

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA
INSTITUTO DE NUTRICIÓN Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS “JOSÉ MATAIX”



**“INFLUENCIA DEL CONSUMO DE LECHE DE CABRA O VACA
ENRIQUECIDA O NO EN HIERRO SOBRE EL REMODELADO
ÓSEO Y DESTINO METABÓLICO DE HIERRO, CALCIO Y
FÓSFORO EN SITUACIÓN DE ANEMIA FERROPÉNICA”**

TESIS DOCTORAL

MERCEDES RAMÍREZ LÓPEZ-FRÍAS
2010

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Mercedes Ramírez López Frías
D.L.: GR 3205-2010
ISBN: 978-84-693-4417-0

The seal of the University of Granada is a circular emblem. It features a central figure of a double-headed eagle with its wings spread, perched on a shield. Above the eagle is a crown. The shield is divided into four quadrants, each containing a different symbol. The eagle's feet are positioned on two columns. The entire emblem is surrounded by a circular border containing Latin text: "UNIVERSITATIS GRANATAE CAROLVS RO IMP SEPT AVG HISPAN REX FVNDA TOR".

Esta memoria de Tesis Doctoral forma parte del Proyecto de Investigación AGL2006-02301/ALI, subvencionado por la Dirección General de Investigación Científica y Técnica (DGICYT) del Ministerio de Educación y Ciencia.

Margarita Sánchez Campos. Catedrática de la Universidad de Granada.

Magdalena López Frías. Profesora Titular de la Universidad de Granada.

Teresa Nestares Pleguezuelo. Profesor Contratado Doctor de la
Universidad de Granada.

CERTIFICAN:

Que los trabajos de investigación que se exponen en la Memoria de Tesis Doctoral: **“Influencia del consumo de leche de cabra o vaca enriquecida o no en hierro sobre el remodelado óseo y destino metabólico de hierro, calcio y fósforo en situación de anemia ferropénica”**, han sido realizados bajo nuestra dirección por la licenciada Mercedes Ramírez López-Frías y la encontramos conforme para ser presentada y aspirar al Grado de Doctor por la Universidad de Granada con el Tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, extendemos el presente en Granada a veintidós de Abril de dos mil diez.



**MEMORIA QUE PRESENTA LA LDA. MERCEDES RAMÍREZ LÓPEZ-FRÍAS
PARA ASPIRAR AL GRADO DE DOCTOR POR LA UNIVERSIDAD DE
GRANADA**

ESTA TESIS DOCTORAL HA SIDO REALIZADA BAJO LA DIRECCIÓN DE:

Prof. Dra. Margarita Sánchez Campos

Prof. Dra. Magdalena López Frías

Prof. Dra. Teresa Nestares Pleguezuelo

Lda. Mercedes Ramírez López-Frías

Granada, 2010



AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que, de una forma u otra, con su apoyo y colaboración, han hecho posible el desarrollo de esta Tesis, en especial:

A mi directora la Profesora Margarita Sánchez Campos, por acogerme en su grupo de investigación en el que he aprendido tanto. Gracias por ser el motor de este trabajo, por su tiempo y dedicación, pero sobre todo por su cariño y cercanía que me han hecho el camino mucho más fácil.

A mi directora la Profesora Magdalena López Frías, gracias por apoyarme y guiarme no sólo en la realización de esta tesis, sino desde el comienzo de mi vida universitaria. Es mucho lo que he aprendido de ti como investigadora, pero es aún más lo que me llevo personalmente. Eres un ejemplo para mí.

A mi directora la Profesora Teresa Nestares Pleguezuelo, por acompañarme en mis primeros pasos en el laboratorio. Gracias por tu implicación a lo largo de todo este trayecto, ayudándome con tus valiosos consejos y orientaciones.

A las Profesoras Inmaculada López Aliaga y María José Muñoz Alférez, por el interés mostrado en cada momento del trabajo y vuestros continuos ánimos.

Al Profesor Emilio Martínez de Victoria, director del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, por poner a mi disposición las instalaciones donde he realizado la parte experimental de esta Tesis.

A la Profesora María López-Jurado Romero de la Cruz Directora del Departamento de Fisiología, por aceptarme desde el principio en dicho departamento.

A Elisa Alcover, por su amabilidad y disponibilidad para solucionar los temas administrativos y siempre con una sonrisa.

A Javier Díaz Castro, por sentir esta tesis como tuya y transmitirme tu entusiasmo por la investigación. Esto no habría sido posible sin tu ayuda incondicional y tu aportación como científico, pero sobre todo como amigo. Mil gracias.

A Silvia Hijano Fernández, por estar siempre ahí, sacarme de más de un apuro y hacer agradables las horas de trabajo. Somos un equipo. Mil gracias.

A M^a Ángeles, con quien he compartido tanto tiempo en el laboratorio, a María y a todos mis compañeros del Departamento de Fisiología y del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos por ofrecerme su tiempo y ayuda siempre que lo he necesitado.

A todos mis amigos, que han seguido muy de cerca el desarrollo de este trabajo de investigación y que con sus ánimos también han contribuido a que esto sea hoy una realidad.

A mi familia, mis padres, mi modelo profesional y personal, a mis hermanas: Cristina, Rocío y Ana, por vivir todos y cada uno de los instantes de esta Tesis tan intensamente como yo, alentándome a no conformarme nunca. Gracias por confiar en mí y ser mi apoyo.

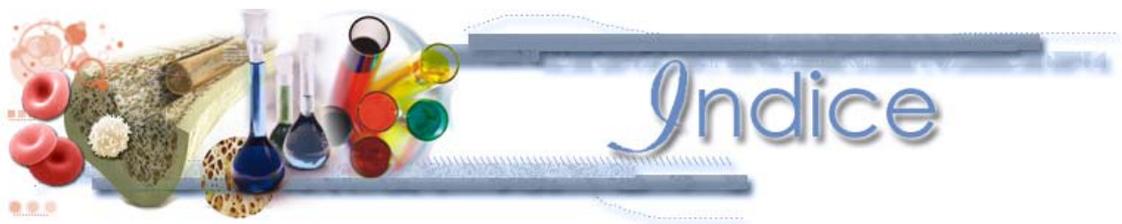
A mis abuelos: Juan Antonio, Paqui, Enrique y Ana, por abrirnos el camino a los que venimos detrás y conducirme a lo largo de toda mi vida incluso desde lejos.

A Diego, porque eres capaz de ver más allá y has creído en mí siempre, tenerte a mi lado me hace aspirar a ser mejor. Gracias por hacerme increíblemente feliz.

“El hombre encuentra a Dios detrás de
cada puerta que la ciencia logra abrir.”

Albert Einstein.

A mis padres...
Porque os lo debo todo.



1. OBJETO	1
2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	
2.1. Remodelado óseo	3
2.1.1. Osteoblastos	5
2.1.2. Osteoclastos	7
2.1.3. Fases del remodelado óseo	9
2.1.4. Factores reguladores del remodelado óseo	11
2.1.5. Marcadores del remodelado óseo.....	20
2.1.5.1. Marcadores de formación ósea	21
2.1.5.2. Marcadores de resorción ósea	23
2.2. El calcio como nutriente.....	25
2.2.1. Fuentes alimentarias de calcio	25
2.2.2. Funciones del calcio	30
2.2.3. El calcio y las enfermedades crónicas.....	33
2.2.4. Utilización nutritiva de calcio	39
2.2.4.1. Requerimientos.....	39
2.2.4.2. Absorción intestinal de calcio.....	41
2.2.4.3. Excreción, retención y balance de calcio.....	52
2.2.5. Regulación homeostática del calcio	54
2.3. El fósforo como nutriente.....	62
2.3.1. Fuentes alimentarias de fósforo.....	63
2.3.2. Funciones del fósforo.....	65
2.3.3. Utilización nutritiva de fósforo.....	66
2.3.3.1. Requerimientos.....	66
2.3.3.2. Absorción intestinal de fósforo.....	67
2.2.4.3. Excreción, retención y balance de fósforo.....	69
2.3.4. Regulación homeostática del fósforo	72
2.4. El hierro como nutriente	80
2.4.1. Fuentes alimentarias de hierro	80
2.4.2. Funciones del hierro.....	82
2.4.3. Utilización nutritiva de hierro	85

2.4.3.1. Requerimientos	85
2.4.3.2. Absorción intestinal de hierro	89
2.4.4.3. Excreción, retención y balance de hierro	100
2.4.4. Regulación homeostática del hierro	106
2.5. Alteraciones del metabolismo de hierro	110
2.5.1. Anemia ferropénica nutricional	110
2.5.1.1. Causas.....	111
2.5.1.2. Signos y síntomas.....	112
2.5.1.3. Tratamiento y prevención.....	115
2.5.2. Sobrecarga de hierro	118
2.5.2.1. Mecanismos de toxicidad del hierro	121
2.5.3. Repercusiones óseas de las alteraciones del metabolismo de hierro.....	123
2.5.3.1. Efecto de la anemia en el compartimento óseo	123
2.5.3.2. Efecto de la sobrecarga de hierro en el compartimento óseo	125
2.6. Características nutricionales de la leche de cabra.....	128
2.6.1. Características organolépticas.....	129
2.6.2. Composición de la leche de cabra.....	131
2.6.2.1. Proteína y aminoácidos	133
2.6.2.2. Hidratos de carbono.....	135
2.6.2.3. Lípidos.....	137
2.6.2.4. Minerales	139
2.6.2.5. Vitaminas	141
2.6.2.6. Factores bioactivos	142

3. MATERIAL Y MÉTODOS

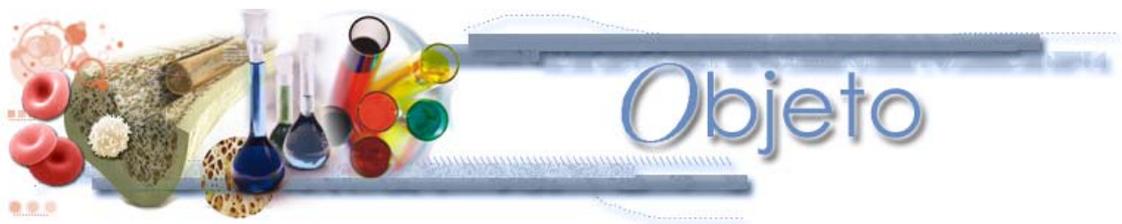
3.1. Diseño experimental.....	145
3.2. Dietas ensayadas	147
3.3. Técnicas analíticas	149
3.3.1. Materia seca.....	149
3.3.2. Materia grasa	149
3.3.3. Contenido proteico	149

3.3.4. Mineralización por vía húmeda.....	149
3.3.4.1. Determinación de hierro y calcio	150
3.3.4.2. Determinación de fósforo.....	150
3.3.5. Recuento de hematíes, Hemoglobina, hematocrito, Volumen corpuscular medio y plaquetas	150
3.3.6. Ferritina sérica	151
3.3.7. Hierro sérico, TIBC (Capacidad total de unión al hierro) y porcentaje de saturación de transferrina.....	151
3.3.8. Marcadores de remodelado óseo.....	151
3.3.8.1. 25-OH vitamina D	151
3.3.8.2. Parathormona	152
3.3.8.3. Rat/mouse PINP	153
3.3.8.4. RatLaps.....	153
3.3.8.5. RatTRAP.....	154
3.3.9. Tratamiento estadístico.....	155

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Estudio hematológico en situación de anemia ferropénica nutricional inducida.....	157
4.2. Remodelado óseo y destino metabólico de hierro, calcio y fósforo en ratas con anemia ferropénica (Día 40 del estudio)	157
4.3. Remodelado óseo tras la repleción de hierro durante diez días con dietas basadas en leche con y sin sobrecarga de hierro (Día 50 del estudio).....	160
4.3.1. Efecto de la anemia	160
4.3.2. Efecto de la sobrecarga de hierro.....	163
4.3.3. Efecto de la dieta	165
4.4. Remodelado óseo y destino metabólico de hierro, calcio y fósforo tras la repleción de hierro durante treinta y cincuenta días con dietas basadas en leche con y sin sobrecarga de hierro (Día 70 y 90 del estudio).....	166
4.4.1. Efecto de la anemia	166
4.4.2. Efecto de la sobrecarga de hierro.....	170

4.4.3. Efecto de la dieta	172
5. TABLAS Y FIGURAS.....	177
6. RESUMEN Y CONCLUSIONES.....	195
7. BIBLIOGRAFÍA	199



1. OBJETO

El hueso es un tejido calcificado, metabólicamente activo y en constante remodelación. Este biomaterial está compuesto de una matriz orgánica, fundamentalmente colágeno tipo I, y un componente mineral, cristales de hidroxiapatita, en proporciones que varían con la edad y localización dentro del esqueleto. Por otra parte, el mineral del compartimento óseo es la principal reserva de calcio y fósforo en el organismo. Estos elementos desempeñan un papel fundamental en numerosas funciones fisiológicas y su homeostasis está regulada por mecanismos que controlan la formación y resorción del tejido óseo, procesos que pueden alterarse por diferentes factores ambientales, nutricionales, genéticos y endocrinos, dando lugar a composiciones anormales o patologías del hueso.

Los minerales del hueso no son componentes inertes ni permanecen fijos sino que son constantemente intercambiados y reemplazados junto con los componentes orgánicos en un proceso que se conoce como remodelado o *turnover* óseo. Su formación y homeostasis está regulada por hormonas y los alimentos ingeridos, que aportan minerales de vital importancia para su correcto funcionamiento. En este sentido, la leche es uno de los alimentos que se considera posee una mayor biodisponibilidad de calcio y por tanto puede incidir de manera positiva en el proceso de mineralización del hueso.

El Grupo de Investigación “Alimentación, Nutrición y Absorción” (AGR- 206) dirigido por la Profesora Sánchez Campos, con quienes he realizado la presente Memoria de Tesis, ha puesto de manifiesto en repetidas ocasiones el efecto beneficioso de la leche de cabra respecto a la de vaca (comúnmente consumida por la población) sobre la utilización nutritiva de minerales en síndrome de malabsorción y ferropdeficiencia.

A lo largo de su experiencia investigadora, el grupo AGR-206 ha acumulado evidencias científicas de que la anemia por deficiencia de hierro produce un considerable grado de osteomalacia, pero en la literatura científica existen muy pocos indicios en este sentido, por lo que nos planteamos efectuar un estudio en profundidad del proceso de remodelado o *turnover* óseo, en estado de anemia por deficiencia de hierro y durante la repleción crónica con hierro.

Estos antecedentes nos llevaron a utilizar la experiencia del Grupo en situación de anemia ferropénica y dar un paso más, profundizando en el impacto, no solo a nivel hematológico y mineral, sino también a nivel óseo, en situación de anemia ferropénica nutricional inducida y en la recuperación de esta patología tras consumir dietas basadas en leche de cabra o vaca, con un contenido normal o con sobrecarga de Fe para estudiar si la leche de cabra podría tener influencia positiva sobre el remodelado del hueso.



2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2.1. REMODELADO ÓSEO

El hueso es un tejido conectivo que consiste esencialmente en una matriz extracelular mineralizada y células especializadas. El principal componente orgánico de la matriz es el colágeno tipo I, que supone alrededor del 90%; el 10% restante lo componen una serie de proteínas no estructurales de menor tamaño entre las que se encuentran la osteocalcina, osteonectina, algunas fosfoproteínas, sialoproteínas, factores de crecimiento y proteínas séricas. La fase inorgánica está compuesta por minúsculos cristales de un mineral de carácter alcalino, la hidroxapatita. Estos cristales se incrustan en las fibras de colágeno para formar un material que reúne las características adecuadas de rigidez, flexibilidad y resistencia, permitiendo esta forma de Ca almacenado ser rápidamente liberado en caso de necesidad cuando la ingesta es inadecuada (Ehrlich y Lanyon, 2002). El hueso, como órgano y tejido vivo, sufre, a lo largo de la vida, diferentes procesos de transformación modulados por factores de tipo local o endocrinometabólico, actuando para ello como efectores las distintas poblaciones celulares óseas: células de revestimiento, osteoclastos, osteoblastos, osteocitos y sus precursores.

En general, dichas transformaciones involucran tres procesos diferentes: crecimiento, modelado y remodelado óseo. Se denomina crecimiento al proceso de alargamiento del esqueleto que ocurre durante la infancia y la juventud, y que dura hasta el cierre de las epífisis. El proceso de modelado está relacionado con la expansión transversal del hueso y la adquisición de su forma exterior durante la etapa de crecimiento. El remodelado óseo; sin embargo, es el mecanismo por el cual el hueso adulto se renueva para mantener intacta su competencia estructural y biomecánica, evitando la acumulación de microlesiones causadas por la fatiga del material (Parfitt, 2001).

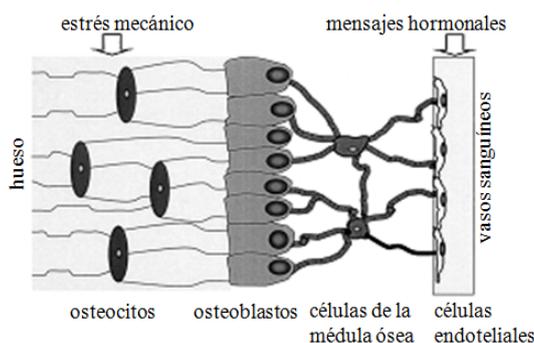
Mientras que el concepto de modelado óseo se refiere a los cambios que experimenta el esqueleto durante el desarrollo hasta alcanzar el tamaño y forma definitivos, el remodelado es el proceso que tiene lugar en el hueso adulto, gracias al cual se sustituye continuamente tejido óseo viejo por nuevo. Como consecuencia de esta renovación, el remodelado óseo, no solamente asegura un abastecimiento de hueso nuevo, sino que contribuye a la homeostasis del Ca (Kanis, 1998). Así pues, modelado y remodelado

difieren completamente: el primero es general y continuo mientras que el remodelado es local y cíclico, la extensión del remodelado es del 5% en el hueso cortical y del 20 % en el trabecular (dado que la superficie expuesta es mayor), la del modelado es del 100%; el balance óseo del remodelado puede ser negativo y en el modelado es positivo (Mundy y col., 2003).

En circunstancias normales, en los individuos jóvenes el remodelado mantiene la masa esquelética prácticamente invariable. Sin embargo; con el envejecimiento, la menopausia o algunas enfermedades, se altera el balance de manera que la resorción predomina sobre la formación y se produce una pérdida neta de hueso que conduce a la osteoporosis. Ello puede deberse a una actividad osteoclástica aumentada o a una disminución de la actividad osteoblástica. El hueso trabecular es especialmente sensible a las alteraciones del balance óseo, dado su rápido *turnover* (Arnett y col., 2003; Arnett, 2004).

A nivel microscópico el remodelado óseo se produce en las llamadas unidades básicas multicelulares o BMU (basic multicellular units). La unidad de remodelado se compone de un frente de osteoclastos seguido de un grupo de osteoblastos, un aporte vascular y nervioso, y tejido conectivo (Fernández García, 2007). La vida media de cada unidad de remodelado en humanos es de 6 a 9 meses y la mayor parte de este período está ocupado por la formación ósea. Existen en el esqueleto humano 35 millones de unidades básicas multicelulares y cada año se activan 3-4 millones, en cada una de ellas el hueso es destruido y sustituido después por otro recién formado (Manolagas y col., 2000; Jilka y col., 2003) por lo que el esqueleto se renueva totalmente cada 10 años (Fernández-Tresguerres y col., 2006).

Figura n° 1. Sincitio funcional compuesto por osteocitos, osteoblastos, células de la medula ósea y células endoteliales (Manolagas, 2000).



2.1.1. OSTEOLASTOS

Los osteoblastos son células grandes (20-30 μm), de forma poliédrica, con citoplasma basófilo y con un aparato de Golgi y un retículo endoplásmico rugoso de tamaño importante. Proceden de las células mesenquimales pluripotenciales de la médula ósea, endostio, periostio y pericitos perivasculares (Canfield y col., 2000).

Los osteoblastos sintetizan la matriz orgánica o sustancia osteoide a un ritmo de 2 a 3 μm por día y expresan una enzima característica: la fosfatasa alcalina (ALP), que permite la mineralización a un ritmo de 1-2 μm por día. Actualmente, se sabe que:

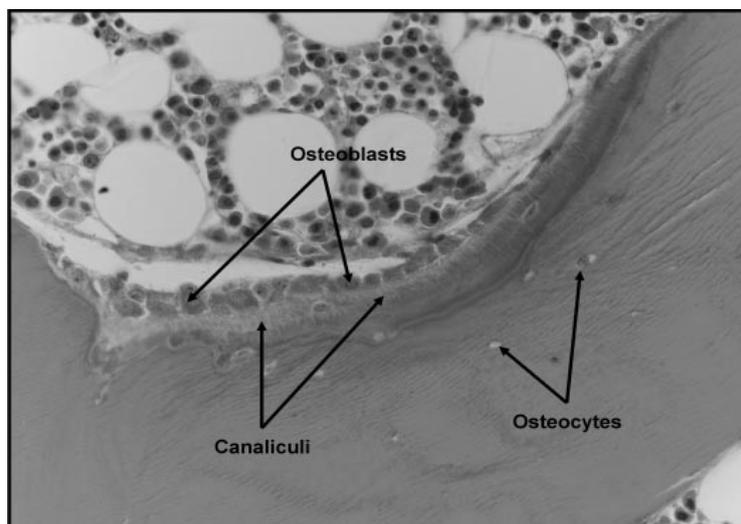
1. sintetizan las proteínas colágenas y no colágenas de la matriz orgánica del hueso,
2. dirigen la disposición de las fibrillas de la matriz extracelular,
3. contribuyen a la mineralización de la sustancia osteoide, gracias a la fosfatasa alcalina,
4. median en la reabsorción llevada a cabo por los osteoclastos a través de la síntesis de citoquinas específicas (Simonet y col., 1997) y
5. sintetizan factores de crecimiento.

Al término de su vida, los osteoblastos pueden desaparecer por mecanismos de apoptosis, transformarse en células de revestimiento (bone lining cells) o en osteocitos (15%) (Aubin y col., 1996).

Las células de revestimiento pueden regular la afluencia y salida de iones minerales del fluido óseo extracelular, sirviendo así como una barrera entre el hueso y la sangre, pero conservando la capacidad de diferenciarse de nuevo a osteoblastos ante la exposición a la hormona de paratiroidea o fuerzas mecánicas (Dobnig y Turner, 1995).

Los osteocitos participan en la síntesis y mineralización de la matriz osteoide, pero se cree que su función principal es la de controlar el remodelado óseo, detectando las variaciones mecánicas de las cargas, fenómeno denominado mecanotransducción (Lanyon, 1993).

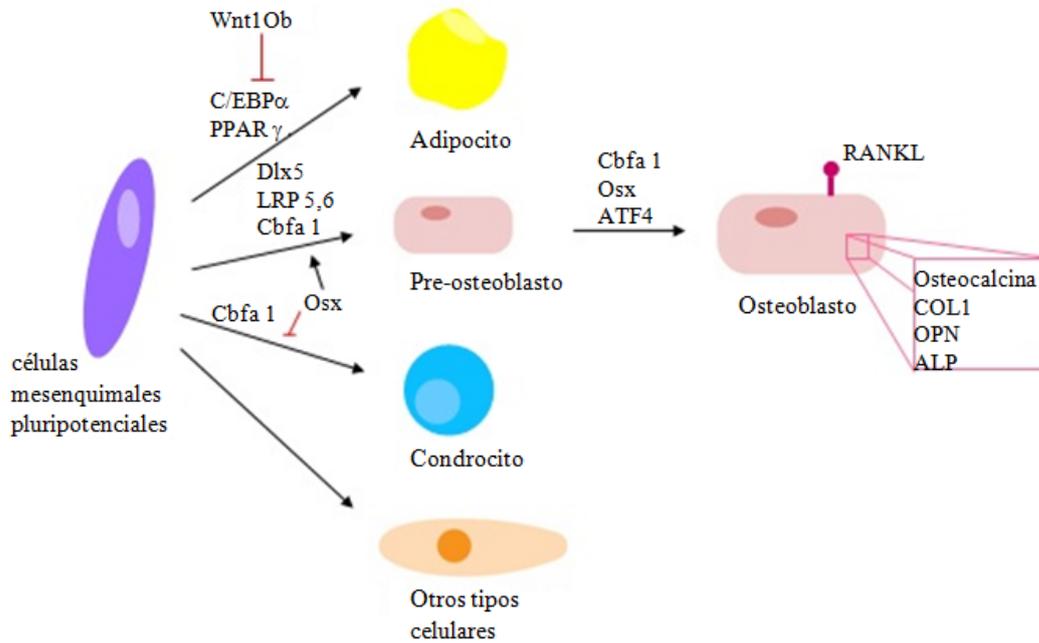
Figura n° 2. Los osteoblastos sintetizan la matriz proteica rellenando los huecos de resorción (Clarke, 2008).



En la diferenciación y función de los osteoblastos intervienen diversos factores (Raisz y col., 2005) de los que merecen señalarse en primer término el Cbfa-1 o Runx-2 y el Osterix (Osx), que actúa distalmente a aquel. Ambos son necesarios para la diferenciación de los osteoblastos. El Cbfa-1, además, influye sobre el binomio RANKL/OPG. El receptor PPAR γ , al contrario de lo que hace el factor Cbfa-1, desvía precursores de los osteoblastos hacia adipocitos. La producción de ligandos de este receptor es estimulada por la lipoxigenasa (Boyle y col., 2003).

