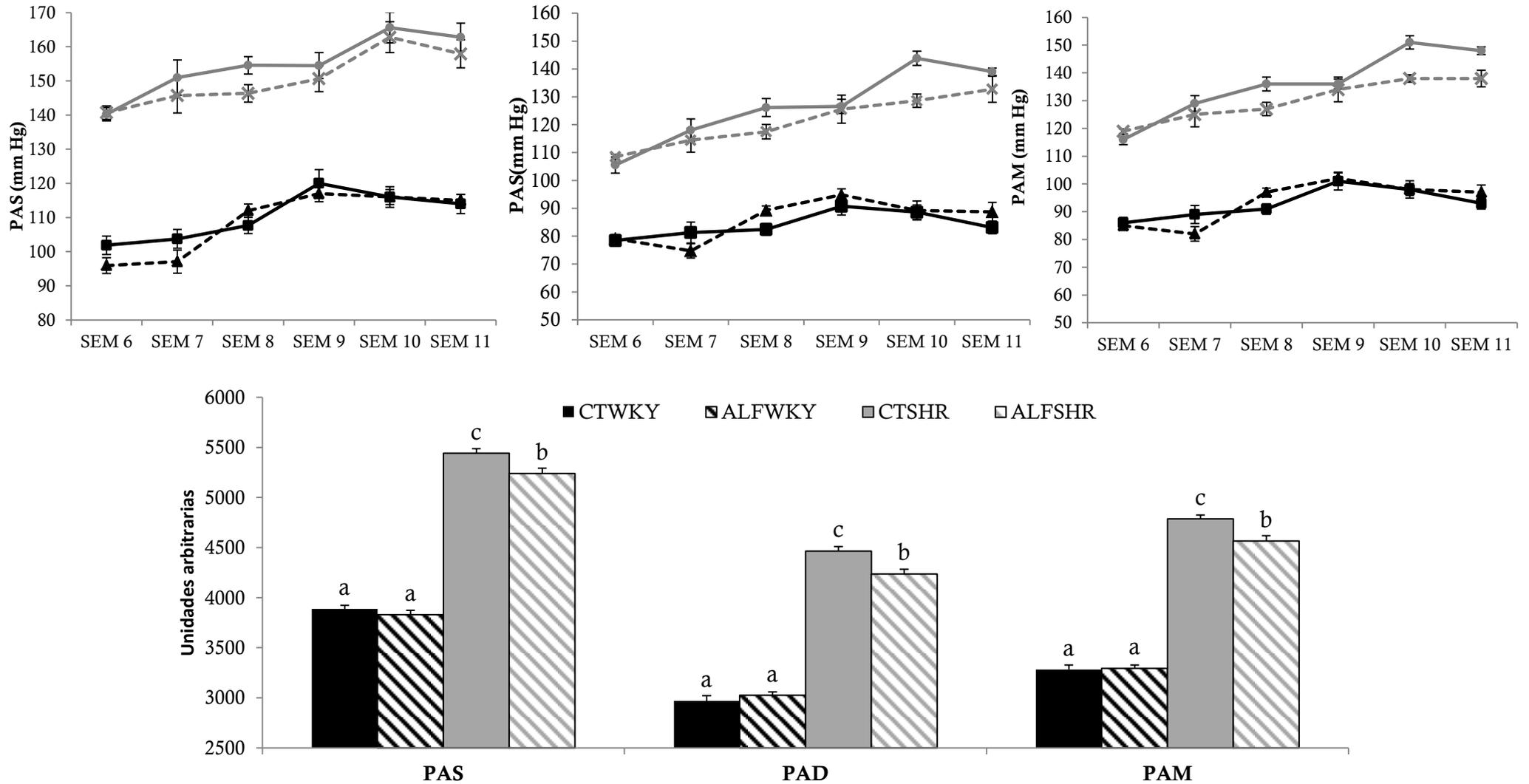


Figura 42. Medidas de presión arterial sistólica (PAS), presión arterial diastólica (PAD) y presión arterial media (PAM) desde la Semana 6 de edad de los animales de experimentación hasta la edad de 11 Semanas. Los parámetros se representan como valores medios grupales (n=8). Los valores son representados como medidas absolutas en cada Semana de los cuatro grupos experimentales (gráficas de líneas) y como el área bajo la curva de cada grupo experimental (gráficas de barras). a,b,c Representan diferencias significativas entre grupos según un test de Tukey ($p < 0,05$). EEM n: edad en Semanas.

Funcionalidad renal.

El riñón juega un papel fundamental en la presión arterial a través de la modulación de diversos parámetros urinarios. Dos de estos parámetros son la diuresis (volumen de orina excretado) y la excreción de sodio, encontrándose ambos disminuidos en el estado de hipertensión tanto en pacientes como en modelos experimentales animales como ocurrió en nuestras condiciones experimentales con el modelo SHR. Aunque existen evidencias que demuestran que la administración de extractos provenientes de diversas plantas como *Tropaeolum majus* (Gasparotto Junior et al., 2012), *Artemisia alba* (Zeggwagh et al., 2008) o el fresno (Eddouks et al., 2005) pueden revertir esta situación, al menos en el modelo experimental animal SHR, la adición de alfalfa a las dietas no tuvo ningún efecto sobre estos parámetros.

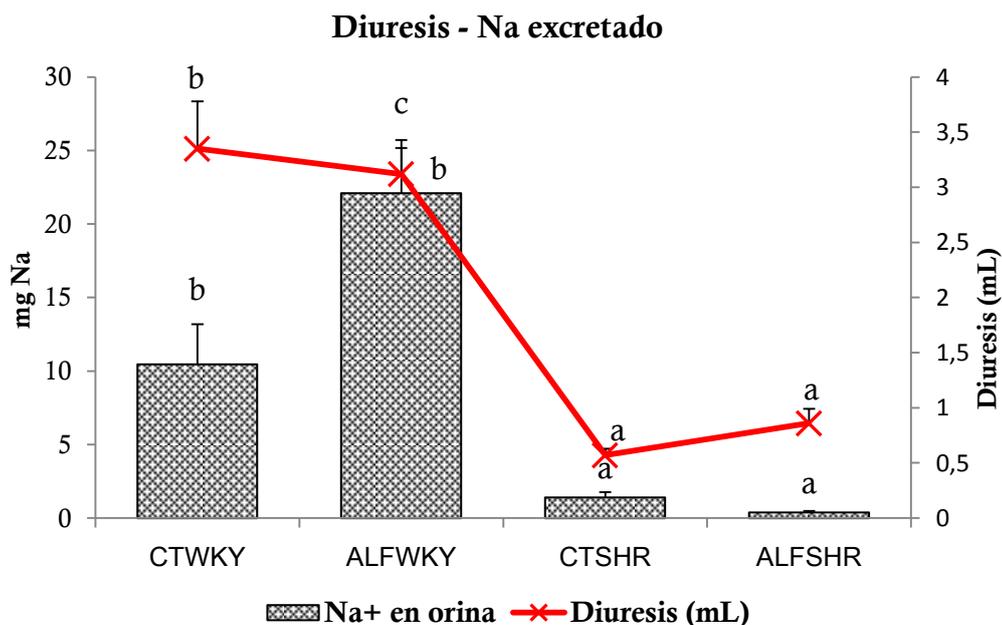


Figura 43. Volumen de orina excretado en 12 horas y sodio excretado en orina (mg) de los cuatro grupos experimentales. Las barras representan medias grupales ($n=8$) \pm EEM. a,b,c Representan diferencias significativas según un análisis de subgrupos homogéneos mediante el test de Tukey ($p<0,05$).

El índice de filtración glomerular (IFG) es aceptado como el mejor índice de funcionalidad renal tanto en situación de salud como en situaciones de enfermedad, mientras que la albuminuria es ampliamente utilizado como un marcador de daño renal (Levey et al., 2015). En la hipertensión, la albuminuria es considerada como

una lesión de este órgano diana, y se ha demostrado que aquellos sujetos que presentan albuminuria también tienen PAS, PAD y de pulso más altas y que además la prevalencia se incrementa conforme aumentan las categorías de presión arterial (de la Sierra et al., 2008). Pudimos observar como nuestro modelo de hipertensión SHR, mostró un incremento de albuminuria con respecto a los animales normotensos, sin que el tratamiento con alfalfa pudiera afectar a este parámetro. Después de determinar el aclaramiento renal de creatinina, como una aproximación al índice de filtración glomerular, observamos que los animales hipertensos aun llegando a doblar e incluso triplicar la concentración de creatinina excretada en orina, tuvieron un aclaramiento renal diez veces menor que los animales de fenotipo normotensos. Estos resultados fueron similares a los descritos por De Cavanagh et al., (2005). El tratamiento dietético a través de la administración de alfalfa no pudo revertir los grandes daños renales promovidos por el fenotipo hipertenso de los animales.

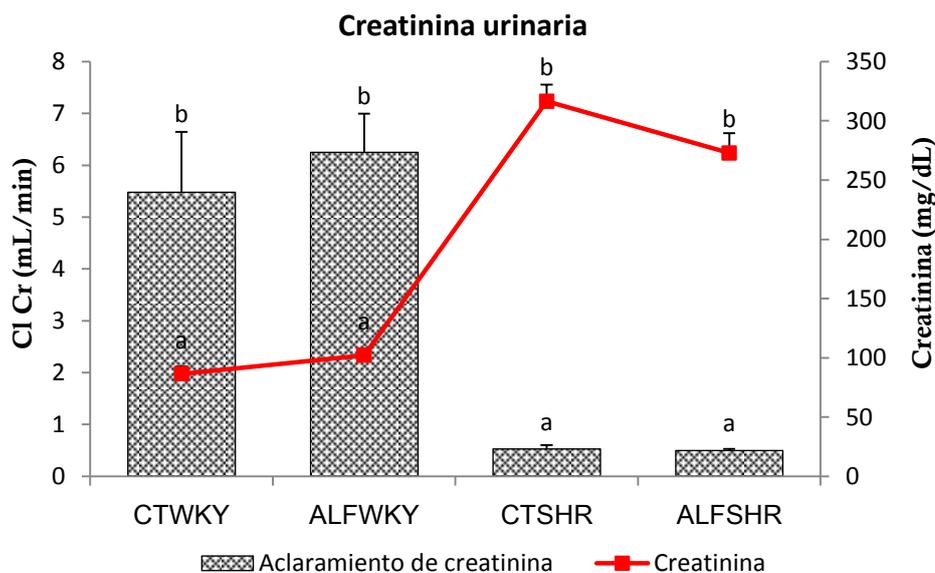


Figura 44. Creatinina urinaria y aclaramiento renal de creatinina (CI Cr) en los cuatro grupos experimentales. Se representan medias grupales (n=8). a,b Representan diferencias significativas entre grupos mediante un análisis de subgrupos homogéneos por el test de Tukey ($p < 0,05$).

Existen evidencias epidemiológicas que confirman que hay una relación entre la hipertensión y la nefrolitiasis/urolitiasis; de manera que los sujetos hipertensos tienen mayor tendencia a formar piedras renales y los pacientes con historial de desarrollo de piedras tienden a desarrollar hipertensión (Obligado and Goldfarb, 2008). Aunque los mecanismos por los que se produce no están claros, existen

ciertos parámetros urinarios que se han relacionado con esta patología; entre los que destacan un pH ácido, un aumento de la excreción de fósforo y ácido úrico (Kadlec et al., 2012); y una disminución de la excreción de ácido cítrico (Akira et al., 2008) ya que el ácido cítrico ha sido descrito como un componente inhibitorio de la formación de cálculos renales impidiendo la aglomeración de cristales (Kok et al., 1990). Esta disminución de ácido cítrico en paciente hipertensos, fue demostrada en un estudio retrospectivo que incluía a 234 sujetos donde se observó una concentración de citratos menor en comparación con los pacientes normotensos (Losito et al., 2009). En concordancia con estos resultados, nuestros animales de experimentación de fenotipo hipertenso desarrollaron unos mayores niveles urinarios de ácido úrico, y fósforo, una menor excreción urinaria de citratos y un pH más ácido; por tanto una mayor probabilidad de desarrollar pideras renales (**Figura 45**). Taylor et al., (2010) demostraron que la intervención dietética, siguiendo una dieta adherida a la dieta DASH podía disminuir el riesgo de nefrolitiasis, también asociado a la mayor excreción urinaria de ácido cítrico. Al igual que los resultados obtenidos por Taylor et al., el tratamiento dietético mediante la inclusión de la alfalfa en la dieta revirtió los parámetros anteriores en los animales hipertensos, de manera que el ácido úrico y el fósforo disminuyeron y la excreción de ácido cítrico y el pH aumentaron. Podemos afirmar que hubo un menor riesgo de nefrolitiasis en los animales hipertensos, relacionado con el consumo de alfalfa.

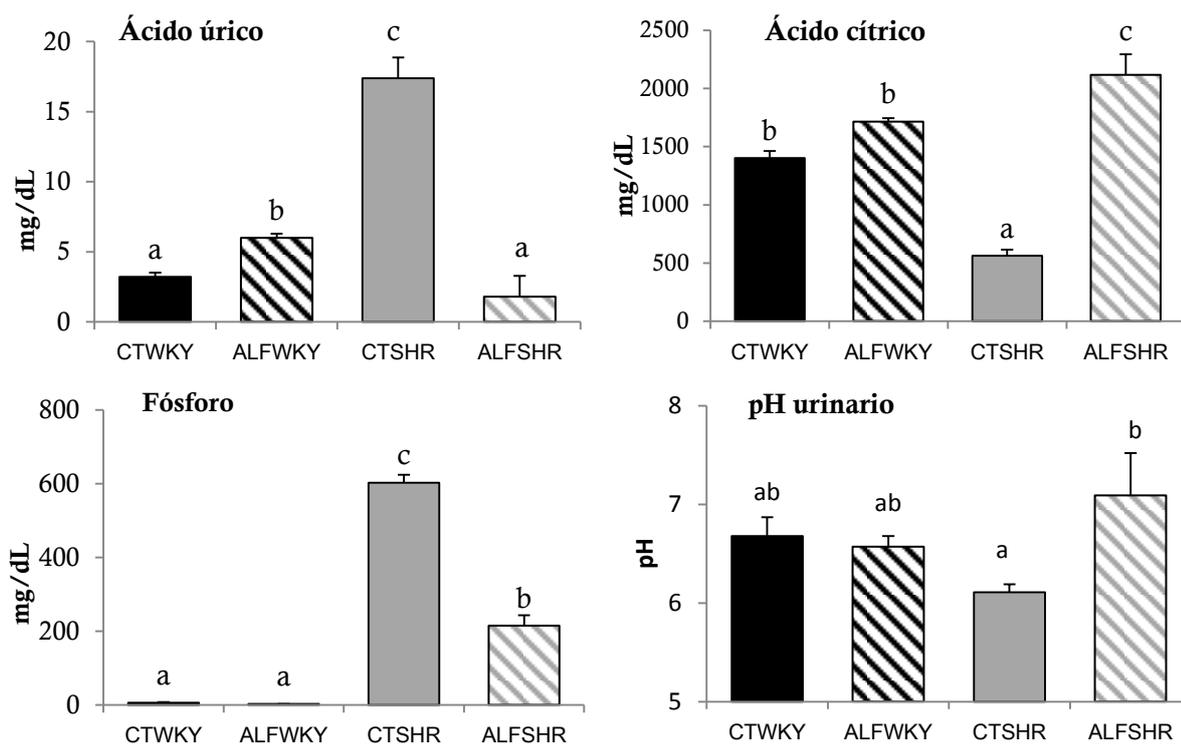


Figura 45. Parámetros urinarios de ácido úrico, ácido cítrico, fósforo y pH de los cuatro grupos experimentales. Las barras representan medias grupales. a,b,c Representan diferencias significativas entre grupos mediante un análisis de subgrupos homogéneos por un test de Tukey ($p < 0,05$).

La determinación de urea plasmática, como desecho metabólico de las proteínas generado en el hígado, también nos indica funcionalidad renal. El consumo de alfalfa promovió un aumento de la concentración de urea en el fenotipo hipertenso lo que pudo empeorar esta funcionalidad renal en relación a la hipertensión.

Metabolismo glucídico.

La hipertensión se encuentra estrechamente relacionada con diversas alteraciones del metabolismo glucídico; en algunos estudios clínicos se ha demostrado que el 50% de los individuos con hipertensión presentaban intolerancia a la glucosa o hiperinsulinemia (Modan et al., 1985). El modelo experimental SHR ha sido ampliamente descrito por un desequilibrio en dicho metabolismo glucídico; en la mayoría de los casos por una hiperinsulinemia en comparación con animales normotensos WKY utilizados como su control (Bhanot and McNeill, 1994; Gouveia et al., 2000; Huang et al., 2013a). Sin embargo, en otros casos no se han encontrado diferencias entre estos grupos de animales (SHR vs WKY), con respecto a las concentraciones plasmáticas de insulina y/o de glucosa (LaPier et al., 2001). Este fue el caso de nuestros animales de experimentación, donde los valores plasmáticos de glucosa fueron muy similares entre los distintos grupos, a excepción del grupo hipertenso que consumió alfalfa, donde el consumo de la leguminosa produjo una muy remarcada disminución de este parámetro (**Figura 46**).

