

## ARTÍCULO ORIGINAL

**Relación hepatosomática y depósito de hierro en hígado durante la instauración de anemia ferropénica nutricional****Hepatosomatic index and iron liver stores during the instauration of nutritional ferropenic anaemia****Díaz-Castro J, Alférez MJM, López-Aliaga I\*, Ramírez L-F M y Campos MS**

Departamento de Fisiología, Facultad de Farmacia, e Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos "José Mataix", Universidad de Granada, 18071 Granada

\*milopez@ugr.es

**RESUMEN**

El hígado es el principal órgano de almacén de hierro en el organismo y juega un papel crucial en la homeostasis de dicho mineral. Los niveles de hierro en se consideran un fiel reflejo del estatus de hierro en el organismo, hecho que nos indujo a determinar la relación hepatosomática y el contenido de hierro en hígado durante la instauración de la anemia ferropénica nutricional inducida experimentalmente en ratas en crecimiento. Los depósitos de hierro estaban profundamente deplecionados, el peso corporal y el peso hepático fue menor en animales anémicos. Como consecuencia, la relación hepatosomática se incrementó en animales ferrodeficientes. Durante la ferrodeficiencia, varios factores reguladores de la hepcidina se alteran, aumenta la demanda eritropoyética por disminución de los parámetros hematológicos, hay un menor aporte de oxígeno a los tejidos y se deplecionan los depósitos corporales, alterándose el metabolismo de hierro, hechos que conducen a una disminución de dicha hormona, lo cual se traducirá en una menor interacción con la ferroportina 1, evitando su internalización y degradación, de manera que aumenta el flujo de salida de hierro ferroso desde los hepatocitos y consecuentemente se reduce su depósito. Por otra parte, la ferrodeficiencia afectó el peso corporal, hecho que se puede atribuir a los menores niveles de hormonas tiroideas encontrados en esta patología. Puesto que hay una clara reducción de la hemoglobina y recuento de hematíes, el suministro de oxígeno a las células se limita considerablemente e incide negativamente en la síntesis de ATP e incremento de peso.

**PALABRAS CLAVE:** Relación hepatosomática. Hierro hepático. Anemia ferropénica nutricional.**ABSTRACT**

Liver is main storage organ of iron in the organism and plays a crucial role in the homeostasis of this mineral. The levels of iron are considered a routine index of the iron status in the body, fact that encouraged us to asses the hepatosomatic index and the iron content in liver, during iron-deficiency anaemia in growing rats. In rats with iron-deficiency anaemia, iron deposits were deeply depleted, body weight and hepatic weight were lower, moreover the hepatic iron deposits were lower in anaemic rats. During the iron-deficiency, several regulatory factors of the hepcidin are impaired (the erythropoietic demand increase due to the decrease of the haematological parameters, there is a minor supply of oxygen to the tissues and the body stores are depleted, being the iron metabolism altered), facts that leads to a decrease of the above mentioned hormone, which will be translated in a minor interaction with the ferroportin1, avoiding its internalization and degradation, therefore increases the outflow of ferrous iron from the hepatocytes and consistently its storage diminishes in the above mentioned organ. On the other hand, the iron-deficiency impaired the body weight, fact that can be related with the lower levels of thyroid hormones found in this pathology. Moreover, since in iron-deficiency situation the haemoglobin and red blood cells count diminish drastically, the supply of oxygen to the cells limits itself considerably, which affects in a negative way to the ATP synthesis and increase of weight.

**KEYWORDS:** Hepatosomatic index. Liver iron. Nutritional ferropenic anaemia.

Fecha de recepción (Date received): 15-04-2010

Fecha de aceptación (Date accepted): 10-06-2010

Ars Pharm 2010; 51 .Suplemento 3: 501-508.