La vía de señalización Wnt (mediada por β -catenina, denominada vía canónica) constituye un mecanismo esencial en la regulación del remodelado óseo, implica el correcto funcionamiento de diversos factores conectados entre sí, y es capaz de ejercer un control global sobre el osteoblasto, favoreciendo su proliferación, diferenciación o apoptosis. Uno de los componentes imprescindibles de dicha vía es el complejo co-receptor formado por una proteína relacionada con el receptor de LDL (LRP5/6) y un receptor *frizzled* (Fz); el funcionamiento adecuado de este complejo conlleva la activación de mecanismos de transcripción genética en el núcleo, mediados por β -catenina, que regulará la expresión de genes relacionados con la diferenciación o función del osteoblasto (Escobar-Gómez y col., 2009).

Figura nº 3. Las células mesenquimales pluripotenciales dan lugar a distintos tipos de células, entre ellas los osteoblastos (modificado de Caetano-Lopes y col., 2007).



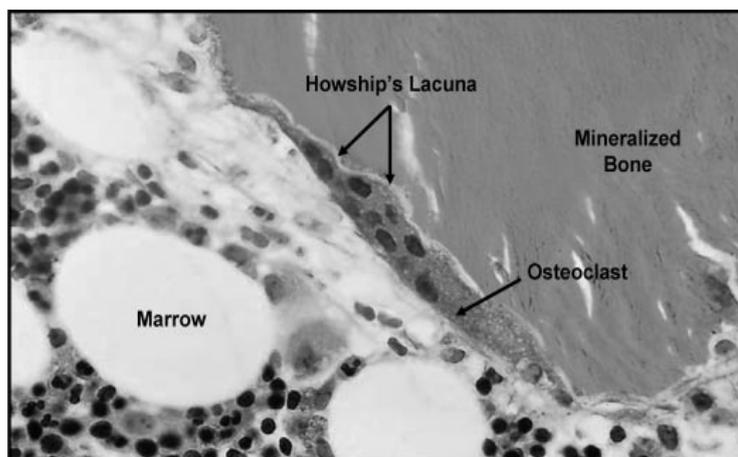
2.1.2. OSTEOCLASTOS

Son las células encargadas de la reabsorción. Se trata de células grandes (100 μm), multinucleadas, ricas en mitocondrias y vacuolas. Contienen fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP), que permite la desfosforilación de las proteínas, cuya actividad es aprovechada para su identificación, como veremos más adelante. Además tienen receptores para calcitonina.

En la membrana de los osteoclastos podemos diferenciar: un borde en cepillo, donde tiene lugar la reabsorción y una zona clara, rica en microfilamentos, con integrinas que sirven de anclaje a la matriz. Para ello, los osteoclastos se movilizan hacia la zona a reabsorber y, seguidamente, se adhieren a la superficie ósea mineralizada por el ribete en cepillo sellando los bordes del área mediante las integrinas. La integrina del osteoclasto, particularmente $\alpha\text{v}\beta\text{3}$, reconoce la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) existente en el colágeno y otras proteínas de la matriz osteoide. A este nivel el pH es ácido, ya que secretan ácidos (H^+) generados por la anhidrasa carbónica II y enzimas proteolíticas como colagenasas, metaloproteasas, catepsina K, glucuronidasa, etc. (Mundy, 1993), que van a originar la

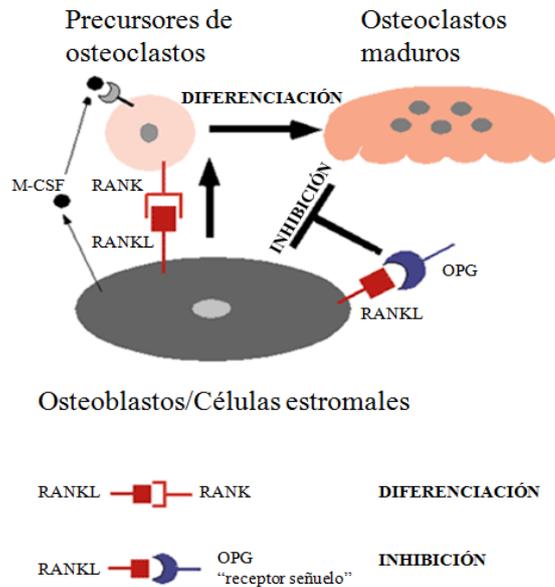
reabsorción del hueso mediante la solubilización de la matriz orgánica primero y de la mineral después (Fernández-Tresguerres y col., 2006).

Figura n° 4. Osteoclastos multinucleados reabsorben el hueso para formar cavidades de resorción conocidos como lagunas de Howship (Clarke, 2008).



Los osteoclastos proceden de células madre hematopoyéticas medulares denominadas “Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos y Macrófagos” (CFU-GM), precursoras de macrófagos y monocitos (Mundy, 1993). Pero los osteoblastos juegan un papel fundamental en la formación de los osteoclastos pues producen M-CSF, OPG, RANK y RANKL que son importantes reguladores de la osteoclastogénesis: el factor estimulante de las colonias de macrófagos (M-CSF) es requerido en las primeras fases del proceso para la formación de células gigantes multinucleadas; RANKL (ligando del receptor activador de NFκB) antiguamente llamado ODF (osteoclast differentiation factor) (Simonet y col., 1997; Burgess y col., 1999) es una citoquina transmembrana perteneciente a la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) (Lacey y col., 1998), se trata de un ligando situado en la superficie de osteoblastos y pre-osteoblastos, que al interactuar con su receptor RANK (situado en la membrana de osteoclastos y pre-osteoclastos) produce una activación de la diferenciación y de la actividad osteoclástica, aumentando la reabsorción; y la OPG (osteoprotegerina, proteína perteneciente a la superfamilia de los receptores de TNF (Simonet y col., 1997) que es sintetizada por osteoblastos y pre-osteoblastos.), cuando se une a RANKL inhibe la unión de RANKL a RANK, inhibiendo, en definitiva, la diferenciación osteoclástica (Cohen, 2006).

Figura nº 5. Regulación de la osteoclastogénesis (modificado de Aubin, 2000).

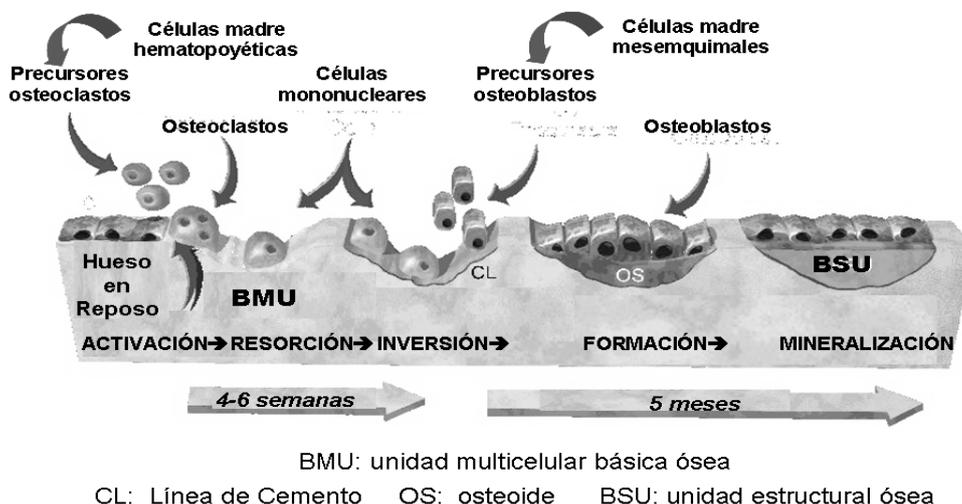


2.1.3. FASES DEL REMODELADO ÓSEO

El lugar en el que se inicia el remodelado puede ser al azar pero se ha visto que también está dirigido concretamente a áreas que requieren reparación (Burr, 2002; Parfitt, 2002).

El remodelado óseo se divide en las siguientes fases:

Figura nº 6. Secuencia del remodelado óseo (modificado de Kearns y Kallmes, 2008).



Fase quiescente: Se dice del hueso en condiciones de reposo. Los factores que inician el proceso de remodelado aún no son conocidos.

Fase de activación: el primer fenómeno que tiene lugar es la retracción de las células limitantes y la digestión de la membrana endóstica por la acción de las colagenasas. La fase de activación produce en esa zona un aumento de la actividad metabólica, con liberación de enzimas proteolíticas que dejan expuestas sustancias quimiotácticas (colágeno tipo I, osteonectina, etc.) encargadas de reclutar de la circulación a las células mononucleares precursoras de los osteoclastos (Roodman, 1999).

Fase de resorción: una vez generados y activados los osteoclastos se fijan, gracias a su borde en cepillo, a la superficie que va a ser remodelada formando un anillo que sella el espacio existente entre la membrana osteoclástica y la matriz ósea, aislándolo del microambiente óseo, para posteriormente comenzar a secretar protones y enzimas proteolíticas (colagenasas, catepsina K, etc.). La acidificación produce un fenómeno de desmineralización, y posteriormente la matriz desmineralizada es degradada por las enzimas proteolíticas (Boyle y col., 2003) que dan lugar, en el hueso cortical, a un túnel denominado “cono penetrante” y, en el hueso trabecular, a una zanja llamada “laguna de Howship” (figura 4).

La fase de resorción finaliza con la apoptosis osteoclástica, proceso regulado por diversos factores, entre los que destaca por su importancia TGF- β que además inhibe la apoptosis de los osteoblastos (Parfitt y col., 2002). Esta fase dura aproximadamente 3 semanas.

Fase de inversión: al término de la etapa anterior, las cavidades de resorción contienen células mononucleares, incluyendo monocitos, osteocitos liberados de la matriz de hueso, y preosteoblastos que sintetizan una sustancia cementante sobre la que se va a adherir el nuevo tejido y expresan BMPs (proteínas morfogenéticas óseas). Las señales que acoplan el final de la resorción y el principio de la formación son aún desconocidas, se piensa que puede tratarse de factores de crecimiento contenidos en la matriz: fundamentalmente TGF- β (factor transformante del crecimiento β) (Bonewald y col., 1990; Locklin y col., 1999; Dallas y col., 2002), PDGF (factor de crecimiento derivado de las

plaquetas), IGF-I y II (factor análogo a la insulina I y II) (Hock y col., 2004) y factor de crecimiento de fibroblastos; o incluso elementos constituyentes de la propia matriz.

Fase de formación: los preosteoblastos, atraídos por los factores de crecimiento que se liberaron de la matriz que actúan como quimiotácticos y que además estimulan su proliferación (Lind y col., 1995), se diferencian a osteoblastos, este proceso es mediado por IGF-I y BMP-2 (Kawaguchi y col., 2005). A los pocos días, los osteoblastos, ya formados, van sintetizando los componentes orgánicos de la matriz (figura 2), que en el caso del hueso cortical se van depositando en forma de laminillas concéntricas, y de forma paralela en el hueso trabecular.

Fase de mineralización: dado que el hueso depositado inicialmente no está mineralizado (hueso osteoide), los osteoblastos regulan la mineralización de la matriz liberando pequeñas vesículas que concentran el Ca y el fosfato y destruyen enzimáticamente inhibidores de la mineralización como el pirofosfato o los proteoglicanos (Anderson, 2003). En la interfase entre el osteoide y el hueso preexistente tiene lugar la mineralización primaria de la matriz, de manera que el hueso recién formado va aumentando progresivamente su densidad mineral a lo largo de un plano de barrido denominado frente de mineralización. Todo este ciclo completo de remodelación ósea dura entre 3 y 8 meses. La fase de mineralización secundaria, más lenta y gradual que la primaria, puede prolongarse durante años (Kanis, 1996).

2.1.4. FACTORES REGULADORES DEL REMODELADO ÓSEO

El balance entre la reabsorción y la formación óseas está influido por una serie de factores, interrelacionados entre sí, como son factores genéticos, mecánicos, nutricionales, sistémicos y locales.

Factores genéticos: son determinantes muy importantes en el pico de masa ósea, ya que entre el 60 y el 80% de ésta se encuentra determinada genéticamente (Grant y Ralston, 1997). Así los sujetos de raza negra poseen una masa ósea mayor que los de raza blanca y éstos mayor que la amarilla. La masa ósea se transmite de padres a hijos, por ello la predisposición a padecer osteoporosis es mayor en hijas de madres que la padecen (Pocock y col., 1987).

Factores mecánicos: entre los que se incluyen la gravedad, el peso y la actividad física. Se cree que la acción muscular transmite al hueso una tensión que es detectada por la red de osteocitos, estos en respuesta a los estímulos, enviarían órdenes a las células de revestimiento, que se retraerían para dejar libre la superficie ósea y atraerían a los precursores de los osteoclastos (Noble y col., 2003).

Factores nutricionales: es interesante este factor porque puede ser modificado. Se necesita un mínimo de Ca para permitir la mineralización que la mayoría de los autores cifran en unos 1.200 mg diarios hasta los 25 años; después y hasta los 45 no debe ser inferior a 1 gramo y tras la menopausia debe ser por lo menos 1.500 mg al día. Asimismo, se conoce que hábitos tóxicos como tabaco, cafeína, alcohol y exceso de sal constituyen factores de riesgo para la aparición de osteopenia (Fernández-Tresguerres y col., 2006).

Factores sistémicos: los reguladores hormonales sistémicos fueron los primeros estudiados, y de los que se tiene mayor información de sus acciones sobre el tejido óseo. Estos factores hormonales circulantes se pueden clasificar en tres grandes grupos:

Tabla nº 1. Hormonas implicadas en el remodelado óseo.

Hormonas calciotropas
<ul style="list-style-type: none"> • Parathormona (PHT) • Calcitriol • Calcitonina
Hormonas sexuales
<ul style="list-style-type: none"> • Estrógenos • Andrógenos
Otras
<ul style="list-style-type: none"> • Hormona de crecimiento • Hormonas tiroideas • Insulina • Glucocorticoides • Leptina

Parathormona (PTH)

Es la hormona que controla la homeostasis del Ca a través de la acción directa sobre el hueso y el riñón e indirecta en el intestino. Producida en las glándulas paratiroides que responden al descenso de la calcemia, es la hormona hipercalcemiante por excelencia, al favorecer la resorción.

No obstante, en los últimos años se ha descubierto un papel estimulador en la formación ósea, a través de la síntesis de IGF-I y TGF- β (Canalis y col., 1989). Este doble efecto de resorción y formación se explicaría porque la PTH administrada de forma continua estimula la resorción ósea a través de la secreción de RANKL e IL-6 y IL-11 por los osteoblastos, lo que activa la diferenciación y función osteoclástica. Esta activación se produce de forma indirecta aunque los osteoclastos expresan receptores para la PTH (Dempster y col., 2005), mientras que a dosis intermitentes, la PTH favorece la formación de hueso, a través de un aumento del número de osteoblastos y de la tasa de formación (Cosman y col., 2004) ya que estimula la transformación de osteocitos en osteoblastos activos (Langub y col., 2001) y disminuye la apoptosis de los mismos (Brinhhurst y col., 2002).

Calcitriol o 1,25(OH)₂ vitamina D₃

Hormona esteroidea que proviene de la síntesis endógena en la piel y de la dieta, favorece la absorción intestinal de Ca y fosfato, facilitando por tanto, la mineralización ósea (Fiter, 2004; Fernández-Tresguerres, 2006). Además estimula la resorción ósea, probablemente a través de su acción sobre la maduración de las células precursoras hematopoyéticas que se diferenciarán hacia osteoclastos y estudios recientes sugieren que la vitamina D produciría la liberación de factores de reabsorción por parte de los osteoblastos, que estimularían la actividad osteoclástica (Holick, 2003).

Calcitonina

Producida en las células C o parafoliculares del tiroides, es inhibidora de la resorción ósea. Chambers (2000) ha demostrado la inhibición directa que la calcitonina (CT) ejerce sobre el osteoclasto; esto se ha establecido de dos maneras: inhibición de la

movilidad y distribución de los osteoclastos, y una reducción de la resorción de hueso cortical por osteoclastos aislados, medida por microscopía electrónica de barrido. En el pasado, un gran número de investigadores han intentado determinar si la calcitonina estimula la formación ósea osteoblástica, y la opinión sobre esta cuestión está muy dividida (Wallach y col., 1993) ya que aunque tradicionalmente se ha considerado que los osteoblastos carecen de receptores para la CT, en algunos experimentos se ha comprobado cierta acción de la misma sobre estas células; consiste en un efecto anabólico, con estimulación de la formación ósea producida por BMP-2 y de la producción de factores de crecimiento (Zaidi y col., 2002). La CT ejercería una acción directa y estimuladora sobre los osteoblastos, por receptores específicos, actuando vía proteína-kinasa C (Villa y col., 2003). Según estos hallazgos, se debe estudiar la posibilidad de que esta hormona incremente la formación ósea, a pesar de que incuestionablemente es más evidente su efecto sobre la resorción.

Estrógenos

Esenciales para el cierre de los cartílagos de conjunción, juegan un papel importante en el desarrollo esquelético tanto femenino como masculino durante la adolescencia (Fiter, 2004). Los estrógenos tienen un doble efecto sobre el metabolismo óseo, favoreciendo, por un lado, la formación ósea, al aumentar el número y función de los osteoblastos y evitar su apoptosis (Kousteni y col., 2001), y por otro, disminuyendo la reabsorción pues estimulan la apoptosis de los osteoclastos mediante la producción de TGF- β por los osteoblastos (Huber y col., 2001) y la inhibición de la producción de IL-6, el principal estímulo para la resorción (Pleilschifter y col., 2002).

Se han descrito receptores de estrógenos en osteoblastos, osteocitos y osteoclastos humanos. Existen distintos estudios tanto *in vivo* como *in vitro* acerca del efecto de los estrógenos sobre el sistema OPG/RANK/RANKL, que aunque con resultados no contundentes, parece ser que apoyan la idea de que los estrógenos inhiben la osteoclastogénesis vía OPG/RANK/RANKL (Koshla y col., 2002; Hofbauer y col., 2004). Estos hechos quedan manifiestos en la pérdida de masa ósea que ocurre en los primeros años de postmenopausia tras el cese de la actividad estrogénica que ocasiona un aumento del remodelado (Riggs y col., 2002).

Andrógenos

Tienen un efecto anabolizante sobre el hueso a través del estímulo de los receptores de los osteoblastos, favoreciendo su proliferación, diferenciación y supervivencia (Vanderschueren y col., 2004), estos efectos pueden deberse a la estimulación de TGF- β (Vanderschueren y col., 2004) e IGF-1 (Rucker y col., 2004) y a la inhibición de IL-6. Mientras que la deficiencia androgénica se asocia a una menor DMO, la administración de testosterona en jóvenes antes del cierre epifisario incrementa la masa ósea. Igualmente, las mujeres con exceso de andrógenos presentan densidades óseas más altas (Fiter, 2004; Fernández-Tresguerres, 2006).

Hormona de crecimiento (GH)

Tiene dos acciones sobre el hueso, directa e indirecta. La GH actúa directamente sobre los osteoblastos, con receptores para la hormona, estimulando su actividad, lo que produce un aumento en la síntesis de colágeno, osteocalcina y fosfatasa alcalina. La acción indirecta se produce a través del aumento de la síntesis de IGF-I y II por los osteoblastos. Estos factores favorecen la proliferación y diferenciación de los osteoblastos, aumentando su número y función (Fernández-Tresguerres, 2006).

Desde hace unos años se viene considerando a la GH como un factor de crecimiento local, ya que no sólo se sintetiza en la adenohipófisis, sino en casi todas las células del organismo, incluidos los osteoblastos (Harvey y Hull, 1998), teniendo un efecto autocrino y paracrino, además de endocrino.

Hormonas tiroideas

Poseen dos acciones contrapuestas sobre el hueso. En primer lugar, estimulan la síntesis de la matriz osteoide por los osteoblastos y su mineralización, favoreciendo la síntesis de IGF-I. Por esto en el hipotiroidismo congénito (cretinismo) se produce talla baja por alteración de la formación ósea. En segundo lugar, se produce un efecto contrario, estimulando la resorción al aumentar el número y función de los osteoclastos. La manifestación clínica de este efecto es la aparición de pérdida de masa ósea en el hipertiroidismo (Jódar Gimeno y col., 1997).

Insulina

Tiene un efecto anabólico importante, pues estimula la incorporación de aminoácidos al tejido óseo, además de aumentar la producción de colágeno (Guyton Arthur y Hall John, 1998) y la síntesis hepática de IGF-I.

Glucocorticoides

De forma fisiológica, actúan como moduladores del remodelado óseo; a dosis altas tienen efectos catabólicos sobre el hueso, ya que inhiben la síntesis de IGF-I por los osteoblastos, y suprimen directamente la BMP-2 y el Cbfa1, factores críticos para la osteoblastogénesis (Manolagas, 2000).

Leptina

Es una de las últimas hormonas que ha sido incluida entre los reguladores de la fisiología ósea. Cuando actúa a nivel del sistema nervioso central, determina un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de la masa ósea y cuando actúa a nivel periférico da lugar al efecto contrario.

El principal mecanismo de acción es una estimulación directa sobre la actividad osteoblástica promoviendo la síntesis de colágeno (Gozdeladze y col., 2002) y una estimulación antiosteoclastogénica de la osteoprotegerina (Burguera y col., 2001), promoviendo la mineralización ósea.

Factores locales: como ya se ha comentado, la secuencia de remodelado óseo se produce en parcelas concretas a lo largo de todo el esqueleto. Cada una de ellas se halla separada tanto en tiempo como en espacio, de las otras. Ésta es una de las razones por las cuales los investigadores han postulado que los factores locales son los principales responsables del control de la remodelación.

Tabla nº 2. Factores locales reguladores del remodelado óseo (Fernández-Tresguerres, 2006).

	Estimulan formación	Estimulan reabsorción	Inhiben reabsorción
Factores de crecimiento	BMP-2 (Proteína morfogenética ósea-2) BMP-4 (Proteína morfogenética ósea-4) BMP-6 (Proteína morfogenética ósea-6) BMP-7 (Proteína morfogenética ósea-7) IGF-I (factor análogo a la insulina I) IGF-II (Factor análogo a la insulina II) TGF- β (Factor transformante del crecimiento β) FGF (Factor de crecimiento fibroblástico) PDGF (Factor de crecimiento derivado de las plaquetas) VEGF (Factor de crecimiento vascular endotelial)	TNF (Factor de necrosis tumoral) EGF (Factor de crecimiento epidérmico) PDGF (Factor de crecimiento derivado de las plaquetas) FGF (Factor de crecimiento fibroblástico) M-CSF (Factor estimulante de colonias de macrófagos) GM-CSF (Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos)	
Citoquinas		IL-1 (Interleuquina -1) IL-6 (Interleuquina -6) IL-8 (Interleuquina -8) IL-11 (Interleuquina -11) PGE ₂ (Prostaglandina E-2) PGE ₁ (Prostaglandina E-1) PGG ₂ (Prostaglandina G-2) PGI ₂ (Prostaglandina I-2) PGH ₂ (Prostaglandina H-2)	IFN- γ (Interferón γ) IL-4 (Interleuquina-4)

IGF-I y II (Insulin-like Growth Factor I y II)

Los factores de crecimiento análogos a la insulina son polipéptidos similares a esta hormona sintetizados por el hígado y los osteoblastos. Se hallan en gran concentración en la matriz osteoide (Cohick y Clemmons, 1993). La IGF-I incrementa el número y función de los osteoblastos, favoreciendo la síntesis de colágeno (Manolagas, 2000). Circulan unidos a proteínas de unión (IGFBP de IGF-binding proteins) que a su vez pueden ejercer efectos estimulatorios o inhibitorios sobre el hueso (Mínuto y col., 2005). Los IGFs están regulados por hormonas y factores de crecimiento locales; así la GH, los estrógenos y la progesterona aumentan su producción, mientras que los glucocorticoides la inhiben. Asimismo, median en la interacción osteoblasto-osteoclasto e intervienen de forma activa en el remodelado óseo (Ueland., 2005).

TGF- β (Transforming Growth Factor- β)

Los factores de crecimiento transformantes β son una superfamilia de proteínas muy abundantes en el tejido óseo (los segundos, tras los IGF). Están presentes en la matriz en forma latente y se activan durante la reabsorción osteoclástica. TGF- β inhibe la apoptosis de los osteoblastos y estimula la de los osteoclastos, acoplando de esta manera la resorción y la formación del tejido óseo (Janssens y col., 2005; Shoback y col., 2007).

BMPs (Bone Morphogenetic Proteins)

Las proteínas morfogenéticas óseas están incluidas dentro de la familia de los TGF- β . Constituyen un grupo de 15 proteínas capaces de conseguir la transformación de tejido conjuntivo en tejido óseo, por lo que se consideran osteoinductivas. Asimismo, son capaces de estimular la diferenciación de células pluripotenciales hacia diferentes líneas celulares (tejido adiposo, cartílago y hueso). Son muy abundantes en el tejido óseo y durante la embriogénesis participan en la formación de hueso y cartílago.

Actualmente se las considera como los factores más potentes de la diferenciación osteoblástica (Yamaguchi y col., 2000). Canalis y col (2003) creen que además de estimular la osteogénesis inhiben la osteoclastogénesis.

PDGF (Platelet-Derived Growth Factor)

El factor de crecimiento derivado de las plaquetas por un lado estimula la síntesis proteica llevada a cabo por los osteoblastos (Nash y col., 1994) y por otro, favorece la reabsorción ósea.