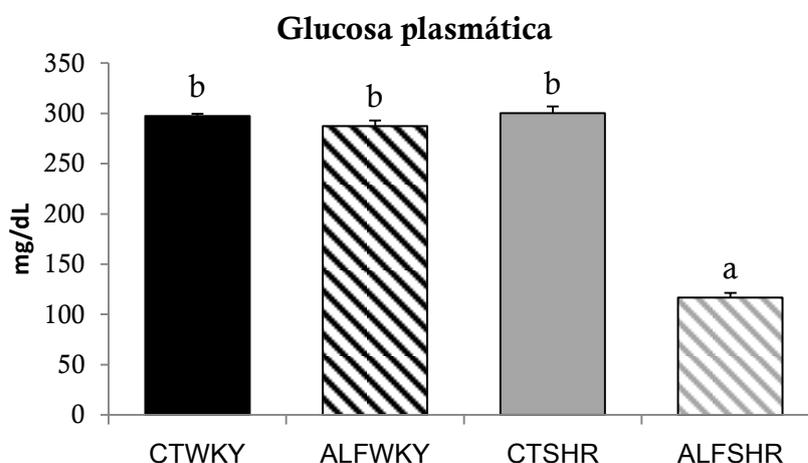


Figura 46. Concentraciones plasmáticas de glucosa de los cuatro grupos experimentales. Las barras representan valores medios grupales (n=8) + EEM. a,b Representan diferencias significativas entre grupos mediante un análisis de subgrupos homogéneos por una test de Tukey ($p<0,05$).

El efecto hipoglucemiante de la alfalfa así como su mecanismo de acción, han sido descritos en modelos experimentales animales de rata y ratón, tanto en los grupos experimentales controles como en los grupos diabéticos (Al-Awadi et al., 2004; Gray and Flatt, 1997; Swanston-Flatt et al., 1990). Sin embargo, al realizar un test de tolerancia a una sobrecarga oral de glucosa (TTOG) la alfalfa mejoró la tolerancia a este azúcar, disminuyendo el área bajo la curva, de los dos grupos de

animales que la consumieron (**Figura 47**), siendo el grupo hipertenso que consumió celulosa el que mayor área bajo la curva tuvo y por tanto la menor tolerancia a la glucosa.

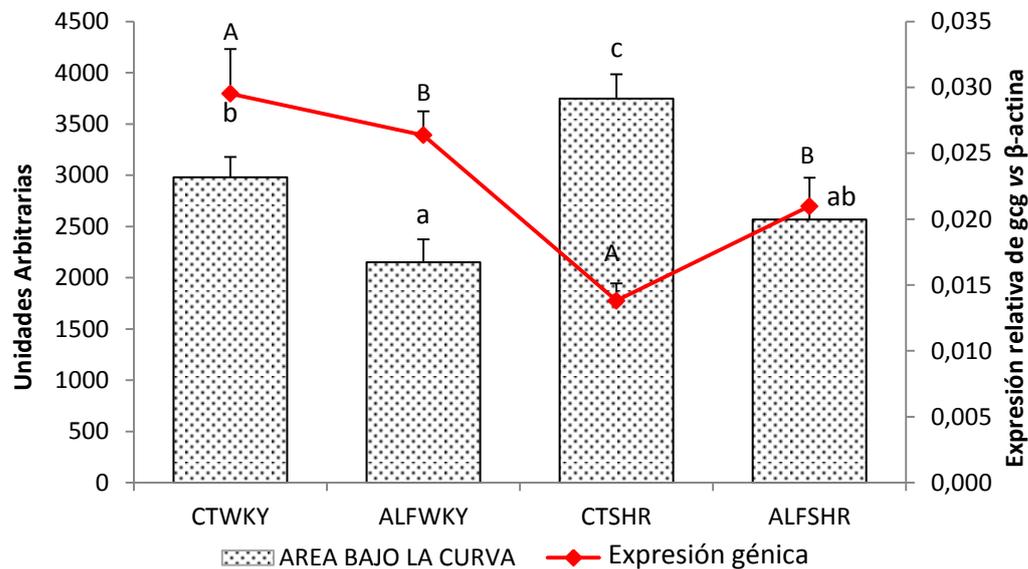


Figura 47. Área bajo la curva tras un test de sobrecarga oral de glucosa y expresión génica relativa de *gcg* en muestras de colon en los cuatro grupos experimentales. Las barras representan valores medios grupales (n=8). a,b,c Representan diferencias significativas entre los grupos experimentales mediante un análisis de subgrupos homogéneos por el test de Tukey ($p < 0,05$).

Esto puede atribuirse a que precisamente en este grupo de animales (CTSHR) la expresión génica de *gcg*, que por procesamiento diferencial postraduccional en colon da lugar al péptido similar al glucagón 1 (GLP-1) (Holst, 2007), fue inferior. Ya que el GLP-1 ha sido descrito como una hormona incretina y contribuye conjuntamente con el péptido GIP a la secreción del 50% de la insulina total secretada (Gribble, 2015); el hecho de que este grupo experimental presentara menor expresión génica (**Figura 22**) podría haber disminuido la secreción de insulina y por tanto haber potenciado la intolerancia a la glucosa. Además como ya se conoce, el GLP-1 es degradado por la enzima dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) unos minutos después de ser secretado, y Nakagami et al., (2014) demostraron que la inhibición de la DPP-IV y por tanto el aumento del tiempo de acción de GLP-1 en un modelo de rata SHR, fue capaz de disminuir el área bajo la curva tras un TTOG. Esto demuestra que disminuyendo la degradación de GLP-1 o, como en nuestro caso, aumentando su expresión génica, podría mejorarse la tolerancia a la glucosa en este modelo. Aunque el mecanismo de acción por el que la alfalfa consiguió aumentar

la expresión de *gcg* en los animales hipertensos con respecto a los normotensos no está claro, se sabe que el péptido GLP-1 es secretado desde las células tipo L del colon. Petersen et al., (2014) demostraron que los ácidos grasos de cadena corta fueron capaces de estimular la diferenciación de las células intestinales hacia células tipo L y ese incremento se vio acompañado de un mayor contenido en GLP-1. El consumo de alfalfa y la fermentación de su fibra, acompañada de la formación de ácidos grasos de cadena corta podría haber contriuido a esta diferenciación celular y por tanto este aumento de la expresión de *gcg*.

Metabolismo lipídico y funcionalidad hepática.

El almacenamiento de grasa hepática es uno de los primeros estadios que llevan a desarrollar la enfermedad de hígado graso no alcohólico, su alta prevalencia en la población ha llevado en multitud de estudios a detectar la asociación con otras alteraciones; entre ellas se ha descrito que el 49% de los pacientes hipertensos presentan hígado graso (López-Suárez et al., 2011). El modelo SHR está asociado con deposición de grasa visceral (Pravenec et al., 2004); lo que conlleva a un aumento del peso del hígado debido principalmente a un aumento de la grasa almacenada. En nuestras condiciones experimentales el modelo hipertenso también mostró un peso del hígado incrementado con respecto a los animales normotensos, si bien la administración de alfalfa consiguió reducir el peso del hígado (probablemente debida al aumento del % de grasa) hasta valores similares a los de los animales normotensos. Al igual que en nuestros resultados, mediante la administración de alfalfa, Kochi et al., (2014) demostraron que la esteatosis hepática puede ser prevenida mediante la administración de catequinas, un antioxidante polifenólico, produciendo una disminución del peso del hígado, así como una disminución de MDA del mismo; por otra parte Xing et al., (2014) consiguieron el mismo resultado con la administración de mangiferina, un compuesto fenólico presente en diversas plantas.

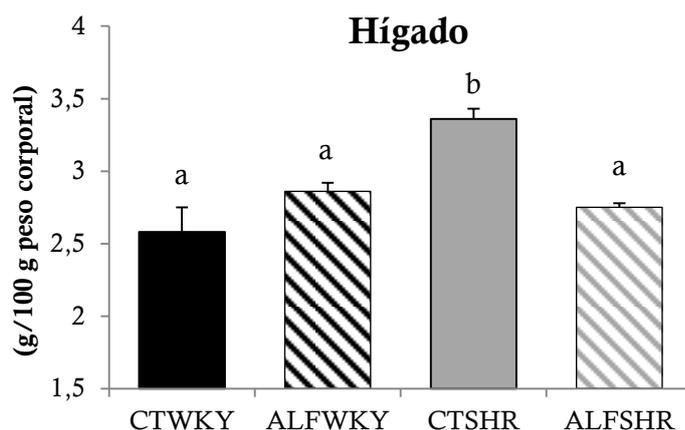


Figura 48. Peso del hígado de los cuatro grupos experimentales. Las barras representan medias grupales. a, b, c Representan diferencias significativas grupales mediante un análisis de subgrupos homogéneos por el test de Tukey ($p < 0,05$).

En relación a los parámetros plasmáticos vinculados con el metabolismo lipídico, se determinaron el colesterol total, c-HDL y c-LDL así como fosfolípidos y triglicéridos. Tanto el colesterol total como HDL y LDL disminuyeron en los animales de fenotipo hipertenso; ha sido descrito para este modelo SHR que debido a un aumento de la excreción de colesterol, combinado con una deficiencia en la captura entérica y transporte molecular, es hipocolesterolémica en comparación con la cepa WKY (Yuan and Kitts, 2002). Además la alfalfa potenció la disminución de los niveles de colesterol total y HDL en los animales de fenotipo hipertenso; efecto que ha sido descrito por otros autores (Khaleel et al., 2005; Shi et al., 2014) y que fue atribuido a la adsorción por parte de la fibra de la leguminosa de los ácidos biliares, propiciando un aumento de la excreción fecal de colesterol.

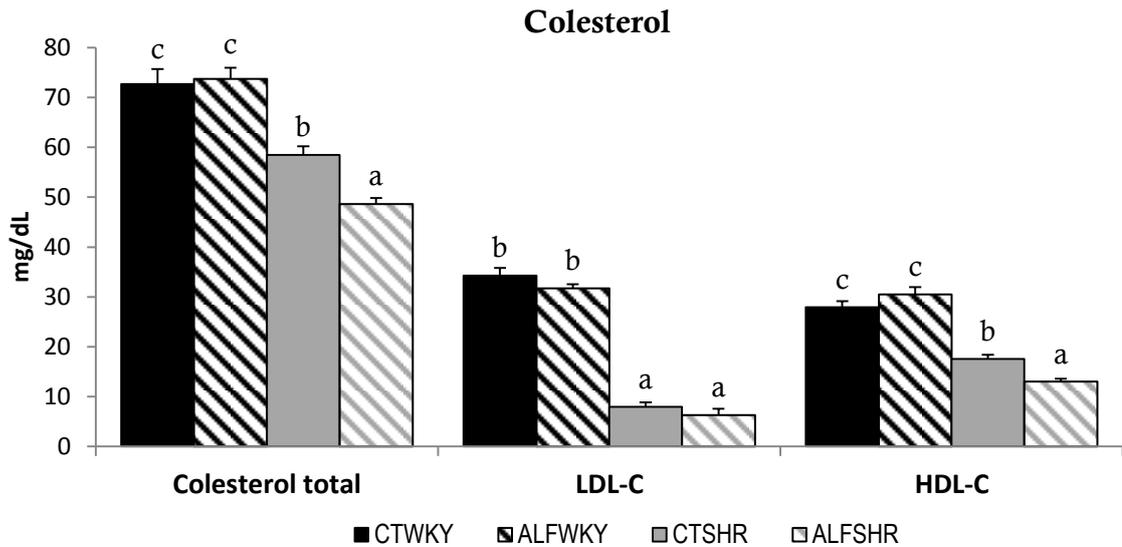


Figura 49. Colesterol total, colesterol LDL y colesterol HDL plasmáticos de los cuatro grupos experimentales. Las barras representan medias grupales ($n=8$) \pm EEM. a, b, c Representan diferencias significativas entre grupos experimentales para un parámetro dado mediante un análisis de subgrupos homogéneos por el test de Tukey ($p < 0,05$).

En cuanto al contenido en triglicéridos plasmáticos, la hipertensión provocó un aumento de este parámetro; aunque la administración de alfalfa promovió un descenso, llegando incluso a valores por debajo de los animales normotensos. Aunque no se conoce el mecanismo por el que se produce esta hipertrigliceridemia, y no todos los autores están de acuerdo, ha sido descrita en diversos trabajos (Iemitsu et al., 2008; Tanaka et al., 2013). La administración de alfalfa fue una intervención dietética que consiguió revertir la situación, siendo este efecto descrito anteriormente en el trabajo llevado a cabo por Shi et al., (2014) en ratas hiperlipidémicas y administrando extractos de saponinas de la alfalfa.

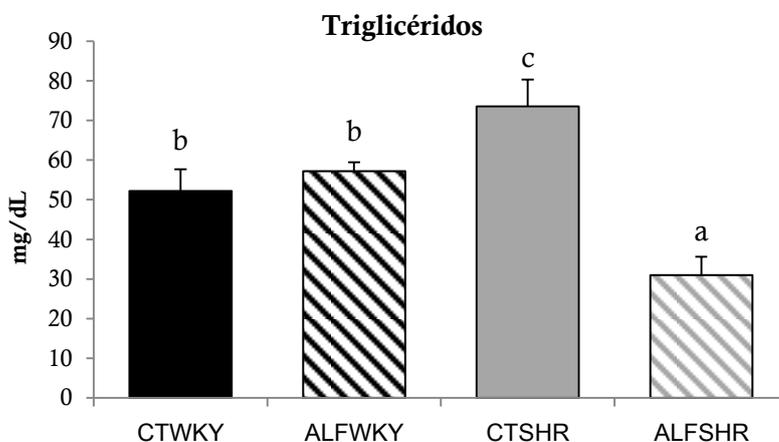


Figura 50. Concentración en plasma de triglicéridos en los cuatro grupo experimentales. Los datos se representan como medias grupales \pm EEM. a, b, c Representan diferencias significativas entre grupos mediante un análisis de subgrupos homogéneos por el test de Tukey ($p < 0,05$).

En cuanto a la funcionalidad hepática las actividades enzimáticas AST, ALT, Gamma GT, fosfatasa alcalina así como el contenido en bilirrubina total (producto de desecho de los grupos hemo de la hemoglobina que se conjuga en el hígado y posteriormente debe ser excretada) fueron determinados. Todas las actividades enzimáticas aumentaron con el desarrollo de la hipertensión, acusando un daño hepático. Ha sido descrita la asociación entre funcionalidad hepática anormal e hipertensión debida principalmente a co-existencia entre hipertensión, hígado graso y resistencia a la insulina (Brookes and Cooper, 2007), situación a la que se vieron expuestos nuestros grupos experimentales hipertensos. Así pues, esta situación conllevó a un aumento de las enzimas AST, ALT, GammaGT y fosfatasa alcalina. Al-Dosari, (2012) describió el efecto hepatoprotector de la administración de alfalfa en ratas con hepatotoxicidad inducida previniendo la elevación plasmática de estas enzimas (ALT, AST, GGT, ALP) así como de la bilirrubina. En nuestras condiciones experimentales y bajo nuestra forma de administración de la leguminosa, la administración de alfalfa en los animales hipertensos impidió que aumentaran las actividades enzimáticas de Gamma GT y fosfatasa alcalina y se mantuvieron en valores similares a los de los animales normotensos; mientras que la bilirrubina disminuyó tanto en los grupos normotensos como los hipertensos que consumieron alfalfa. Sin embargo, las actividades ALT y AST no pudieron ser revertidas, en incluso aumentaron en los grupos hipertensos que consumieron la planta.