---

## INTRODUCCIÓN

La anemia por deficiencia de hierro ha sido reconocida como uno de los mayores problemas sanitarios que afecta a una elevada proporción de la población mundial a todas las edades. Los grupos de población más afectados son las mujeres en edad fértil, especialmente las embarazadas y los niños, durante la etapa de crecimiento<sup>1</sup>. La anemia se produce cuando las pérdidas de hierro o los requerimientos del mismo superan el aporte que proporciona la dieta, con lo cual se agotan las reservas del organismo. Se trata de un proceso patológico en el cual, la concentración de hemoglobina (Hb) en las células rojas es anormalmente baja. No hay duda de que la deficiencia de Fe es la causa de la gran mayoría de anemias. La anemia por deficiencia de Fe o anemia ferropénica nutricional se caracteriza por la reducción o ausencia de depósitos de Fe, bajos niveles de Fe sérico y Hb, reducción del hematocrito y niveles de plaquetas incrementados<sup>2</sup>, bajo porcentaje de saturación de transferrina, disminución de ferritina sérica y un drástico incremento en la capacidad total de fijación al Fe.

El hígado es el principal órgano de almacén de Fe en el organismo, y no es sorprendente la hepatotoxicidad como una consecuencia principal de la sobrecarga de Fe, dado el papel crucial que juega este tejido en la homeostasis de dicho mineral. Los niveles de Fe en hígado pueden ser considerados por tanto un fiel reflejo del estatus de Fe en el organismo<sup>3,4</sup>, con lo cual resulta de gran interés conocer cómo se afecta el depósito de dicho mineral en este órgano durante la instauración de la ferrodeficiencia. Teniendo en cuenta estas consideraciones, el objetivo del presente estudio fue determinar la relación hepatosomática y el contenido de Fe en hígado en la instauración de la anemia ferropénica nutricional en ratas en crecimiento.

## MATERIAL Y MÉTODOS

En el presente estudio se han empleado 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.

Tras el destete, las ratas fueron divididas en dos grupos experimentales. La ferrodeficiencia fue inducida en uno de los grupos por la técnica desarrollada previamente por nuestro grupo de investigación<sup>5</sup>, las ratas son sometidas a un periodo de 40 días, en los cuales se les suministra dieta estándar AIN-93G<sup>6</sup>, 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 dieta. El grupo control recibió la misma dieta, pero con un contenido normal en Fe (45 mg Fe/kg dieta)<sup>6</sup>.

Desde el comienzo del estudio, las ratas fueron alojadas en células individuales de metabolismo. Estas células se encuentran situadas en una habitación aireada y termorregulada

( $21 \pm 2$  °C) con fotoperíodo controlado de 12 horas (luz-oscuridad) y un  $55 \pm 10\%$  de humedad. La dieta y el agua bidestilada estaba disponible ad libitum para todas las ratas. En el día 40, se sacrifican los animales siguiendo el Protocolo del Comité de Ética de la Universidad de Granada. Se anestesia al animal con pentobarbital sódico (Sigma Diagnostics, St Louis, MI, USA) a una dosis de 5 mg/100 g de peso por vía intraperitoneal y tras laparotomía media se extrae el hígado, se lava con solución salina (NaCl al 0,9%) y se conserva congelado a  $-40$  °C para evaluar posteriormente el contenido de Fe hepático y relación hepatosomática.

### **Dietas ensayadas**

Las dietas estándar AIN 93-G (con contenido normal o bajo contenido en Fe) y los suplementos minerales y vitamínicos son preparados de acuerdo a las recomendaciones del Instituto Americano de Nutrición<sup>6</sup> pero con ligeras modificaciones en la fuente y nivel de grasa: la grasa proviene de 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) y la proporción de grasa es 10% en lugar del 7%. La fuente de Fe empleada fue citrato férrico. El contenido en Fe por análisis en las dietas ensayadas usadas 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.

### **Materia seca**

Es determinada como la parte de sustancia que no desaparece al someter la muestra a una temperatura de  $105 \pm 2$  °C, hasta alcanzar un peso constante. La materia seca se determina en las distintas dietas ensayadas, y en el órgano objeto de estudio, el hígado.