GM-CSF (Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor)

El factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos es importante para la osteoclastogénesis y puede intervenir en la patogenia de la osteopetrosis (Fernández-Tresguerres, 2006).

M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor)

El factor estimulador de colonias de macrófagos es producido por los osteoblastos y células del estroma medular y es requerido como factor esencial en las primeras fases de la osteoclastogénesis para la formación de células gigantes multinucleadas, pero no tiene efecto sobre la actividad osteoclástica (Fernández-Tresguerres, 2006).

TNF (Tumor Necrosis Factor)

El factor de necrosis tumoral *in vitro* estimula la reabsorción y se le ha relacionado con la pérdida ósea de la artritis y de la enfermedad periodontal (Fernández-Tresguerres, 2006).

Interleuquina 1 (IL-1)

Es un factor activador de los osteoclastos maduros (Kim y col., 2006).

Interleuquina 6 (IL-6)

Estimula los precursores hematopoyéticos de los osteoclastos, por tanto, indirectamente estimula la formación osteoclástica (Gorny y col., 2004)

Interleuquina 11 (IL-11)

Estimula la producción de RANKL por los osteoblastos (Ahlen y col., 2002).

Prostaglandinas (PG)

Parecen favorecer, al menos *in vitro*, la proliferación de los osteoclastos y la resorción ósea, fundamentalmente la PGE2, pero también la PGE1, PGG2, PGI2 y la PGH2 (Kawaguchi, 1995).

Óxido Nítrico

Su síntesis es estimulada por diversas citoquinas y por algunas hormonas, como el calcitriol y los estrógenos. Parece ejercer efectos tanto sobre los osteoblastos como sobre los osteoclastos (Van't y Ralston, 2001). A concentraciones bajas, el NO tiende, en general, a favorecer la actividad osteoblástica (Otsuka y col., 1998).

Proteínas de la matriz

Recientemente se ha descubierto que las proteínas de la matriz actúan como moduladores de los factores de crecimiento (Young, 2003). Hay que tener en cuenta que las proteínas de la matriz se hallan a una concentración mil veces mayor que los factores de crecimiento, por lo que podrían jugar un papel más importante en la regulación de las diferentes funciones celulares (Horowitz, 2003).

2.1.5. MARCADORES DEL REMODELADO ÓSEO

Durante el proceso de remodelado, son liberadas a la circulación una serie de sustancias derivadas de la actividad de osteoclastos y osteoblastos, cuya medida, refleja de manera indirecta la fisiología del tejido óseo, son los llamados “marcadores bioquímicos del remodelado óseo” (MRO). Cada marcador proporciona información sobre un aspecto diferente del metabolismo del hueso. Incluso, algunos de estos marcadores (como la osteocalcina sérica o la hidroxiprolina urinaria) pueden reflejar, al menos en cierto grado, tanto la formación como la resorción del hueso (Stepan, 2006).

Las características ideales que debería cumplir un marcador de remodelado óseo son: determinación no invasiva, facilidad de recogida de la muestra, ser un producto específico del metabolismo óseo, mostrar correlación con técnicas de referencia en el análisis del remodelado y responder al tratamiento específico de enfermedades que afecten al metabolismo óseo (de la Higuera López-Frías, 2004). Sin embargo, aunque los MRO son instrumentos de investigación interesantes, su utilidad clínica está limitada por sus aspectos técnicos y analíticos específicos y por la variabilidad preanalítica (Stepan, 2006).

El proceso de resorción ósea origina la liberación de su contenido mineral y la degradación de la matriz proteica. De igual forma, en la síntesis y mineralización del tejido óseo se liberan sustancias enzimáticas y fragmentos derivados del procesamiento del colágeno que son integrados al torrente circulatorio y pueden ser determinados como índices de remodelado óseo. De los once marcadores bioquímicos más frecuentemente usados para medir la formación y reabsorción óseas, nueve son proteínas de la matriz extracelular (Young, 2003).

Tabla n° 3. Marcadores del metabolismo óseo.

Marcadores de formación
<ul style="list-style-type: none"> • Fosfatasa alcalina específica de hueso (BSAP) • Osteocalcina (OC) • Propéptidos de colágeno tipo-I carboxil terminal (PICP) • Propéptidos de colágeno tipo-I amino terminal (PINP)
Marcadores de resorción
<ul style="list-style-type: none"> • Hidroxiprolina e Hidroxilisina • Piridolina (Pyr) y Deoxipiridolina (D- Pyr) • N-telopéptidos de los enlaces de colágeno (NTx) • C- telopéptidos de los enlaces de colágeno (CTx) y enlaces unidos a C-telopéptidos de colágeno tipo-I (ICTP) • Fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP)

2.1.5.1. MARCADORES DE FORMACIÓN ÓSEA

Los marcadores de formación de hueso son medidos en el suero. Unos son enzimas u otras proteínas secretadas por osteoblastos en diferentes estadios de diferenciación, y otros son los subproductos de la deposición de colágeno tipo I (Schonau y Rauch, 1997).

Fosfatasa Alcalina en Suero (ALP)

La fosfatasa alcalina se encuentra en la membrana celular de los osteoblastos y en las células del hígado, el riñón, el intestino, el bazo, y la placenta. Todavía no se sabe con precisión su función, pero se piensa que desempeña un papel en la formación osteoide y la mineralización. En adultos normales, aproximadamente la mitad de la fosfatasa alcalina del

suero proviene del hueso (Calvo y col., 1996). Como la fosfatasa alcalina de los diferentes tipos de células se diferencia en su contenido de carbohidratos, se han desarrollado inmunoensayos relativamente específicos para la fosfatasa alcalina del hueso, aunque todavía exista una reactividad cruzada entre las enzimas del hueso y del hígado de hasta el 20% (Seibel, 2005).

Osteocalcina

La osteocalcina es un péptido grande sintetizado por los osteoblastos, se une a la hidroxiapatita y la mayor parte se incorpora a la matriz del hueso. Como los fragmentos de osteocalcina son liberados de la matriz durante la resorción, los ensayos para determinar la osteocalcina y sus fragmentos reflejan tanto formación como resorción (Cloos y Christgau, 2004).

Péptidos de Procolágeno

El colágeno tipo I es el componente más abundante de la matriz ósea. Durante la síntesis del mismo, se liberan fragmentos peptídicos amino y carboxiterminales de la molécula precursora (el pro-colágeno) y son liberados a la circulación (Risteli y Risteli, 2006). Los productos fraccionados de este proceso son el PICP y el PINP. Estas extensiones de péptidos de pro-colágeno tipo I pueden ser detectadas por radioinmunoanálisis y reflejan la cantidad de matriz ósea sintetizada (Cons-Molina, 2003).

Estudios *in vitro* han demostrado un aumento en la secreción de PINP después de estimular osteoblastos de ratón con BMP-4 y estrógenos (Parikka y col., 2005). Y los valores de PINP también son elevados tras el tratamiento con PTH tanto en ratas jóvenes ovariectomizadas como en ratas viejas intactas (Hale y col., 2007).

El PINP es un marcador particularmente útil para monitorizar la eficacia de la terapia antiosteoporótica con agentes anabólicos (Chen y col., 2005; Finkelstein y col., 2006), y es también el mejor marcador de remodelado óseo para monitorizar la eficacia de la terapia antiresortiva (Nenonen y col., 2005; Finkelstein y col., 2006).

2.1.5.2. MARCADORES DE RESORCIÓN ÓSEA

Son liberados como consecuencia de la degradación osteoclástica durante la resorción ósea, son medidos en el suero o la orina. Los indicadores más directos son los fragmentos de colágeno producidos por la actividad osteoclástica (Calvo y col., 1996).

Hidroxiprolina e Hidroxilisina

Son aminoácidos característicos del colágeno, por tanto, el aumento en el remodelado óseo puede elevar los niveles hidroxiprolina urinaria; sin embargo, en la actualidad la medición de hidroxiprolina urinaria es el menos empleado de los marcadores por ser poco específico (Singer y Eyre, 2008).

Piridinolina y Deoxipiridinolina

Son los dos principales tipos de aminoácidos encontrados en los puentes cruzados intra y extramoleculares (*crosslinks*) del colágeno tipo I, que le confieren elevada insolubilidad y resistencia, a diferencia de las fibras colágenas de otros tejidos (Eyre, 1988).

La piridinolina se encuentra principalmente en el cartílago y a niveles bajos en el colágeno del hueso. En contraste, la deoxipiridinolina se halla casi exclusivamente en la dentina y en el colágeno tipo I, siendo de esta manera un marcador excelente de pérdida ósea (Rosen, 1994).

Telopéptidos C-terminal o aminoterminal del colágeno tipo I

Son también fragmentos liberados durante la actividad de los osteoclastos y son marcadores potencialmente más específicos de la pérdida de colágeno óseo. Las pruebas inmunoenzimáticas para los telopéptidos-N y telopéptidos-C son indicadores sensibles y específicos de la resorción ósea. Los niveles de telopéptidos en sangre o en orina aumentan en pacientes con enfermedades óseas asociadas con aumento en la resorción (Cons-Molina, 2003).

Fosfatasa Ácida Resistente a Tartrato (TRACP)

Los macrófagos activados y los osteoclastos en fase de resorción ósea expresan una alta cantidad de fosfatasa ácida tartrato resistente (RatTRAP o TRACP), que puede ser distinguida de otras isoenzimas de fosfatasa ácida (Yaziji y col., 1995). En sangre, circulan dos formas de TRACP: TRACP 5a y TRACP 5b (Lam y col., 1981). TRACP 5b procede de los osteoclastos (juega un papel importante en la resorción ósea) y TRACP 5a de macrófagos inflamatorios (Halleen y col., 2000; Janckila y col., 2002). Los osteoclastos secretan TRACP 5b al torrente sanguíneo como una enzima activa que posteriormente es inactivada y degradada a fragmentos más pequeños antes de ser eliminada de la circulación; de manera que la actividad de TRACP 5b no se acumula en caso de fracaso renal o hepático (Halleen y col., 2001; Hannon y col., 2004).

La variabilidad diurna de TRACP 5b en suero es baja y sus niveles no se ven afectados por la alimentación, permitiendo por tanto la recogida de la muestra en cualquier momento de día (Hannon y col., 2004).

Los niveles plasmáticos de TRACP están elevados en pacientes con enfermedades óseas metabólicas que cursan con un aumento en la velocidad del remodelado óseo. Es el único de los marcadores de remodelado que evalúa la actividad directa del osteoclasto ya que el resto de los marcadores de resorción son indicadores del grado de destrucción de la matriz ósea (Cons-Molina, 2003). Incluso estudios recientes van más allá y han mostrado que la secreción de TRACP 5b indica más bien el número de osteoclastos que su actividad (Alatalo y col., 2004).

Usos potenciales de los Marcadores Bioquímicos de Remodelado Óseo: predicción de la masa ósea, predicción del riesgo de fractura, predicción de pérdida ósea y monitoreo de la efectividad de un tratamiento (Cons-Molina, 2003).

2.2. EL CALCIO COMO NUTRIENTE

El Ca es el mineral más abundante del organismo, aproximadamente el 99% (alrededor de 1,2 Kg) se encuentra en los dientes y en la matriz inorgánica del esqueleto formando parte de los cristales de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ y brinda al hueso su estabilidad mecánica. El 1% restante está disuelto en el plasma sanguíneo y en fluidos celulares, donde lleva a cabo su principal función metabólica, que es servir como un segundo mensajero acoplado a varias respuestas intracelulares a señales extracelulares (Awumey y Bukoski, 2006), como son: la conducción nerviosa, la contracción muscular, la secreción hormonal, la proliferación celular y la coagulación sanguínea (Miller y col. 2001). Éstas son funciones vitales que justifican que el organismo proporcione un nivel constante de Ca en la sangre y en las células, de manera que cuando existe un aporte insuficiente de este mineral en la alimentación, el organismo recurrirá al agotamiento parcial de la reserva de Ca que constituye el esqueleto, aún poniendo en peligro la fortaleza ósea, protegiendo así la función metabólica fundamental del Ca (Heaney y Robert, 2006).

2.2.1. FUENTES ALIMENTARIAS DE CALCIO

Tabla n° 4. Aporte de Ca de algunos alimentos (López y col., 2007).

	Gramos por ración	Calcio (mg)
Leche completa	250	290
Leche descremada	250	300
Crema de leche	250	285
Yogurt natural hipograso	250	415
Yogurt con frutas hipograso	250	315
Yogurt helado	250	200
Helado con leche	250	176
Sardinas (con espina)	95	372
Salmón	95	180
Gambas	250	147
Brócoli (cocinado)	250	136
Nabos verdes cocinados	250	267

Aunque la leche y los productos lácteos constituyen las fuentes primarias de Ca, existen otros alimentos con igual o mayor aporte de este elemento, cabe destacar las verduras de hoja verde como el brócoli, repollo, apio, coliflor y nabo; en el caso del ruibarbo, las espinacas y la remolacha el ácido oxálico limita bastante su biodisponibilidad. Los pescados azules como el bacalao, caballa, salmón, sardinas, angulas, langostinos y arenques frescos, aportan una cantidad importante de Ca a la dieta. Los frutos secos (almendras, nueces, avellanas, castañas, higos, pasas y cacahuetes) y legumbres (garbanzos, judías blancas y pintas, habas y lentejas) también son ricos en este micronutriente, destaca especialmente el Ca presente en la soja y sus derivados, como por ejemplo el tofu (elaborado con sulfato cálcico o cloruro cálcico), pues es absorbido por el cuerpo de igual modo que el de la leche o incluso en mayor proporción.

Tabla n° 5. Tasa de absorción del Ca de algunos alimentos.

Hortalizas de hoja verde oscura (brécol, coles de Bruselas, col china o verde, col rizada, etc.)	50-70%
Leche	32%
Salmón y sardina	30%
Almendras	21%
Legumbres	17%
Espinacas cocidas	5%

Beneficios del calcio procedente de la leche y sus derivados

La leche y sus derivados constituyen un grupo de alimentos de gran valor nutricional, proporcionan cantidades importantes de sustancias nutritivas esenciales como: P (32%), riboflavina (26%), vitamina B₁₂ (21%), proteína de alta calidad (19%), K (18,9%), Zn (16%), Mg (16%), y vitamina A (15%) pero el nutriente por excelencia que aporta este conjunto de alimentos es el Ca, el 75-89% del Ca ingerido procede de estas fuentes (Cáceres y col., 2003).

El Ca y el P de los productos lácteos se encuentran en una proporción óptima para el crecimiento y el desarrollo esquelético, de ahí la relación directa que existe entre la ingesta de lácteos y la adquisición de masa ósea, esta circunstancia les confiere un mayor valor nutritivo si cabe. De hecho, estudios clínicos y epidemiológicos publicados desde 1975 demuestran que el consumo de las cantidades adecuadas de Ca o alimentos ricos en Ca, como la leche y sus derivados, en todas las etapas de la vida, contribuye a optimizar el pico de masa ósea a los 30 años o antes, reducir la pérdida de hueso relacionada con la edad y el riesgo de fractura osteoporótica en la edad adulta. Este punto es reforzado por las *Directrices Dietéticas para americanos de 2005* y en *el Informe sobre salud ósea y osteoporosis de 2004*, que recomienda 3 productos lácteos al día (pues es difícil alcanzar las recomendaciones de Ca dietéticas sin su consumo), y sugiere que su ingesta puede tener beneficios en la salud adicionales más allá de los mencionados en el hueso (Huth y col., 2006).

Tanto la leche de vaca como la de cabra contienen 1043-1283 mg/kg de Ca (Gaucheron, 2005) de los cuales el 20% está unido a caseína como un coloide orgánico insoluble y el 80% restante en forma mineral (45% en el fosfato tricálcico de los fosfocaseínatos, que es también insoluble y coloidal, y un 35% soluble). El Ca orgánico y mineral unido a la caseína es fácilmente liberado durante la digestión, y su biodisponibilidad es alta, por ello, muchos estudios de solubilidad del Ca usan el de la leche como patrón de referencia; mientras que el Ca en las espinacas, presente como un oxalato insoluble, es tomado como el ejemplo extremo de la peor biodisponibilidad. Sin embargo, excepto para los recién nacidos alimentados con leche materna que pueden absorber casi todo el Ca ingerido, el porcentaje absorbido de la leche, rara vez excede el 40% en condiciones normales (Guéguen, 2000).

Otros derivados lácteos, como por ejemplo el queso, también contienen Ca fácilmente disponible, a pesar de que usualmente contienen grandes cantidades de ácidos grasos saturados de cadena larga y no contienen lactosa (Guéguen, 1992). Estudios en ratas alimentadas con queso cheddar marcado con ^{47}Ca mostraron que el Ca fue absorbido de la misma forma que en la leche y que el grado de maduración del queso no afectó a la absorción (Buchowski y Miller, 1990). El Ca de este queso y otros quesos procesados es utilizado tan bien como el de la leche ya que los fosfocaseínatos formados por la digestión proteolítica de la caseína en el intestino aumentan su absorción. El queso madurado es una fuente de Ca especialmente buena para individuos que presentan deficiencia de lactasa (Kato y col., 2002).

El Ca de la leche presenta varios aspectos interesantes con respecto a otros alimentos o suplementos dietéticos. Estos factores pueden ser importantes cuando es necesario asegurar una alta absorción de Ca, bajo ciertas condiciones fisiológicas que no son favorables.

Puesto que el Ca de la leche está unido a péptidos y proteínas, es más probable que permanezca en solución cuando el pH es desfavorable, como cuando existe aclorhidria. El Ca de la leche puede absorberse en ausencia de vitamina D, bajo la influencia de la lactosa en el intestino delgado distal, a través de la vía paracelular. Por tanto, la leche proporciona Ca con “absorción asegurada”, que es generalmente insensible a factores externos, excepto a los inhibidores como el ácido oxálico. Los productos lácteos no contienen ningún componente que inhiba la absorción intestinal de Ca, a diferencia de algunos vegetales que contienen fitatos, oxalatos o polifenoles que reducen la biodisponibilidad del Ca a pesar de que su contenido en este mineral es alto. El efecto hipercalcémico de los sulfatos de las proteínas lácteas es compensado por el efecto hipocalcémico del P (Spencer y col., 1988). Estas ventajas no pueden ser proporcionadas por ninguna otra fuente de Ca (Heaney, 1996).

Fortificación de alimentos con calcio

La disminución del consumo de leche en los países industrializados ha dado lugar a una inadecuada ingesta de Ca. Ésta es una de las razones por las que la industria alimentaria ha desarrollado los alimentos fortificados con Ca asegurando así un consumo conveniente de este mineral (Nicklas, 2003; De la Fuente y col., 2004). Perales y col., (2006) comprobaron que la biodisponibilidad del Ca es mayor en leches fortificadas en comparación con las que no lo están. En estudios llevados a cabo en humanos, la eficacia de la fortificación con Ca dietético ha sido demostrada por una mejora en el balance de Ca cuando su ingesta aumenta (Kohls, 1991; Chang y col., 1995).

El zumo de naranja, el pan, los cereales o los productos de repostería son algunos alimentos que suelen fortificarse con Ca. Es de gran importancia una correcta elección de la sal empleada sobre todo en bebidas como la leche de soja y el zumo de naranja, pues se ha demostrado que algunos fortificantes tienden a asentarse en la parte inferior del envase (Heaney y col., 2005; Heaney y Rafferty, 2006), e incluso la agitación vigorosa no era suficiente para resuspender la sal de Ca en algunos productos.

Rafferty y col., en un meta-análisis llevado a cabo en 2007, compararon once sales de Ca, y en general, a pesar de que parece que algunas de ellas destacan (como por ejemplo el lactato cálcico, el fosfato cálcico o el sulfato cálcico), la mayoría presentan una biodisponibilidad similar. De hecho, en estudios anteriores realizados en fórmulas infantiles fortificadas se obtuvieron resultados equivalentes, demostrando que los efectos positivos derivados del enriquecimiento con sales cálcicas podrían deberse al alto contenido de Ca presente en el alimento y no al tipo de sal (Kaup, 1998).

Por tanto, según Rafferty y col., (2007), a la hora de seleccionar una fuente de Ca para enriquecer un alimento o bebida se tendrá en cuenta la facilidad de uso, el sabor, y la estabilidad en el alimento terminado. Y la cantidad de Ca empleada dependerá del costo total y de sus beneficios para la salud: el Ca es mejor absorbido por el organismo cuando se consume en cantidades pequeñas, tomadas varias veces durante el día. Por lo tanto, el Ca añadido es, probablemente, más eficaz en unos niveles de fortificación de no más de 300 mg por porción.

En cuanto a la facilidad de uso, el carbonato de calcio se utiliza a menudo en alimentos como barras de cereales donde su característico “sabor a tiza” probablemente no se notará. Como el carbonato de calcio es el menos costoso, bebidas de reemplazo de comida y bebidas de soja también son un buen vehículo para esta sal, sobre todo en forma micronizada. Esta aplicación; sin embargo, funciona mejor cuando los estabilizadores y los ingredientes para reducir la interacción con proteínas (cuando existen) son empleadas para mantener este Ca insoluble en suspensión y reducir al mínimo la formación de complejos proteína-Ca y la sedimentación (Rafferty y col., 2007).

El fosfato cálcico es otra fuente de Ca de baja solubilidad usada en alimentos y bebidas que no sean transparentes, porque también puede actuar como un amortiguador para el control de la acidez. En el caso de las bebidas transparentes, será necesaria una sal soluble a un cierto pH, como el citrato cálcico, o bien, que sea soluble en un amplio pH y gama de concentración (Rafferty y col., 2007).

El lactato cálcico y el gluconato cálcico son formas de Ca sumamente solubles pero que provocan un sabor desagradable en el alimento haciéndolo indeseable para el consumidor. El fumarato cálcico parece ser útil para bebidas claras por su sabor y solubilidad, pero la

disolución es considerablemente más lenta que la de las sales de lactato y gluconato, y la solubilidad en el agua fría es inferior también. Finalmente, las mezclas concentradas o jarabes son difíciles o imposibles de obtener con el fumarato cálcico mientras que el lactato cálcico y el gluconato cálcico sí los hace factibles (Rafferty y col., 2007).

No obstante, la adición de sales minerales como fortificantes en productos de alimentación plantea el riesgo de reducir la biodisponibilidad de los minerales propios del alimento debido a un cambio en su solubilidad intestinal o por competencia por los sitios de absorción entre minerales con propiedades físicas y químicas similares; el efecto inhibitorio del Ca en la absorción del Fe y el Zn es el ejemplo más debatido y mejor documentado (Lönnerdal B, 1997; Amaro y Cámara, 2004).

La mayoría de los experimentos realizados en animales han demostrado un efecto inhibitorio del Ca procedente de los productos lácteos sobre la absorción del Fe (Jovaní y col., 2001, Amaro y Cámara, 2004). Y en numerosos estudios *in vivo* se ha observado el resultado negativo del Ca en la biodisponibilidad del Fe: la absorción del Fe disminuye un 45% cuando la ingesta de Ca y Fe es simultánea (Abrams y col. 1996; Hallberg, 1998). Sin embargo, en el contexto de la totalidad de la dieta, una serie de estudios humanos y animales han puesto de manifiesto la adaptación, al menos parcial, a este hecho si la inhibición de la absorción de Fe no es prolongada o si no llegan a desarrollarse anomalías en el estado de Fe (Reddy y Cook, 1997; Wauben y Atkinson, 1999). En dos estudios aleatorios, no hubo efectos perjudiciales sobre la absorción o el estatus de Fe en niños de 9 meses alimentados con fórmulas enriquecidas en Ca y P (Dalton y col., 1997), o en niños alimentados con cereales de desayuno fortificados con Ca. Así, hasta el momento, ninguna prueba indica que la ingesta de Ca debería ser restringida para mejorar el estado de Fe (Abrams y col., 2001).

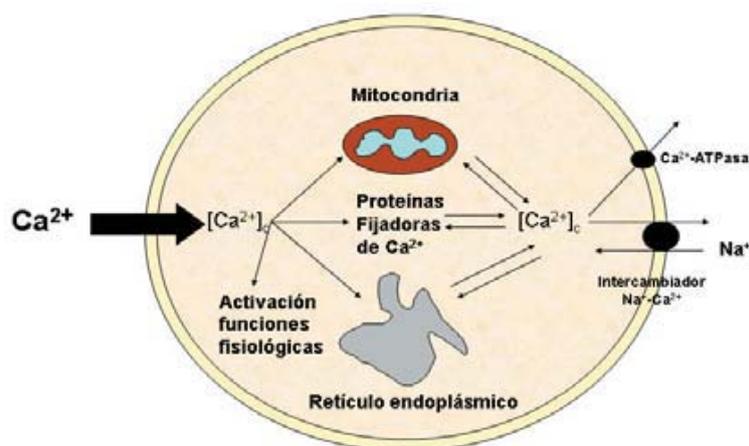
2.2.2. FUNCIONES DEL CALCIO

Elemento estructural: el Ca es un compuesto clave en la configuración estructural de hueso y dientes. El Ca óseo puede encontrarse de dos formas: como Ca intercambiable o difusible; es decir, constituyendo cristales amorfos de fosfato monocálcico poco fijados al hueso y muy pequeños, lo que permite una fácil movilización tanto para depositarse como

para reabsorberse; o bien, como Ca en depósito que constituye el Ca que forma parte de los cristales de hidroxapatita (Mataix, 2008).