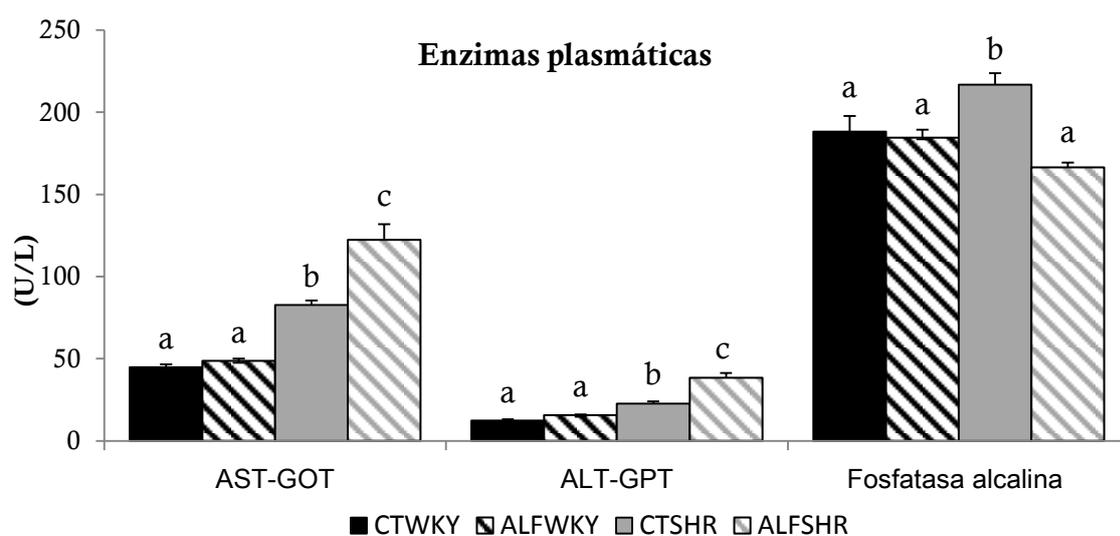


Figura 51. Actividades de las enzimas AST/GOT, ALT/GPT y Fosfatasa alcalina plasmáticas de los cuatro grupos experimentales. Las barras representan medias grupales (n=8). a,b,c Representan diferencias significativas entre grupos mediante un análisis de subgrupo homogéneos por el test de Tukey ($p < 0,05$).

Funcionalidad cardíaca.

Al igual que el sistema renal, el músculo cardíaco juega un papel principal en la hipertensión y el corazón es uno de los órganos que se ve afectado entre otras cosas, en cuanto a su peso. Como ya se comentó en el capítulo de revisión bibliográfica, se produce una hipertrofia del ventrículo izquierdo, lo que conlleva a un aumento de la masa muscular cardíaca. Nuestro modelo experimental mostró un peso del corazón superior en aquellos animales de fenotipo hipertenso SHR; sin que la administración de alfalfa en la dieta pudiera revertir este parámetro. Ha sido descrito y corroborado en varios estudios que este aumento de masa cardíaca se produce en los animales SHR y se ha demostrado que la administración de β -bloqueantes pueden revertir el proceso y disminuir el peso del corazón (Arnalich-Montiel et al., 2014; Quintana-Villamandos et al., 2013). El peso que el fenotipo tiene sobre este parámetro, es difícil de combatir mediante terapias dietéticas ya que parece que sólo el tratamiento farmacológico es efectivo.

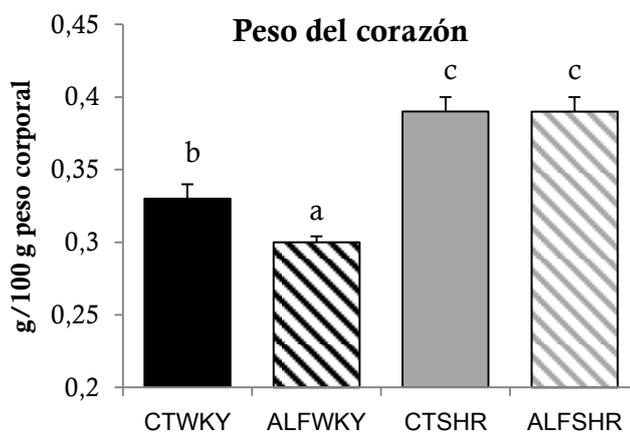


Figura 52. Peso del corazón de los cuatro grupos experimentales. Las barras representan medias grupales. a, b, c Representan diferencias significativas grupales mediante un análisis de subgrupos homogéneos por el test de Tukey ($p < 0,05$).

Además se determinó la actividad plasmática de la enzima Ck-MB como marcadora de daño cardíaco. La hipertensión provocó un aumento de esta actividad que fue parcialmente revertida por el consumo de la alfalfa en los grupos hipertensos, efecto que ha sido descrito anteriormente por Gomathi et al., (2014) donde la administración de extractos etanólicos de la leguminosa promovió una disminución de esta enzima cardíaca.

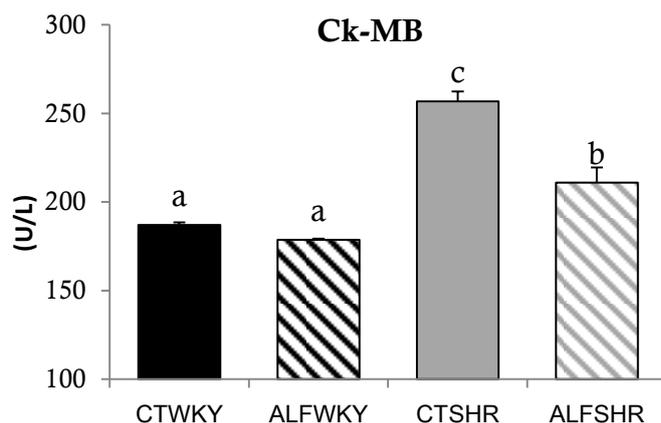


Figura 53. Actividad de la enzima plasmática Ck-MB de los cuatro grupos experimentales. Las barras representan medias grupales. a, b, c Representan diferencias significativas grupales mediante un análisis de subgrupos homogéneos por el test de Tukey ($p < 0,05$).

Actividades enzimáticas antioxidantes y TBARs.

En la patogenia de la hipertensión se ha descrito que ocurre un desequilibrio oxidativo principalmente por el aumento de la formación de ROS. Las fuentes más importantes de estas ROS con respecto a la hipertensión son la xantina oxidasa, la NO sintasa endotelial desacoplada y la NAD(P)H oxidasa. Se ha demostrado mediante numerosos estudios que los pacientes hipertensos presentan en plasma y sangre, altos niveles de ROS (Lacy et al., 1998); las actividades de las enzimas antioxidantes como la SOD y la GPx pueden verse disminuidas (Pedro-Botet et al., 2000); así como la actividad CAT (Redón et al., 2003); además los sujetos hipertensos muestran niveles de GSH más bajos y niveles de GSSG y MDA más altos que los sujetos control no hipertensos. Para estudiar el daño oxidativo producido durante el desarrollo y mantenimiento de la hipertensión en distintos órganos, es necesario llevar a cabo estudios con modelos experimentales animales que desarrollan hipertensión.

En nuestras condiciones experimentales, se determinaron las actividades enzimáticas SOD, CAT, GPx y el contenido en MDA en riñón, ya que juega un papel fundamental en el desarrollo y mantenimiento de hipertensión, y en hígado a causa de que tiene un papel fundamental en el metabolismo, toxicidad y eliminación de componentes exógenos y endógenos; y debido a que las enzimas

antioxidantes tienen el papel de proteger a los tejidos de los radicales libres, es de interés conocer la influencia de la hipertensión sobre la capacidad metabólica del hígado. Se comprobó que los animales con fenotipo hipertenso mostraron tanto en riñón como en hígado una disminución de las actividades enzimáticas SOD-Mn y GPx, mientras que la actividad de la enzima SOD-Cu/Zn se vio disminuída en hígado, mientras que se produjo un aumento en la formación de TBARs en el mismo órgano. Aunque en algunos trabajos la actividad SOD no se ha visto alterada en animales que desarrollaron hipertensión (Sundaram et al., 2013); en otros estudios la actividad de esta enzima disminuyó significativamente en los animales SHR, tanto en hígado como en riñón; además en el mismo estudio también se vio una disminución de la actividad GPx y CAT (Héctor Polizio and Peña, 2005); el tratamiento con Losartan revirtió estos resultados. Esta disminución en la actividad GPx también ha sido descrita por Cediel et al., (2003) donde la disminución de la actividad enzimática se observó en hígado, mientras que Patina et al. (2014) y Sundaram et al., (2013) observaron el mismo resultado en riñón de ratas SHR. Estos resultados han sido corroborados incluso en otros modelos animales experimentales de rata hipertensa, como es el caso del modelo DOCA donde la actividad GPx también fue disminuída (Nicod et al., 2000).

Otro de los parámetros relacionados con estrés oxidativo, es la formación de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico, ó TBARs. En nuestras condiciones experimentales, se observó un aumento de este parámetro en el hígado de los animales con fenotipo hipertenso. La misma tendencia ha sido descrita por otros autores donde el MDA, utilizado como marcador de la peroxidación lipídica, fue mayor en el hígado de las ratas SHR, en comparación con su control WKY (Cediel et al., 2003). Al igual que ha sido descrito para el riñón, donde se observó un aumento tanto del MDA como de ROS en animales hipertensos de 13 semanas de edad (Mattace Raso et al., 2013). En nuestro experimento no encontramos este último efecto, debido quizás a que en los animales SHR el daño renal no se desarrolla hasta una edad más avanzada, y no está instaurado hasta los dos años.

Algunos de los resultados encontrados fueron revertidos al adicionar la alfalfa a las dietas. En ambos órganos, riñón e hígado, el consumo de la alfalfa como fuente de fibra consiguió aumentar la actividad de la enzima GPx y se produjo una

disminución de la concentración de TBARs formadas en el hígado de los animales hipertensos. La actividad antioxidante de la alfalfa ha sido demostrada en diversos estudios; debido a su composición rica en polisacáridos conjugados, se ha descrito que la administración de alfalfa es capaz de reducir la formación de MDA en cultivos celulares de hepatocitos en aves (Wang et al., 2014).

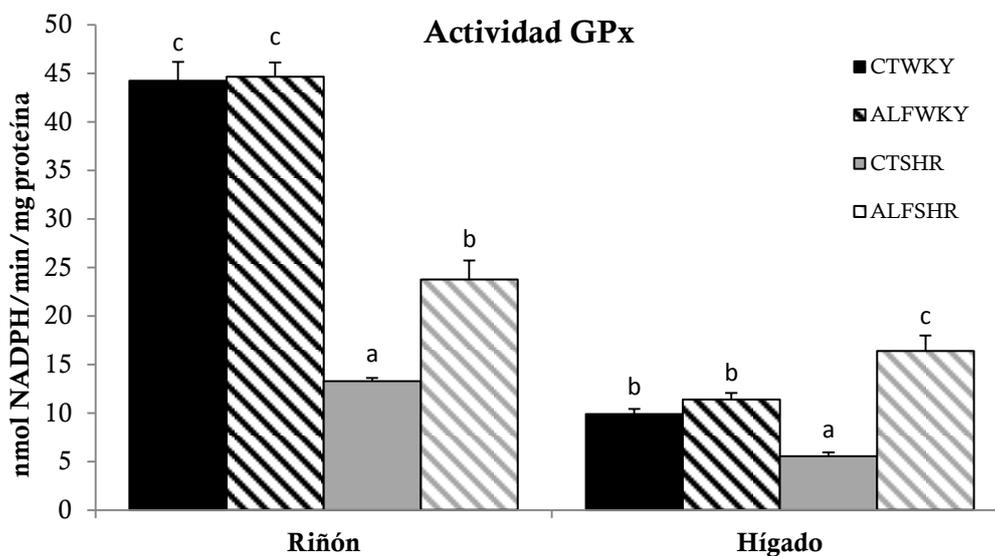


Figura 54. Actividad de la enzima antioxidante GPx en muestras de riñón e hígado. Las barras representan medias grupales (n=8). a,b,c Representan diferencias significativas entre grupos mediante un análisis de subgrupos homogéneos por el test de Tukey ($p < 0,05$).

El efecto ha sido atribuido a la bioactividad de los polisacáridos de la alfalfa que están constituidos en un alto porcentaje por ácidos urónicos, y los ácidos urónicos a su vez son capaces de inhibir hasta un 50% los radicales hidroxilo y los radicales superóxido (Chen et al., 2004) evitando en cierto grado la peroxidación lipídica en hígado y, por tanto disminuyendo la formación de MDA. Además también ha sido descrito que los péptidos extraídos de las hojas de alfalfa tienen la capacidad de atrapar radicales superóxido y radicales hidroxilo *in vitro* (Xie et al., 2008) lo que podría también favorecer la disminución de la peroxidación lipídica observada en los animales hipertensos que consumieron alfalfa. En la composición de la alfalfa ha sido descrita la presencia de diversos flavonoides, estos tienen la capacidad de disminuir los procesos oxidativos gracias a su propiedad de atrapar radicales libres, así Duarte et al. (2001) comprobaron que la administración de quercetina, flavonol presente en la alfalfa, disminuyó la concentración de MDA en hígado de ratas SHR. Otro de los efectos atribuidos a la quercetina fue el de aumentar la actividad enzimática GPx; y una actividad GPx aumentada se relaciona con una

disminución de acúmulo de ROS y por tanto una menor formación de MDA, lo que explicaría los resultados encontrados en nuestro estudio. El aumento de la actividad GPx ocurrió a la vez que disminuyó la actividad CAT en el grupo de animales hipertensos que consumió alfalfa. Las dos enzimas actúan entre otros, sobre el sustrato H_2O_2 , y ha sido descrito que la enzima GPx actúa cuando hay bajas concentraciones de H_2O_2 mientras que la CAT actúa cuando hay altas concentraciones de H_2O_2 (Winterbourn, 2013). Debido a la presencia de flavonoides en la alfalfa es posible que la producción de H_2O_2 por las enzimas SOD haya sido reducida y por tanto la mayor parte de la degradación de peróxido de hidrógeno la haya llevado a cabo la enzima GPx que tuvo una mayor actividad. Por otra parte, como ha sido descrito por Sharma (Bora and Sharma, 2011b) la administración de extractos de alfalfa tuvieron la capacidad de aumentar la concentración de GSH, y debido a que este es limitado en las células a su vez limita la actividad GPx, si se produce un aumento de GSH cabría esperar de igual modo un aumento de la actividad GPx.

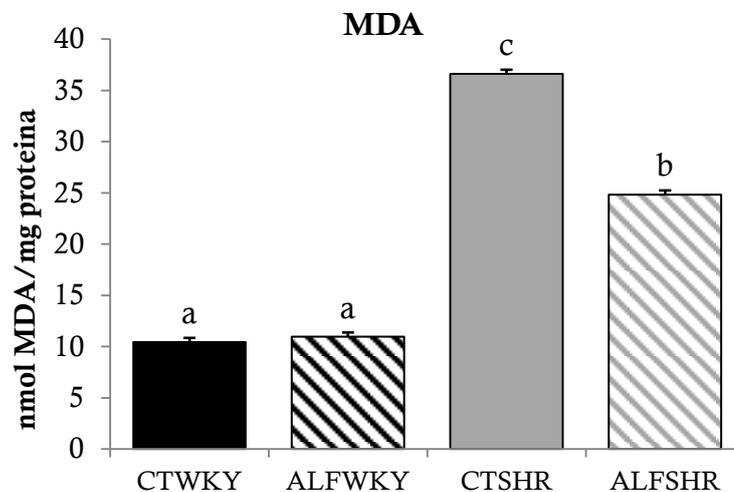


Figura 55. Concentración de MDA como marcador de peroxidación lipídica en hígado de los cuatros grupos experimentales. Las barras representan medias grupales (n=8). a,b,c Representan diferencias significativas entre grupos mediante un análisis de subgrupos homogéneos por el test de Tukey (p<0,05).

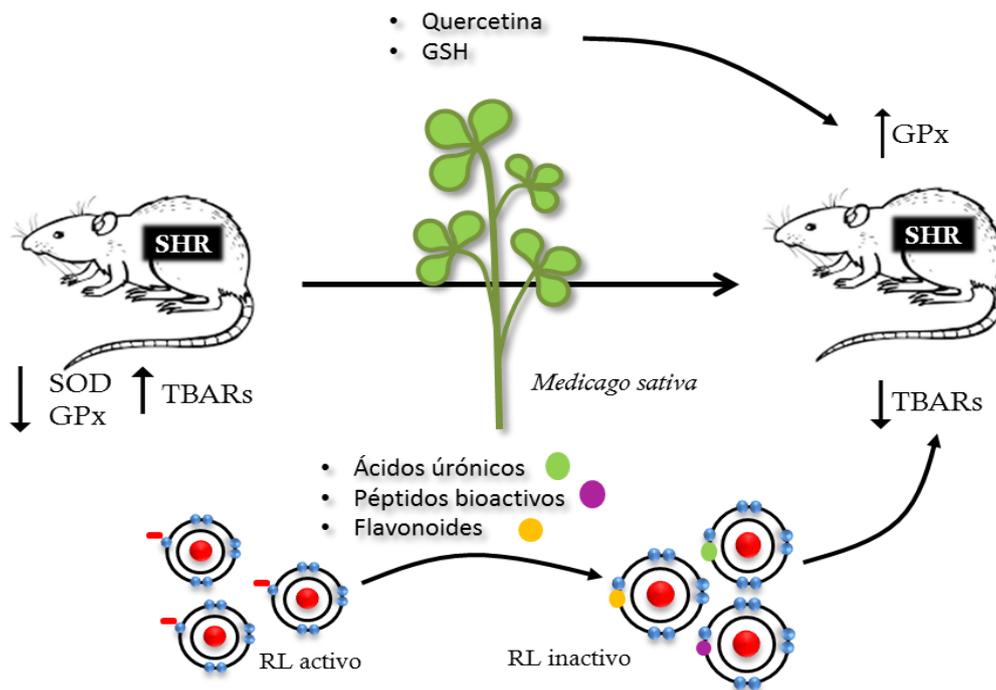


Figura 56. Posible mecanismo de acción de la alfalfa sobre la actividad GPx y la formación de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARs) en hígado de ratas espontáneamente hipertensas (SHR). SOD: superóxido dismutasa; GPx: glutatión peroxidasa; GSH: glutatión; RL: radical libre.

