

ARTÍCULO ORIGINAL

Efecto de la anemia ferropénica nutricional sobre el contenido en hueso de Ca, P y Fe**Iron deficiency anemia effect of nutrition on the content in bone, Ca, P and Fe****Ramírez L-F M, López-frías M¹, Díaz-castro J, Nestares T, López-Aliaga I*, Alférez MJM y Campos MS**

¹Departamento de Fisiología e Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos. Universidad de Granada
milopez@ugr.es

RESUMEN

La anemia ferropénica nutricional provoca una alteración de gran importancia en el metabolismo fosfocálcico. Con este estudio pretendemos comprobar cómo la anemia ferropénica nutricional afecta el depósito de Ca y P en fémur y el contenido de Fe en esternón, para ello determinamos Fe y Ca por espectrofotometría de absorción atómica y de P por espectrofotometría ultravioleta visible en ratas macho raza Wistar albina ferodeficientes. El depósito de Ca y P en el fémur es significativamente ($P < 0.001$) más bajo para el grupo anémico. Esto puede deberse al incremento de los niveles séricos de PTH y cortisol, inducidos por la ferodeficiencia severa (Campos y col., 2007). Además se produce una drástica disminución ($P < 0.001$) en el contenido de Fe en esternón, hecho que incide de manera muy negativa en el proceso hematopoyético.

PALABRAS CLAVE: Anemia ferropénica nutricional, desmineralización ósea, calcio, fósforo, hierro, fémur, esternón.

ABSTRACT

Nutritional iron-deficiency anemia provokes a noteworthy alteration in the phosphorus and calcium metabolism. With the current study we tried to check how the nutritional iron deficiency anemia affects Ca and P deposit in femur and the Fe content in sternum. We determined Fe and Ca by atomic absorption spectrophotometry and P by ultraviolet /visibly spectrophotometry in Fe-deficient male wistar albino rats. Ca and P deposit in femur is significantly lower in the anaemic group. This can be due to the increase of the serum levels of PTH and cortisol, induced by the severe Fe-deficiency. In addition, a drastic decrease in the Fe content in sternum was recorded, fact that affects in a very negative way in the haematopoietic process.

KEYWORDS: Nutritional iron deficiency anemia, bone demineralization, calcium, phosphorus, iron, femur, sternum

INTRODUCCIÓN

La anemia es un problema de salud pública generalizado que tiene consecuencias de gran alcance para la salud humana y para el desarrollo social y económico. La Organización Mundial de la Salud (OMS) calcula que en el mundo hay aproximadamente un total de 2.000 millones de personas anémicas, y que cerca del 50% de los casos pueden atribuirse a la falta de Fe¹. La anemia ferropénica o por deficiencia de Fe es, por tanto, la carencia nutricional más frecuente de la humanidad, afectando principalmente a mujeres en edad fértil, especialmente las embarazadas, y a adolescentes y niños². En estudios previos se ha puesto de manifiesto que la anemia ferropénica nutricional provoca una alteración de gran importancia en el metabolismo fosfocálcico³, minerales esenciales para la matriz inorgánica ósea, pues forman parte de los cristales de hidroxiapatita [Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂] y brindan al hueso su estabilidad mecánica. Estos antecedentes nos han llevado a estudiar cómo la anemia ferropénica nutricional afecta el depósito de Ca y P en fémur y el contenido de Fe en esternón.