Segundo mensajero: el Ca actúa como una molécula de señal dentro de la célula gracias a la cual se llevan a cabo procesos tales como la excitabilidad nerviosa, la contracción muscular, movimientos y adhesión celulares, secreciones glandulares y procesos de división celular. Cuando el Ca es liberado y por lo tanto es activo, actúa en un espacio muy limitado de tiempo, por eso la concentración de Ca^{2+} dentro de la célula es muy baja normalmente. El Ca está almacenado dentro de orgánulos, habitualmente en el retículo endoplásmico o retículo sarcoplásmico en las células musculares.

Figura nº 7. Esquema que ilustra la entrada, redistribución intracelular y salida de Ca^{2+} en una célula (Eguiagaray y col., 2004).



Cuando la célula se encuentra en reposo el Ca citosólico se mantiene muy bajo (0,1 micromolar) gracias a que existen bombas de “achique” que lo expulsan al exterior celular (Ca-ATPasa e intercambiador Na/Ca de la membrana plasmática) o hacia el retículo endoplásmico (Ca-ATPasa reticular, SERCA, o “Sarco-Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase”). Al activarse la célula, el Ca^{2+} citosólico se eleva bruscamente hasta 100 y más veces por encima de su concentración basal (1-10 micromolar). Este aumento se hace a expensas de dos fuentes, extra e intracelular. En células excitables, que sufren grandes cambios de su potencial de membrana y pueden generar ráfagas de potenciales de acción (neuronas, músculo, células endocrinas), el Ca^{2+} extracelular, arrastrado por un enorme gradiente electroquímico favorable, penetra en la célula por canales de Ca^{2+} sensibles al

voltaje, que se abren al activarse la célula y despolarizarse su membrana plasmática. En células no excitables (hepatocito, linfocito, macrófago, endotelio, glía) el Ca^{2+} almacenado en el retículo endoplásmico se libera al citosol por un canal sensible al inositol trifosfato (IP_3): cuando se activa un receptor de la membrana plasmática, perteneciente a la gran familia de los acoplados a proteínas G (muscarínico, serotoninérgico, adrenérgico alfa) se sintetiza IP_3 , (ya que se estimula una fosfolipasa C de membrana, que hidroliza el fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2), originando inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG)) que acciona el mecanismo de apertura del receptor IP_3 en el retículo endoplásmico (Eguiagaray y col., 2004).

Este Ca citosólico activa una calmodulina específica que a su vez lo hace con determinadas quinasas, que fosforilando a proteínas específicas llevan a cabo las correspondientes funciones celulares (contracción muscular lisa, secreción de insulina por células β -pancreáticas, secreción córtico adrenal de aldosterona) (Mataix, 2008). Así por ejemplo, el complejo Ca^{2+} /calmodulina tiene efecto sobre la óxido nítrico sintasa (NOS), enzima encargada de la síntesis del neurotransmisor gaseoso, y sobre el óxido nítrico (NO) (responsable de la vasoconstricción y vasodilatación), que activa a la guanilciclase, encargada de la síntesis del segundo mensajero GMPc. Además, el Ca^{2+} tiene efectos sobre proteínas de transcripción, y así actúa en la regulación de la expresión de genes (Charney y col., 1999). Por otra parte, el DAG liberado a partir del PIP_2 activa una proteinquinasa ligada a la membrana, la cual estimula la bomba correspondiente para sacar sodio al exterior celular para recuperar el nivel de reposo, y poder de nuevo iniciar un nuevo ciclo de activación-reposo (Mataix, 2008).

Pero este sistema de liberación de Ca reticular no es patrimonio exclusivo de las células no excitables; también las células excitables poseen depósitos intracelulares de Ca^{2+} que realizan funciones muy precisas. Así en cada latido cardíaco, el potencial de acción abre un canal por el que el Ca^{2+} accede al interior celular. Pero no es este Ca^{2+} el que utiliza la fibra miocárdica para contraerse; esta pequeña cantidad de Ca^{2+} , que procede del exterior, activa un canal del retículo sarcoplásmico, lo que permite la salida hacia el citosol del Ca^{2+} almacenado. Este canal de Ca intracelular recibe el nombre de canal rianodina. También las neuronas, células endocrinas y otras muchas células excitables o no excitables expresan canales rianodina (Eguiagaray y col., 2004).

La mitocondria es la fábrica que acuña la moneda energética universal, el ATP. La formación de ATP se incrementa durante la activación celular, y el Ca^{2+} tiene mucho que decir en este proceso. La membrana interna posee un uniportador, que se pone en marcha cuando se eleva la concentración citosólica de Ca^{2+} , para bombear el catión al interior mitocondrial. La elevación del Ca^{2+} en la luz mitocondrial ocasiona la activación de deshidrogenasas y la formación de ATP. En otras palabras, el Ca^{2+} acopla la producción de ATP al incremento de la demanda de energía que se produce durante la activación celular. (Eguiagaray y col., 2004).

Hasta ahora, la sobrecarga mitocondrial de Ca^{2+} se había asociado a situaciones patológicas de isquemia-reperfusión en corazón y cerebro, a fenómenos de neurotoxicidad y a enfermedades neurodegenerativas en las que la depleción de ATP, la producción en exceso de radicales libres y la liberación de factores apoptóticos conducen a la muerte celular. Sin embargo, los últimos experimentos sugieren que las enormes elevaciones transitorias de Ca^{2+} mitocondrial que se han detectado están lejos de lo patológico, y revisten gran interés fisiológico, para la regulación de la entrada y distribución de Ca^{2+} en el interior celular. (Montero y col., 2000; Villalobos y col., 2002).

Cofactor proteico: el Ca es asimismo un cofactor de proteasas diversas que estabiliza y potencia su actividad entre las cuales se encuentran la gliceraldehido deshidrogenasa, piruvato deshidrogenasa y α -cetoglutarato deshidrogenasa. También es un cofactor fundamental para la actuación de diversos factores de coagulación (Mataix, 2008).

Sistema Vestibular: el oído interno contiene un órgano sensorial que percibe el equilibrio y da la información acerca de la posición corporal. Las células sensoriales del sistema vestibular detectan el desplazamiento de una capa de carbonato cálcico incrustada en una matriz gelatinosa (la membrana otolítica).

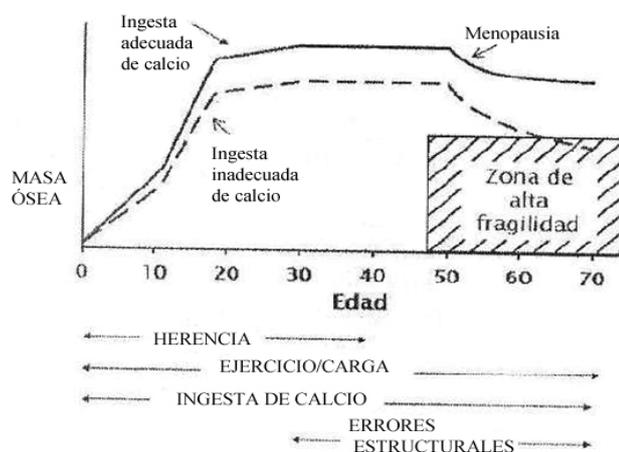
2.2.3. EL CALCIO Y LAS ENFERMEDADES CRÓNICAS

Calcio y osteoporosis: la osteoporosis es una enfermedad crónica y multifactorial que puede progresar en forma silente por décadas hasta que ocurra una fractura. Se caracteriza por una baja densidad ósea y por un deterioro de la microarquitectura ósea

(OMS, 1994), lo cual produce una mayor vulnerabilidad de sufrir fracturas, principalmente en la muñeca, cadera y columna vertebral (Curhan y col., 1993).

La osteoporosis es una enfermedad juvenil, ya que es en la adolescencia cuando se adquiere la mayor parte de la masa ósea, lo cual determinará si la persona tendrá riesgo de sufrir fracturas en los próximos años. Así, a los 17 años de edad la adolescente femenina ha adquirido el 90% de su masa ósea, a los 19,8 años el 95% y a los 22,1 años el 99% de su masa ósea (Teegarden y col., 1995). Aunque el proceso de la adquisición de la masa ósea esta determinado en un 60-80% por la genética del individuo, existen factores modificables que afectan este proceso, como ingesta de Ca, actividad física y estilo de vida, dentro de los cuales, la ingesta de Ca es el que tiene mayor efecto (Matkovic y col., 1990). Si en la adolescencia el individuo no consume una cantidad adecuada de este mineral, no llegará al pico máximo de masa ósea y entrará en la etapa adulta con una densidad ósea inferior a su potencial genético (línea punteada, figura 8). Cuando comience el período de rápida pérdida de la masa ósea, lo que se corresponde con la menopausia, este individuo podría llegar a presentar fracturas. El desarrollo de la masa ósea hasta el potencial del pico máximo protege contra la osteoporosis, ya que hay una relación inversa entre la densidad mineral ósea y la incidencia de fracturas (Melton y col., 1993; Cummings y col., 1993).

Figura n° 8. Factores que afectan la masa ósea en el tiempo (Palacios, 2003).



Estudios en adolescentes y niños y en adultos han demostrado que la suplementación con Ca aumenta la masa ósea. En niñas adolescentes se observó un incremento de 35 g más en el contenido mineral óseo con la suplementación de productos

lácteos durante un año comparado con el grupo control (Chan y col., 1995). Estos efectos se mantienen sólo si la alta ingesta de Ca es constante, y no como una intervención corta, ya que después de un año de la intervención, desaparecieron las diferencias en densidad ósea (Lee y col., 1996). Estudios transversales y de intervención en adultos reportan una relación positiva entre la ingesta de Ca y la masa ósea. Un meta-análisis de 33 estudios evidenció una correlación significativa entre la ingesta de Ca y la densidad ósea (Welten y col., 1995). Se concluyó que la ingesta de 1 g/día de Ca puede prevenir la pérdida de 1% de hueso/año en la mayoría de las regiones del cuerpo. En los primeros años de la postmenopausia, la masa ósea no responde tanto a la suplementación con Ca, ya que es una etapa de rápida resorción ósea; sin embargo, sí favorece a aquellas mujeres con más de 5 años posmenopáusicas (Dawson-Hughes y col., 1990). En ancianos también se ha observado que la intervención con Ca favorece la reducción del índice de fracturas (Dawson-Hughes y col., 1997). Además de proteger la masa ósea, un alta ingesta de Ca reduce la remodelación excesiva común en mujeres posmenopáusicas y en la osteoporosis (Recker y col., 2004). Un grado de remodelación alto es un factor de riesgo de fractura, probablemente, tan importante como una masa ósea baja (Heaney, 2003). Esto se muestra, por ejemplo, en el hecho de que la tasa de remodelación predice la fractura (Eastell y col., 2003). Así pues, examinando la totalidad de las pruebas, resulta claro que la gran mayoría de los estudios que evalúan la relación entre el consumo de Ca y la masa ósea, relacionándolo con la edad o el riesgo de fractura, muestran el efecto beneficioso de la ingesta de Ca alta, de hecho, hay pocos estudios que no encuentren ningún efecto (Grant, 2005; Porthousey col., 2005; Jackson y col., 2006).

Calcio y obesidad: la información reciente procedente de estudios animales y epidemiológicos ha proporcionado un fuerte apoyo al efecto beneficioso del aumento del consumo de productos lácteos sobre la disminución del peso y la grasa corporal durante la restricción de energía; existiendo una relación inversa, estadísticamente significativa, entre la ingesta de productos lácteos/ingesta de Ca y el peso de cuerpo y la pérdida de grasa, esta asociación fue demostrada en un estudio epidemiológico en mujeres, donde aquellas con un alto consumo de Ca (>1300 mg/d Ca), presentaron un bajo riesgo relativo (0,16) de tener alta grasa corporal comparado con aquellas con una ingesta menor a 300 mg/d de Ca (Zemel y col., 2000).

Ensayos clínicos recientes también han demostrado que estos hechos tienen lugar cuando los suplementos proporcionan el Ca adecuado y este efecto es aún mayor si la cantidad equivalente de Ca es suministrada por medio de productos lácteos, poniendo así de manifiesto que las sustancias nutritivas adicionales de la leche y sus derivados desempeñan un importante papel (Huth y col., 2006). Este hecho quedó demostrado en un ensayo realizado en sujetos obesos a los que se les administró una dieta exclusivamente a base de productos lácteos, estos perdieron 7,4 kg, mientras que aquellos con una dieta mixta perdieron sólo 1,4 kg en 4 semanas (Summerbell y col., 1998). En un re-análisis de varios estudios en mujeres se determinó que por cada 1000 mg de diferencia en el consumo de Ca había 8 kg de diferencia en el peso corporal (Davies y col., 2000).

Algunos autores sugieren que la disminución de la ingesta dietética de Ca puede resultar en un aumento de los niveles de Ca intracelular, el cual interviene en la modulación de los depósitos de triglicéridos, podría aumentar la lipogénesis, e inhibir la lipólisis y la termogénesis. También se ha propuesto que el Ca dietético podría inhibir la absorción de grasas en el tracto gastrointestinal y aumentar la pérdida de ácidos grasos por las heces. Sin embargo, los estudios de observación han demostrado resultados inconsistentes (Tejeda-López y col., 2009).

Calcio e hipertensión arterial: existe una base de datos considerable procedente de los ensayos clínicos y los estudios de observación en cuanto a los efectos beneficiosos del Ca sobre la tensión arterial y la reducción del riesgo de hipertensión. Distintos tipos de estudios de observación indican que el consumo de leche y sus derivados se asocia con una menor prevalencia así como un riesgo inferior de desarrollar hipertensión. Uno de estos análisis demostró que el Ca procedente de los alimentos era más efectivo en la reducción de la presión arterial comparado con los suplementos (Griffith y col., 1999).

Los resultados de ensayos clínicos aleatorios controlados sugieren que el consumo de los niveles recomendados de productos lácteos puede contribuir a bajar la presión arterial sistólica y diastólica en individuos que presentan una tensión arterial normal y elevada (Huth y col., 2006). El estudio “DASH”(Dietary Approaches to Stop Hipertension) investigó el efecto de 3 dietas en la presión arterial: 1) dieta alta en grasa saturada y baja en Ca (450 mg/d Ca); 2) dieta rica en frutas y vegetales pero baja en Ca (450 mg/d Ca); y 3) dieta rica en frutas y vegetales y en productos lácteos bajos en grasa saturada “dieta

combinada” (1240 mg/d Ca). La dieta combinada redujo significativamente la presión arterial comparada con las otras dos dietas (Appel y col., 1997) y era dos veces mejor que los suplementos de carbonato de calcio (McCarron, 2006).

El mecanismo por el cual el Ca afecta la presión arterial es alterando sus sistemas regulatorios (Resnick, 1999): la vitamina D y la PTH; estas hormonas regulan el Ca libre en el citosol, el cual participa como segundo mensajero en diversas reacciones. Un alto nivel de Ca libre en el citoplasma aumenta la contracción del músculo liso, secreción de catecolaminas y actividad del sistema nervioso central y por consiguiente aumenta la presión arterial. Una alta ingesta de Ca mantiene bajo el Ca libre en el citoplasma porque la vitamina D y la PTH no aumentan, por lo que la presión arterial tampoco aumenta (Palacios, 2003).

Calcio y cáncer: estudios epidemiológicos han demostrado que un alto consumo de Ca disminuye el riesgo de padecer cáncer de colon y su recurrencia. En estudios con más de cien mil sujetos se determinó que la ingesta de 1200 mg/día de Ca estaba asociada a un menor riesgo e incidencia de cáncer de colon, tanto en hombres como en mujeres (Wu y col., 2002). Estudios longitudinales con numerosos sujetos con o sin historia de cáncer de colon demuestran que el consumo de más de dos porciones diarias de alimentos ricos en Ca protege contra el cáncer de colon recurrente, especialmente si se consumen productos lácteos bajos en grasa (Ma y col., 2002), lo cual resulta en un bajo riesgo relativo de cáncer de colon (Jarvinen y col., 2001).

Estudios clínicos han encontrado una disminución de la actividad proliferativa de las células colónicas con el consumo de Ca (Holt y col., 2001). El mecanismo por el cual el Ca parece proteger contra el cáncer de colon radica en la participación del Ca en la división celular y en la regulación de la proliferación y diferenciación celular. Un bajo nivel de Ca ionizado intracelular contribuye a la proliferación celular mientras que las altas concentraciones disminuyen la proliferación de las células colónicas (Boffa y col., 1989). Aunque el cáncer de colon tiene una compleja etiología, hay estudios suficientes (en humanos y animales) que indican que los ácidos grasos y ciertos ácidos biliares no absorbidos, a través de su efecto irritante en la mucosa, actúan como promotores del cáncer (Holt, 2006). El Ca actuaría también precipitando los ácidos biliares y grasos en las heces (Van der y col., 1997), los cuales son potencialmente tóxicos, mientras que las sales

insolubles de Ca son menos tóxicas para la mucosa colónica. De manera que la suplementación con Ca reduce la concentración de los ácidos biliares fecales (Lupton y col., 1996).

En cuanto al cáncer de mama, se encontró que un alto consumo de productos lácteos estaba relacionado a un bajo riesgo relativo en mujeres jóvenes (Knekt y col., 1996), pero no en mujeres post-menopáusicas (Shin y col., 2002). Se observó que los productos lácteos bajos en grasa, especialmente los productos fermentados (yogurt), estaban relacionados con un menor riesgo de cáncer, mientras que los productos lácteos altos en grasa (chocolate y queso amarillo) con un mayor riesgo (Ronco y col., 2002).

La ingesta de Ca también ha sido asociada con la prevención del cáncer ovárico. Según Goodman y col., (2002), existe un bajo riesgo relativo cuando el consumo de productos lácteos bajos en grasa es alto, en comparación con un consumo bajo.

Para observar el efecto protector del Ca en el cáncer no es necesario consumir niveles más altos que los recomendados para la población en general, ya que se ha demostrado que niveles más altos de Ca (>1200 mg/día) no producen beneficios adicionales (Wu y col., 2002).

Calcio y litiasis renal: los cálculos renales se forman cuando la orina se concentra y las sustancias que normalmente se encuentran en ella cristalizan, tal es el caso del oxalato y el Ca; por lo que la primera medida terapéutica ante una litiasis renal implicaría una reducción del consumo de Ca; sin embargo, existen evidencias que demuestran lo contrario. Un estudio con más de 45 mil hombres demostró que la alta ingesta de Ca disminuyó el riesgo de presentar cálculos renales en un 34% (Curhan y col., 1993), con un bajo riesgo relativo en aquellos con un alto consumo de Ca comparado con los que consumieron < 850 mg/d de Ca. En mujeres también se observó que un alto consumo de Ca disminuyó el riesgo de cálculos renales, pero solo si el Ca provenía de los alimentos, ya que el uso de suplementos de Ca estuvo asociado positivamente al riesgo de cálculos renales, especialmente en aquellas que consumieron el suplemento sin la comida (Curhan y col., 1997). Varios años más tarde Borghi y col. (2002), en un estudio aleatorio controlado de cinco años realizado en hombres con tendencia a formar piedras, mostró que una alta ingesta de Ca procedente de fuentes lácteas, redujo la reincidencia de litiasis renal en un

50% en comparación con una dieta restringida en Ca, puesto que los alimentos ricos en Ca (productos lácteos) pueden contener otras sustancias que ayuden a disminuir el riesgo. Se ha sugerido que el mecanismo por el cual el Ca evita los cálculos renales es la interferencia de la absorción intestinal del oxalato (Liebman y Chai, 1997).

Estudios clínicos demuestran que el Ca se une al oxalato a nivel intestinal, haciéndolo menos disponible para su absorción, lo que lleva a un menor contenido de oxalato en el organismo y por lo tanto a una menor excreción de oxalato en la orina (Sakhaee y col., 1994; Nishiura y col., 2002). La alta concentración de oxalato en la orina es la que ocasiona el cálculo.

2.2.4. UTILIZACIÓN NUTRITIVA DE CALCIO

2.2.4.1. REQUERIMIENTOS

El Ca presenta lo que se denomina un comportamiento “umbral” (Heaney, 2006), pues a medida que aumenta su consumo la retención de este mineral (es decir, la masa ósea) se eleva, pero sólo hasta un cierto nivel. Esta ingesta umbral da lugar a una retención positiva durante el crecimiento, nula durante la etapa adulta y negativa durante la vejez. Por encima de la ingesta umbral no se produce una retención mayor. Para las actuales recomendaciones de ingesta de Ca, el punto medio en el que los diferentes grupos de edad habían alcanzado su umbral fue tomado como la exigencia promedio estimada para la población, una cifra que fue designada “Adecuado consumo” (AI) en el informe final de la Food and Nutrition Board (FNB). Por ello las recomendaciones alimenticias para el Ca varían en las distintas etapas de la vida, así las necesidades de este mineral son más altas durante los períodos de crecimiento rápido, como la niñez y la adolescencia, durante el embarazo y la lactancia, en los casos de deficiencia de Ca, cuando se practica ejercicio que aumenta la densidad del hueso y la absorción del Ca y en la vejez.

La ingesta de Ca ideal es aquella que permite la formación de un adecuado pico de masa ósea en la niñez y la adolescencia, que se mantiene durante la edad adulta y que reduce al mínimo las pérdidas en el anciano (Flynn A, 2003). La principal finalidad de las recomendaciones de Ca en el adulto es compensar las pérdidas diarias que se producen a través de excretas, sudor, cabello, uñas y piel (Heaney y Robert, 2006). Food and Nutrition

Board, Institute of Medicine (2004) ha definido recomendaciones de Ca dietéticas para distintos los grupos de edad. Los requerimientos de Ca fueron establecidos basándose en tres indicadores: el riesgo de fractura, medidas de la masa muscular y la máxima retención de Ca.

Las ratas, tanto en fase de crecimiento como en la edad adulta, requieren 5000 mg/Kg de dieta de Ca (Reeves y col., 1993).

Tabla nº 6. Ingestas diarias recomendadas (RDA) de Ca (modificado de Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, 2004).

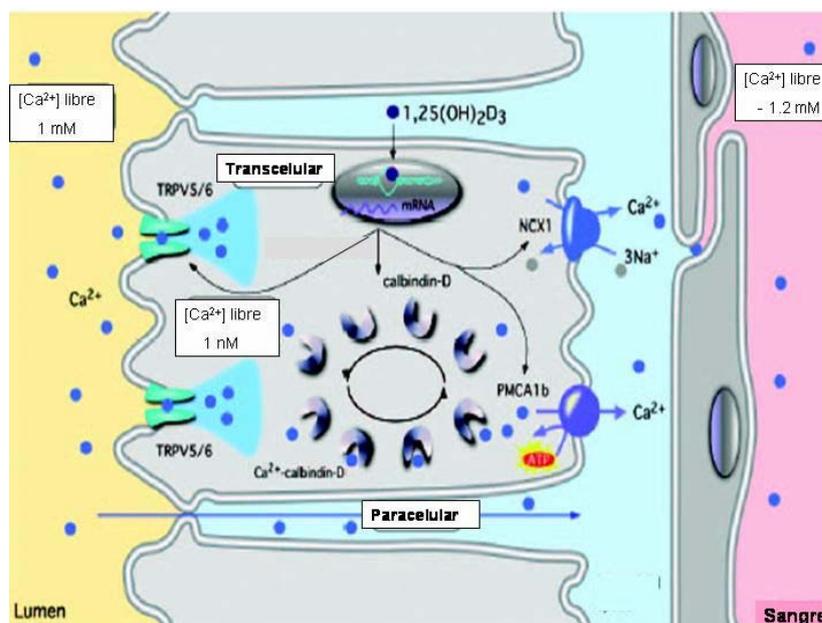
ETAPA DE LA VIDA	EDAD	♂ (mg/día)	♀ (mg/día)
Lactantes	0-6 meses	210	210
	7-12 meses	270	270
Niños	1-3 años	500	500
	4-8 años	800	800
	9-13 años	1300	1300
Adolescentes	14-18 años	1300	1300
Adultos	19-30 años	1000	1000
	31-50 años	1000	1000
	51-70 años	1200	1200
	Más de 70 años	1200	1200
Embarazo	Menos de 18 años	-	1300
	19-30 años	-	1000
	31-50 años	-	1000
Lactancia	Menos de 18 años	-	1300
	19-30 años	-	1000
	Más de 30 años	-	1000

2.2.4.2. ABSORCIÓN INTESTINAL DE CALCIO

La absorción intestinal de Ca es, como la de todos los nutrientes que ingresan en nuestro aparato digestivo, una función que debe estar conservada. La falta de absorción de Ca, se asocia a desórdenes como el hiperparatiroidismo secundario, osteopenia, osteoporosis, patologías asociadas a la dentadura, hipertensión, etc. Está comprobado desde hace décadas que no es suficiente el incremento de la cantidad de Ca en la dieta para lograr una mayor absorción, de hecho, el intestino parece defenderse de las grandes ingestas de Ca mediante disminución de la fracción de absorción del catión.