Expresión de nts en muestras de colon.

El péptido neurotensina (NT) fue descubierto por Carraway y Leeman (Carraway and Leeman, 1973). Es expresado en el sistema nervioso central donde actúa como neurotransmisor, y en las células neuroendocrinas del tracto gastrointestinal donde actúa como una hormona local. Su efecto fisiológico y farmacológico depende del tejido o tipo de célula donde actúa, así que la NT en el tracto gastrointestinal modula la motilidad, estimula la secreción intestinal, el crecimiento y la regeneración de la mucosa intestinal y ha sido implicado en la patofisiología del cáncer de colon y de la inflamación intestinal (Zhao et al., 2007). En nuestras condiciones experimentales se produjo una disminución de la expresión génica de *nts* en los animales que se alimentaron con la alfalfa. Aunque con los datos que tenemos hasta ahora no podemos explicar cuál ha sido el efecto fisiológico, derivado o precursor, de esta menor expresión ya que el efecto antiinflamatorio de la alfalfa ha sido descrito (Hong et al., 2009; Rose and Chrisope, 1999), uno de los mecanismos implicados podría estar mediado por la menor expresión intestinal del

péptido NT, que fue superior en los animales que también consumieron alfalfa pero que eran hipertensos.

Expresión del receptor del péptido GLP-1 (*glp1-r*) en riñón y corazón

A parte del efecto de hormona incretina del péptido GLP-1, otra de las funciones fisiológicas que le han sido atribuidas es la de disminuir la presión arterial. Hirata et al., (2009) demostraron que la administración de un inhibidor de la enzima DPP-IV, y por tanto el aumento de la vida media de péptido GLP-1, exhibía una disminución de la presión arterial a través de su interacción con el receptor del péptido GLP-1 en riñón. En este sentido, nuestros animales de experimentación hipertensos tuvieron una expresión génica de *glp1-r* en riñón extremadamente inferior a sus controles normotensos por lo que la interacción del péptido con su receptor fue menor. Ha sido descrito que los animales hipertensos SHR poseen una menor expresión del receptor de GLP-1 en las arterias renales con respecto a sus controles normotensos WKY (Liu et al., 2012), por lo que nuestros resultados reafirmar este hallazgo.

Este receptor también se expresa en los vasos sanguíneos y en el corazón, aunque su expresión es diferencial y se localiza esencialmente en la zona atrial. Se ha demostrado recientemente que su activación en esta zona promueve la secreción del péptido natriurético atrial y provoca una disminución de la presión arterial (Kim et al., 2013). Nuestros resultados muestran una menor expresión en el grupo hipertenso que consumió celulosa en comparación con su control hipertenso, lo que podría significar que en los animales hipertensos, al igual que ocurría con el receptor del péptido en riñón, su expresión está disminuida. Aunque bajo nuestras condiciones experimentales, debido a la baja expresión de *glp1-r* que encontramos y por tanto, la desviación tan alta de los distintos grupos experimentales es difícil exponer resultados concluyentes.

6. CONCLUSIONES

FASE I.

Nuestros resultados sugieren que la co-inoculación de *H. maura* y *E. meliloti* potencia la productividad de la *M. sativa* y revela la eficacia de *H. maura* para mejorar el crecimiento y la productividad de la alfalfa en suelos salinos, esto podría contribuir a una mejor explotación agraria de zonas de baja productividad. *H. maura* puede ser considerada como un candidato para ser usada en la formulación de bioinoculantes y además contribuir a la posible reducción del sobreuso de fertilizantes químicos y su impacto medioambiental.

1. La co-inoculación de las plantas de *Medicago sativa* con *E. meliloti* y *H. maura*, cultivada en invernadero bajo condiciones de salinidad específicas similares a las de suelos Solonchak órtico, resultó en una mejora del crecimiento y propiedades fisiológicas de la planta (potencial hídrico y leghemoglobina) con respecto a las plantas inoculadas sólo con *E. meliloti*.
2. En los experimentos en invernadero, la co-inoculación también mejoró las propiedades nutricionales de las plantas referidas a contenido en nitrógeno, cenizas totales, calcio y magnesio.
3. En los experimentos en campo caracterizado como Solonchak órtico, la co-inoculación produjo un incremento de la productividad mayor que el observado en invernadero, siendo un 50% mayor que el tratamiento control.
4. Las propiedades funcionales de *M. sativa* mejoraron tanto en los experimentos realizados en invernadero y en campo. En invernadero, tanto la co-inoculación como la salinidad produjeron una mejora de la actividad antioxidante determinada mediante la capacidad de inhibición de la peroxidación lipídica. El cultivo en suelo Solonchak aumentó en el contenido de polifenoles totales de *Medicago sativa* con respecto a las plantas cultivadas sin adición de sales.

FASE 2.

La alfalfa cultivada en suelos salinos supone una importante fuente de aporte de minerales, fibra y diversos componentes no nutricionales que repercuten en una

mejor regulación del metabolismo glucídico y lipídico y en un mayor contenido mineral en hueso y músculo. Estos beneficios se complementan con su actividad beneficiosa en el control de la presión arterial y el daño cardíaco relacionado y en un mejor estado antioxidante. Por todo esto, la alfalfa se puede considerar un buen suplemento dietético para distintas situaciones fisiológicas y patológicas.

FASE 2.1.

5. El menor crecimiento de los animales a la ingesta de alfalfa como única fuente de proteína de la dieta se relaciona con una peor digestibilidad intrínseca de dicha proteína y la presencia de componentes no nutricionales como las saponinas.
6. La mejora de los parámetros plasmáticos relacionados con el metabolismo glucídico y lipídico (glucosa, triglicéridos, colesterol total, LDL y HDL) y el menor peso del hígado de los animales tras la ingesta de dieta con alfalfa se puede asociar efecto de la fibra y componentes no nutricionales del tipo de polifenoles aportados.
7. El consumo de la dieta formulada con alfalfa, inoculada con *E. meliloti* así como la alfalfa inoculada con *E. meliloti* y *H. maura*, aumenta la utilización nutritiva de magnesio y mejora la salud ósea y el contenido mineral del músculo esquelético.

FASE 2.2

8. El modelo experimental SHR desarrolló hipertensión aumentando el grado de severidad a lo largo del período experimental. La administración de la alfalfa produjo una disminución de la presión arterial de los animales hipertensos SHR y de la enzima Ck-MB, marcadora de daño cardíaco, atribuidas a la presencia de quercetina en estas plantas. El consumo de alfalfa también disminuyó el riesgo de nefrolitiasis, reduciendo la excreción de P urinaria y aumentando el pH de la orina así como la excreción de citratos.
9. El modelo hipertenso mostró una intolerancia a la glucosa con una mayor área bajo la curva, así como una menor expresión del proglucagon (*gcg*) en colon. La administración de alfalfa revirtió estos dos parámetros, y disminuyó la concentración de glucosa plasmática. Por otra parte, este

tratamiento dietético tuvo una repercusión positiva sobre el metabolismo lipídico de los animales hipertensos al disminuir el peso del hígado, los triglicéridos y colesterol plasmáticos.

10. El consumo de alfalfa causó también un efecto positivo sobre el estado antioxidante de riñón e hígado en los animales hipertensos, aumentando la actividad enzimática GPx en ambos órganos y disminuyendo la peroxidación lipídica a nivel hepático.

6. CONCLUSIONS.

PHASE I

Our results suggest that the co-inoculation of *H. maura* and *E. meliloti* enhance alfalfa productivity and reveal the efficacy of *H. maura* to improve the growth and yield of alfalfa in saline soils, thus contributing to a better agricultural exploitation of low productive areas. *H. maura* may be considered as a candidate to be used in formulation as bioinoculant and therefore contribute to a possible reduction of overuse of chemical fertilizers and their environmental impacts.

1. The co-inoculation of the plants of *Medicago sativa* with both *E. meliloti* and *H. maura*, cultivated in a greenhouse and under specific salinity conditions similar to the ones of Solonchak órtic soil, resulted in an improvement of plant growth and their physiologic properties (water potential and leghemoglobin) compared to the plants inoculated only with *E. meliloti*.
2. Regarding the greenhouse experiments, co-inoculation also improved the nutritional properties of the plants such as nitrogen content, total ash content, calcium and magnesium.
3. Regarding field experiments carried out in Solonchak órtic soil, co-inoculation with both bacteria produced a 50% greater increase of plant productivity compared to the control treatment; such increase being higher than the one of the greenhouse.
4. There has been observed an improvement of functional properties of *M. sativa* in the experiments carried out in greenhouse as well as the ones carried out in the field. Specifically, in greenhouse there was observed an improvement of antioxidant capacity as determined by the inhibition of lipid peroxidation due to both inoculation and salinity. In the field crop, in Solonchak soil, the content of total polyphenols was found increased compared to the plants that were cultivated without any addition of salts.

FASE 2.

Alfalfa cultivated in saline soils is an important source of minerals, fibre and various non-nutritional components that result in a better regulation of glucose and lipid metabolism as well as in a greater mineral content of bone and muscle. Such

benefits are complemented by the improvements that alfalfa induces in the regulation of blood pressure and heart damage both linked to an improved antioxidant status. Therefore, alfalfa can be considered as a good dietetic supplement in diverse physiologic and pathologic situations.

FASE 2.1.

5. The lower body weight of the animals that consumed the diet of alfalfa as a unique source of protein in the diet is associated with the lower intrinsic digestibility of this protein and the presence of non-nutritional components such as saponins.
6. The animals that consumed the alfalfa diet showed improved plasma parameters related to glucose and lipid metabolism (concentration of glucose, triglycerides, total-, LDL- and HDL cholesterol) as well as lower liver weight, which can be associated with the effect of fibre and non nutritional components, such as polyphenols, provided by the specific diet.
7. The consumption of alfalfa inoculated with *E. meliloti*, as well as the diet inoculated with both *E. meliloti* and *H. maura*, increased the nutritional utilisation of magnesium and improves bone health status and the mineral content of skeletal muscle.

PHASE 2.2

8. The experimental model of SHR developed hypertension with time-dependent increase severity throughout the experimental period. The administration of alfalfa produced a decrease of blood pressure of the hypertensive animals SHR, attributed in the presence of quercetin in these plants. The consumption of alfalfa also decreased the enzyme Ck-MB, a marker of heart damage, and the risk of nephrolithiasis, by decreasing the excretion of phosphorus and increasing the urine pH as well as the excretion of citrates.
9. The hypertensive model, showed glucose intolerance with a greater area under the curve, as well as a lower expression of proglucagon (*gcg*) in colon. The administration of alfalfa reverted these parameters and decreased the concentration of glucose in plasma. Moreover, such dietetic treatment had a

positive impact on lipid metabolism of hypertensive animals reducing liver weight, triglyceride content and concentration of cholesterol in plasma.

10. The consumption of alfalfa induced a positive effect on antioxidant status of kidney and liver of hypertensive animals, increasing the antioxidant activity of GPx in both organs and decreasing lipid peroxidation of liver.

7. REFERENCIAS.

- Adebawo, O.O., Salau, B.A., Adeyanju, M.M., and Famodu, A.A. & O. (2007). Fruits and vegetables moderate blood pressure, fibrinogen concentration and plasma viscosity in Nigerian hypertensives. *Afr. J. Food Agric. Nutr. Dev.* 7.
- Adrogué, H.J., and Madias, N.E. (2014). Sodium surfeit and potassium deficit: Keys to the pathogenesis of hypertension. *J. Am. Soc. Hypertens.* 8, 203–213.
- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126.
- AEFA (2012). A.E.F.A. – Asociación Española de fabricantes de Alfalfa Deshidratada » El Cultivo de la Alfalfa.
- Aguilar J, A.J. (1990). Proyecto Lucdeme: mapa de suelos: escala 1:100.000: Baza-994 (MURCIA: ICONA).
- Ahmad, M., Zahir, Z.A., Asghar, H.N., and Asghar, M. (2011). Inducing salt tolerance in mung bean through coinoculation with rhizobia and plant-growth-promoting rhizobacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Can. J. Microbiol.* 57, 578–589.
- Ahmad, M., Zahir, Z.A., Khalid, M., Nazli, F., and Arshad, M. (2013). Efficacy of Rhizobium and Pseudomonas strains to improve physiology, ionic balance and quality of mung bean under salt-affected conditions on farmer's fields. *Plant Physiol. Biochem. PPB Société Fr. Physiol. Végétale* 63, 170–176.
- Akama, K., Kanetou, J., Shimosaki, S., Kawakami, K., Tsuchikura, S., and Takaiwa, F. (2009). Seed-specific expression of truncated OsGAD2 produces GABA-enriched rice grains that influence a decrease in blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Transgenic Res.* 18, 865–876.
- Akaogi, J., Barker, T., Kuroda, Y., Nacionales, D.C., Yamasaki, Y., Stevens, B.R., Reeves, W.H., and Satoh, M. (2006). Role of non-protein amino acid l-canavanine in autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* 5, 429–435.
- Akira, K., Masu, S., Imachi, M., Mitome, H., Hashimoto, M., and Hashimoto, T. (2008). ¹H NMR-based metabolomic analysis of urine from young spontaneously hypertensive rats. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46, 550–556.
- Alagawadi, A.R., and Gaur, A.C. (1988). Associative effect of Rhizobium and phosphate-solubilizing bacteria on the yield and nutrient uptake of chickpea. *Plant Soil* 105, 241–246.
- Ben Ali Gam, Z., Abdelkafi, S., Casalot, L., Tholozan, J.L., Oueslati, R., and Labat, M. (2007). *Modicisalibacter tunisiensis* gen. nov., sp. nov., an aerobic, moderately halophilic bacterium isolated from an oilfield-water injection sample, and emended description of the family Halomonadaceae Franzmann et al. 1989 emend Dobson and Franzmann 1996 emend. Ntougias et al. 2007. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 2307–2313.
- Allison, L.E. (1973). Oversaturation Method for Preparing Saturation Extracts for Salinity Appraisal. *Soil Sci.* 116.

- Amenta, F., and Tomassoni, D. (2011). Spontaneously Hypertensive Rat (SHR): An Animal Model of Vascular Brain Disorder. In *Animal Models of Dementia*, P.P.D. Deyn, and D.V. Dam, eds. (Humana Press), pp. 577–611.
- Anan'ina, L.N., Plotnikova, E.G., Gavrish, E.Y., Demakov, V.A., and Evtushenko, L.I. (2007). *Salinicola socius* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic bacterium from a naphthalene-utilizing microbial association. *Microbiology* 76, 324–330.
- Appel, L.J., Moore, T.J., Obarzanek, E., Vollmer, W.M., Svetkey, L.P., Sacks, F.M., Bray, G.A., Vogt, T.M., Cutler, J.A., Windhauser, M.M., et al. (1997). A Clinical Trial of the Effects of Dietary Patterns on Blood Pressure. *N. Engl. J. Med.* 336, 1117–1124.
- Arahal, D.R., Castillo, A.M., Ludwig, W., Schleifer, K.H., and Ventosa, A. (2002a). Proposal of *Cobetia marina* gen. nov., comb. nov., within the Family Halomonadaceae, to Include the Species *Halomonas marina*. *Syst. Appl. Microbiol.* 25, 207–211.
- Arahal, D.R., Ludwig, W., Schleifer, K.H., and Ventosa, A. (2002b). Phylogeny of the family Halomonadaceae based on 23S and 16S rDNA sequence analyses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 241–249.
- Aranda, P., Lopez-Jurado, M., Llopis, J., Mataix, F.J., and Urbano, G. (1987). Nutritive utilization of Ca and Mg in Mg-deficient rats: a recovery study. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* 33, 451–459.
- Araujo, M., and Wilcox, C.S. (2014). Oxidative Stress in Hypertension: Role of the Kidney. *Antioxid. Redox Signal.* 20, 74–101.
- Argandoña, M., Fernández-Carazo, R., Llamas, I., Martínez-Checa, F., Caba, J.M., Quesada, E., and del Moral, A. (2005). The moderately halophilic bacterium *Halomonas maura* is a free-living diazotroph. *FEMS Microbiol. Lett.* 244, 69–74.
- Arias, S., Moral, A. del, Ferrer, M.R., Tallon, R., Quesada, E., and Béjar, V. (2003). Mauran, an exopolysaccharide produced by the halophilic bacterium *Halomonas maura*, with a novel composition and interesting properties for biotechnology. *Extremophiles* 7, 319–326.
- Arnalich-Montiel, A., González, M.C., Delgado-Baeza, E., Delgado-Martos, M.J., Condezo-Hoyos, L., Martos-Rodríguez, A., Rodríguez-Rodríguez, P., and Quintana-Villamandos, B. (2014). Short-Term Esmolol Improves Coronary Artery Remodeling in Spontaneously Hypertensive Rats through Increased Nitric Oxide Bioavailability and Superoxide Dismutase Activity. *BioMed Res. Int.* 2014.
- Ashagrie, Y., Zech, W., Guggenberger, G., and Mamo, T. (2007). Soil aggregation, and total and particulate organic matter following conversion of native forests to continuous cultivation in Ethiopia. *Soil Tillage Res.* 94, 101–108.
- Ashley Jr., F.W., and Kannel, W.B. (1974). Relation of weight change to changes in atherogenic traits: The Framingham study. *J. Chronic Dis.* 27, 103–114.
- Asif, M., Rooney, L.W., Ali, R., and Riaz, M.N. (2013). Application and Opportunities of Pulses in Food System: A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 53, 1168–1179.