METODOLOGÍA

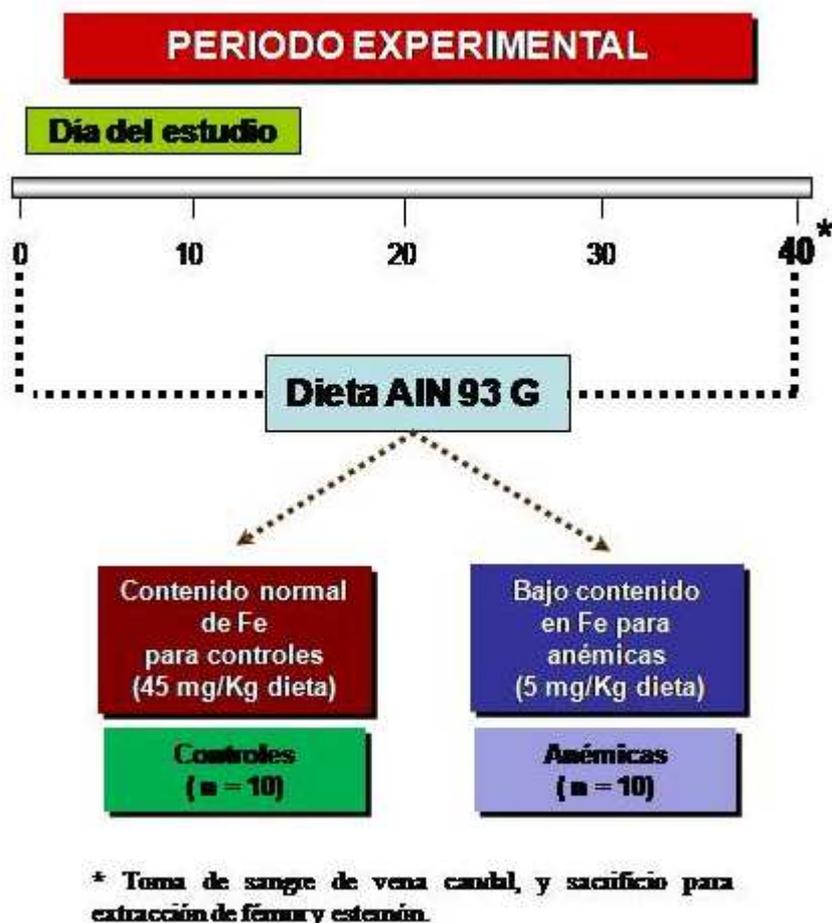
Animales

Se realizó un ensayo biológico en 20 ratas macho (*Ratus norvegicus*, raza Wistar albina), recién destetadas, procedentes del Servicio de Animales de Laboratorio de la Universidad de Granada. Los protocolos de manejo, cuidado y sacrificio de animales empleados fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de Granada y de acuerdo con las directrices comunitarias de la Unión Europea.

Diseño experimental y dietas

Tras el destete, las ratas se dividieron en dos grupos experimentales. La ferrodeficiencia fue inducida en uno de ellos por la técnica desarrollada previamente por nuestro grupo de investigación⁴: los animales fueron alimentadas durante 40 días con la dieta AIN-93G⁵, pero con bajo contenido en Fe (5 mg Fe/kg dieta). La dieta baja en Fe utilizada para inducir la anemia se obtuvo omitiendo el Fe del suplemento mineral de la misma. El grupo control recibió la misma dieta, pero con un contenido normal en Fe (45 mg Fe/kg dieta)⁵.

FIGURA 1. Diseño Experimental



Los suplementos minerales y vitamínicos de la dieta AIN 93-G se prepararon de acuerdo a las recomendaciones del Instituto Americano de Nutrición⁵, y se realizaron ligeras modificaciones en la fuente y nivel de grasa: se empleó aceite de oliva en lugar de soja (debido a sus conocidos efectos beneficiosos sobre la salud y por ser la más comúnmente consumida en nuestro país) siendo la proporción de grasa del 10% en lugar del 7%. La fuente proteica fue caseína y el Fe se aportó como citrato férrico. El contenido en este mineral obtenido por análisis en las dietas ensayadas fue: 44.71 mg/kg en la dieta para los animales controles y 6.31 mg/kg en la dieta que recibieron las ratas anémicas.

Tabla 1. Composición de las dietas^a

Componente	Cantidad (g/kg)
Dieta AIN 93 G (contenido normal o bajo contenido en Fe)^a	
Caseína	200
Aceite de Oliva Virgen	100
Almidón de trigo	501
Ingredientes constantes ^b	199

^a Las dietas fueron preparadas de acuerdo a las recomendaciones del Instituto Americano de Nutrición (Reeves y col., 1993) para las ratas controles (contenido normal de Fe: 45 mg/kg dieta) y con bajo contenido en Fe para las ratas anémicas (5 mg/kg dieta).

^b Los ingredientes constantes (g/kg dieta) fueron: fibra (celulosa micronizada) 50, sacarosa 100, Cloruro de colina 2.5, L-cistina 1.8, corrector mineral 35, corrector vitamínico 10. El corrector vitamínico y mineral se preparó de acuerdo a las directrices del Instituto Americano de nutrición (Reeves y col., 1993).