El Ca debe encontrarse en su forma ionizada (Ca^{2+}) o unido a una molécula orgánica soluble para que pueda atravesar la pared del intestino. Los dos procesos implicados en la absorción de Ca^{2+} a través de epitelios son el transporte paracelular y transcelular. El primero permite el cambio directo de iones de Ca entre dos compartimentos; el segundo implica el transporte a través de al menos dos membranas celulares (Hoenderop y col., 2005). La absorción de Ca dietético mediante el transporte transcelular tiene lugar predominantemente en el duodeno y en el yeyuno proximal, en gran parte es regulado por el $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, y es un transporte saturable que requiere energía. La ruta paracelular es una difusión dependiente de concentración del ión que ocurre en todas partes de la longitud del intestino (Bronner, 2003) pero principalmente en el íleon y muy poco en el intestino grueso, y es un proceso no dependiente de energía.

El colon también posee una cierta capacidad absorptiva, y puede disponer del Ca presente en los vegetales cuando es liberado de la fibra por medio de la fermentación microbiana del colon. Cuando la ingesta de Ca es baja, el transporte transcelular en el duodeno representa aproximadamente el 80% del Ca absorbido, pero la contribución de este transporte al Ca total es menor cuando la ingesta de Ca es alta, debido principalmente al poco tiempo de tránsito intestinal (tres minutos en el duodeno) y a la bajada de la regulación de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, los canales dependientes de Ca^{2+} y la calbindina intestinal (Bronner, 2003). Por lo que es importante aumentar el consumo de alimentos con Ca para asegurar una absorción adecuada del mismo y prevenir la pérdida de hueso (Bronner, 2009).

Figura nº 9. Transporte epitelial de Ca (Russo de Boland, 2005).

Transporte paracelular: la difusión pasiva de pequeñas moléculas e iones a través de las uniones intercelulares existentes entre las células epiteliales y el espacio extracelular es conocida como transporte paracelular. La absorción del Ca tiene lugar en un sistema de intercambio Na/Ca, en donde tres moléculas de Na^+ se intercambian por una de Ca^{2+} (Groff y Gropper, 2000). Se ha sugerido que las estrechas uniones del epitelio manifiestan las mismas propiedades biofísicas: como la selectividad al ión y al tamaño, la permeabilidad al Ca dependiente de la concentración, la sensibilidad al pH y la competencia entre moléculas permeables (Butters y col., 1997; Tang y col., 2003).

La permeabilidad de la uniones celulares está regulada constantemente por varias condiciones fisiológicas (Butters y col., 1997; Goodenough, 1999) y modulada por citoquinas, factores de crecimiento, toxinas bacterianas, hormonas, proteína quinasa (PK) C, serina treonina quinasa, y factores aún desconocidos (Wilson y col., 2001; Gopalakrishnan y col., 2002; Benais-Pont y col., 2003; Wang y col., 2004). Otro agente importante que influye en el transporte de Ca es el tiempo de estancia intestinal, que el más alto es en el íleon (Bronner, 2003), y donde, bajo dietas normocalcémicas, se absorbe la proporción más alta de Ca (Marcus y Lengemann, 1962). Hay que hacer notar que las células del íleon no contienen ninguna calbindina (Bronner, 2003). Como el tiempo de estancia intestinal está en función de la longitud del intestino, la contribución total del transporte paracelular del Ca en este órgano puede variar entre las especies. Aunque el transporte paracelular del Ca

es la principal ruta de absorción en el intestino cuando las dietas son altas en Ca, su importancia no ha sido investigada a fondo. Hallazgos recientes sugieren que puede ser de vital importancia en muchos estados de enfermedad, como hipomagnesemia familiar (Simon y col., 1999), hipertensión (Wilcox y col., 2001) y formación de tumores. Y que puede ser regulado por claudina (Sheehan y col., 2007), proteína que regula la integridad de la unión y su función (Wilson y col., 2001; Sheehan y col., 2007).

Transporte transcelular: este proceso comprende tres fases (Ramesh e Ilka, 2008). (figura 9):

a) Entrada del Ca a favor de un gradiente electroquímico desde el lumen a la célula intestinal a través de canales de Ca especializados, localizados en la membrana de borde en cepillo (BBM), estas proteínas de la membrana luminal no eran bien conocidas hasta que Peng y col. (2003) describieran los canales CaT1 y ECaC, denominadas TRPV6 y TRPV5 respectivamente (Montell y col., 2002). Se ha demostrado que varios tejidos expresan TRPV5 y TRPV6; la presencia de TRPV6 ha sido confirmada en intestino y riñón y TRPV5 sólo en riñón (Okano y col., 2004).

b) Difusión intracelular, mediada por la proteína citosólica ligadora de Ca (calbindina D-9k) involucrada en el transporte de Ca hacia la membrana basolateral (BLM), así como en su regulación intracelular (Russo de Boland, 2005).

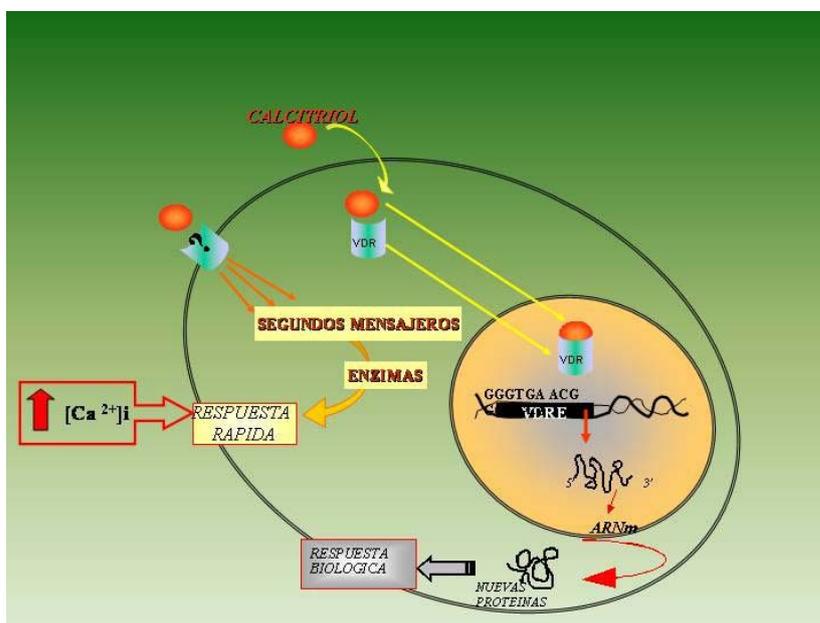
c) Extrusión del Ca al sistema vascular contra gradiente, mediado por la Ca-ATPasa y el cotransportador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ localizados en la BLM. Parte del Ca también puede ser transportado en la célula por vesículas endosómicas y lisosómicas y salir a través de un proceso de exocitosis, ya que el rápido aumento de la concentración de Ca^{2+} en la región apical puede alterar los filamentos de actina cercanos a los canales de Ca^{2+} e iniciar la formación de vesículas (Ramesh e Ilka, 2008).

Esto resulta en una absorción neta de Ca^{2+} desde el espacio luminal al compartimiento extracelular.

El calcitriol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) es el principal regulador de la absorción transcelular de Ca. Actúa en intestino a través de dos mecanismos: uno típico de hormonas esteroideas,

uniéndose con su receptor (VDR) específico en el citosol o núcleo, el complejo H-VDR interactúa en el núcleo con secuencias específicas de ADN, induciendo la transcripción génica y la síntesis de nuevas proteínas. El otro mecanismo es a nivel de membrana, independiente de la síntesis *de novo* de proteínas, activando vías de transducción de señales que conducen en pocos segundos o minutos a una respuesta biológica, siendo la más importante el aumento del Ca intracelular (figura 10).

Figura nº 10. Mecanismo de acción del calcitriol en las células intestinales (Russo de Boland, 2005).



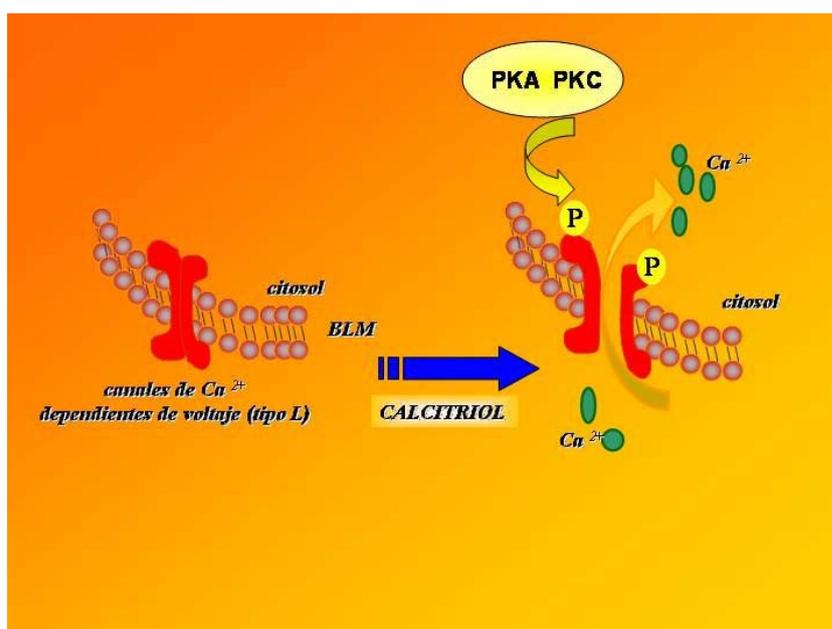
-Mecanismo genómico: el principal efecto genómico del calcitriol en el metabolismo del Ca es aumentar su absorción intestinal induciendo la síntesis de varias proteínas, incluyendo a la calbindina D-9k que constituye el producto génico mejor entendido y más estudiado (Christakos y col., 2003), los canales de Ca de la BBM, TRPV5 y TRPV6 (Hoenderop y col., 2003) involucrados en el transporte transcelular y la Ca-ATPasa y el cotransportador Na^+/Ca^{2+} involucrados en la extrusión del Ca intestinal (Pannabecker y col., 1995).

-Mecanismo no-genómico: la hormona activa de forma rápida y transitoria las vías mensajeras intracelulares adenilil ciclasa/AMPC/PKA (Massheimer y col, 1994) y fosfolipasa C/IP₃/DAG/PKC que participan en la regulación del Ca intracelular

promoviendo el influjo de Ca a través de canales dependientes de voltaje, y provocando la liberación de Ca de los depósitos intracelulares (Wali y col., 1990, Boland y col., 1996); seguido de un aumento sostenido que proviene del medio extracelular (Boland y Nemere, 1992) ya que el cierre y la apertura de los canales de Ca localizados en la BBM están controlados por el potencial de la membrana (canales sensibles a voltaje) y regulados por la fosforilación de las proteínas que forman el poro o canal.

Así pues, el calcitriol estimula la actividad de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje a través de las fosforilaciones mediadas por las proteinquinas A y C (figura 11), provocando la apertura del canal y por consiguiente la entrada de Ca al enterocito, elevando su concentración intracelular (Boland y Norman, 1990a; Boland y Norman, 1990b).

Figura n° 11. Apertura de los canales de Ca^{2+} -dependientes de voltaje por fosforilaciones mediadas por PKA y PKC (Russo de Boland, 2005).



Biodisponibilidad del calcio

Se entiende por biodisponibilidad la proporción de un determinado nutriente que puede ser absorbida y utilizada por el organismo desde los alimentos ingeridos que lo contienen. La biodisponibilidad del Ca oscila entre el 20-35%. En la biodisponibilidad y absorción del Ca alimentario intervienen factores fisiológicos, condiciones fisiopatológicas y factores nutricionales y alimentarios.

Proteína: los estudios epidemiológicos indican que existe una relación inversa entre la proteína de la dieta y la salud ósea. Uno de los aspectos más importantes de la interacción de la ingesta de proteínas con el metabolismo de Ca, se refiere al aumento en la excreción de Ca en la orina: se estima que hay un aumento en orina de 60 mg de Ca/día por cada 50 gramos de ingesta de proteínas; es decir, cada gramo de proteína metabolizada provoca un aumento de las concentraciones urinarias de Ca alrededor de 1,75 mg. El exceso de proteína animal conlleva una gran cantidad de aminoácidos azufrados (metionina, cistina, homocisteína, cisteína), responsables de una mayor eliminación de sulfatos que acidifican la orina, estos iones se unen al Ca impidiendo su reabsorción tubular, dando lugar a la pérdida del mineral. Además la acidificación ocasionada, estimula la actividad osteoclástica y la resorción ósea, inhibiéndose la actividad osteoblástica y la síntesis de colágeno (Krieger y col., 1992; Brandao-Burch y col., 2005). Así se comprende que en los países subdesarrollados, con una menor ingesta de proteínas cárnicas, las necesidades de Ca sean menores. Probablemente, el efecto negativo que las proteínas tienen en la reabsorción renal de Ca y en el metabolismo de dicho elemento, en general, sólo sería significativo si la ingesta de Ca es baja. Además, también depende de otros elementos como el Na, K y P. Una relación de Ca y proteínas superior a 20:1 probablemente protege el esqueleto (Fairweather-Tait y Teucher, 2002).

En la leche, la biodisponibilidad del Ca es alta debido a su alto contenido en dicho mineral y que éste se encuentra asociado a caseínas. La caseína forma micelas y contiene fosfato cálcico en estado coloidal, lo cual favorece la absorción de Ca, siendo más importante que el efecto de la proteína sobre la absorción del mineral. Además los caseinofosfopéptidos, producidos por la acción de las enzimas que degradan las proteínas de la caseína, poseen una gran capacidad de unión al Ca y lo mantienen en solución en un pH neutro y alcalino, haciéndolo altamente biodisponible e inhibiendo su precipitación en el intestino en forma de fosfato cálcico. El efecto positivo de los caseinofosfopéptidos podría ser resultado no sólo del aumento de la solubilidad de Ca en el lumen intestinal, sino también el posible efecto protector de estos compuestos contra las interacciones antagonistas entre el Ca y otros minerales (Erba y col., 2001).

Fósforo: la acción “antiosificante” del P tendría lugar a través de dos mecanismos fundamentales: el incremento en la secreción de PTH y la reducción de la absorción intestinal de Ca (Krall y Dawson-Hughes, 2002) al formarse complejos Ca-P relativamente

insolubles que conducen a pérdidas fecales de Ca. Y aunque se considere que la interacción Ca-P existe en sentido opuesto; es decir, favoreciendo la reabsorción de Ca en la parte distal de la nefrona (Mataix, 2000), el P no compensa la pérdida neta de Ca asociada a la elevada ingesta proteica (Weaver y col., 1999). Actualmente, adolescentes y niños sustituyen el agua de bebida y la leche por bebidas refrescantes, a las que se adiciona una gran cantidad de P, de manera que el aporte de este mineral es tal, que incluso supera sus recomendaciones. El exceso de P en relación a Ca estimula la PTH y si este patrón de consumo es crónico, se deriva en la pérdida de hueso (Anderson, 2003).

La absorción simultánea de Ca y P incrementa la captación de Ca por el hueso, por tanto, disminuye su excreción en orina. Generalmente se admite que una relación Ca/P de 2/1, como en la leche materna, es óptima para la biodisponibilidad, mientras que relaciones inferiores, como sería el caso de la leche de vaca, (1,2/1) favorecerían la formación de fosfatos cálcicos insolubles.

Sal y sodio: el incremento en el consumo de Na se acompaña de un aumento en la excreción renal de Ca debido posiblemente a la competencia Na-Ca por la reabsorción renal o por un efecto del Na en la secreción de PTH. Se ha comprobado, en roedores, que las dietas ricas en sal son capaces de reducir la densidad mineral ósea (De Vernejool, 2001). Cuando se aportan 500 mg de Na añadidos, el riñón elimina unos 10 mg de Ca acompañantes. Por ello, se ha indicado que las mujeres postmenopáusicas que sigan las recomendaciones de ingerir 1000 mg Ca/día no deben superar 2000 mg de Na, lo que equivale a 5 g de sal (Krall y Dawson-Hughes, 2002).

Hidratos de carbono: en general, los hidratos de carbono parecen aumentar la absorción de Ca, en este sentido, la lactosa es el más eficaz entre ellos. Durante el transcurso de 50 años, muchos estudios se han publicado acerca de la importancia de la suplementación con lactosa en la absorción de Ca en la dieta de los animales. También en los humanos, muchos investigadores han estudiado la eficacia de este azúcar en gran variedad de experimentos. Algunos incluso han sugerido que la osteoporosis es más frecuente en la maladigestión de la lactosa (Jackson y Savaiano, 2001). La lactosa podría afectar también la absorción de otros minerales, como el Zn, esta posibilidad fue sugerida por Bertolo y col., (2001) en un estudio realizado en animales, pero no fue demostrado en humanos, así Abrams y col (2002) confirmaron que la absorción de Ca era mayor en

fórmulas infantiles con lactosa comparadas con las que no la presentaban, pero no observaron efectos en la absorción de Zn. Los efectos de la lactosa en la absorción de minerales pueden ser atribuidos a los disacáridos, porque la glucosa y la galactosa no incrementan la absorción de los mismos. Sin embargo, el mecanismo de acción aún no está claro.

En el neonato el papel de la lactosa parece evidente pero de relativa importancia, en el caso del adulto joven; en cambio, esto no ha sido demostrado de modo concluyente. En cualquier caso, como la lactosa se encuentra en la leche y el yogur, los posibles beneficios que tenga suceden obligatoriamente al tomar esos alimentos que de forma habitual son casi obligados actualmente para cubrir los correspondientes requerimientos nutricionales (Mataix, 2000).

Fibra: una alta ingesta de fibra puede perjudicar la absorción de minerales, sobre todo de Ca, ya que debido a su naturaleza polianiónica, reaccionaría con los iones metálicos formando complejos inabsorbibles. La relación entre la fibra dietética y el Ca es controvertida puesto que algunos estudios defienden su efecto negativo sobre la absorción de Ca mientras que en otros no se observa ningún cambio en la absorción o en el balance mineral de una dieta rica en fibra comparada con un consumo moderado de ésta (Wisker y col., 1991; Spencer y col., 1991; Coudray y col., 1997). Los resultados contrarios pueden ser debidos a distintos aspectos metodológicos de los estudios (como por ejemplo una duración corta) y a que en la mayor parte de estos ensayos estudiaron el efecto sobre la absorción mineral de suplementos de fibra y no de fuentes de fibra naturales (Shah y col., 2009), en las que muchos componentes de la dieta en condiciones fisiológicas pueden interferir con este proceso.

Así en ratas alimentadas con dos fuentes de lignina procedente de salvado de trigo y coliflor, no se observaron diferencias significativas en la absorción de ^{45}Ca , cuando se comparaban con el grupo control, que no recibía fibra (Shen y col., 1998). Mientras que Shah y col., (2009) sí apreciaron que una dieta rica en fibra tiene un cierto impacto sobre el Ca y el balance de P en sujetos con diabetes tipo II por ello aconsejan asegurar un aporte adecuado de Ca y otros minerales en individuos que consumen una dieta rica en fibra. Pero hay que tener en cuenta que la aparente influencia negativa de la fibra sobre la absorción del Ca es

principalmente debido a algunos componentes como los fitatos que con frecuencia están asociados con la fibra dietética (Guéguen, 2000).

Ácido fítico y ácido oxálico: el ácido fítico presente en los cereales y las leguminosas y el ácido oxálico en los vegetales (Heaney y col., 1991; Heaney y col., 1998) tienen la capacidad de unirse a cationes como el Ca en el tracto gastrointestinal, evitando así su absorción.

Los productos no lácteos como la leche de soja fortificada con Ca constituyen una buena fuente de este mineral, especialmente en poblaciones o grupos que no consumen habitualmente productos lácteos. Sin embargo, la soja contiene cantidades relativamente altas de ácido fítico que inhibe fuertemente la absorción de Fe y Zn y en un menor grado la absorción del Ca. Los estudios en los adultos y adolescentes han demostrado que la absorción de Ca proveniente de la leche de soja puede aumentarse substancialmente eliminando el ácido fítico mediante tratamiento enzimático (Heaney y col., 1991; Heaney y col., 2000). Este método tiene el potencial de mejorar el valor nutritivo de los productos a base de soja. Los cereales integrales también aportan gran cantidad de fitatos pero solamente en casos muy reducidos en que se ingiera gran cantidad de salvado, normalmente con fines laxantes, la interacción del ácido fítico y el Ca podrá tener significación y, además, siempre que coincidiera la ingesta de un alimento con Ca y ese producto de uso minoritario (Mataix, 2000).

El más potente inhibidor de la absorción de Ca parece ser el ácido oxálico que está presente en las espinacas y los productos alimenticios de cacao. A pesar de contener una cantidad apreciable de Ca, la tasa de absorción del Ca de las espinacas es sólo del 5% (Buzinaro y col., 2006). En cuanto al segundo, la cantidad de producto comercial que se ingiere junto con, por ejemplo, un vaso de leche, no impide la absorción total del Ca, sino tan sólo una muy pequeña parte de él, pero además, la ventaja de que, junto con estos productos, muchos niños e incluso ancianos tomen leche supera con creces las pequeñas pérdidas fecales del mineral (Mataix, 2000).

Fructooligosacáridos: se ha demostrado que la adición de fructooligosacáridos en los distintos tipos de alimentos también puede incrementar la absorción de Ca, pues evita el efecto inhibidor del ácido fítico, oxálico o de la fibra. Estos oligosacáridos son muy

resistentes a las enzimas digestivas humanas, y llegan al intestino grueso intactos donde son fermentados por la microflora del colon. Los ácidos grasos de cadena corta producidos dan lugar a una reducción del pH del colon resolubilizando los complejos de Ca insolubles, y volviendo el Ca disponible para la absorción (López y col., 2000).

Los estudios en adolescentes, pero no en adultos, han demostrado que el consumo de cantidades razonables de fructooligosacáridos aumenta la absorción del Ca (Van den Heuvel y col., 1999) y mejora la mineralización ósea (Scholz-Ahrens y col., 2001), e influye también positivamente en otros minerales como el Mg (Van den Heuvel y col., 2009). Las dosis de oligosacáridos no digeribles que demostraron ser efectivas en adultos, han sido altas y no es probable que se utilicen en alimentos para humanos por la incomodidad digestiva que producen (Van den Heuvel, 1998).

Grasas: una dieta con alto contenido en grasa decrecerá la biodisponibilidad del Ca dietético en casos de malabsorción de grasa (Sáyago-Ayerdi y col., 2008). Esto se debe a que el Ca se une a los ácidos grasos saturados para formar jabones insolubles los cuales no se absorben y aparecen en heces. Sin embargo, los complejos formados entre ácidos grasos de cadena media y Ca y ácidos grasos de cadena corta, parecen incrementar la absorción del mineral (Haderslev y col., 2000; Mineo y col., 2001). Se sabe que la grasa láctea y el ácido oleico favorecen la absorción de Ca mientras que los ácidos de cadena larga saturados favorecen la formación de jabones insolubles (Pérez-Granados y col., 2003).

Campos y col., (2003) compararon en ratas los efectos de la leche de cabra, rica en ácidos grasos de cadena media, frente a la leche de vaca sobre la absorción de Ca y su contenido en diferentes tejidos, y encontraron en el caso de la leche caprina, un incremento en la absorción y contenido en hueso de Ca. Los resultados se atribuyeron a que los ácidos grasos de cadena media más abundantes en la leche de cabra, podrían incrementar el transporte pasivo de Ca en el intestino al favorecerse la formación de micelas y el flujo mucosa-serosa.

Café y cafeína: se sabe que la cafeína incrementa la eliminación urinaria de Ca en las 1-3 horas siguientes a su toma, pero este efecto no se ha comprobado de forma sostenida (Krall y Dawson-Hughes, 2002). En mujeres postmenopáusicas que toman poca leche, el consumo de dos o más tazas de café (más de 300 mg) se acompaña de una menor

densidad mineral ósea (Rapuri y col., 2001) por ello, se ha indicado que, por cada taza de café de 180 mL, la dieta debiera suplementarse con 40 mg de Ca. Sin embargo, otros autores no han encontrado este efecto y no proponen dicha suplementación (Rico, 2002).

Alcohol y tabaco: en el alcoholismo crónico hay una reducción de la densidad mineral ósea tanto por efecto tóxico directo sobre los osteoblastos como por la malnutrición habitualmente asociada, además de haber un alto riesgo de fracturas ante la mayor frecuencia de caídas (Krall y Dawson-Hughes, 2002). Aunque se ha discutido acerca del efecto beneficioso de la ingesta de ciertas cantidades de alcohol, Wolf y col., (2000) determinaron que incluso su consumo moderado en mujeres perimenopáusicas podría tener un efecto negativo en la absorción de Ca.

Las personas fumadoras, especialmente mujeres, tienen una menor densidad mineral ósea y una mayor velocidad de pérdida ósea que las no fumadoras. En varones, también se ha visto la menor mineralización que se da en fumadores. El mecanismo podría ser múltiple: los fumadores suelen tener menor peso corporal y mayor consumo de alcohol y cafeína. Las mujeres fumadoras tienen la menopausia más temprana que las no fumadoras. Se sabe que el tabaco aumenta la transformación hepática del estradiol en sustancias no activas y disminuye la formación de estriol y estrona, pero no se conoce las acciones del tabaco sobre los andrógenos (Krall y Dawson-Hughes, 2002).

Edad: las mujeres ancianas pueden tener una absorción de Ca defectuosa, debido a la falta de respuesta intestinal a la $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ (Pattanaungkul y col., 2000). Con la edad también decrece la cantidad de ácido producido en el estómago (una ligera aclorhidria) que incrementa el pH del estómago, debido a lo cual el Ca no puede disociarse completamente de las sales, provocando una disminución de la absorción. Según Weaver y Heaney (2001) la aclorhidria no debería suponer un problema si el Ca se ingiere con las comidas. Adicionalmente, los complejos de bajo peso molecular como el carbonato cálcico pueden ser absorbidos intactos a través de la ruta paracelular, incluso en personas con aclorhidria (Weaver y Heaney, 1999).