- Avato, P., Bucci, R., Tava, A., Vitali, C., Rosato, A., Bialy, Z., and Jurzysta, M. (2006). Antimicrobial activity of saponins from *Medicago* sp.: structure-activity relationship. *Phytother. Res.* *20*, 454–457.
- Al-Awadi, F. m., Anim, J. t., Srikumar, T. s., and Al-Rustom, M. (2004). Possible role of trace elements in the hypoglycemic effect of plants extract in diabetic rats. *J. Trace Elem. Exp. Med.* *17*, 31–44.
- Awhin, E.P., Jeroh, E., Anigboro, A.A., and Rachael, N. (2013). Effect of chronic consumption of *Piliostigma thonningii* on activities of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase in serum and liver in *Rattus norvegicus*. *Pak. J. Biol. Sci. PJBS* *16*, 2062–2065.
- Baaij, J.H.F. de, Hoenderop, J.G.J., and Bindels, R.J.M. (2015). Magnesium in Man: Implications for Health and Disease. *Physiol. Rev.* *95*, 1–46.
- Balde, A.T., Vandersall, J.H., Erdman, R.A., Reeves III, J.B., and Glenn, B.P. (1993). Effect of stage of maturity of alfalfa and orchardgrass on in situ dry matter and crude protein degradability and amino acid composition. *Anim. Feed Sci. Technol.* *44*, 29–43.
- Barahona E (1974). Arcillas de ladrería de la provincia de Granada: evaluación de algunos ensayos de materias primas (España).
- Barber, A., and Ponz, F. (1998). *Principios de Fisiología Animal - 14* (España: Editorial Síntesis S.A.).
- Barrios-Ramos, J.P., Garduño-Siciliano, L., Loredó, M., Chamorro-Cevallos, G., and Jaramillo-Flores, M.E. (2012). The effect of cocoa, soy, oats and fish oil on metabolic syndrome in rats. *J. Sci. Food Agric.* *92*, 2349–2357.
- Baudh, K., and Singh, R.P. (2012). Growth, tolerance efficiency and phytoremediation potential of *Ricinus communis* (L.) and *Brassica juncea* (L.) in salinity and drought affected cadmium contaminated soil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* *85*, 13–22.
- Baylis, C., Mitruka, B., and Deng, A. (1992). Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J. Clin. Invest.* *90*, 278–281.
- Beltrán-Debón, R., Rull, A., Rodríguez-Sanabria, F., Iswaldi, I., Herranz-López, M., Aragonès, G., Camps, J., Alonso-Villaverde, C., Menéndez, J.A., Micol, V., et al. (2011). Continuous administration of polyphenols from aqueous rooibos (*Aspalathus linearis*) extract ameliorates dietary-induced metabolic disturbances in hyperlipidemic mice. *Phytomedicine Int. J. Phytother. Phytopharm.* *18*, 414–424.
- Beringer, J.E. (1974). R Factor Transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* *84*, 188–198.
- Bhanot, S., and McNeill, J.H. (1994). Vanadyl sulfate lowers plasma insulin and blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* *24*, 625–632.
- Bhattarai, S.P., and Midmore, D.J. (2009). Oxygenation enhances growth, gas exchange and salt tolerance of vegetable soybean and cotton in a saline vertisol. *J. Integr. Plant Biol.* *51*, 675–688.
- Bora, K.S., and Sharma, A. (2011a). Phytochemical and pharmacological potential of *Medicago sativa*: a review. *Pharm. Biol.* *49*, 211–220.

- Bora, K.S., and Sharma, A. (2011b). Evaluation of Antioxidant and Cerebroprotective Effect of *Medicago sativa* Linn. against Ischemia and Reperfusion Insult. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM* 2011, 792167.
- Bora, K.S., and Sharma, A. (2011c). Bioactivity-Directed Separation of an Anxiolytic Fraction from *Medicago sativa* Linn. *JPBMS* 8.
- Bouchotroch, S., Quesada, E., Moral, A. del, Llamas, I., and Béjar, V. (2001). *Halomonas maura* sp. nov., a novel moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 1625–1632.
- Bouhmouch, I., Souad-Mouhsine, B., Brhada, F., and Aurag, J. (2005). Influence of host cultivars and Rhizobium species on the growth and symbiotic performance of *Phaseolus vulgaris* under salt stress. *J. Plant Physiol.* 162, 1103–1113.
- Brockwell, J., Bottomley, P., and Thies, J. (1995). Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility: A critical assessment. *Plant Soil* 174, 143–180.
- Brookes, M.J., and Cooper, B.T. (2007). Hypertension and fatty liver: guilty by association? *J. Hum. Hypertens.* 21, 264–270.
- Burns, R.A., LeFaivre, M.H., and Milner, J.A. (1982). Effects of Dietary Protein Quantity and Quality on the Growth of Dogs and Rats. *J. Nutr.* 112, 1843–1853.
- Carraway, R., and Leeman, S.E. (1973). The isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalami. *J. Biol. Chem.* 248, 6854–6861.
- Carretero, O.A., and Oparil, S. (2000). Essential Hypertension Part I: Definition and Etiology. *Circulation* 101, 329–335.
- Cassidy, M.M., Lightfoot, F.G., Grau, L.E., Story, J.A., Kritchevsky, D., and Vahouny, G.V. (1981). Effect of chronic intake of dietary fibers on the ultrastructural topography of rat jejunum and colon: a scanning electron microscopy study. *Am. J. Clin. Nutr.* 34, 218–228.
- De Cavanagh, E.M.V., Toblli, J.E., Ferder, L., Piotrkowski, B., Stella, I., Fraga, C.G., and Inserra, F. (2005). Angiotensin II blockade improves mitochondrial function in spontaneously hypertensive rats. *Cell. Mol. Biol. Noisy--Gd. Fr.* 51, 573–578.
- Cediel, E., Sanz-Rosa, D., Oubiña, M.P., Heras, N. de las, Pacheco, F.R.G., Vegazo, O., Jiménez, J., Cachofeiro, V., and Lahera, V. (2003). Effect of AT1 receptor blockade on hepatic redox status in SHR: possible relevance for endothelial function? *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 285, R674–R681.
- Chan, Q., Stamler, J., Brown, I.J., Daviglus, M.L., Van Horn, L., Dyer, A.R., Oude Griep, L.M., Miura, K., Ueshima, H., Zhao, L., et al. (2014). Relation of raw and cooked vegetable consumption to blood pressure: the INTERMAP Study. *J. Hum. Hypertens.* 28, 353–359.
- Chen, H., Zhang, M., and Xie, B. (2004). Quantification of uronic acids in tea polysaccharide conjugates and their antioxidant properties. *J. Agric. Food Chem.* 52, 3333–3336.
- Chen, P.S., Toribara, T.Y., and Warner, H. (1956). Microdetermination of Phosphorus. *Anal. Chem.* 28, 1756–1758.

- Cheng, Q. (2008). Perspectives in biological nitrogen fixation research. *J. Integr. Plant Biol.* *50*, 786–798.
- Colla, G., Roupshael, Y., Cardarelli, M., Svecova, E., Rea, E., and Lucini, L. (2013). Effects of saline stress on mineral composition, phenolic acids and flavonoids in leaves of artichoke and cardoon genotypes grown in floating system. *J. Sci. Food Agric.* *93*, 1119–1127.
- Conrad, C.H., Brooks, W.W., Hayes, J.A., Sen, S., Robinson, K.G., and Bing, O.H. (1995). Myocardial fibrosis and stiffness with hypertrophy and heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Circulation* *91*, 161–170.
- D'Addabbo, T., Carbonara, T., Leonetti, P., Radicci, V., Tava, A., and Avato, P. (2011). Control of plant parasitic nematodes with active saponins and biomass from *Medicago sativa*. *Phytochem. Rev.* *10*, 503–519.
- Dahl, L.K., Heine, M., and Tassinari, L. (1962). Role of Genetic Factors in Susceptibility to Experimental Hypertension due to Chronic Excess Salt Ingestion. *Nature* *194*, 480–482.
- Dai, F.-J., Hsu, W.-H., Huang, J.-J., and Wu, S.-C. (2013). Effect of pigeon pea (*Cajanus cajan* L.) on high-fat diet-induced hypercholesterolemia in hamsters. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* *53*, 384–391.
- Davey, M.E., and O'toole, G.A. (2000). Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *64*, 847–867.
- Day, D.A., Poole, P.S., Tyerman, S.D., and Rosendahl, L. (2001). Ammonia and amino acid transport across symbiotic membranes in nitrogen-fixing legume nodules. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *58*, 61–71.
- Demirci, F., and Dolar, F.S. (2006). Effects of Some Plant Materials on Phytophthora Blight (*Phytophthora capsici* Leon.) of Pepper. *Turk. J. Agric. For.* *30*, 247–252.
- Dewanto, V., Wu, X., Adom, K.K., and Liu, R.H. (2002). Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* *50*, 3010–3014.
- DiBona, G.F., and Jones, S.Y. (2001). Dynamic Analysis of Renal Nerve Activity Responses to Baroreceptor Denervation in Hypertensive Rats. *Hypertension* *37*, 1153–1163.
- Dickhout, J.G., and Lee, R.M.K.W. (1998). Blood pressure and heart rate development in young spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* *274*, H794–H800.
- Dinh, Q.N., Drummond, G.R., Sobey, C.G., and Chrissobolis, S. (2014). Roles of Inflammation, Oxidative Stress, and Vascular Dysfunction in Hypertension. *BioMed Res. Int.* *2014*, e406960.
- Dobson, S.J., and Franzmann, P.D. (1996). Unification of the Genera *Deleya* (Baumann et al. 1983), *Halomonas* (Vreeland et al. 1980), and *Halovibrio* (Fendrich 1988) and the Species *Paracoccus halodenitrificans* (Robinson and Gibbons 1952) into a Single Genus, *Halomonas*, and Placement of the Genus *Zymobacter* in the Family Halomonadaceae. *Int. J. Syst. Bacteriol.* *46*, 550–558.
- Doggrell, S.A., and Brown, L. (1998). Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc. Res.* *39*, 89–105.

- Domínguez-Ferreras, A., Muñoz, S., Olivares, J., Soto, M.J., and Sanjuán, J. (2009). Role of Potassium Uptake Systems in *Sinorhizobium meliloti* Osmoadaptation and Symbiotic Performance. *J. Bacteriol.* *191*, 2133–2143.
- Dong, X.F., Gao, W.W., Tong, J.M., Jia, H.Q., Sa, R.N., and Zhang, Q. (2007). Effect of polysavone (alfalfa extract) on abdominal fat deposition and immunity in broiler chickens. *Poult. Sci.* *86*, 1955–1959.
- Dong, X.F., Gao, W.W., Su, J.L., Tong, J.M., and Zhang, Q. (2011). Effects of dietary polysavone (Alfalfa extract) and chlortetracycline supplementation on antioxidation and meat quality in broiler chickens. *Br. Poult. Sci.* *52*, 302–309.
- Dornas, W.C., and Silva, M.E. (2011). Animal models for the study of arterial hypertension. *J. Biosci.* *36*, 731–737.
- Al-Dosari, M.S. (2012). In vitro and in vivo antioxidant activity of alfalfa (*Medicago sativa* L.) on carbon tetrachloride intoxicated rats. *Am. J. Chin. Med.* *40*, 779–793.
- Duarte, J., Galisteo, M., Ocete, M.A., Pérez-Vizcaino, F., Zarzuelo, A., and Tamargo, J. (2001). Effects of chronic quercetin treatment on hepatic oxidative status of spontaneously hypertensive rats. *Mol. Cell. Biochem.* *221*, 155–160.
- Duranti, M. (2006). Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia* *77*, 67–82.
- Eddouks, M., Maghrani, M., Zeggwagh, N.-A., Haloui, M., and Michel, J.-B. (2005). *Fraxinus excelsior* L. evokes a hypotensive action in normal and spontaneously hypertensive rats. *J. Ethnopharmacol.* *99*, 49–54.
- Eidi, A., Eidi, M., and Sokhteh, M. (2007). Effect of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L) seeds on serum parameters in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Nutr. Res.* *27*, 728–733.
- Elmer, P.J., Obarzanek, E., Vollmer, W.M., Simons-Morton, D., Stevens, V.J., Young, D.R., Lin, P.-H., Champagne, C., Harsha, D.W., Svetkey, L.P., et al. (2006). Effects of Comprehensive Lifestyle Modification on Diet, Weight, Physical Fitness, and Blood Pressure Control: 18-Month Results of a Randomized Trial. *Ann. Intern. Med.* *144*, 485–495.
- Ely, D.L., and Turner, M.E. (1990). Hypertension in the spontaneously hypertensive rat is linked to the Y chromosome. *Hypertension* *16*, 277–281.
- Erejuwa, O.O., Sulaiman, S.A., Wahab, M.S.A., Sirajudeen, K.N.S., Salleh, M.S.M., and Gurtu, S. (2011). Differential responses to blood pressure and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic Wistar-Kyoto rats and spontaneously hypertensive rats: effects of antioxidant (honey) treatment. *Int. J. Mol. Sci.* *12*, 1888–1907.
- Estruch, R., Ros, E., Salas-Salvadó, J., Covas, M.-I., Corella, D., Arós, F., Gómez-Gracia, E., Ruiz-Gutiérrez, V., Fiol, M., Lapetra, J., et al. (2013). Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet. *N. Engl. J. Med.* *368*, 1279–1290.
- European Parliament and of the Council (2009). Commission decision of 13 October 2009 authorizing the placing on the market of a leaf extract from lucerne (*Medicago sativa*) as novel food on novel food ingredient under Regulation (EC) No 258/97.

- European Union Council (2010). Directive on the protection of animals used for scientific purposes. *Official J. Eur. Union* 276, 33–79.
- Fatnassi, I.C., Chiboub, M., Saadani, O., Jebara, M., and Jebara, S.H. (2013). Phytostabilization of moderate copper contaminated soils using co-inoculation of *Vicia faba* with plant growth promoting bacteria. *J. Basic Microbiol.* n/a – n/a.
- Fischer, H.M. (1994). Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol. Rev.* 58, 352–386.
- Frankel, W.L., Zhang, W., Singh, A., Klurfeld, D.M., Don, S., Sakata, T., Modlin, I., and Rombeau, J.L. (1994). Mediation of the trophic effects of short-chain fatty acids on the rat jejunum and colon. *Gastroenterology* 106, 375–380.
- Franzmann, P.D., Wehmeyer, U., and Stackebrandt, E. (1988). Halomonadaceae fam. nov., a New Family of the Class Proteobacteria to Accommodate the Genera Halomonas and Deleya. *Syst. Appl. Microbiol.* 11, 16–19.
- Frisoli, T.M., Schmieler, R.E., Grodzicki, T., and Messerli, F.H. (2011). Beyond salt: lifestyle modifications and blood pressure. *Eur. Heart J.* 32, 3081–3087.
- Fukai, T., and Ushio-Fukai, M. (2011). Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. *Antioxid. Redox Signal.* 15, 1583–1606.
- Gao, L., Liu, Q., Liu, S., Chen, Z., Li, C., Lei, L., Sun, S., Li, L., Liu, J., and Shen, Z. (2014). A refined-JinQi-JiangTang tablet ameliorates prediabetes by reducing insulin resistance and improving beta cell function in mice. *J. Ethnopharmacol.* 151, 675–685.
- Garriga, M., Ehrmann, M.A., Arnau, J., Hugas, M., and Vogel, R.F. (1998). *Carnimonas nigrificans* gen. nov., sp. nov., a bacterial causative agent for black spot formation on cured meat products. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 677–686.
- Garwitz, E.T., and Jones, A.W. (1982). Aldosterone infusion into the rat and dose-dependent changes in blood pressure and arterial ionic transport. *Hypertension* 4, 374–381.
- Gasparotto Junior, A., Prando, T.B.L., Leme, T. dos S.V., Gasparotto, F.M., Lourenço, E.L.B., Rattmann, Y.D., Da Silva-Santos, J.E., Kassuya, C.A.L., and Marques, M.C.A. (2012). Mechanisms underlying the diuretic effects of *Tropaeolum majus* L. extracts and its main component isoquercitrin. *J. Ethnopharmacol.* 141, 501–509.
- Gatouillat, G., Magid, A.A., Bertin, E., Okiemy-Akeli, M.-G., Morjani, H., Lavaud, C., and Madoulet, C. (2014). Cytotoxicity and apoptosis induced by alfalfa (*Medicago sativa*) leaf extracts in sensitive and multidrug-resistant tumor cells. *Nutr. Cancer* 66, 483–491.
- Gawel, E. (2012). Chemical composition of lucerne leaf extract (EFL) and its applications as a phytobiotic in human nutrition. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 11, 303–310.
- Gawel, E., and Grzelak, M. (2014). Protein from lucerne in animals supplement diet. *J Food Agric Environ.*
- Gholami, A., De Geyter, N., Pollier, J., Goormachtig, S., and Goossens, A. (2014). Natural product biosynthesis in *Medicago* species. *Nat. Prod. Rep.* 31, 356–380.