El día previo al sacrificio, las ratas se sometieron a un ayuno de 12 horas y posteriormente, fueron pesadas y anestesiadas con pentobarbital sódico (Sigma Diagnostics, St Louis, MI, USA) mediante inyección intraperitoneal a una dosis de 5 mg/100 g peso corporal. Tras laparotomía media, los animales fueron desangrados por canulación de la aorta abdominal y se procedió a la extracción del fémur y del esternón.

Desde el comienzo del estudio, las ratas se alojaron en células individuales de metabolismo con recogida separada de heces y orina. Estas células se encontraban en una habitación aireada y termorregulada ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) con fotoperiodo controlado de 12 horas (luz-oscuridad) y un 55-60% de humedad. El agua bidestilada estuvo disponible “*ad libitum*”, mientras que la ingesta de alimento se controló, de manera que los animales comieron 15 g de alimento al día “*pair feed*”, para evitar las diferencias debidas a la cantidad de dieta ingerida. Estos 15 g son el 80% de la ingesta media de alimento al día.

Técnicas analíticas

La materia seca es determinada como la parte de sustancia que no desaparece al someter la muestra a una temperatura de $105 \pm 2^\circ\text{C}$, hasta que alcance un peso constante. Ésta se midió en las dietas ensayadas y en los órganos objeto de estudio.

Mineralización por vía húmeda

Un gramo de muestra en sustancia seca en el caso de las dietas o el hueso completo se introdujo en un vaso de precipitado, se añadieron 10-12 mL de ácido nítrico concentrado (riqueza del 69%) y se tapó con un vidrio de reloj. Se colocó en un baño de arena SELECTA

(Selecta, Barcelona, España) a una temperatura de 70-80°C y se esperó la aparición de vapores rojizos/anaranjados de óxido nítrico. Se añadieron 2 mL de ácido nítrico (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) a la muestra, tantas veces como fue necesario hasta la aparición de vapores blanquecinos. En este momento se comenzó a añadir 10 mL de mezcla nítrico/perclórico (4:1, v/v) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) en alícuotas de 2 mL cada vez, hasta completar la mineralización. Una vez finalizada, se dejó enfriar, se filtró en papel Whatman del nº 41 libre de cenizas (Whatman International Ltd., Maidstone, UK) y se enrasó hasta un volumen final de 25 mL en un matraz aforado. Como resultado final se obtuvo una solución transparente que se empleó en la posterior determinación de minerales.

Determinación de hierro y calcio

Las concentraciones de hierro y calcio en fémur y esternón se determinaron por espectrofotometría de absorción atómica (AAS) (PERKIN ELMER 1100B, Norwalk, USA) a partir de una muestra adecuada, previamente mineralizada por vía húmeda y diluida convenientemente, comparándose frente a una serie de patrones de concentración conocida. En la espectroscopía atómica se consigue que los átomos individuales de una especie interactúen con la radiación electromagnética.

Dada la importancia de una exacta determinación de los distintos parámetros estudiados se llevó a cabo un control de calidad de estas determinaciones. Este control incluyó el análisis de un conjunto de patrones primarios y muestras problemas. Los estándares primarios son de dos tipos: propios de cada determinación y sueros controles liofilizados (BCR certified reference material CRM 063R; Community Bureau of Reference, Brussels, Belgium). Los valores derivados del análisis de este material de referencia son: Fe: 210 ± 6 mg/kg (valor certificado: 214 ± 6 mg/kg), Ca: 132 ± 2 mg/kg (valor certificado: 135 ± 1 mg/kg).

En nuestro caso, tanto la desviación estándar de la media de los patrones primarios entre ellos, como en relación con las muestras problema no fueron significativos en ningún caso a lo largo de todo el tiempo de experimentación en que se realizó el trabajo.

Determinación de fósforo

La concentración de fósforo en fémur y esternón se analiza por espectrofotometría UV visible mediante la técnica de Fiske-Subbarow (1925).