### **Materia grasa**

El contenido graso de las dietas fue determinado tras hidrólisis hidroclicórica por extracción con éter de petróleo<sup>7</sup>.

### **Contenido proteico**

El contenido en nitrógeno de las dietas se determina por el método Kjeldahl usando un factor de conversión de 6,25<sup>8</sup>.

### **Mineralización por vía húmeda**

Un gramo de muestra (hígado y dietas) en sustancia seca se coloca en un vaso de precipitado, se añaden 10-12 ml de ácido nítrico concentrado (69%, v/v) y se tapa con un vidrio de reloj. Se coloca en un baño de arena SELECTA (Selecta, Barcelona, España) a una temperatura de 70-80 °C y se espera la aparición de vapores rojizos/anaranjados de óxido nítrico. Se añaden alícuotas de 2 ml de ácido nítrico (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) a la muestra, tantas veces como sea necesario hasta la aparición de vapores blanquecinos. En este momento se comienza 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 finalizado el proceso, se deja enfriar, se filtra en papel Whatman del nº 41, libre de cenizas (Whatman International Ltd., Maidstone, UK) y se enrasa hasta un volumen final de 25 ml en un matraz aforado. Como resultado final, se obtiene una solución transparente que se emplea en la posterior determinación de minerales.

### **Determinación de hierro**

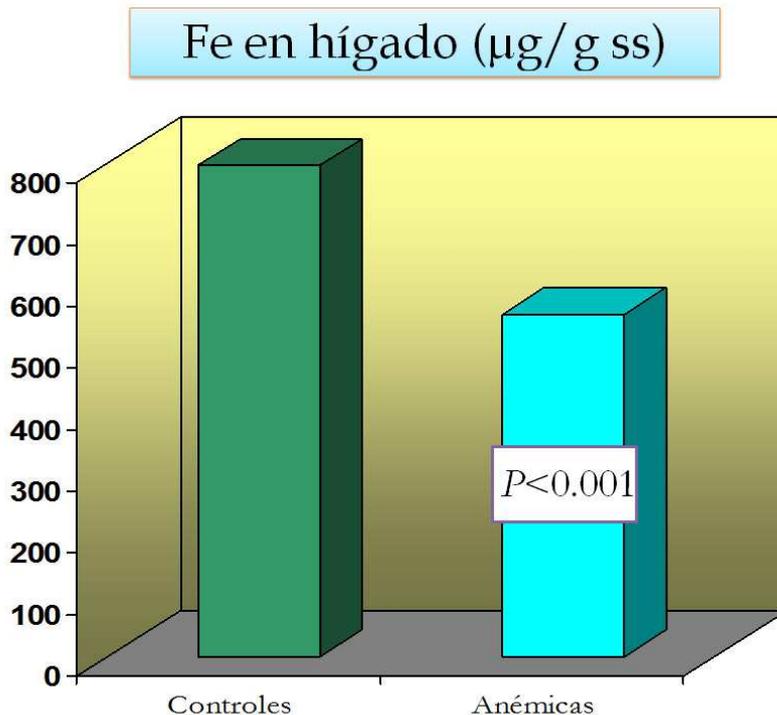
Las concentraciones de Fe en el hígado y en las dietas se determinan por espectrofotometría de absorción atómica (EAA) (PERKIN ELMER 1100B, Norwalk, USA) a partir de una muestra adecuada, previamente mineralizada por vía húmeda y diluida convenientemente, comparándose frente a una serie de patrones de concentración conocida. Dada la importancia de una exacta determinación de los distintos parámetros estudiados se ha llevado a cabo un control de calidad de estas determinaciones. Este control incluye el análisis de un conjunto de patrones primarios y muestras problemas. Los estándar 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:  $210 \pm 6$  mg/kg (valor certificado:  $214 \pm 6$  mg/kg).