- Glazebrook, J., and Walker, G.C. (1989). A novel exopolysaccharide can function in place of the calcofluor-binding exopolysaccharide in nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *Cell* 56, 661–672.
- Goldblatt, H., Lynch, J., Hanzal, R.F., and Summerville, W.W. (1934). STUDIES ON EXPERIMENTAL HYPERTENSION. *J. Exp. Med.* 59, 347–379.
- Gomathi, R., Vijipriya, M., and Usha, K. (2014). Cardioprotective effect of ethanolic extract of *Medicago sativa* stem on isoproterenol induced myocardial infarction in wistar albino rats. *Int J Pharm Pharm Sci* 839.
- Gouveia, L.M., Kettelhut, I.C., and Foss, M.C. (2000). Abnormalities of glucose metabolism in spontaneously hypertensive rats. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Médicas E Biológicas Soc. Bras. Biofísica* 33, 1357–1362.
- Gray, A.M., and Flatt, P.R. (1997). Pancreatic and extra-pancreatic effects of the traditional anti-diabetic plant, *Medicago sativa* (lucerne). *Br. J. Nutr.* 78, 325–334.
- Gribble, F.M. (2015). An absorbing sense of sweetness. *Diabetes* 64, 338–340.
- Guang, C., and Phillips, R.D. (2009). Plant food-derived Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *J. Agric. Food Chem.* 57, 5113–5120.
- De la Haba, R.R., Arahál, D.R., Márquez, M.C., and Ventosa, A. (2010). Phylogenetic relationships within the family Halomonadaceae based on comparative 23S and 16S rRNA gene sequence analysis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 737–748.
- Hagins, M., States, R., Selfe, T., and Innes, K. (2013). Effectiveness of Yoga for Hypertension: Systematic Review and Meta-Analysis. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2013, e649836.
- Hamza, S.M., and Dyck, J.R.B. (2014). Systemic and renal oxidative stress in the pathogenesis of hypertension: modulation of long-term control of arterial blood pressure by resveratrol. *Front. Physiol.* 5, 292.
- Hayakawa, K., Kimura, M., Kasaha, K., Matsumoto, K., Sansawa, H., and Yamori, Y. (2004). Effect of a γ -aminobutyric acid-enriched dairy product on the blood pressure of spontaneously hypertensive and normotensive Wistar–Kyoto rats. *Br. J. Nutr.* 92, 411–417.
- Héctor Polizio, A., and Peña, C. (2005). Effects of angiotensin II type 1 receptor blockade on the oxidative stress in spontaneously hypertensive rat tissues. *Regul. Pept.* 128, 1–5.
- Hirata, K., Kume, S., Araki, S., Sakaguchi, M., Chin-Kanasaki, M., Isshiki, K., Sugimoto, T., Nishiyama, A., Koya, D., Haneda, M., et al. (2009). Exendin-4 has an anti-hypertensive effect in salt-sensitive mice model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 380, 44–49.
- Holst, J.J. (2007). The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol. Rev.* 87, 1409–1439.
- Hong, Y.H., Huang, C.J., Wang, S.C., and Lin, B.F. (2009). The ethyl acetate extract of alfalfa sprout ameliorates disease severity of autoimmune-prone MRL-lpr/lpr mice. *Lupus* 18, 206–215.
- Hoo, R.L., Wong, J.Y., Qiao, C., Xu, A., Xu, H., and Lam, K.S. (2010). The effective fraction isolated from *Radix Astragali* alleviates glucose intolerance, insulin resistance and

hypertriglyceridemia in db/db diabetic mice through its anti-inflammatory activity. *Nutr. Metab.* **7**, 67.

Houghton, P., Patel, N., Jurzysta, M., Biely, Z., and Cheung, C. (2006). Antidermatophyte activity of medicago extracts and contained saponins and their structure-activity relationships. *Phytother. Res.* **20**, 1061–1066.

Houston, M.C. (2005). Nutraceuticals, Vitamins, Antioxidants, and Minerals in the Prevention and Treatment of Hypertension. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **47**, 396–449.

Hu, L.S., George, J., and Wang, J.H. (2013). Current concepts on the role of nitric oxide in portal hypertension. *World J. Gastroenterol. WJG* **19**, 1707–1717.

Huang, L., Zhang, C., Hou, Y., Laudon, M., She, M., Yang, S., Ding, L., Wang, H., Wang, Z., He, P., et al. (2013a). Blood pressure reducing effects of piromelatine and melatonin in spontaneously hypertensive rats. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **17**, 2449–2456.

Huang, W.-Y., Davidge, S.T., and Wu, J. (2013b). Bioactive natural constituents from food sources-potential use in hypertension prevention and treatment. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **53**, 615–630.

Hungria, M., Nogueira, M.A., and Araujo, R.S. (2013). Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. *Biol. Fertil. Soils* **49**, 791–801.

Iemitsu, M., Shimojo, N., Maeda, S., Irukayama-Tomobe, Y., Sakai, S., Ohkubo, T., Tanaka, Y., and Miyauchi, T. (2008). The benefit of medium-chain triglyceride therapy on the cardiac function of SHR is associated with a reversal of metabolic and signaling alterations. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **295**, H136–H144.

Inoue, K., Shirai, T., Ochiai, H., Kasao, M., Hayakawa, K., Kimura, M., and Sansawa, H. (2003). Blood-pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing γ -aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives. *Eur. J. Clin. Nutr.* **57**, 490–495.

Intengan, H.D., and Schiffrin, E.L. (2001). Vascular Remodeling in Hypertension Roles of Apoptosis, Inflammation, and Fibrosis. *Hypertension* **38**, 581–587.

Itoh, H., Mukoyama, M., Pratt, R.E., Gibbons, G.H., and Dzau, V.J. (1993). Multiple autocrine growth factors modulate vascular smooth muscle cell growth response to angiotensin II. *J. Clin. Invest.* **91**, 2268–2274.

IUSS Working Group WRB (2007). World Reference Base for Soil Resources 2006, first update 2007. *World Soil Resources Reports No.* 103.

Jahan-mihan, A., Szeto, I.M.Y., Luhovyy, B.L., Huot, P.S.P., and Harvey Anderson, G. (2012). Soya protein- and casein-based nutritionally complete diets fed during gestation and lactation differ in effects on characteristics of the metabolic syndrome in male offspring of Wistar rats. *Br. J. Nutr.* **107**, 284–294.

JJAA (1999). Los criterios y estándares para declarar un suelo contaminado en Andalucía y la metodología y técnicas de toma de muestra y análisis para su investigación.

- Johnson, M.L., Ely, D.L., and Turner, M.E. (1992). Genetic divergence between the Wistar-Kyoto rat and the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 19, 425–427.
- Kadlec, A.O., Greco, K., Fridirici, Z.C., Hart, S.T., Vellos, T., and Turk, T.M. (2012). Metabolic Syndrome and Urinary Stone Composition: What Factors Matter Most? *Urology* 80, 805–810.
- Kang, D.G., Moon, M.K., Sohn, E.J., Lee, D.H., and Lee, H.S. (2004). Effects of Morin on Blood Pressure and Metabolic Changes in Fructose-Induced Hypertensive Rats. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 1779–1783.
- Kapel, R., Chabeau, A., Lesage, J., Riviere, G., Ravallec-Ple, R., Lecouturier, D., Wartelle, M., Guillochon, D., and Dhulster, P. (2006a). Production, in continuous enzymatic membrane reactor, of an anti-hypertensive hydrolysate from an industrial alfalfa white protein concentrate exhibiting ACE inhibitory and opioid activities. *Food Chem.* 98, 120–126.
- Kapel, R., Rahhou, E., Lecouturier, D., Guillochon, D., and Dhulster, P. (2006b). Characterization of an antihypertensive peptide from an Alfalfa white protein hydrolysate produced by a continuous enzymatic membrane reactor. *Process Biochem.* 41, 1961–1966.
- Kapravelou, G., Martínez, R., Andrade, A.M., Sánchez, C., Chaves, C.L., López-Jurado, M., Aranda, P., Cantarero, S., Arrebola, F., Fernández-Segura, E., et al. (2013). Health promoting effects of Lupin (*Lupinus albus* var. multolupa) protein hydrolyzate and insoluble fiber in a diet-induced animal experimental model of hypercholesterolemia. *Food Res. Int.* 54, 1471–1481.
- Kapravelou, G., Martinez, R., Andrade, A.M., Lopez Chaves, C., Lopez-Jurado, M., Aranda, P., Arrebola, F., Canizares, F.J., Galisteo, M., and Porres, J.M. (2014a). Improvement of the antioxidant and hypolipidaemic effects of cowpea flours (*Vigna unguiculata*) by fermentation: results of in vitro and in vivo experiments. *J. Sci. Food Agric.*
- Kapravelou, G., Martínez, R., Andrade, A.M., López Chaves, C., López-Jurado, M., Aranda, P., Arrebola, F., Cañizares, F.J., Galisteo, M., and Porres, J.M. (2014b). Improvement of the antioxidant and hypolipidaemic effects of cowpea flours (*Vigna unguiculata*) by fermentation: results of in vitro and in vivo experiments. *J. Sci. Food Agric.* n/a – n/a.
- Kawano, Y. (2010). Physio-pathological effects of alcohol on the cardiovascular system: its role in hypertension and cardiovascular disease. *Hypertens. Res.* 33, 181–191.
- Khaleel, A.E., Gad, M.Z., El Maraghy, S.A., Hifnawy, M.S., and Abdel-Sattar, E. (2005). Study of hypocholesterolemic and antiatherosclerotic properties of *Medicago sativa* L. cultivated in Egypt. *J food drug anal* 13, 212–218.
- Kim, M., Platt, M.J., Shibasaki, T., Quaggin, S.E., Backx, P.H., Seino, S., Simpson, J.A., and Drucker, D.J. (2013). GLP-1 receptor activation and Epac2 link atrial natriuretic peptide secretion to control of blood pressure. *Nat. Med.* 19, 567–575.
- Knapp, B.K., Bauer, L.L., Swanson, K.S., Tappenden, K.A., Fahey, G.C., and de Godoy, M.R.C. (2013). Soluble Fiber Dextrin and Soluble Corn Fiber Supplementation Modify Indices of Health in Cecum and Colon of Sprague-Dawley Rats. *Nutrients* 5, 396–410.
- Kobori, H., Nangaku, M., Navar, L.G., and Nishiyama, A. (2007). The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol. Rev.* 59, 251–287.

- Kochi, T., Shimizu, M., Terakura, D., Baba, A., Ohno, T., Kubota, M., Shirakami, Y., Tsurumi, H., Tanaka, T., and Moriwaki, H. (2014). Non-alcoholic steatohepatitis and preneoplastic lesions develop in the liver of obese and hypertensive rats: suppressing effects of EGCG on the development of liver lesions. *Cancer Lett.* 342, 60–69.
- Kok, D.J., Papapoulos, S.E., and Bijvoet, O.L. (1990). Crystal agglomeration is a major element in calcium oxalate urinary stone formation. *Kidney Int.* 37, 51–56.
- Kokkinos, P. (2014). Cardiorespiratory Fitness, Exercise, and Blood Pressure. *Hypertension* 64, 1160–1164.
- Koliaki, C., and Katsilambros, N. (2013). Dietary sodium, potassium, and alcohol: key players in the pathophysiology, prevention, and treatment of human hypertension. *Nutr. Rev.* 71, 402–411.
- Kovner, I., Taicher, G.Z., and Mitchell, A.D. (2010). Calibration and validation of EchoMRI whole body composition analysis based on chemical analysis of piglets, in comparison with the same for DXA. *Int. J. Body Compos. Res.* 8.
- Kumar, S. (2011). Biotechnological advancements in alfalfa improvement. *J. Appl. Genet.* 52, 111–124.
- Kuo, Y.-H., Rozan, P., Lambein, F., Frias, J., and Vidal-Valverde, C. (2004). Effects of different germination conditions on the contents of free protein and non-protein amino acids of commercial legumes. *Food Chem.* 86, 537–545.
- Kushner, D.J. (1993). Growth and nutrition of halophilic bacteria. In *The Biology of Halophilic Bacteria*, (Boca Raton, Fla: CRC Press), pp. 87–103.
- Kushner, D.J., and Kamekura, M. (1988). Physiology of halophilic eubacteria. In *Halophilic Bacteria*, (I. Boca Raton, Fla: CRC Press, Inc.), pp. 109–138.
- Lacy, F., O'Connor, D.T., and Schmid-Schönbein, G.W. (1998). Plasma hydrogen peroxide production in hypertensives and normotensive subjects at genetic risk of hypertension. *J. Hypertens.* 16, 291–303.
- Lancaster, K.J., Schoenthaler, A.M., Midberry, S.A., Watts, S.O., Nulty, M.R., Cole, H.V., Ige, E., Chaplin, W., and Ogedegbe, G. (2014). Rationale and design of Faith-based Approaches in the Treatment of Hypertension (FAITH), a lifestyle intervention targeting blood pressure control among black church members. *Am. Heart J.* 167, 301–307.
- Landers, K.L., Moore, R.W., Herrera, P., Landers, D.A., Howard, Z.R., McReynolds, J.L., Bryd, J.A., Kubena, L.F., Nisbet, D.J., and Ricke, S.C. (2008). Organ weight and serum triglyceride responses of older (80 week) commercial laying hens fed an alfalfa meal molt diet. *Bioresour. Technol.* 99, 6692–6696.
- LaPier, T.L.K., Swislocki, A.L.M., Clark, R.J., and Rodnick, K.J. (2001). Voluntary running improves glucose tolerance and insulin resistance in female spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Hypertens.* 14, 708–715.
- Larson, A.J., Symons, J.D., and Jalili, T. (2012). Therapeutic Potential of Quercetin to Decrease Blood Pressure: Review of Efficacy and Mechanisms. *Adv. Nutr. Int. Rev. J.* 3, 39–46.

Ledingham, J.M., and Pelling, D. (1970). Haemodynamic and other studies in the renoprival hypertensive rat. *J. Physiol.* *210*, 233–253.

Leonard, L.T. (1943). A Simple Assembly for Use in the Testing of Cultures of Rhizobia. *J. Bacteriol.* *45*, 523–527.

Levey, A.S., Becker, C., and Inker, L.A. (2015). Glomerular filtration rate and albuminuria for detection and staging of acute and chronic kidney disease in adults: a systematic review. *JAMA* *313*, 837–846.

Lewis, G.P. (2005). *Legumes of the World* (London: Royal Botanic Gardens, Kew).

Lezin, E.S., Simonet, L., Pravenec, M., and Kurtz, T.W. (1992). Hypertensive strains and normotensive “control” strains. How closely are they related? *Hypertension* *19*, 419–424.

Li, J.-X., Xue, B., Chai, Q., Liu, Z.-X., Zhao, A.-P., and Chen, L.-B. (2005). Antihypertensive effect of total flavonoid fraction of *Astragalus complanatus* in hypertensive rats. *Chin. J. Physiol.* *48*, 101–106.

Lipton, D.S., Blanchar, R.W., and Blevins, D.G. (1987). Citrate, Malate, and Succinate Concentration in Exudates from P-Sufficient and P-Stressed *Medicago sativa* L. Seedlings 1. *Plant Physiol.* *85*, 315–317.

Liu, L., Liu, J., Wong, W.T., Tian, X.Y., Lau, C.W., Wang, Y.-X., Xu, G., Pu, Y., Zhu, Z., Xu, A., et al. (2012). Dipeptidyl peptidase 4 inhibitor sitagliptin protects endothelial function in hypertension through a glucagon-like peptide 1-dependent mechanism. *Hypertension* *60*, 833–841.