Medicamentos: algunos medicamentos como los antibióticos, anticonvulsivantes y glucocorticoides interfieren con la absorción del Ca. Dentro de los antibióticos se encuentra la tetraciclina, un compuesto que forma quelatos con minerales, provocando que

tanto el principio activo como el mineral no sean disponibles. La minociclina tiene menor capacidad quelante y el efecto de la doxiciclina en la absorción del Ca aún está cargado de controversia.

Los anticonvulsivantes tales como la fenitoína y fenobarbital, pueden causar hipocalcemia por tres mecanismos diferentes: a) disminuyen la absorción de Ca, posiblemente a través de la inhibición de proteína transportadora de Ca, b) estimulan el catabolismo del colecalciferol (vitamina D₃) y c) incrementan el catabolismo de la vitamina K, con la consiguiente reducción de la formación de proteínas dependientes de esta vitamina implicadas en el manejo del Ca por parte de los osteoblastos (Utermohlen, 2000).

El tratamiento a largo plazo con glucocorticoides puede causar complicaciones, entre las cuales, la osteoporosis es uno de las más con frecuentes. Se ha observado que los pacientes tratados con una dosis de 7,5 mg o más de prednisona diariamente durante al menos tres meses desarrollan osteoporosis ya que el uso prolongado de estos fármacos da lugar a una inhibición de la formación del hueso, un aumento de la resorción, un balance de Ca negativo (Papierska y Rabijewski, 2007) y un incremento de la necesidad de vitamina B₆, Ca y vitamina D.

2.2.4.3. EXCRECIÓN, RETENCIÓN Y BALANCE DE CALCIO

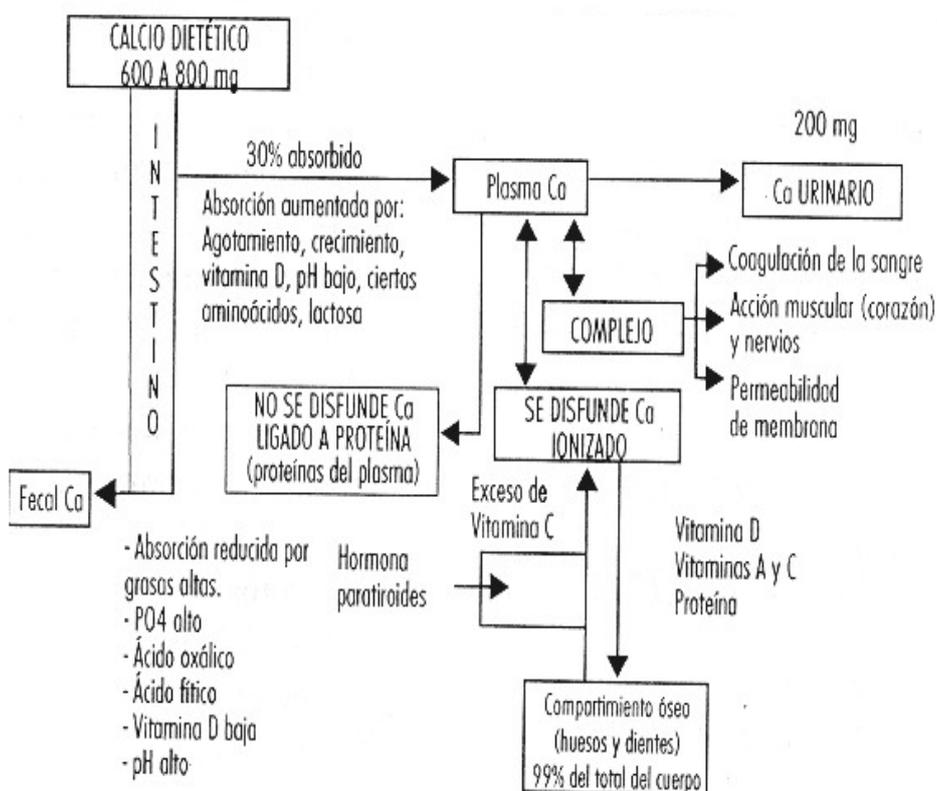
El principal reservorio de Ca es el esqueleto (como ya se ha comentado). Los factores que, en mayor medida, afectan la eficacia de su almacenaje en el hueso no son dietéticos; son fisiológicos, como por ejemplo: el crecimiento, el embarazo o la lactancia. El exceso de Ca absorbido que no puede ser almacenado en el hueso es excretado en la orina, las heces y el sudor, piel, pelo y uñas. En el adulto no se produce retención de Ca en el tejido óseo, de modo que este mineral es excretado por dichas rutas, posiblemente tras la incorporación y liberación del hueso. En esta etapa, los individuos, pierden aproximadamente un 0,3% de su masa ósea al año; es decir, unos 10 mg Ca/año: esto significa que su balance de Ca es ligeramente negativo. En mujeres postmenopáusicas, esta pérdida de masa ósea puede ser hasta 10 veces superior (Guéguen y Pointillart, 2000).

Las pérdidas cálcicas diarias se han calculado en 420 mg/día, sumando las urinarias (220 mg), fecales (136 mg) y dérmicas (64 mg).

La excreción fecal es la resultante de la porción no absorbida proveniente del alimento más el Ca endógeno que procede de células mucosales descamadas y de las secreciones, salival, gástrica, intestinal y biliar (Mataix, 2008).

Las pérdidas urinarias resultan de la filtración glomerular (unos 10 g de Ca por día) y la reabsorción tubular, que recupera el 98% de la carga filtrada (Broadus, 1993). La reabsorción tubular es un proceso fuertemente regulado por la PTH. Las cantidades de Ca en la orina humana son mucho mayores que en la orina de otros animales. Cambios en la cantidad de Ca excretado en orina pueden tener un gran impacto en el balance de Ca. Ciertos factores de la dieta pueden influenciar la reabsorción y deben ser evaluados cuidadosamente a la hora de evaluar la biodisponibilidad del mineral (Guéguen y Pointillart, 2000).

Figura nº 12. Metabolismo del Ca (Mora y col., 2000).



La concentración normal de Ca en sangre oscila entre 2,20 y 2,65 mmol/L. Alrededor del 40% está unido a albúmina, 10% unido a citrato, bicarbonato o fosfato y el 50% restante está en forma ionizada. La afinidad del Ca por la albúmina y otras proteínas

disminuye conforme desciende el pH (acidosis). El Ca está sometido a un estricto control homeostático mediante la absorción, la excreción, la secreción y el almacenaje en el hueso para el mantenimiento de la concentración de Ca ionizado en el plasma en torno a 1,1-1,3 mmol/L. La regulación de la concentración plasmática de Ca se realiza mediante un complejo sistema fisiológico que comprende la interacción de las hormonas calciotropas, (PTH, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y calcitonina), en los distintos tejidos diana (el riñón, el hueso y el intestino) y así, aumenta o disminuye la entrada de Ca en el espacio extracelular. Sólo en circunstancias extremas, como la desnutrición severa o el hiperparatiroidismo, la concentración de Ca en suero se encuentra por debajo o por encima de la gama normal. La secreción de estas hormonas está regulada, total o parcialmente, por la concentración de Ca ionizado en plasma, formando un sistema de retroalimentación negativo (Cashman, 2002).

2.2.5. REGULACIÓN HOMEOSTÁTICA DEL CALCIO

Receptor-sensor de Ca (CaSR): es un receptor transmembrana acoplado a proteínas G que posee una gran región extracelular amino terminal capaz de responder a variaciones de Ca extracelular activando una serie de cascadas intracelulares cuyo resultado final es el mantenimiento de la homeostasis del Ca (Brown y MacLeod, 2001). CaSR es expresado en muchos tejidos (Chattopadhyay y Brown, 2000), donde realiza importantes funciones: como la modulación de la secreción de PTH por la glándula paratiroidea y de calcitonina por las células C del tiroides; en el riñón regula la excreción de Ca, influyendo en el movimiento transepitelial de agua y electrolitos (Goodman, 2004) también promueve el transporte de Ca en la glándula mamaria (VanHouten y col., 2004) y el flujo de fluidos en el tracto gastrointestinal (Cheng y col., 2002).

De igual forma, las respuestas extracelulares de CaSR, son observadas en tejidos donde el papel fisiológico de este receptor no está claro, como el hueso. Osteoblastos y osteoclastos cultivados responden al aumento extracelular del Ca a través de un mecanismo que puede ser distinto de CaSR (Pi y Quarles, 2005). Aunque CaSR haya sido detectado en estas células por algunos investigadores (Yamaguchi y col., 2001), otros han sido incapaces de identificar CaSR en osteoblastos o en osteoclastos (Shalhoub y col., 2003; Kim y col., 2003; Choudhary y col., 2003). Se ha observado que osteoblastos obtenidos de ratones que presentan CaSR inactivados muestran respuestas inalteradas al Ca extracelular (Pi y col., 2000), lo cual sugiere la presencia de otro mecanismo que detecta las variaciones de Ca.

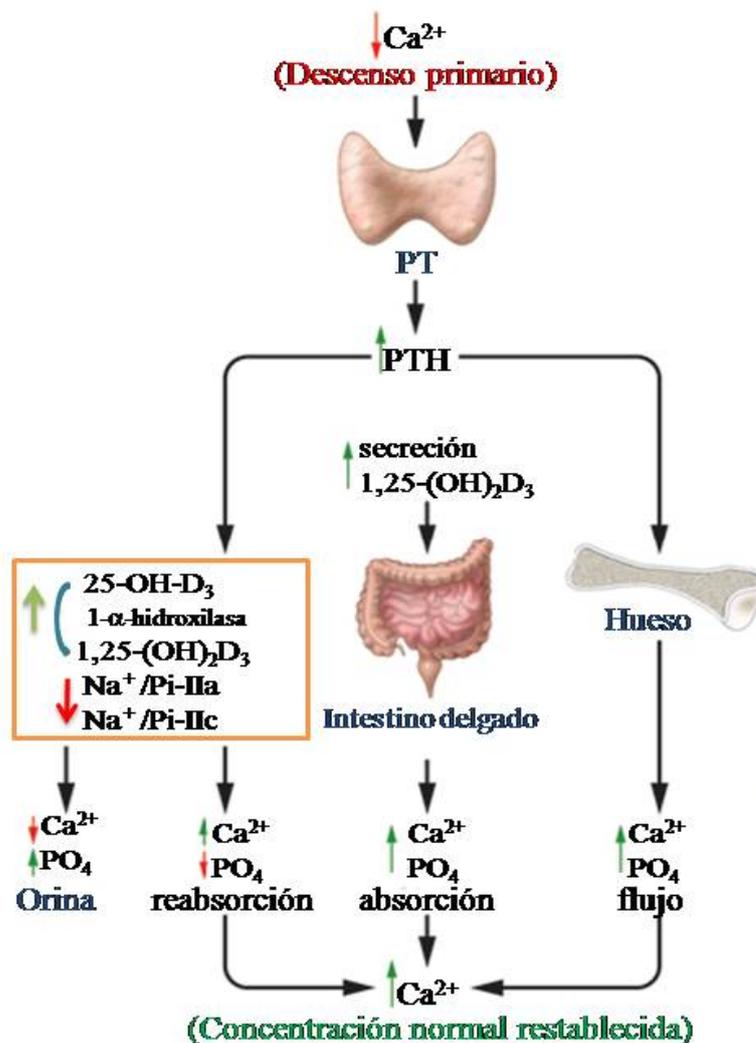
El microambiente óseo tiene una concentración extracelular de este mineral más alta que la circulación general y una matriz extracelular ósea específica con proteínas de unión al Ca como la osteocalcina, estas estrictas circunstancias hacen que los osteoblastos detecten el Ca extracelular, posiblemente, a través de otro receptor de baja afinidad por el Ca (Pi y col., 2005). Se ha propuesto la existencia de un posible receptor sensible al Ca en los osteoblastos (Ob. CaSR), que se distingue de CaSR por las diferencias en la especificidad del ligando y acoplamiento a las vías de transducción de señales. La reciente caracterización funcional de Ob. CaSR indica su capacidad para detectar cationes y aminoácidos y funciona como un receptor acoplado a proteína G, sugiriendo que este supuesto receptor también puede pertenecer a esta familia de receptores (Pi y Quarles, 2005).

Hormona Paratiroidea (PTH): es un polipéptido de 84 aminoácidos que se forma a partir de la pre-proPTH (110 aminoácidos) y la pro-PTH (90 aminoácidos). Su acción biológica radica en el extremo amino-terminal.

Las variaciones de los niveles de Ca sérico son detectadas por CaRS (Brown, 2000) que se encuentran en la membrana de las células de la glándula paratiroidea. En respuesta a la hipocalcemia, ésta aumenta la producción y secreción de parathormona, que actúa en el túbulo renal distal para reducir la excreción renal de Ca y en el túbulo proximal para inhibir la reabsorción de P; en el intestino delgado aumenta el transporte activo de Ca y P por estímulo de la hidroxilación de $25(\text{OH})\text{D}_3$ a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ a nivel renal (Rizzoli y col., 1974) y también tiene efectos directos sobre el hueso a través de receptores de PTH en los osteoblastos, dando lugar a un incremento del flujo de Ca y P de desde el compartimento óseo (Talmage y col, 1976) a través de la resorción RANKL-dependiente mediada por los osteoclastos (Ma y col., 2001). Con todo ello se eleva de nuevo la calcemia.

La PTH es una hormona hipofosfatemiante puesto que en el riñón aumenta la fosfaturia, efecto que prevalece frente al aumento del aporte de P desde el hueso e intestino, esto contribuye al efecto hipercalcemiante de la hormona, ya que la hipofosfatemia tiende a aumentar el Ca plasmático.

Figura nº 13. Eje PTH/1,25(OH)₂D₃ (modificado de Quarles, 2008).

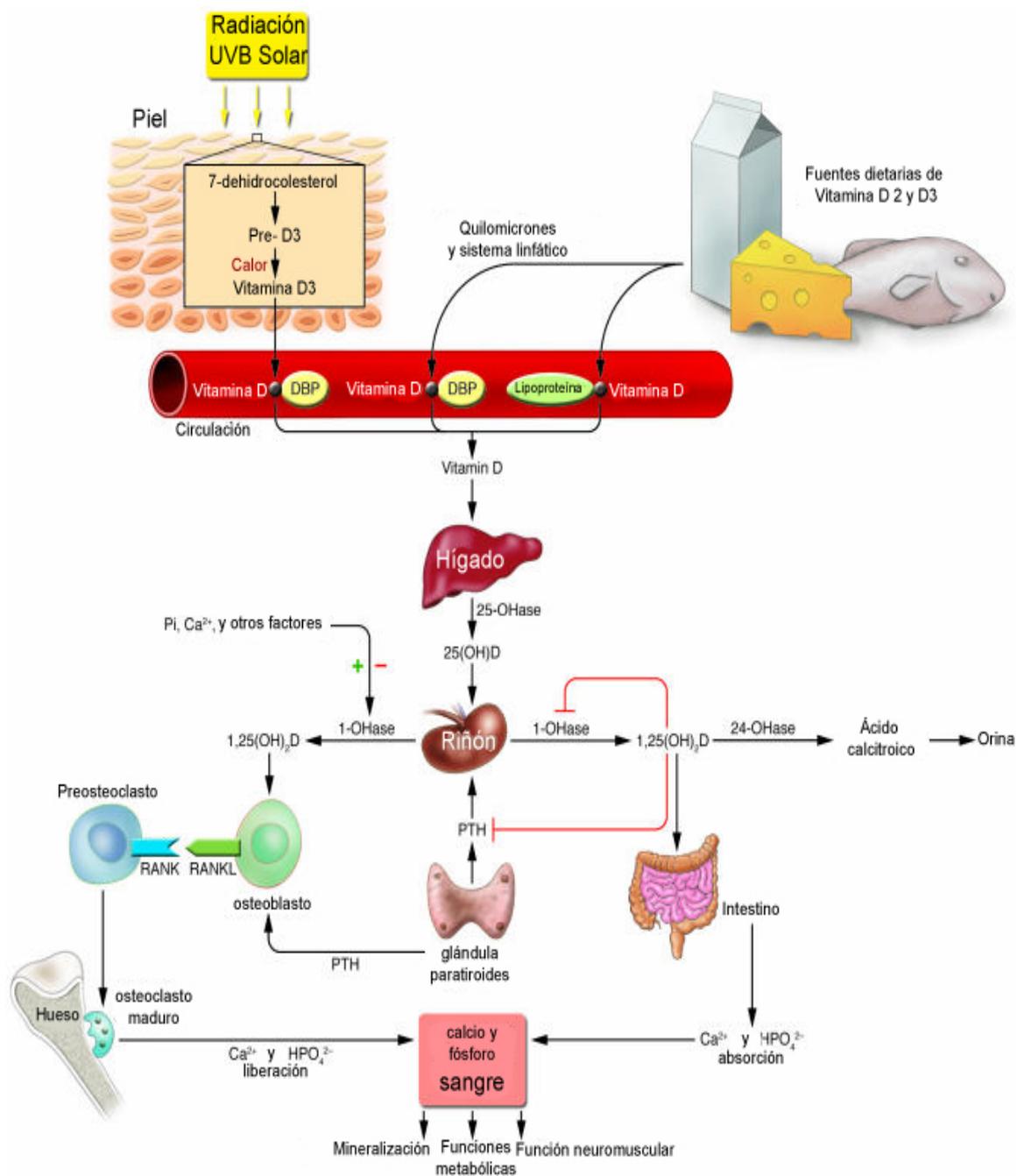


Así pues, la respuesta de la PTH al descenso del Ca plasmático se produce en cuestión de minutos por medio de acciones inmediatas (secreción de la hormona, reducción de su degradación) o más tardías (aumento en la expresión génica, proliferación de las células paratiroideas). Los niveles elevados de Ca son también detectados por CaRS, que hace que se desencadenen unas cascadas de señalización intracelular que, en último término, llevan a una inhibición de la liberación de la hormona y, además, favorecen su degradación dentro de las propias células paratiroideas (Silver y col., 2002). El resultado es una respuesta de la glándula paratiroides de tipo sigmoidal, en la que pequeños cambios en el Ca iónico extracelular provocan grandes variaciones de PTH, consiguiéndose su máxima inhibición en la hipercalcemia (Carrillo-López y col., 2009). Se ha observado que anomalías en la regulación de la PTH están relacionadas con la baja expresión de la CaRS (Cañadillas y col., 2005).

Calcitriol o $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$: es una hormona que regula el metabolismo fosfocálcico. Por tanto, su función primaria es mantener los niveles séricos de Ca y P en un estado normal capaz de proporcionar las condiciones adecuadas para la mayoría de sus funciones metabólicas, incluyendo la mineralización ósea (Holick, 2006). Como está implicada en el crecimiento del esqueleto, la vitamina D, es esencial durante la niñez y la adolescencia (Gordon y col., 2004). Los niveles normales de vitamina D en suero determinan la absorción del 30% del Ca dietético y más del 60-80 % durante los períodos de crecimiento, debido a la alta demanda de Ca (Holick, 2004). Por eso la deficiencia de vitamina D durante la niñez puede causar retraso en el crecimiento y anomalías de hueso (raquitismo), aumentando el riesgo de fracturas en la edad adulta (osteomalacia) (Holick, 2007).

La vitamina D es producida en la piel por la exposición a la radiación UVB o es ingerida en la dieta, pasa a circulación, donde es transportada mediante sus proteínas de unión (DBP) y lipoproteínas (De Luca, 2004; Holick, 2004; Holick, 2005). La Vitamina D es liberada de DBP en el hígado y sufre una hidroxilación sobre el C-25 por la 25-Hidroxilasa (también conocida como CYP27A1, CYP3A4, CYP2R1, CYP2J3) produciendo 25-(OH)-vitamina D (De Luca, 2004; Holick, 2004; Bouillon R, 2001). Ésta es la principal forma circulante de la vitamina D, por lo que es medida para determinar el estado de la misma, ya que su vida media en la circulación es de dos semanas y se correlaciona con el hiperparatiroidismo secundario, raquitismo y osteomalacia (Holick, 2004; Holick, 2006; Bouillon, 2001). El complejo de la 25-hidroxi-vitamina D y la vitamina D unida a proteínas, filtran en el riñón y son captadas del lumen tubular renal a través del receptor endocítico de la mesalina. Una vez en el interior de las células epiteliales del túbulo renal (Holick, 2004; Bouillon R, 2001) la 25(OH)D₃ es liberada y es convertida en las mitocondrias por la 1- α -hidroxilasa (también conocida como CYP27B1) en 1,25(OH)₂D₃ que es la forma biológicamente activa de vitamina D, responsable de mantener la homeostasis del Ca y el P. La hidroxilación renal está estrechamente regulada por la PTH. La 1,25(OH)₂D₃ mejora la absorción intestinal de P y Ca, reduce su excreción renal y estimula la expresión de RANKL en los osteoblastos que interacciona con su receptor RANK en los preosteoclastos induciendo la maduración osteoclástica (Khosla, 2001; Holick, 2004; Bouillon R, 2001), así se libera el Ca y el P (HPO₄²⁻) procedentes del hueso. Finalmente, la misma 1,25(OH)₂D₃ inhibe la 1- α -hidroxilasa renal y estimula la expresión de 25(OH)D-24-hidroxilasa (24-OHase). La hidroxilación en la posición 24 sería el paso inicial en la inactivación del sustrato 25(OH)D₃, y de 1,25(OH)₂D₃.

Figura n° 14. Fotoproducción, metabolismo y varios efectos biológicos de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sobre Ca, P y metabolismo del hueso (modificado de Holick, 2006).



El receptor nuclear de la vitamina D (VDR) se encuentra además, de en intestino y hueso, en una variedad de células y tejidos que incluyen linfocitos, células musculares estriadas, corazón, páncreas, piel, cerebro, gónadas, etc. La interacción de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ con estos receptores es responsable de numerosos efectos fisiológicos recientemente conocidos. Algunos tejidos como mama, próstata, colon y piel poseen la enzima $1-\alpha$ -

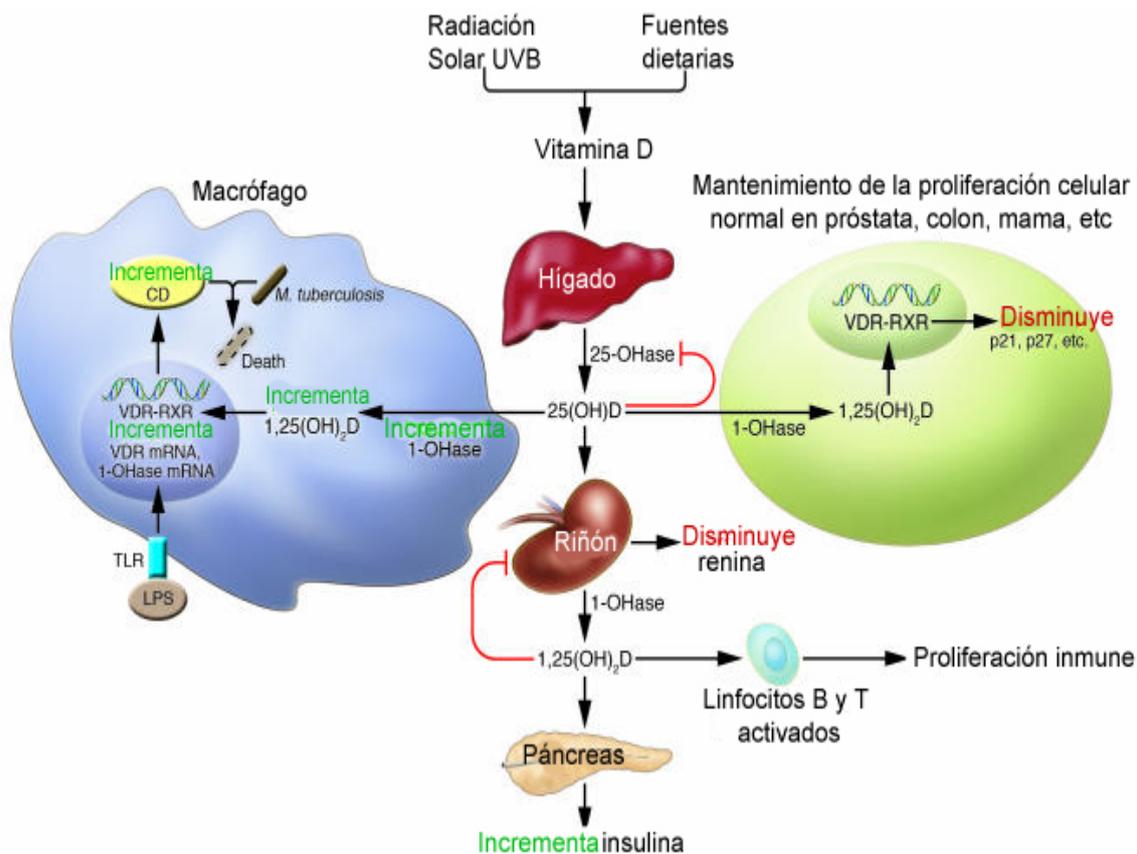
hidroxilasa y por lo tanto la capacidad de producir $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ localmente. Así la forma activa de la vitamina D media en efectos inmunológicos al unirse a su receptor VDR, presente en las células inmunológicas, de respuesta innata y adaptativa. El VDR es expresado en monocitos y macrófagos activados, células dendríticas, células asesinas o natural killers, células T y B. Además se ha observado que al activarse tiene una potente función antiproliferativa, pro-diferenciativa e inmunomoduladora, por lo que tiene efectos inmunosupresores e inmunoestimuladores (Nagpal, 2005).