### **Análisis estadístico**

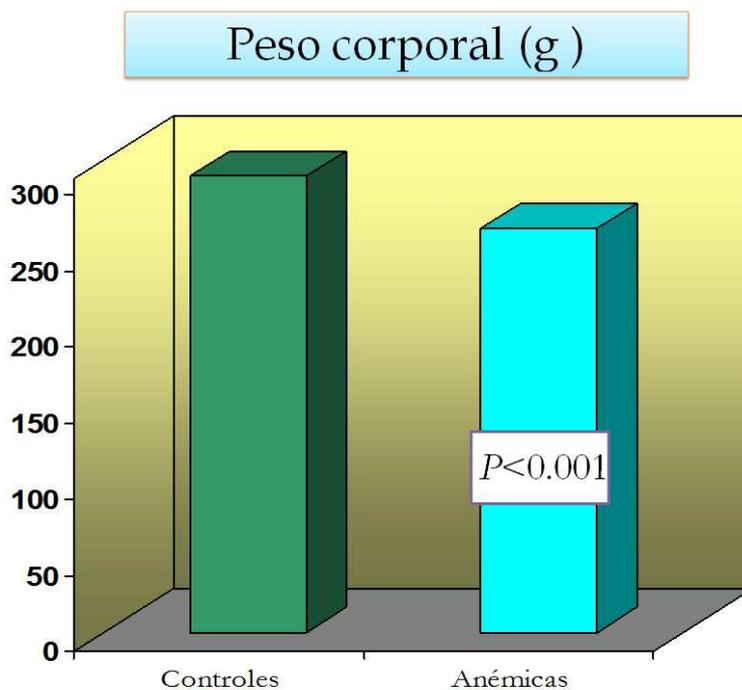
El test de la t de Student para muestras independientes se empleó para determinar las diferencias entre ambos grupos experimentales (controles y anémicas). Las diferencias son consideradas significativas a un nivel de  $P < 0,05$ . Todos los análisis se han efectuado con el paquete estadístico "Statistical Package for Social Sciences" (SPSS, versión 15.0, 2008).

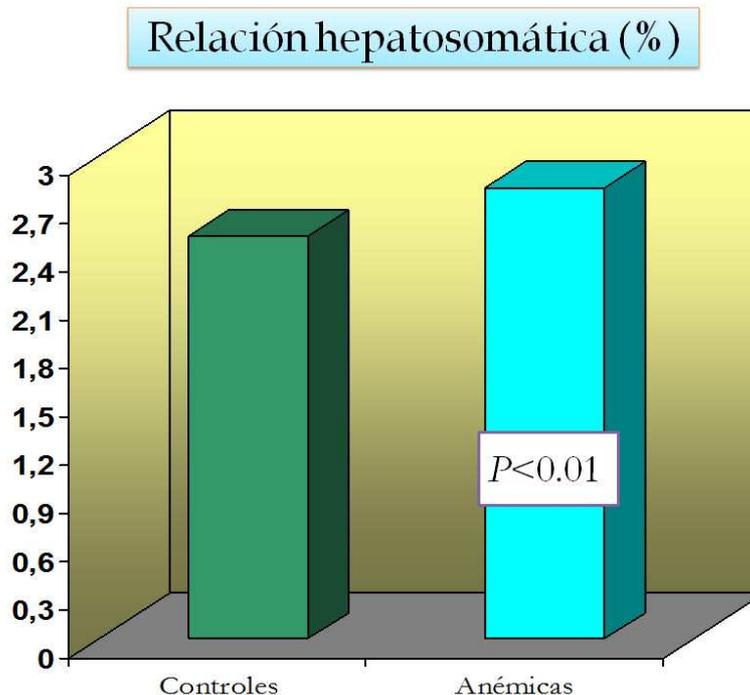
## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Las diferencias en el contenido de Fe hepático ( $796,47 \pm 39,42$  µg/g SS en controles vs.  $555,02 \pm 43,11$  µg/g SS en anémicas;  $P < 0,001$ ) (Figura 1) revelan que los depósitos de Fe se encuentran profundamente deplecionados y que se ha alcanzado una severa ferropdeficiencia inducida por el consumo prolongado de una dieta restrictiva en Fe durante 40 días.