Lloret, J., Wulff, B.B.H., Rubio, J.M., Downie, J.A., Bonilla, I., and Rivilla, R. (1998). Exopolysaccharide II Production Is Regulated by Salt in the Halotolerant Strain *Rhizobium meliloti* EFB1. *Appl. Environ. Microbiol.* *64*, 1024–1028.

López-Suárez, A., Guerrero, J.M.R., Elvira-González, J., Beltrán-Robles, M., Cañas-Hormigo, F., and Bascuñana-Quirell, A. (2011). Nonalcoholic fatty liver disease is associated with blood pressure in hypertensive and nonhypertensive individuals from the general population with normal levels of alanine aminotransferase. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* *23*, 1011–1017.

Losito, A., Nunzi, E.G., Covarelli, C., Nunzi, E., and Ferrara, G. (2009). Increased acid excretion in kidney stone formers with essential hypertension. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* *24*, 137–141.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* *193*, 265–275.

Lu, C., Su, L.-Y., Lee, R.M.K.W., and Gao, Y.-J. (2011). Alterations in perivascular adipose tissue structure and function in hypertension. *Eur. J. Pharmacol.* *656*, 68–73.

Mancia, G., Fagard, R., Narkiewicz, K., Redón, J., Zanchetti, A., Böhm, M., Christiaens, T., Cifkova, R., De Backer, G., Dominiczak, A., et al. (2013). 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J. Hypertens.* *31*, 1281–1357.

Martínez, R., Nebot, E., Aranda, P., Urbano, G., Moral, A. del, Porres, J.M., and López-Jurado, M. (2011). Effect of an exopolysaccharide produced by *Halomonas maura* on the digestive utilization of minerals. (*Ann Nutr Metab*), pp. 83–84.

Martínez-Cánovas, M.J., Quesada, E., Martínez-Checa, F., and Béjar, V. (2004). A taxonomic study to establish the relationship between exopolysaccharide-producing bacterial strains living in diverse hypersaline habitats. *Curr. Microbiol.* *48*, 348–353.

Mathai, M.L., Naik, S., Sinclair, A.J., Weisinger, H.S., and Weisinger, R.S. (2008). Selective reduction in body fat mass and plasma leptin induced by angiotensin-converting enzyme inhibition in rats. *Int. J. Obes.* *32*, 1576–1584.

Mattace Raso, G., Simeoli, R., Russo, R., Santoro, A., Pirozzi, C., d'Emmanuele di Villa Bianca, R., Mitidieri, E., Paciello, O., Pagano, T.B., Orefice, N.S., et al. (2013). N-Palmitoylethanolamide protects the kidney from hypertensive injury in spontaneously hypertensive rats via inhibition of oxidative stress. *Pharmacol. Res.* *76*, 67–76.

Mazahery-Laghab, H., Yazdi-Samadi, B., Bagheri, M., and Bagheri, A.R. (2011). Alfalfa (*Medicago sativa* L.) shoot saponins: identification and bio-activity by the assessment of aphid feeding. *Br. J. Nutr.* *105*, 62–70.

Michaud, R., Lehman, W.F., and Rumbaugh, M.D. (1988). World Distribution and Historical Development. In *Alfalfa and Alfalfa Improvement*, (Madison, Wisconsin: ASA-CSSA-SSSA), pp. 25–91.

Mielmann, A. (2013). The utilisation of lucerne (*Medicago sativa*): a review. *Br. Food J.* *115*, 590–600.

Miller, D.D., Schrickler, B.R., Rasmussen, R.R., and Van Campen, D. (1981). An in vitro method for estimation of iron availability from meals. *Am. J. Clin. Nutr.* *34*, 2248–2256.

Mishra, R.P.N., Tisseyre, P., Melkonian, R., Chaintreuil, C., Miché, L., Klonowska, A., Gonzalez, S., Bena, G., Laguerre, G., and Moulin, L. (2012). Genetic diversity of *Mimosa pudica* rhizobial symbionts in soils of French Guiana: investigating the origin and diversity of *Burkholderia phymatum* and other beta-rhizobia. *FEMS Microbiol. Ecol.* *79*, 487–503.

Moawad, H., El-Din, S.M.S.B., and Abdel-Aziz, R.A. (1998). Improvement of biological nitrogen fixation in Egyptian winter legumes through better management of *Rhizobium*. *Plant Soil* *204*, 95–106.

Modan, M., Halkin, H., Almog, S., Lusky, A., Eshkol, A., Shefi, M., Shitrit, A., and Fuchs, Z. (1985). Hyperinsulinemia. A link between hypertension obesity and glucose intolerance. *J. Clin. Invest.* *75*, 809–817.

Moraine, R.A., and Rogovin, P. (1966). Kinetics of polysaccharide B-1459 fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* *8*, 511–524.

Muhammad J., Deog L., Kwand J., Muhammad A., Sheong C., and Eui S. (2006). Effect of salt (NaCl) stress on germination and early seedling growth of four vegetables species. *J Central Europ. Agric.*

- Mukai, Y., and Sato, S. (2009). Polyphenol-containing azuki bean (*Vigna angularis*) extract attenuates blood pressure elevation and modulates nitric oxide synthase and caveolin-1 expressions in rats with hypertension. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* *19*, 491–497.
- Mukai, Y., and Sato, S. (2011). Polyphenol-containing azuki bean (*Vigna angularis*) seed coats attenuate vascular oxidative stress and inflammation in spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr. Biochem.* *22*, 16–21.
- Mullins, J.J., Peters, J., and Ganten, D. (1990). Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2 gene. *Nature* *344*, 541–544.
- Munns, R., and Tester, M. (2008). Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* *59*, 651–681.
- Najjar, S.S., Scuteri, A., and Lakatta, E.G. (2005). Arterial Aging Is It an Immutable Cardiovascular Risk Factor? *Hypertension* *46*, 454–462.
- Nakagami, H., Pang, Z., Shimosato, T., Moritani, T., Kurinami, H., Koriyama, H., Tenma, A., Shimamura, M., and Morishita, R. (2014). The dipeptidyl peptidase-4 inhibitor teneligliptin improved endothelial dysfunction and insulin resistance in the SHR/NDmcr-cp rat model of metabolic syndrome. *Hypertens. Res.* *37*, 629–635.
- National Research Council (1995). *Nutrient Requirements of Laboratory Animals, Fourth Revised Edition, 1995* (The National Academies Press).
- Navar, L.G. (2005). The Role of the Kidneys in Hypertension. *J. Clin. Hypertens.* *7*, 542–549.
- Navarro-Cid, J., Maeso, R., Perez-Vizcaino, F., Cachofeiro, V., Ruilope, L.M., Tamargo, J., and Lahera, V. (1995). Effects of Losartan on Blood Pressure, Metabolic Alterations, and Vascular Reactivity in the Fructose-Induced Hypertensive Rat. *Hypertension* *26*, 1074–1078.
- Nicod, L., Rodriguez, S., Letang, J.M., Viollon-Abadie, C., Jacqueson, A., Berthelot, A., and Richert, L. (2000). Antioxidant status, lipid peroxidation, mixed function oxidase and UDP-glucuronyl transferase activities in livers from control and DOCA-salt hypertensive male Sprague Dawley rats. *Mol. Cell. Biochem.* *203*, 33–39.
- Ntougias, S., Zervakis, G.I., and Fasseas, C. (2007). *Halotalea alkalilenta* gen. nov., sp. nov., a novel osmotolerant and alkalitolerant bacterium from alkaline olive mill wastes, and emended description of the family Halomonadaceae Franzmann et al. 1989, emend. Dobson and Franzmann 1996. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *57*, 1975–1983.
- Nwaogu, L.A., and Emejulu, A.A. (2010). Evaluation of the toxicity of cyanogens in a commonly consumed Nigeria legume pigeon pea (*Cajanus cajan*) seed and its biochemical effects in rabbits. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* *4*.
- Obligado, S.H., and Goldfarb, D.S. (2008). The Association of Nephrolithiasis With Hypertension and Obesity: A Review. *Am. J. Hypertens.* *21*, 257–264.
- Oboh, G., Puntel, R.L., and Rocha, J.B.T. (2007). Hot pepper (*Capsicum annum*, Tepin and *Capsicum chinese*, Habanero) prevents Fe²⁺-induced lipid peroxidation in brain – in vitro. *Food Chem.* *102*, 178–185.

- Ohkawa, H., Ohishi, N., and Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* *95*, 351–358.
- Okamoto, K., and Aoki, K. (1963). Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn. Circ. J.* *27*, 282–293.
- Okamoto, K., Yamori, Y., and Nagaoka, A. (1974). Establishment of stroke - prone spontaneously hypertensive rats (SHR). *Circ Res* *34/35*, 143–153.
- Okamoto, T., Taguchi, H., Nakamura, K., Ikenaga, H., Kuraishi, H., and Yamasato, K. (1993). *Zymobacter palmae* gen. nov., sp. nov., a new ethanol-fermenting peritrichous bacterium isolated from palm sap. *Arch. Microbiol.* *160*, 333–337.
- Oldroyd, G.E.D. (2013). Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat. Rev. Microbiol.* *11*, 252–263.
- Oldroyd, G.E.D., and Downie, J.A. (2004). Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 566–576.
- Oliveira, S.A., Okoshi, K., Lima-Leopoldo, A.P., Leopoldo, A.S., Campos, D.H.S., Martinez, P.F., Okoshi, M.P., Padovani, C.R., Pai-Silva, M.D., and Cicogna, A.C. (2009). Nutritional and cardiovascular profiles of normotensive and hypertensive rats kept on a high fat diet. *Arq. Bras. Cardiol.* *93*, 526–533.
- Osborn, A., Goss, R.J.M., and Field, R.A. (2011). The saponins – polar isoprenoids with important and diverse biological activities. *Nat. Prod. Rep.* *28*, 1261–1268.
- Ott, T., van Dongen, J.T., Günther, C., Krusell, L., Desbrosses, G., Vigeolas, H., Bock, V., Czechowski, T., Geigenberger, P., and Udvardi, M.K. (2005). Symbiotic Leghemoglobins Are Crucial for Nitrogen Fixation in Legume Root Nodules but Not for General Plant Growth and Development. *Curr. Biol.* *15*, 531–535.
- Pastrana, J., and García de Casasola, G. (2013). *Fisiopatología y patología general básicas para ciencias de la salud* (España: Elsevier).
- Patinha, D., Afonso, J., Sousa, T., Morato, M., and Albino-Teixeira, A. (2014). Activation of adenosine receptors improves renal antioxidant status in diabetic Wistar but not SHR rats. *Ups. J. Med. Sci.* *119*, 10–18.
- Peacock, M. (2010). Calcium Metabolism in Health and Disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* *5*, S23–S30.
- Pedro-Botet, J., Covas, M.I., Martín, S., and Rubiés-Prat, J. (2000). Decreased endogenous antioxidant enzymatic status in essential hypertension. *J. Hum. Hypertens.* *14*, 343–345.
- Pellock, B.J., Cheng, H.-P., and Walker, G.C. (2000). Alfalfa Root Nodule Invasion Efficiency Is Dependent on *Sinorhizobium meliloti* Polysaccharides. *J. Bacteriol.* *182*, 4310–4318.
- Peña, T.C. de la, and Pueyo, J.J. (2011a). Legumes in the reclamation of marginal soils, from cultivar and inoculant selection to transgenic approaches. *Agron. Sustain. Dev.* *32*, 65–91.
- Peña, T.C. de la, and Pueyo, J.J. (2011b). Legumes in the reclamation of marginal soils, from cultivar and inoculant selection to transgenic approaches. *Agron. Sustain. Dev.* *32*, 65–91.

- Peoples, M.B., Herridge, D.F., and Ladha, J.K. (1995). Biological nitrogen fixation: An efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production? *Plant Soil* 174, 3–28.
- Perret, X., Staehelin, C., and Broughton, W.J. (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 64, 180–201.
- Petersen, N., Reimann, F., Bartfeld, S., Farin, H.F., Ringnalda, F.C., Vries, R.G.J., van den Brink, S., Clevers, H., Gribble, F.M., and de Koning, E.J.P. (2014). Generation of L cells in mouse and human small intestine organoids. *Diabetes* 63, 410–420.
- Pinto, Y.M., Paul, M., and Ganten, D. (1998). Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. *Cardiovasc. Res.* 39, 77–88.
- Poole, P., and Allaway, D. (2000). Carbon and nitrogen metabolism in *Rhizobium*. *Adv. Microb. Physiol.* 43, 117–163.
- Porres, J.M., Aranda, P., López-Jurado, M., and Urbano, G. (2005). Nutritional potential of raw and free alpha-galactosides lupin (*Lupinus albus* Var. multolupa) seed flours. Effect of phytase treatment on nitrogen and mineral dialyzability. *J. Agric. Food Chem.* 53, 3088–3094.
- Porres, J.M., Aranda, P., López-Jurado, M., and Urbano, G. (2006). Nutritional evaluation of protein, phosphorus, calcium and magnesium bioavailability from lupin (*Lupinus albus* var. multolupa)-based diets in growing rats: effect of α -galactoside oligosaccharide extraction and phytase supplementation. *Br. J. Nutr.* 95, 1102–1111.
- Porta, J., López-Acevedo, M., and Roquero, C. (2003). *Edafología para la Aguicultura y el Medio Ambiente* (Madrid: Mundi-Prensa libros).
- Pravenec, M., Zídek, V., Landa, V., Simáková, M., Mlejnek, P., Kazdová, L., Bílá, V., Krenová, D., and Kren, V. (2004). Genetic analysis of “metabolic syndrome” in the spontaneously hypertensive rat. *Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov.* 53 Suppl 1, S15–S22.
- Prieto, P.G., Cancelas, J., Villanueva-Peñacarrillo, M.L., Valverde, I., and Malaisse, W.J. (2004). Plasma D-glucose, D-fructose and insulin responses after oral administration of D-glucose, D-fructose and sucrose to normal rats. *J. Am. Coll. Nutr.* 23, 414–419.
- Pruessner, J.C., Kirschbaum, C., Meinlschmid, G., and Hellhammer, D.H. (2003). Two formulas for computation of the area under the curve represent measures of total hormone concentration versus time-dependent change. *Psychoneuroendocrinology* 28, 916–931.
- Quesada, E., Bejar, V., and Calvo, C. (1993). Exopolysaccharide production by *Volcaniella eurihalina*. *Experientia* 49, 1037–1041.
- Quintana-Villamandos, B., Jesús Delgado-Martos, M., Javier Sánchez-Hernández, J., Gómez de Diego, J.J., del Carmen Fernández-Criado, M., Canillas, F., Martos-Rodríguez, A., and Delgado-Baeza, E. (2013). Early regression of left ventricular hypertrophy after treatment with esmolol in an experimental rat model of primary hypertension. *Hypertens. Res.* 36, 408–413.
- Quiros, C.F., and Bauchan, G.R. (1988). The Genus *Medicago* and the Origin of the *Medicago sativa* Complex. In *Alfalfa and Alfalfa Improvement*, (Madison, Wisconsin: ASA-CSSA-SSSA), pp. 93–124.