Análisis estadístico

Los datos se presentan como valor medio \pm EEM. Para comprobar las diferencias entre

grupos (controles vs. anémicas) se usa el test de la *t* de *Student* para muestras independientes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Depósito mineral en situación de anemia ferropénica nutricional inducida

Al final del estudio, el depósito de Ca ($168,31 \pm 3,50$ en controles vs. $99,42 \pm 3,7$ mg/g SS en anémicas) y P ($122,83 \pm 2,60$ en controles vs. $102,62 \pm 2,64$ mg/g SS en anémicas) en el fémur es significativamente ($P < 0.001$) más bajo para el grupo anémico. Estos datos confirman los obtenidos en estudios previos de nuestro grupo de investigación, en los que se observó un importante grado de desmineralización ósea causada por la ferropénica, debida probablemente al incremento de los niveles séricos de PTH (que estimula la actividad osteoclástica) y cortisol (que inhibe la diferenciación de los osteoblastos), inducidos por la anemia ferropénica severa⁶. En este sentido, otros autores también han puesto de manifiesto la relación existente entre el Fe y el metabolismo óseo, demostrando que la ingesta de Fe se asocia con la densidad mineral ósea y la resistencia mecánica; afectando negativamente a la microarquitectura y a la calidad de huesos largos y vertebras^{7,8,9,10,11}.

Tabla 2. Depósito de minerales en hueso*

Órganos 40 días	Grupo Control (contenido normal en Fe)	Grupo Anémico (bajo contenido en Fe)
Ca en fémur (mg/g SS)	168,31±3,50	99,42±3,7*
P en fémur (mg/g SS)	122,83±2,60	102,62±2,64*
Fe en esternón (µg/g SS)	77,65±4,35	61,90±2,85*

*Valores significativamente diferentes ($P < 0.001$) del grupo control mediante el test de la "*t* de *Student*".

Además, en la ferropénica, se produce una importante disminución ($P < 0.001$) en el contenido de Fe ($77,65 \pm 4,35$ en controles vs. $61,90 \pm 2,85$ µg/g SS en anémicas) en esternón, hecho que incide de manera muy negativa en el proceso hematopoyético.

CONCLUSIÓN

La anemia ferropénica nutricional causa un importante grado de desmineralización ósea debida al menor depósito de calcio y fósforo, elementos constitutivos de los cristales de hidroxiapatita y de la matriz inorgánica ósea. Así como una depleción del contenido de hierro en esternón, órgano implicado en la eritropoyesis.

BIBLIOGRAFIA

1. OMS/UNICEF/UNU (2001). Iron deficiency anaemia: assessment, prevention, and control. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, (WHO/NHD/01.3).
 2. Stephenson LS, Lathan MC y Ottesen EA (2000). Global malnutrition. *Parasitology*. 121: S5-S22.
 3. Campos MS, Barrionuevo M, Alférez MJ, Gómez-Ayala AE, Rodríguez-Matas MC, López Aliaga I y Lisbona F (1998). Interactions among iron, calcium, phosphorus and magnesium in the nutritionally iron-deficient rat. *Exp Physiol*. 83: 771-781.
 4. Pallarés I, Lisbona F, López-Aliaga I, Barrionuevo M, Alférez MJM y Campos MS (1993). Effects of iron deficiency on the digestive utilization of iron, phosphorus, calcium and magnesium in rats. *Br J Nutr*. 70: 609-620.
 5. Reeves P, Nielsen F y Fahey G (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.
 6. Campos MS, Barrionuevo M, Alférez MJM, Nestares T, Díaz-Castro J, Ros PB, Ortega E y López Aliaga I (2007). Consumption of caprine milk improves metabolism of calcium and phosphorus in rats with nutritional ferropenic anaemia. *Int Dairy J*. 17: 412-419.
 7. Medeiros DM, Ilich J, Ireton J, Matkovic V, Shiry L y Wildman R (1997). Femurs from rats fed diets deficient in copper or iron have decreased mechanical strength and altered mineral composition. *J Trace Elem Exp Med*. 10: 197-203.
 8. Medeiros DM, Plattner A, Jennings D y Stoecker B (2002). Bone morphology, strength and density are compromised in iron-deficient rats and exacerbated by calcium restriction. *J Nutr*. 132: 3135-3141.
 9. Medeiros DM, Stoecker B, Plattner A, Jennings D y Haub M (2004). Iron deficiency negatively affects vertebrae and femurs of rats independently of energy intake and body weight. *J Nutr*. 134: 3061-3067.
 10. Parelman M, Stoecker B, Baker A y Medeiros D (2006). Iron restriction negatively affects bone in female rats and mineralization of hFOB osteoblast cells. *Exp Biol Med (Maywood)*. 231: 378-386.
 11. Katsumata S, Tsuboi R, Uehara M y Suzuki K (2006). Dietary iron deficiency decreases serum osteocalcin concentration and bone mineral density in rats. *Biosci Biotechnol Biochem*. 70: 2547-2550.
-