Por otro lado se le ha reconocido a la vitamina D un rol en la regulación de la diferenciación celular. Células preleucémicas de rata mostraron una marcada inhibición del crecimiento y aumento en la maduración en presencia de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Posteriormente varias observaciones mostraron el efecto antiproliferativo en células de cáncer de mama, melanoma y osteosarcoma (Holick, 2002). Aunque la actividad anticancerígena de la vitamina D no está totalmente dilucidada parece estar implicada en: la regulación del ciclo celular, estimulación de la diferenciación, disminución de los estímulos que actúan sobre el crecimiento, inhibición de la angiogénesis y aumento de la apoptosis de células malignas (Pozzo, 2005).

Estudios epidemiológicos y clínicos de las últimas dos décadas sugieren, además la existencia de una relación inversa entre la vitamina D y la tensión arterial y/o la actividad de renina plasmática. Según las observaciones de Li y col. (2003), el receptor de vitamina D podría ser un regulador negativo de la expresión de la renina.

Y algunos estudios han encontrado asociación entre deficiencia de vitamina D y diabetes tipo II. La célula pancreática expresa VDR. El mecanismo patogénico podría ser un efecto sobre la sensibilidad a la insulina, la función de la célula P o ambas. Un estudio reciente, reveló una correlación positiva entre los niveles de $25(\text{OH})\text{D}_3$ y la sensibilidad a la insulina y un efecto negativo de la hipovitaminosis D sobre la función pancreática (Chiu y col., 2004).

Figura nº 15. Funciones no-calcémicas del 1,25(OH)₂D₃ (modificado de Holick, 2006).



Los requerimientos de vitamina D, de acuerdo con Food and Nutrition Board and Institute of Medicine (2002), son de 2,5 µg/día para prevenir un raquitismo por deficiencia de esta vitamina. En los niños y adolescentes se recomiendan 5 µg/día. Los adultos de más de 50 años deben aumentar su ingesta hasta 10 µg/día e incluso de 15 µg/día a partir de los 70 años. Las máximas cantidades diarias tolerables son de 25 µg/día para los niños y de 50 µg/día para los adultos.

En la mayoría de los casos, los aportes de vitamina D en la dieta son suficientes. Los alimentos más ricos en vitamina D son los pescados (bacalao, salmón, sardinas, ostras, etc.), el hígado de vaca o ternera, los huevos, la leche y el queso. Los suplementos de vitamina D sólo son necesarios para aquellas personas que estén alejadas crónicamente del sol como los trabajadores nocturnos o las personas que viven en latitudes muy nórdicas.

Calcitonina (CT): es un péptido de 32 aminoácidos producido por las células parafoliculares del tiroides, células pituitarias y unas pocas células neuroendocrinas

ampliamente dispersadas. Al igual que otras hormonas pépticas, se sintetiza en forma de pre-prohormona para posteriormente almacenarse en las vesículas del aparato de Golgi como calcitonina activa. Al contrario que la PTH y la vitamina D, la calcitonina posee una acción hipocalcemiante, siendo el equilibrio entre las tres hormonas lo que determina finalmente la concentración de Ca y P en la sangre.

El osteoclasto es la célula más rica en receptores de calcitonina (RCT). Una vez que la CT se une a su receptor, ejerce su acción sobre la célula a través de la proteína G-adenilciclase-AMPC y de fosfolipasa C- inositol trifosfato. La gran riqueza de receptores en el osteoclasto explica que se configure en esta célula la acción biológica fundamental de la CT, actuando como un potente inhibidor de la actividad osteoclástica y, por tanto, del remodelado óseo. La CT actúa sobre el osteoclasto maduro causando rápidamente una pérdida del borde “en cepillo” y evita el reclutamiento de sus precursores, reduciendo también el número de células; lo que lleva a una disminución de la resorción ósea. La CT inhibe, también, la síntesis y secreción de la fosfatasa ácida tartrato-resistente (TRAP), la actividad de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ y de la anhidrasa carbónica, reduciendo la secreción ácida de H^+ , fenómenos todos necesarios para la acción resorptiva. También inhibe la fijación del osteoclasto actuando sobre las integrinas y moléculas de adhesión.

La CT también ejerce su acción en otros tejidos, como el riñón, donde se sabe que aumenta la expresión de mRNA de la enzima 1-alfa-hidroxilasa, que cataliza el paso de $25(\text{OH})\text{D}_3$ a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en el túbulo proximal, aumentando los niveles de este último metabolito activo e, indirectamente, la absorción intestinal de calcio. A nivel de los túbulos renales inhibe la reabsorción de fosfato y aumenta la reabsorción absoluta de Ca^{+2} y Mg^+ (Pérez Cano y Montoya, 2004).

2.3. EL FÓSFORO COMO NUTRIENTE

El P desempeña un papel destacado en un gran número de procesos biológicos y es un componente excepcionalmente importante de los cristales de hidroxapatita, el principal componente mineral del hueso. Además, el P está presente en los ácidos nucleicos, en la señalización de proteínas bioactivas, en las enzimas fosforiladas y en las membranas celulares (Krebs y Beavo, 1979; Hunter y Cooper, 1985; Cohen, 1989; Hubbard y Till, 2000). Una deficiencia prolongada de P origina serios problemas biológicos, pues afecta a la mineralización ósea causando osteomalacia o raquitismo, provoca anomalías en eritrocitos, leucocitos y trastorna también la agregación plaquetaria; cuando la integridad de la membrana celular se ve perjudicada puede dar lugar a rhabdomiólisis; y a alteraciones en la función cardíaca (Knochel, 1977; Knochel y col., 1978; Kumar, 1997; Kumar, 2000; Schiavi y Kumar, 2004). Por lo tanto, el mantenimiento apropiado de la homeostasis del P es crítico para el bienestar del organismo.

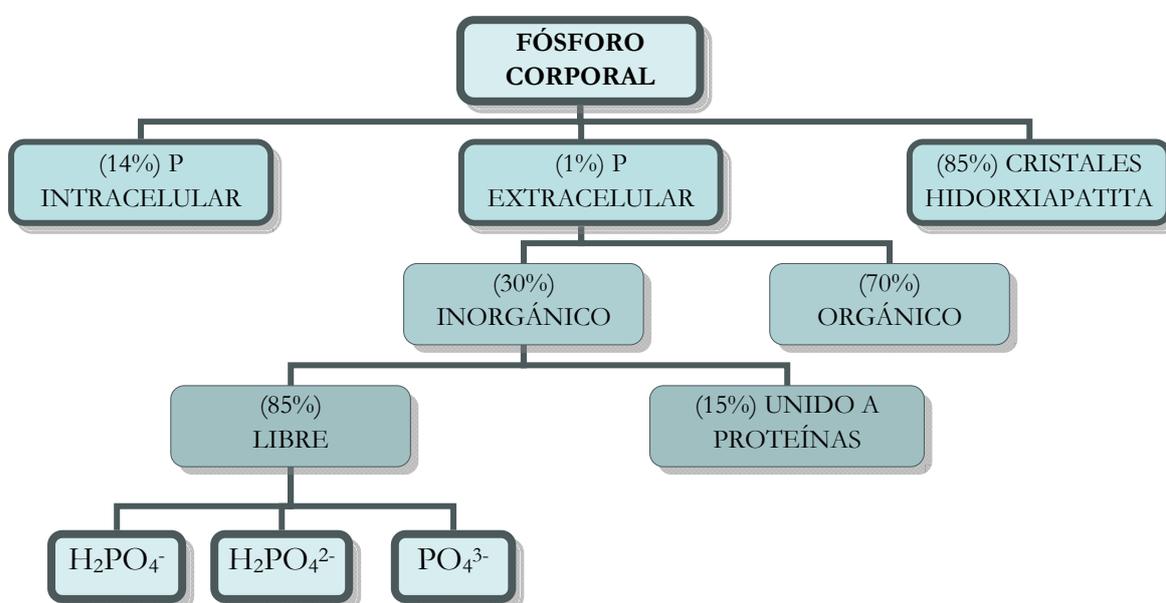
El contenido corporal total de P en el adulto (figura 16) es de 700 g aproximadamente, el 85% se halla en el hueso en forma de cristales de hidroxapatita [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$], el 14% es intracelular y sólo el 1% es extracelular, del cual, el 70% es orgánico y contenido en los fosfolípidos, y el 30% es inorgánico, de éste, el 15% está unido a proteínas, siendo por tanto la mayoría ultrafiltrable y el 85% restante se encuentra complejoado con Na^+ , Ca^{2+} o Mg^{2+} o como P inorgánico (Pi) que representa el 0,15% del P total (el 15% del P extracelular), circula de forma libre y es la fracción medible (Moe, 2008). La diferencia de concentración entre el fosfato intracelular y extracelular no es tan acusada como en el caso del Ca, por ello no es necesario un mecanismo de regulación tan fino como el de éste último.

Por tanto, el P está presente prácticamente en cada fluido corporal. En el plasma humano, se encuentra en forma de fosfato o Pi, fosfolípidos, y éster fosfórico. La concentración total de P en suero oscila entre 89 y 149 mg/L (2,87-4,81 mM), el P inorgánico (fosfato, Pi) entre 25,6 y 41,6 mg/L (0,83-1,34 mM) éste experimenta variaciones relacionadas con la ingesta y la excreción renal, además muestra un ritmo circadiano, observándose unos valores mínimos por la mañana y unos valores máximos al final de la tarde (Mataix, 2008) y cambia también con la edad (Berndt y Kumar, 2007); la concentración de P como éster fosfórico es de 25-45 mg/dL (0,81-1,45 mM), y el

contenido de P en los fosfolípidos es de 69-97 mg/L (2,23-3,13 mm) (Diem y Lentner, 1970). Las ratas tienen un valor normal de Pi algo superior a los humanos, debido a las diferencias en el metabolismo basal, que es superior en los roedores (Tenenhouse, 2005).

En mamíferos, el hueso contiene una cantidad sustancial de P (aproximadamente 10 g/100 g tejido seco libre de grasa); en comparación con el músculo que presenta 0,2 g/100 g tejido libre de grasa, y el cerebro 0,33 g/100 g de tejido fresco (Diem y Lentner, 1970).

Figura nº 16. Distribución y naturaleza química del P en el organismo (modificado de Mataix, 2008).



2.3.1. FUENTES ALIMENTARIAS DE FÓSFORO

Las principales fuentes del P son los grupos de alimentos proteínicos: el huevo, la carne (ternera, cerdo, pollo, pavo, caza) y la leche, entre los derivados lácteos cabe destacar el queso, son particularmente ricos en este nutriente el queso cheddar (5,1 mg/g) y el queso suizo (6,1 mg/g); en otros tipos de quesos más suaves existen cantidades menores, pero también significativas.

Una alimentación que cubra los requerimientos de Ca y proteína también suministra una cantidad suficiente de P (Calvo y Park, 1996).

Aunque los panes integrales y los cereales contienen más P que aquellos elaborados con harina refinada, corresponden a una forma de almacenamiento del P llamada fitina, que los humanos no absorben. Las frutas y las verduras contienen únicamente cantidades pequeñas de P (Yu, 2007; Plotnikoff, 2007). Este hecho debe ser tenido en cuenta, especialmente en grupos con dietas presumiblemente saludables (ricas en cereales, legumbres, frutas y verduras), en los cuales no es relevante la medida de la ingesta total de P (Calvo y Park, 1996).

Tabla nº 7. Contenido en P de algunos alimentos (modificado de Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, 2004).

ALIMENTO	RACIÓN	FÓSFORO (mg)
Yogur desnatado	240 g	383
Lentejas	½ taza, cocinadas	356
Salmón	90 g, cocinado	252
Leche desnatada	240 g	247
Ternera	90 g, cocinada	173
Pavo	90 g, cocinada	155
Almendras	30 g	139
Queso mozzarella	30 g	131
Huevo	1, cocinado	104
Pan integral	1 rebanada	64
Bebida carbonatada de cola	360 g	44

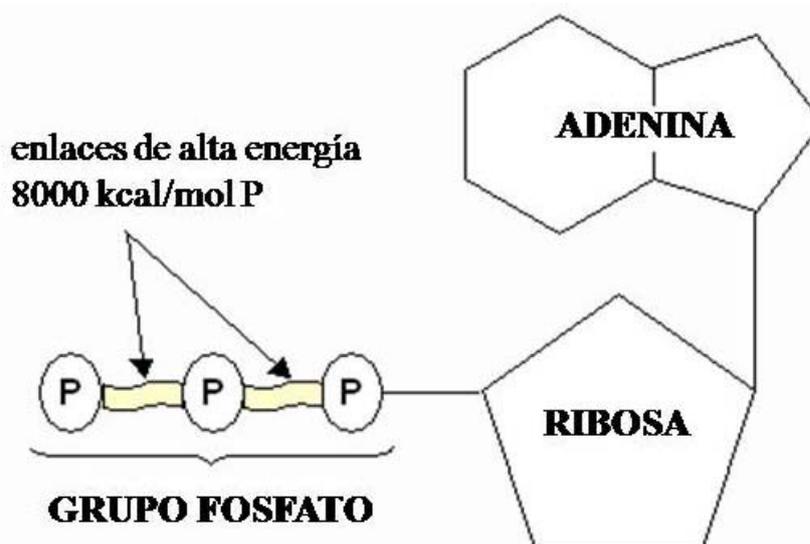
Hay que añadir que dentro de los nuevos productos que el ser humano consume, se encuentran muchas bebidas de cola que son acidificadas hasta un pH de 2,4 mediante la adición de ácido fosfórico, así el P alcanza valores de hasta 300 mg/L y la carga ácida total llega a ser de 20 mmosmo/L. Las recomendaciones de P en la infancia y en la adolescencia

son de 800-1200 mg/día, pero debido al gran consumo de alimentos ricos en P, se ha comprobado que la ingesta llega a ser de 1000-1600 mg/día (Infante y col., 2001).

2.3.2. FUNCIONES DEL FÓSFORO

Además de ser uno de los componentes fundamentales en la formación y estructura de los huesos (Hansen y col., 1976), el P juega un papel crítico en la biología celular (Berndt y Kumar, 2007) como elemento estructural e interviniendo en procesos que requieren de este mineral de una u otra forma, incluyendo la síntesis y metabolismo de ácidos nucleicos (ADN y ARN) (Kornberg, 1979); el metabolismo energético (Lehninger y Wadkins, 1962; Lardy y Ferguson, 1969) ya que es un elemento constituyente de la molécula de adenosintrifosfato (ATP): principal fuente de energía en distintos procesos metabólicos (transporte activo, reacciones de biosíntesis, etc.) así como para la contracción muscular (Bessman y Carpenter, 1985; Jencks, 1997).

Figura n° 17. Esquema de la molécula de ATP.



El ión fosfato es esencial para el metabolismo de los carbohidratos, proteínas y lípidos (Fruman y col., 1998) donde funciona como cofactor en múltiples sistemas enzimáticos; participa también en la señalización celular (Krebs y Beavo, 1979) formando parte de segundos mensajeros hormonales como AMPc, GMPc, inositol trifosfato o 2,3-difosfoglicerato; es fundamental para la integridad de las membranas (Rothfield y Finkelstein,

1968; Op den Kamp, 1979) como componente básico de los fosfolípidos; un número elevado de enzimas y hormonas dependen de la fosforilación para su activación (Stock y col., 2000). Actúa como regulador de la liberación de oxígeno por la hemoglobina; de fosfoproteínas como calmodulina (proteína intracelular ligadora de calcio), estatmina (participa en la proliferación y diferenciación celular) y glutaminasa (interviene en la eliminación de NH_3 y en la regulación ácido-básica) (Mataix, 2008). En forma de fosfato es especialmente importante por su efecto estabilizador y amortiguador sobre los cambios de pH ya que las soluciones acuosas a pH fisiológico (alrededor de 7,4) contienen aproximadamente cuatro quintos del fosfato inorgánico como ión hidrogenofosfato (HPO_4^{2-}) y casi un quinto como ión dihidrogenofosfato (H_2PO_4^-). Esto significa que la cantidad significativa de fosfato inorgánico en las células, fluido extracelular y sangre actúa como un buffer efectivo (Kohlmeier, 2003).

2.3.3. UTILIZACIÓN NUTRITIVA DE FÓSFORO

2.3.3.1. REQUERIMIENTOS

Los requerimientos de P son de unos 700-800 mg/día en adultos, esta recomendación está basada en el mantenimiento de un nivel normal de fosfato con objeto de cubrir las necesidades celulares y la formación del hueso, pero se elevan a unos 1200-1250 mg/día en la adolescencia ya que el P es necesario en los periodos de rápido crecimiento óseo. Sin embargo, en la práctica, las alimentaciones occidentales suelen contener elevadas cantidades de huevos, carne, pescado y lácteos, con importante aporte de P y proteínas, por ello es muy poco probable que se produzcan deficiencias en individuos sanos; bien al contrario, en las sociedades ricas, donde la disponibilidad de estos alimentos es elevada, el consumo de P supera las ingestas dietéticas recomendadas (Farré y Frasquet, 1999).

La ingesta de P debe ser paralela a la de Ca, puesto que una relación Ca/P de 1:1 a 2:1 es la adecuada y por debajo de 1 se considera un riesgo de pérdida de masa ósea (Porrata y cols., 1996). Esta proporción sólo se da en la leche y derivados.

Los requerimientos de P para la rata son 3000 mg/Kg de dieta, tanto en fase adulta como de crecimiento (Reeves y col., 1993).

Tabla n° 8. Ingestas diarias recomendadas (RDA) de P (modificado de Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, 2004).

ETAPA DE LA VIDA	EDAD	♂ (mg/día)	♀ (mg/día)
Lactantes	0-6 meses	100	100
	7-12 meses	275	275
Niños	1-3 años	460	460
	4-8 años	500	500
	9-13 años	1250	1250
Adolescentes	14-18 años	1250	1250
Adultos	19-30 años	700	700
	31-50 años	700	700
	51-70 años	700	700
	Más de 70 años	700	700
Embarazo	Menos de 18 años	-	1250
	19-30 años	-	700
	31-50 años	-	700
Lactancia	Menos de 18 años	-	1250
	19-30 años	-	700
	Más de 30 años	-	700

2.3.3.2. ABSORCIÓN INTESTINAL DE FÓSFORO

El P es introducido en el organismo con los alimentos en distintas formas (sales de fosfato, nucleótidos y fosfolípidos). Las uniones de P orgánicas son atacadas por las enzimas digestivas (fosfatasa alcalina) como paso previo a la absorción del ión fosfato. Aproximadamente un 70% es absorbido principalmente en duodeno y yeyuno.

La absorción intestinal, representa la suma de un componente pasivo, no saturable, dependiente de la concentración de P (independiente de vitamina D) y un componente activo, saturable, mediado por proteínas transportadoras dependientes de Na⁺ y estimulado por la

1,25(OH)₂D₃ (Laurence, 1997). El transporte debido al transportador tipo I es constante, mientras que la expresión y el transporte el cotransportador Na⁺/Pi tipo IIb depende de la ingesta de fosfato y la cantidad de 1,25(OH)₂D₃. También existe la posibilidad de que un transportador adicional Na⁺-independiente opere en la membrana del borde en cepillo. Los cotransportadores de Na⁺ tipo III parecen estar implicados en la creación de un flujo de Pi desde la membrana basolateral para cubrir las propias necesidades del enterocito (Tenenhouse y col., 1998).

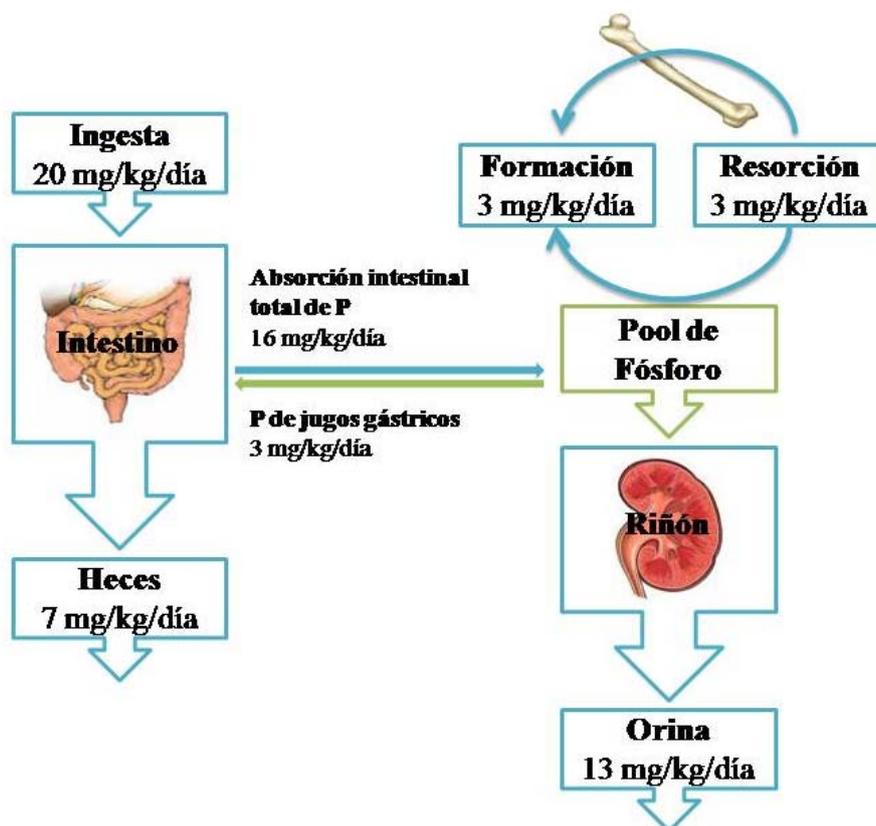
La difusión pasiva predomina cuando las ingestas de P son altas, mientras que la hormona paratiroidea (PTH) y dietas bajas en P estimulan la absorción transcelular ejerciendo sus efectos sobre la vitamina D. La absorción intestinal de los fosfatos está menos finamente regulada que la absorción del Ca y presenta dos diferencias importantes con respecto a este elemento: a) la absorción neta del P es tres veces mayor; b) el proceso de absorción pasiva, no saturable, tiene mayor importancia en el caso del P; se ha demostrado que en el intervalo normal de ingestas dietéticas de P, la absorción es función lineal de su concentración en el lumen (Farré y Frasquet, 1999). En condiciones normales, la absorción pasiva puede satisfacer las necesidades de P y la regulación hormonal de la absorción intestinal juega solo un rol menor en la homeostasis del P.

En general, la biodisponibilidad del P es elevada tanto si procede de fuentes orgánicas como inorgánicas, con algunas excepciones tales como los pirofosfatos y los polifosfatos (fosfatos condensados unidos linealmente) utilizados en la industria alimentaria para ablandar agua, en quesos para fundir, salchichas cocidas, surimi o palitos de pescado. La presencia de oxalato también puede reducir la absorción de este mineral y el P en forma fítica (presente en semillas y cereales) puesto que no es inmediatamente disponible debido a que el intestino humano es deficiente en la enzima fitasa. Una relación Ca/P mayor a 3 puede dar lugar a un descenso en la absorción de fosfatos mediante la formación de compuestos insolubles en el intestino (Mataix, 2008). Se ha señalado también una disminución de la eficiencia en la absorción de fosfatos como consecuencia del uso de antiácidos como el hidróxido de aluminio por un periodo de tiempo prolongado, debido a que este compuesto fija el P haciendo que no sea disponible.

2.3.3.3. EXCRECIÓN, RETENCIÓN Y BALANCE DE FÓSFORO

El intestino y el riñón juegan los papeles más destacados en la absorción del P de la dieta y en la excreción del mismo en la orina, de ahí que el balance de P esté determinado principalmente por los procesos que regulan la eficiencia de su absorción intestinal y su reabsorción renal. La figura 18 muestra los aspectos cuantitativos de la homeostasis del P en humanos (Berndt y Kumar, 2007). En los estados de equilibrio de P, la cantidad absorbida en el intestino (13 mg/ kg/día, ~1-1,5 g/24 h) es equivalente a la cantidad excretada en la orina. Las hormonas y factores implicados en la regulación de la homeostasis del P actúan modificando la eficacia de absorción de P_i en el intestino o la reabsorción de P_i en el túbulo proximal del riñón.

Figura n° 18. Balance de P (modificado de Berndt y Kumar, 2007).



Tras ser absorbido, el P pasa al torrente sanguíneo y al líquido extracelular. La mayoría del fosfato circulante está contenido en los fosfolípidos de las lipoproteínas y las membranas de las células sanguíneas. Una menor cantidad circula como ión inorgánico (P_i). La concentración plasmática de fosfato inorgánico es de alrededor de 1 mmol/L si la ingesta es adecuada.