- Ramadan, G., El-Beih, N.M., and Abd El-Kareem, H.F. (2011). Anti-metabolic syndrome and immunostimulant activities of Egyptian fenugreek seeds in diabetic/obese and immunosuppressive rat models. *Br. J. Nutr.* *105*, 995–1004.
- Raveendran, S., Dhandayuthapani, B., Nagaoka, Y., Yoshida, Y., Maekawa, T., and Sakthi Kumar, D. (2013a). Biocompatible nanofibers based on extremophilic bacterial polysaccharide, Mauran from *Halomonas maura*. *Carbohydr. Polym.* *92*, 1225–1233.
- Raveendran, S., Palaninathan, V., Chauhan, N., Sakamoto, Y., Yoshida, Y., Maekawa, T., Mohanan, P.V., and Kumar, D.S. (2013b). In vitro evaluation of antioxidant defense mechanism and hemocompatibility of mauran. *Carbohydr. Polym.* *98*, 108–115.
- Rebello, C.J., Greenway, F.L., and Finley, J.W. (2014). A review of the nutritional value of legumes and their effects on obesity and its related co-morbidities. *Obes. Rev. Off. J. Int. Assoc. Study Obes.* *15*, 392–407.
- Redón, J., Oliva, M.R., Tormos, C., Giner, V., Chaves, J., Iradi, A., and Sáez, G.T. (2003). Antioxidant Activities and Oxidative Stress Byproducts in Human hypertension. *Hypertension* *41*, 1096–1101.
- Reeves, P.G., Nielsen, F.H., and Fahey, G.C., Jr (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.* *123*, 1939–1951.
- Rehm, B.H.A. (2010). Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *Nat. Rev. Microbiol.* *8*, 578–592.
- Ribeiro, M.O., Antunes, E., Nucci, G. de, Lovisolo, S.M., and Zatz, R. (1992). Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension* *20*, 298–303.
- Riet-Correa, F., Carvalho, K.S., Riet-Correa, G., Barros, S.S., Simões, S.V.D., Soares, M.P., and Medeiros, R.M.T. (2013). Periacinar liver fibrosis caused by *Tephrosia cinerea* in sheep. *Res. Vet. Sci.* *95*, 200–203.
- Rigaud, J., and Puppo, A. (1975). Indole-3-acetic Acid Catabolism by Soybean Bacteroids. *J. Gen. Microbiol.* *88*, 223–228.
- Rodrigo, R., Gil, D., Miranda-Merchak, A., and Kalantzidis, G. (2012). Antihypertensive role of polyphenols. *Adv. Clin. Chem.* *58*, 225–254.
- Rodriguez-Valera, F., Ruiz-Berraquero, F., and Ramos-Cormenzana, A. (1981). Characteristics of the heterotrophic bacterial populations in hypersaline environments of different salt concentrations. *Microb. Ecol.* *7*, 235–243.
- Rose, R., and Chrisope, G.L. (1999). Antiarthritic agent consists of a palatability agent, cayenne, ginger, yucca roots, devil's claw, black cohosh, nettle leaf, tumeric, alfalfa, celery seeds, glucosamine hydrochloride and mucopolysaccharide (Google Patents).
- Rubattu, S., Pagliaro, B., Pierelli, G., Santolamazza, C., Di Castro, S., Mennuni, S., and Volpe, M. (2014). Pathogenesis of Target Organ Damage in Hypertension: Role of Mitochondrial Oxidative Stress. *Int. J. Mol. Sci.* *16*, 823–839.

- Sacks, F.M., Obarzanek, E., Windhauser, M.M., Svetkey, L.P., Vollmer, W.M., McCullough, M., Karanja, N., Lin, P.-H., Steele, P., Proschan, M.A., et al. (1995). Rationale and design of the Dietary Approaches to Stop Hypertension trial (DASH): A multicenter controlled-feeding study of dietary patterns to lower blood pressure. *Ann. Epidemiol.* *5*, 108–118.
- Sadowska, B., Budzyska, A., Wi ckowska-Szakiel, M., Paszkiewicz, M., Stochmal, A., Moniuszko-Szajwaj, B., Kowalczyk, M., and Rozalska, B. (2014). New pharmacological properties of *Medicago sativa* and *Saponaria officinalis* saponin-rich fractions addressed to *Candida albicans*. *J. Med. Microbiol.* *63*, 1076–1086.
- Sanada, L.S., da Rocha Kalil, A.L., Tavares, M.R., Neubern, M.C.M., Salgado, H.C., and Fazan, V.P.S. (2012). Sural nerve involvement in experimental hypertension: morphology and morphometry in male and female normotensive Wistar-Kyoto (WKY) and spontaneously hypertensive rats (SHR). *BMC Neurosci.* *13*, 24–24.
- Sánchez-Porro, C., Haba, R.R. de la, Soto-Ramírez, N., Márquez, M.C., Montalvo-Rodríguez, R., and Ventosa, A. (2009). Description of *Kushneria aurantia* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family Halomonadaceae, and a proposal for reclassification of *Halomonas marisflavi* as *Kushneria marisflavi* comb. nov., of *Halomonas indalinina* as *Kushneria indalinina* comb. nov. and of *Halomonas avicenniae* as *Kushneria avicenniae* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *59*, 397–405.
- Sanders, B.J., and Lawler, J.E. (1992). The borderline hypertensive rat (BHR) as a model for environmentally-induced hypertension: A review and update. *Neurosci. Biobehav. Rev.* *16*, 207–217.
- Santos, M., and Shah, A.M. (2014). Alterations in cardiac structure and function in hypertension. *Curr. Hypertens. Rep.* *16*, 428.
- SEH-LELHA (2005). Hipertensión arterial. Definición. Epidemiología. In GUÍA ESPAÑOLA DE HIPERTENSIÓN ARTERIAL 2005, pp. 3–8.
- Shahraki, M.R., Harati, M., and Shahraki, A.R. (2011). Prevention of high fructose-induced metabolic syndrome in male wistar rats by aqueous extract of *Tamarindus indica* seed. *Acta Med. Iran.* *49*, 277–283.
- Shamseldin, A., and Werner, D. (2005). High salt and high pH tolerance of new isolated *Rhizobium etli* strains from Egyptian soils. *Curr. Microbiol.* *50*, 11–16.
- Shannon, M.C. (1997). Adaptation of plants to Salinity. In *Advances in Agronomy*, (California: Academic Press), pp. 75–120.
- Shelden, M.C., and Roessner, U. (2013). Advances in functional genomics for investigating salinity stress tolerance mechanisms in cereals. *Front. Plant Sci.* *4*, 123.
- Shi, Y., Guo, R., Wang, X., Yuan, D., Zhang, S., Wang, J., Yan, X., and Wang, C. (2014). The Regulation of Alfalfa Saponin Extract on Key Genes Involved in Hepatic Cholesterol Metabolism in Hyperlipidemic Rats. *PLoS ONE* *9*.
- Shizuka, F., Kido, Y., Nakazawa, T., Kitajima, H., Aizawa, C., Kayamura, H., and Ichijo, N. (2004). Antihypertensive effect of gamma-amino butyric acid enriched soy products in spontaneously hypertensive rats. *BioFactors Oxf. Engl.* *22*, 165–167.

- De la Sierra, A., Isabel Egocheaga, M., and Teresa Aguilera, M. (2008). Prevalencia y características clínicas de la microalbuminuria en la población española con hipertensión arterial. *Med. Clínica* *130*, 201–205.
- Simão, A.N.C., Lozovoy, M.A.B., and Dichi, I. (2014). Effect of soy product kinako and fish oil on serum lipids and glucose metabolism in women with metabolic syndrome. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* *30*, 112–115.
- Simão, S., Gomes, P., Pinto, V., Silva, E., Amaral, J.S., Igreja, B., Afonso, J., Serrão, M.P., Pinho, M.J., and Soares-da-Silva, P. (2011). Age-related changes in renal expression of oxidant and antioxidant enzymes and oxidative stress markers in male SHR and WKY rats. *Exp. Gerontol.* *46*, 468–474.
- Sivakumar, B., Aswathy, R.G., Sreejith, R., Nagaoka, Y., Iwai, S., Suzuki, M., Fukuda, T., Hasumura, T., Yoshida, Y., Maekawa, T., et al. (2014). Bacterial exopolysaccharide based magnetic nanoparticles: a versatile nanotool for cancer cell imaging, targeted drug delivery and synergistic effect of drug and hyperthermia mediated cancer therapy. *J. Biomed. Nanotechnol.* *10*, 885–899.
- Sivaramaiah, N., Malik, D.K., and Sindhu, S.S. (2007). Improvement in symbiotic efficiency of chickpea (*Cicer arietinum*) by coinoculation of *Bacillus* strains with *Mesorhizobium* sp. *Cicer. Indian J. Microbiol.* *47*, 51–56.
- Smith, A.D., Morris, V.C., and Levander, O.A. (2001). Rapid determination of glutathione peroxidase and thioredoxin reductase activities using a 96-well microplate format: comparison to standard cuvette-based assays. *Int. J. Vitam. Nutr. Res. Int. Z. Für Vitam.-Ernährungsforschung J. Int. Vitaminol. Nutr.* *71*, 87–92.
- Soil Survey Staff (2010). *Keys to Soil Taxonomy* (Washington, DC: USDA-Natural Resources Conservation Service).
- Stochmal, A., Piacente, S., Pizza, C., De Riccardis, F., Leitz, R., and Oleszek, W. (2001). Alfalfa (*Medicago sativa* L.) flavonoids. 1. Apigenin and luteolin glycosides from aerial parts. *J. Agric. Food Chem.* *49*, 753–758.
- Subyaga, J.G., and Moreno, J.F. (1998). La alfalfa: cultivo, transformación y consumo. *MG Mundo Ganad.* 50–56.
- Sun, W., Goetsch, A.L., Forster, L.A., Galloway, D.L., and Lewis, P.K. (1994). Forage and splanchnic tissue mass in growing lambs: effects of dietary forage levels and source on splanchnic tissue mass in growing lambs. *Br. J. Nutr.* *71*, 141–151.
- Sundaram, A., Siew Keah, L., Sirajudeen, K.N.S., and Singh, H.J. (2013). Upregulation of catalase and downregulation of glutathione peroxidase activity in the kidney precede the development of hypertension in pre-hypertensive SHR. *Hypertens. Res.* *36*, 213–218.
- Suresh Kumar, A., Mody, K., and Jha, B. (2007). Bacterial exopolysaccharides – a perception. *J. Basic Microbiol.* *47*, 103–117.
- Swanston-Flatt, S.K., Day, C., Bailey, C.J., and Flatt, P.R. (1990). Traditional plant treatments for diabetes. Studies in normal and streptozotocin diabetic mice. *Diabetologia* *33*, 462–464.

- Sylwia, G., Leszczynski, B., and Wieslaw, O. (2006). Effect of low and high-saponin lines of alfalfa on pea aphid. *J. Insect Physiol.* *52*, 737–743.
- Talbi, C., Argandoña, M., Salvador, M., Alché, J.D., Vargas, C., Bedmar, E.J., and Delgado, M.J. (2013). *Burkholderia phymatum* improves salt tolerance of symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Soil* *367*, 673–685.
- Tanaka, S., Kojiguchi, C., Yamazaki, T., Mitsumoto, A., Kobayashi, D., Kudo, N., and Kawashima, Y. (2013). Altered fatty acid profile in the liver and serum of stroke-prone spontaneously hypertensive rats: reduced proportion of cis-vaccenic acid. *J. Oleo Sci.* *62*, 933–948.
- Taylor, E.N., Stampfer, M.J., Mount, D.B., and Curhan, G.C. (2010). DASH-style diet and 24-hour urine composition. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* *5*, 2315–2322.
- Te Morenga, L.A., Levers, M.T., Williams, S.M., Brown, R.C., and Mann, J. (2011). Comparison of high protein and high fiber weight-loss diets in women with risk factors for the metabolic syndrome: a randomized trial. *Nutr. J.* *10*, 40.
- Toledo, E., Hu, F.B., Estruch, R., Buil-Cosiales, P., Corella, D., Salas-Salvadó, J., Covas, M.I., Arós, F., Gómez-Gracia, E., Fiol, M., et al. (2013). Effect of the Mediterranean diet on blood pressure in the PREDIMED trial: results from a randomized controlled trial. *BMC Med.* *11*, 207.
- Tovar, J., Nilsson, A., Johansson, M., and Björck, I. (2014). Combining functional features of whole-grain barley and legumes for dietary reduction of cardiometabolic risk: a randomised cross-over intervention in mature women. *Br. J. Nutr.* *111*, 706–714.
- Troszyńska, A., Estrella, I., López-Amóres, M.L., and Hernández, T. (2002). Antioxidant Activity of Pea (*Pisum sativum* L.) Seed Coat Acetone Extract. *LWT - Food Sci. Technol.* *35*, 158–164.
- Turner, N., Colmer, T., Quealy, J., Pushpavalli, R., Krishnamurthy, L., Kaur, J., Singh, G., Siddique, K.M., and Vadez, V. (2013). Salinity tolerance and ion accumulation in chickpea (*Cicer arietinum* L.) subjected to salt stress. *Plant Soil* *365*, 347–361.
- Tyurin IV (1951). Analytical procedure for a comparative study of soil humus. *Trudy Pochv Inst Dokuchayeva. Trudy Pochv Inst Dokuchayeva* *38*, 5–9.
- Ukeda, H., Maeda, S., Ishii, T., and Sawamura, M. (1997). Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on tetrazolium salt 3'--1--(phenylamino)-carbonyl--3, 4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)benzenesulfonic acid hydrate reduction by xanthine-xanthine oxidase. *Anal. Biochem.* *251*, 206–209.
- Velázquez, E. (2010). Proteobacteria forming nitrogen fixing symbiosis with higher plants. In *Proteobacteria: Phylogeny, Metabolic Diversity and Ecological Effects*, (New York, USA: Nova Science Publishers Inc), pp. 37–56.
- Ventosa, A., Gutierrez, M.C., Garcia, M.T., and Ruiz-Berraquero, F. (1989). Classification of "Chromobacterium marismortui" in a New Genus, *Chromohalobacter* gen. nov., as *Chromohalobacter marismortui* comb. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* *39*, 382–386.
- Ventosa, A., Nieto, J.J., and Oren, A. (1998). Biology of Moderately Halophilic Aerobic Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *62*, 504–544.

- Walkley, A., and Black, I. (1934). An examination of Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci* 37, 29–38.
- Wang, J., Xiong, X., and Liu, W. (2013). Yoga for Essential Hypertension: A Systematic Review. *PLoS ONE* 8, e76357.
- Wang, S., Dong, X., Ma, H., Cui, Y., and Tong, J. (2014). Purification, characterisation and protective effects of polysaccharides from alfalfa on hepatocytes. *Carbohydr. Polym.* 112, 608–614.
- Wankhade, S., and Sanz, A. (2013). Chronic mild salinity affects source leaves physiology and productivity parameters of rice plants (*Oryza sativa* L., cv. Taipei 309). *Plant Soil* 367, 663–672.
- Wardener, H.E.D. (2001). The Hypothalamus and Hypertension. *Physiol. Rev.* 81, 1599–1658.
- Weickert, M.O., and Pfeiffer, A.F.H. (2008). Metabolic Effects of Dietary Fiber Consumption and Prevention of Diabetes. *J. Nutr.* 138, 439–442.
- Wendling, B., Jucksch, I., Mendonça, E.S., and Alvarenga, R.C. (2010). Organic-Matter Pools of Soil under Pines and Annual Cultures. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 41, 1707–1722.
- WHO (2013). A global brief on hypertension Silent killer, global public health crisis.
- Winterbourn, C.C. (2013). The biological chemistry of hydrogen peroxide. *Methods Enzymol.* 528.
- Xie, Z., Huang, J., Xu, X., and Jin, Z. (2008). Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. *Food Chem.* 111, 370–376.
- Xing, X., Li, D., Chen, D., Zhou, L., Chonan, R., Yamahara, J., Wang, J., and Li, Y. (2014). Mangiferin treatment inhibits hepatic expression of acyl-coenzyme A:diacylglycerol acyltransferase-2 in fructose-fed spontaneously hypertensive rats: a link to amelioration of fatty liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 280, 207–215.
- Yamaguchi, T., and Blumwald, E. (2005). Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities. *Trends Plant Sci.* 10, 615–620.
- Yamakochi, J., FUKUDA, S., SATOH, T., TSUJI, R., SAITO, M., OBATA, A., MATSUYAMA, A., KIKUCHI, M., and KAWASAKI, T. (2007). Antihypertensive and Natriuretic Effects of Less-Sodium Soy Sauce Containing γ -Aminobutyric Acid in Spontaneously Hypertensive Rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71, 165–173.
- Yu, S., Wang, W., and Wang, B. (2012). Recent progress of salinity tolerance research in plants. *Russ. J. Genet.* 48, 497–505.
- Yuan, Y.V., and Kitts, D.D. (2002). Dietary fat source and cholesterol interactions alter plasma lipids and tissue susceptibility to oxidation in spontaneously hypertensive (SHR) and normotensive Wistar Kyoto (WKY) rats. *Mol. Cell. Biochem.* 232, 33–47.
- Zahrán, H.H. (2009). Enhancement of Rhizobia–Legumes Symbioses and Nitrogen Fixation for Crops Productivity Improvement. In *Microbial Strategies for Crop Improvement*, M.S. Khan, A. Zaidi, and J. Musarrat, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 227–254.

Zanin, V. (1998). A new nutritional idea for man : lucerne leaf concentrate. (France: Association pour la promotion des extraits foliaires en nutrition),.

Zaru, A., Maccioni, P., Riva, A., Morazzoni, P., Bombardelli, E., Gessa, G.L., Carai, M.A.M., and Colombo, G. (2013). Reducing effect of a combination of *Phaseolus vulgaris* and *Cynara scolymus* extracts on operant self-administration of a chocolate-flavoured beverage in rats. *Phytother. Res. PTR* 27, 944–947.

Zeggwagh, N.-A., Farid, O., Michel, J.B., and Eddouks, M. (2008). Cardiovascular effect of *Artemisia herba alba* aqueous extract in spontaneously hypertensive rats. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 30, 375–381.

Zhao, D., Zhan, Y., Zeng, H., Koon, H.W., Moyer, M.P., and Pothoulakis, C. (2007). Neurotensin stimulates expression of early growth response gene-1 and EGF receptor through MAP kinase activation in human colonic epithelial cells. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 120, 1652–1656.