El peso corporal es menor en anémicas ( $298,4 \pm 7,8$  g en controles vs.  $270,2 \pm 7,5$  g en anémicas;  $P < 0,001$ ) (Figura 2), y el peso hepático también descendió ligeramente ( $7,926 \pm 0,25$  g en controles vs.  $7,598 \pm 0,33$  g en anémicas). Como consecuencia, la relación hepatosomática (relación peso hígado/peso corporal) es mayor en los animales ferodeficientes ( $2,60 \pm 0,06$  % en controles vs.  $2,79 \pm 0,09$  % en anémicas;  $P < 0,01$ ) (Figura3).





El menor contenido de Fe en hígado observado en situación de anemia ferropénica se atribuye a la disminución de la hepcidina hepática descrita en esta patología<sup>9</sup>. La hepcidina es un péptido hepático, que resulta clave en el metabolismo del Fe. Hay varios factores que regulan la síntesis de esta hormona peptídica. Entre los estímulos con mayor capacidad reguladora de la hepcidina destacan la inflamación, ciertas infecciones, demanda eritropoyética, hipoxia y de manera especial el estatus de Fe corporal<sup>10</sup>. Estudios de deficiencia de Fe observada en ratones KO para el gen de la hepcidina, sugiere que este péptido interviene regulando el almacenamiento del mineral (atenuando tanto la absorción intestinal de Fe como la liberación del Fe de los macrófagos). Por otra parte, una baja expresión de la hepcidina en situación de sobrecarga de Fe, sugiere que la hepcidina es también un factor en la señal de la regulación eritroide<sup>11</sup>. La expresión disminuida de la hepcidina en respuesta a la hipoxia anémica, y su expresión aumentada en ratones y humanos con inflamación, sugiere que esta hormona peptídica también puede participar en la mediación de la hipoxia y en la cascada de reguladores inflamatorios<sup>12</sup>. La hepcidina también controla los niveles de Fe directamente actuando recíprocamente con la ferroportina 1 (FPN1), conduciendo a la internalización y degradación de FPN1 cuando niveles de Fe son altos, por consiguiente bloqueando la liberación del Fe en los sitios de almacén; hepatocitos, enterocitos y macrófagos<sup>4</sup>.

Durante la ferrodeficiencia, varios factores reguladores de la hepcidina se ven alterados (aumenta la demanda eritropoyética por disminución de los parámetros hematológicos, hay un menor aporte de oxígeno a los tejidos y se deplecionan los depósitos corporales, alterándose el metabolismo de Fe), hechos que conducen a una disminución de

---

dicha hormona, lo cual se traducirá en una menor interacción con la FPN1<sup>13</sup>, evitando su internalización y degradación, de manera que aumenta el flujo de salida de Fe<sup>2+</sup> desde los hepatocitos y consecuentemente se reduce su depósito en dicho órgano.

Por otra parte, el grado de ferodeficiencia producido por la dieta restrictiva en Fe es lo suficientemente severo como para afectar al peso corporal, lo cual coincide con los resultados de otros autores<sup>14</sup> y se puede atribuir a los menores niveles de hormonas tiroideas encontrados en esta patología<sup>15</sup>. Por otra parte, puesto que en situación de ferodeficiencia la hemoglobina y recuento de hematíes se reducen drásticamente, el suministro de oxígeno a las células se limita considerablemente, lo cual incide de manera negativa en la síntesis de ATP e incremento de peso. Estos hallazgos coinciden con los descritos por Schneider y col.<sup>16</sup>, quienes aseguraban que en niños de entre 12 y 36 meses, los bajos niveles de hemoglobina perjudican significativamente la ganancia de peso, explicando por tanto la asociación encontrada en el presente estudio entre el menor peso y la ferodeficiencia.

A la vista de los resultados, podemos afirmar que la severa ferodeficiencia inducida de manera experimental provoca una depleción de los niveles hepáticos de Fe debido a la disminución de la hepcidina, junto con una ligera disminución del tamaño del hígado, hecho que incide de manera negativa en la ganancia de peso de animales en crecimiento, ya que la hipoxia inducida por la ferodeficiencia limita la producción de ATP.

**BIBLIOGRAFIA**

1. Stephenson LS, Lathan MC, Ottesen EA. Global malnutrition. *Parasitology*. 2000; 121:S5-S22.
2. Campos MS, Barrionuevo M, Alférez MJM, Gómez-Ayala AE, Rodríguez-Matas MC, López-Aliaga I, Lisbona F. Interactions among iron, calcium, phosphorus and magnesium in nutritionally iron – deficient rats. *Experimental Physiology*. 1998; 83:771-781.
3. Ramm GA, Ruddell RG. Hepatotoxicity of iron overload: Mechanisms of iron-induced hepatic fibrogenesis. *Seminars in Liver Disease*. 2005; 25:433-449.
4. Nemeth E., Ganz T. Regulation of iron metabolism by hepcidin. *Annu. Rev. Nutr.*, 2008; 26:323-342.
5. Pallarés I, Lisbona F, López-Aliaga I, Barrionuevo M, Alférez MJM, Campos MS. Effects of iron deficiency on the digestive utilization of iron, phosphorus, calcium and magnesium in rats. *British Journal of Nutrition*. 1993; 70:609-620.
6. Reeves P, Nielsen F, Fahey G. 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. *Journal of Nutrition*. 1993; 123:1939-1951.
7. Sanderson P. 1986. A New method of analysis of feeding stuffs for the determination of crude oils and fat. In: Haresing W. and Cole DJA. *Recent advances in animal nutrition*. London: Butter Worths, pp: 77-86.
8. Kjeldahl JZ. Neue Methode zur Bestimmung des stickstoffs in organischen Körpern. *Z. Analytical Chemistry*. 1883; 22:366-382.
9. Theurl I, Aigner E, Theurl M, Nairz M, Seifert M, Schroll A, Sonnweber T, Eberwein L, Witcher DR, Murphy AT, Wroblewski VJ, Wurz E, Datz C, Weiss G. Regulation of iron homeostasis in anemia of chronic disease and iron deficiency anemia: diagnostic and therapeutic implications. *Blood*. 2009; 113:5277-5286.
10. Zhang A., Enns C. Iron homeostasis: recently identified proteins provide insight into novel control mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*. 2009; 284, 711–715.
11. Weinstein DA, Roy CN, Fleming MD, Loda MF, Wolfsdorf JI, Andrews NC. Inappropriate expression of hepcidin is associated with iron refractory anemia: implications for the anemia of chronic disease. *Blood*. 2002; 100:3776-3781.
12. Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, Danaan JL, Bigard X, Devaux I, Beaumont C, Kahn A, Vaulont S. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia and inflammation. *The Journal of Clinical Investigation*. 2002; 110:1037-1044.
13. Tselepis C, Ford SJ, McKie AT, Vogel W, Zoller H, Simpson RJ, Diaz Castro J, Iqbal TH, Ward DG. Characterization of the transition-metal-binding properties of hepcidin. *Biochemical Journal*. 2010; 427:289-296.
14. Strube YNJ, Beard JL, Ross AC. Iron deficiency and marginal vitamin A deficiency affect growth hematological indices and the regulation of iron metabolism genes in rats. *Journal of Nutrition*. 2002; 132:3607–3615.
15. Beard JL, Brigham DE, Kelley SK, Green MH. Plasma thyroid hormone kinetics are altered in iron-deficient rats. *Journal of Nutrition*. 1998; 128: 1401–1408.
16. Schneider JM, Fujii ML, Lamp CL, Lönnerdal B, Dewey KG, Zidenberg-Cherr S. The use of multiple logistic regression to identify risk factors associated with anemia and iron deficiency in a convenience sample of 12–36-mo-old children from low-income families. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2008; 87: 614-620.