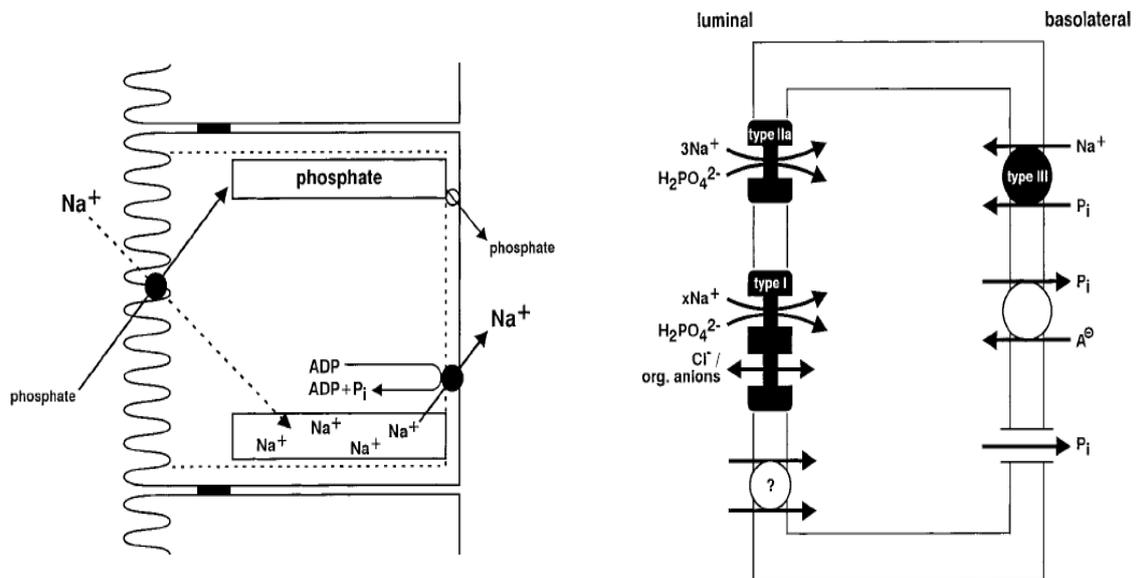
El fosfato entra en las células a través del cotransportador de Na^+ , principalmente por medio de los ubicuos cotransportadores de Na^+ tipo III. Una pequeña diferencia se observa a nivel óseo, donde el cotransportador de Na^+/Pi tipo III bombea fosfato a la matriz extracelular durante la mineralización ósea en las primeras etapas de la vida. El cotransportador de Na^+/Pi tipo III también desempeña un papel importante en la calcificación vascular y de tejidos blandos, que se produce en respuesta a la hiperfosfatemia (Giachelli y col., 2001).

Los osteoclastos disuelven los minerales del hueso creando un microambiente ácido. La ATPasa vacuolar bombea protones generados por la anhidrasa carbónica II a un espacio restringido entre la superficie ósea y el borde sellado por las fibras de actina. Una serie de enzimas hidrolíticas, entre las cuales se encuentran la fosfatasa ácida tartrato-resistente, proteasas y metaloproteasas, digieren el colágeno y otros elementos de la matriz ósea. Como resultado, los elementos minerales del hueso, incluyendo el fosfato, se liberan y pueden difundir por los capilares sanguíneos cercanos (Palmer y col., 1999).

Por las heces se eliminan alrededor de un 30% de los fosfatos ingeridos, pero el riñón es la vía de excreción más importante (Mataix, 2008).

Reabsorción tubular de fosfato

Figura nº 19. Reabsorción tubular proximal de Pi (Murer y col., 2000).



Izquierda: transporte activo secundario. Derecho: cotransportadores Na^+/Pi en la célula tubular proximal.

El principal factor que determina el nivel de P sérico es la excreción renal de fosfato inorgánico (Pi). Ésta resulta de la filtración glomerular del mismo y de su reabsorción tubular proximal. Para un sujeto adulto cuya filtración glomerular es de 180 L/día, se filtran 6500 mg de Pi por día; de manera que si se excretan 775 mg/día, el 88% del Pi es reabsorbido y solo el 12% es excretado. El P filtrado es reabsorbido mayoritariamente en el túbulo proximal, siendo aproximadamente el 60% de la carga filtrada reclamada en su porción contorneada y 15 a 20% en su porción recta. Solo una pequeña y variable porción de la carga filtrada (< 10%) es reabsorbida en las porciones más distales de la nefrona. Por todo esto, hablar de la regulación del nivel de P sérico es hablar de la regulación de la reabsorción tubular proximal de Pi (Negri, 2004).

El transporte transepitelial de Pi es esencialmente unidireccional e involucra la entrada por la membrana apical con ribete en cepillo, su pasaje a través de la célula, y su salida por la membrana basolateral. La captación del Pi a nivel de la membrana apical es el paso limitante de todo el proceso de reabsorción y es el sitio más importante de regulación (Berndt y Knox, 1992). La entrada de fosfato al túbulo proximal es mediada por transportadores de fosfato dependientes de Na^+ localizados en la membrana apical que a su vez dependen del gradiente de Na^+ creado por la Na/K ATPasa que se encuentra en la membrana basolateral para movilizar el proceso de transporte.

Se han identificado tres tipos no relacionados de cotransportadores Na^+/Pi en mamíferos: el tipo I (NPT1) y el tipo II (NPT2) y tipo III (Murer y col., 2000a; Murer y col., 2000b; Tenenhouse y Murer, 2003; Murer y col., 2004). El tipo I está localizado en el ribete en cepillo de las células tubulares proximales. La función del cotransportador Na^+/Pi tipo I no está claramente establecida, y se sugiere que mediaría el transporte de Cl y de aniones orgánicos. El cotransportador Na^+/Pi tipo II se expresa en la membrana apical de los epitelios absortivos/resortivos, existen tres subtipos: IIa, IIb y IIc. La reabsorción renal fisiológica de P es llevada a cabo por los subtipos IIa y IIc (Wagner, 2007). El tipo IIb se expresa en el intestino delgado, como ya se ha comentado. Los cotransportadores Na^+/Pi tipo II median el cotransporte electrogénico de Na^+ y fosfato con una estequiometría de tres iones de Na^+ por uno de fosfato. El tipo IIa parece ser el determinante más importante

de cotransporte Na^+/Pi proximal y de la tasa global de reabsorción tubular de P (Murer y col., 2001). La disrupción del gen NPT2 que codifica este cotransportador, resulta en fosfaturia, en la pérdida de aproximadamente el 80% de la tasa de cotransporte Na^+/Pi , y en una falta de respuesta de la reabsorción tubular de fosfato a dos de los más importantes mecanismos regulatorios: la inhibición inducida por la parathormona (PTH) y a la estimulación de la reabsorción provocada por la privación dietética de fosfato (Negri, 2004).

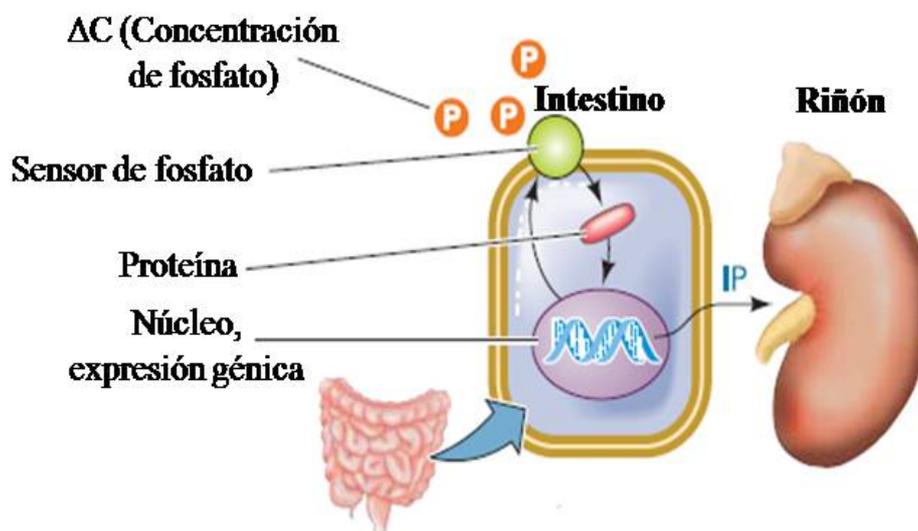
Existe una diferencia fundamental en la regulación de los cotransportadores Na^+/Pi tipo IIa y IIb. En el riñón, donde está localizado el cotransportador tipo IIa, existen mecanismos regulatorios rápidos (mediados por PTH, otras hormonas peptídicas y por la ingesta dietaria de P) y lentos (regulados por la demanda de fosfato por el crecimiento y desarrollo). En contraste, en el intestino, donde está localizado el cotransportador tipo IIb, existen solo mecanismos reguladores lentos (relacionados con el aporte dietario de P o con la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$).

La regulación de la homeostasis sistémica de P se produce primariamente controlando el número de cotransportadores Na^+/Pi -IIa y Na^+/Pi -IIc presentes en la superficie del ribete en cepillo del túbulo proximal (Negri, 2007).

2.3.4. REGULACIÓN HOMEOSTÁTICA DEL FÓSFORO

Las células detectan los cambios en la concentración de Pi (ΔC) extracelular (o en algunos casos intracelular) vía “sensores de fosfato” específicos (Suzuki y col., 2004; Mouillon y Persson, 2006; Lamarche y col., 2008). Los cuales, alteran el metabolismo intracelular de las proteínas, generalmente cambiando el estado de fosforilación de las mismas, y los acontecimientos de transcripción nucleares subsecuentes (figura 20). Las proteínas sintetizadas en respuesta a los cambios de la transcripción génica aumentan la eficacia con la cual el P es conservado por la célula y pueden ser los componentes del sensor de Pi celular (Berndt y Kumar, 2009).

Figura nº 20. Mecanismos por los cuales las células y organismos responden a alteraciones en las concentraciones de P extracelular (modificado de Berndt y Kumar, 2009).

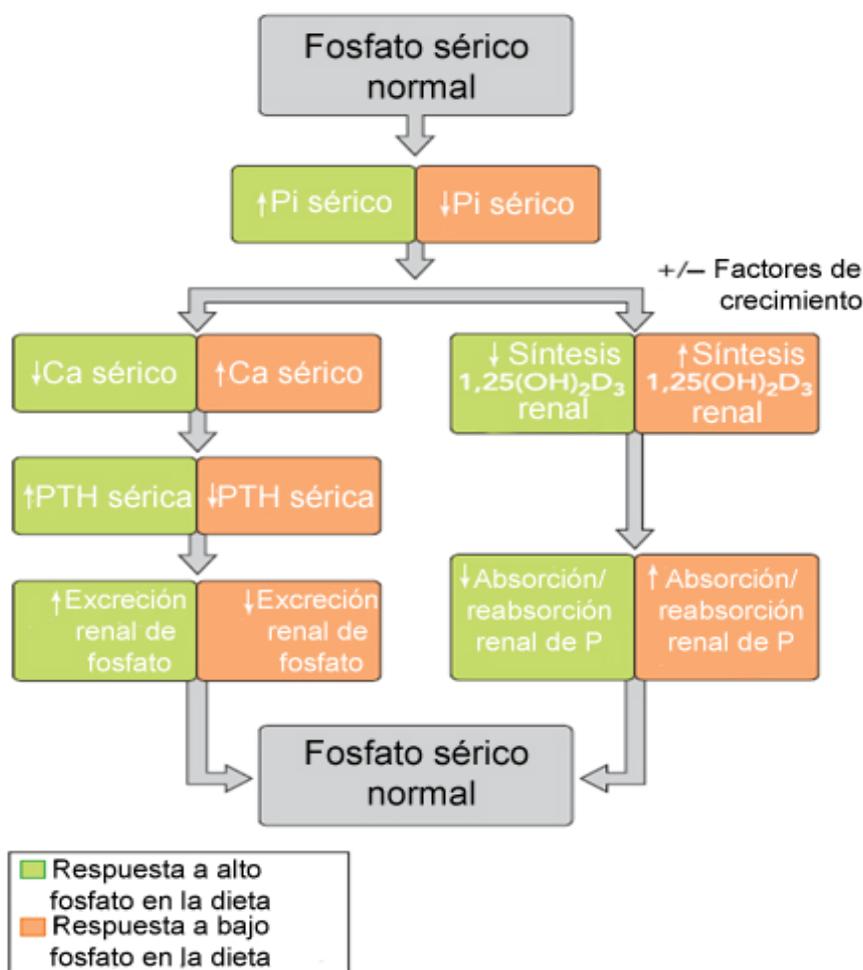


Históricamente la homeostasis del fosfato ha sido vista principalmente desde la perspectiva del eje PTH/ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en estrecha relación con la homeostasis del Ca (figura 21):

1. La PTH favorece la liberación de P desde el hueso e inhibe la reabsorción renal de fosfato al producir la rápida internalización del cotransportador $\text{Na}^+/\text{Pi-IIa}$ y promover su degradación a nivel lisosomal. A su vez, las elevaciones crónicas de PTH modulan el ARNm y la proteína del $\text{Na}^+/\text{Pi-IIa}$. La PTH también, indirectamente, incrementa la absorción intestinal de Pi al estimular la síntesis de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. El P tiene un efecto de estimulación directo sobre la secreción de PTH (Negri, 2007).
2. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ o calcitriol estimula la resorción ósea, incrementa la absorción intestinal y la reabsorción renal de Pi. El Pi extracelular regula la $1-\alpha$ -hidroxilasa renal que controla la síntesis de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Negri, 2007). Aunque hay estudios que demuestran la existencia de un aumento del transporte de Pi, independiente de esta enzima durante la privación de Pi que ocurre en ausencia su receptor (De Luca, 2004; Segawa y col., 2004; Williams y De Luca 2007).

Además de la PTH y la vitamina D, existen otras hormonas que influyen en el transporte de P, por ejemplo: insulina, hormona tiroidea, calcitonina, hormona del crecimiento e IGF-I, glucocorticoides, etc. Entre los factores no hormonales que alteran la velocidad de reabsorción, podemos destacar la ingesta dietética, el ayuno y el estado ácido-base. Varios de dichos factores afectan la expresión y distribución celular del cotransportador Na^+/Pi en el epitelio del túbulo renal (Murer y col., 2000).

Figura nº 21. Adaptación a los cambios de P sérico (modificado de Berndt y Kumar, 2007).



Fosfatoninas

Recientemente ha surgido una nueva clase de reguladores del control sistémico de la homeostasis del P llamados fosfatoninas, que establecen un nexo directo de comunicación entre el metabolismo óseo y el manejo renal del fosfato. El conocimiento de esta nueva clase de reguladores del balance de P surgió de la observación de un grupo de

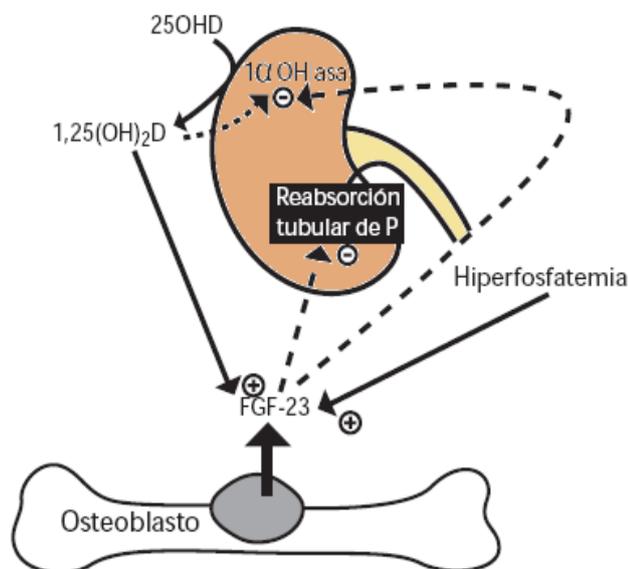
condiciones patológicas en las cuales los niveles de P están alterados sin una modificación significativa en las concentraciones de PTH, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y Ca, lo cual es incomprensible según el esquema clásico de regulación del P. Estas enfermedades que se caracterizan por hipofosfatemia, hiperfosfaturia y mineralización ósea defectuosa (raquitismo/osteomalacia), incluyen a la hipofosfatemia ligada al X (XLH), el raquitismo hipofosfatémico autosómico dominante (del inglés Autosomal Dominant Hypophosphatemic Rickets o ADHR), su forma recesiva (ARHR) y la osteomalacia inducida por tumores (TIO) (Negri, 2007). Así se ha acuñado el término “fosfatoninas” para describir a factores con actividad reguladora del P. Se han identificado diferentes moléculas como el factor de crecimiento-23 (FGF-23) el FGF-7, el MEPE y el sFRP-4. Su potencia como agentes fosfáticos se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* (Negri, 2007).

Factor de crecimiento fibroblástico-23 (FGF-23): es una proteína miembro de una subfamilia de FGFs que son capaces de interactuar con receptores de FGF (FGFR) en presencia de la proteína Klotho (proteína transmembrana necesaria para que la activación del receptor del FGF-23 se haga efectiva; por tanto, parece ser indispensable para que el FGF 23 actúe y consecuentemente imparte especificidad a sus funciones) y que tienen acciones sistémicas/hormonales más que locales/paracrinas más típicas de este tipo de factores de crecimiento (Quarles, 2008). Dentro de los distintos tipos de receptores para FGF-23, los estudios *in vitro* indican que el FGF-23 puede activar FGFR1c, 3c y 4c (Kuro-o y col., 1997; Urakawa y col., 2006). Hasta ahora todavía no está resuelto cuál es el receptor de FGF-23 fisiológicamente relevante. Existe la posibilidad de que el FGF-23 tenga un nuevo tipo de receptor, esta hipótesis surge al observar que ni la activación ni la inactivación de los FGFRs conocidos resultan en hipo o hiperfosfatemia.

El FGF-23 es producido principalmente por los osteoblastos/osteocitos en el hueso (Yoshiko y col., 2007) y el riñón es su principal blanco fisiológico. Actúa como un factor fosfático y ejerce su efecto reduciendo la reabsorción renal de P al suprimir la expresión de los cotransportadores $\text{Na}^+/\text{Pi-IIa}$ y IIc de la membrana del borde en cepillo del túbulo proximal. Además, el FGF-23 suprime la expresión de la $1-\alpha$ -hidroxilasa, reduciendo de esta manera la producción renal de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y también aumenta la expresión de la 24-hidroxilasa renal que transforma a la vitamina D en un metabolito de menor actividad biológica (figura 22). De esta manera, el FGF-23 no solo decrece el P

plasmático por supresión de su reabsorción renal sino también disminuyendo su absorción intestinal al bajar los niveles de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Quarles, 2008). Un incremento en los niveles de FGF-23 causa hipofosfatemia y disminución de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

Figura n° 22. Acciones del FGF-23 (Parisi y Oliveri, 2008).



Jonsson y col. (2003) encontraron que el FGF-23 está presente en la circulación de individuos sanos, aunque a niveles bajos, consistentes con el rol fisiológico del FGF-23 en la regulación del P. Sin embargo, el FGF-23 estaba muy elevado en sujetos que padecían tumores inductores de osteomalacia (TIO) y los valores se normalizaron tras la resección quirúrgica del tumor. También encontraron que los sujetos con XLH, el trastorno hipofosfatémico hereditario más frecuente ligado al cromosoma X, presentaban elevaciones del FGF-23 circulante.

Proteína secretada similar a *frizzle-4* (sFRP-4), factor de crecimiento fibroblástico-7 (FGF-7) y la fosfoglicoproteína de la matriz extracelular (MEPE): al igual que FGF-23, sFRP-4 disminuye la reabsorción renal de PO_4 mediante la reducción de los cotransportadores NPT de los túbulos renales proximales e inhibe la formación de calcitriol (Berndt y col., 2003).

FGF-7 inhibe el NPT localizado en las células renales. Los anticuerpos anti-FGF-7 atenúan la inhibición del transporte de fósforo inducida por FGF-7 (Carpenter y col., 2005). Se ha demostrado recientemente que FGF-7 es fosfatúrico (Shaikh y col., 2007).

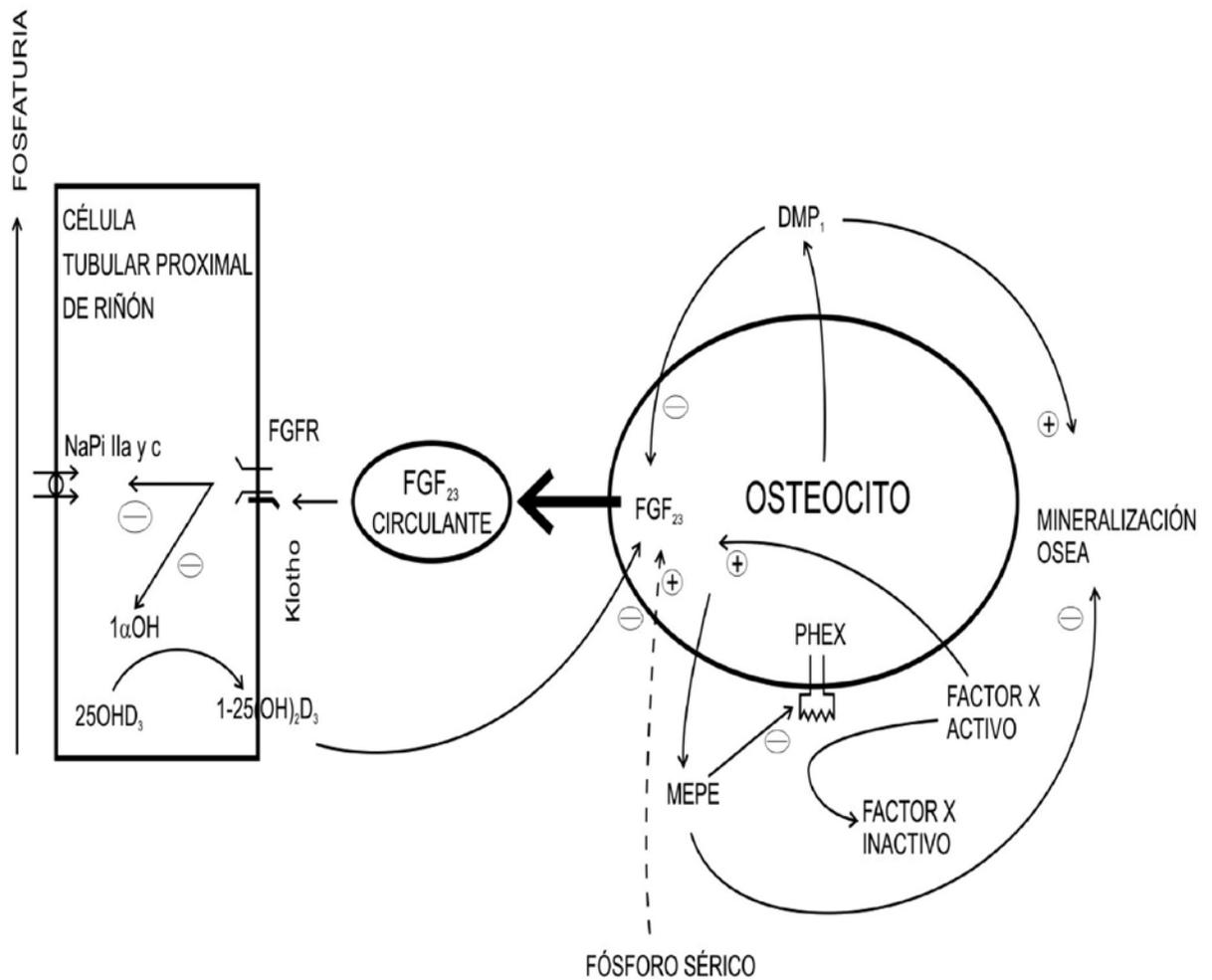
MEPE es una proteína de 525 aminoácidos que se expresa en el hueso. MEPE ha demostrado aumentar la excreción fraccional de fosfato, inhibir la mineralización ósea e inducir hipofosfatemia (Rowe y col., 2004). Su división libera un péptido rico en ácidos (ASARM) situado en la parte carboxiterminal de MEPE. ASARM es un péptido que causa fosfaturia e inhibe la mineralización ósea en ratones, sugiriendo que MEPE también juega un papel en la homeostasis del P. El aumento de ASARM, MEPE y de FGF-23 se presenta en los pacientes con hipofosfatemia ligada al cromosoma X, trastorno debido a mutaciones en el gen *PHEX* (del inglés Phosphate-regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome) (The Hyp Consortium, 1995). Liu y col., (2007) observaron que los cultivos de células del estroma óseo suplementadas con el péptido ASARM producían una significativa elevación de FGF-23 y una inhibición de la mineralización. Estos hallazgos sugieren que el MEPE inhibe la mineralización ósea y la actividad del PHEX que lleva a un incremento en la producción de FGF-23. Es importante destacar que MEPE no inhibe la formación de calcitriol (Shaik y col., 2008).

La proteína de la matriz de la dentina 1 (DMP1, dentin matrix protein 1), es un miembro de la familia de glicoproteínas ácidas extracelulares secretadas llamadas SIBLING (Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoprotein) que también incluye a la sialoproteína ósea (BSP, bone sialoprotein), dentina sialofosfoproteína (DSPP, dentin sialophosphoprotein), osteopontina (OPN), y la fosfoglicoproteína de matriz extracelular (MEPE, matrix extracellular phosphoglycoprotein). Esta proteína está altamente expresada en los tejidos mineralizados, especialmente en osteoblastos y osteocitos. *In vitro*, los péptidos de la DMP1 pueden promover la mineralización dependiendo del grado de fosforilación, el tamaño del péptido, y la concentración. La delección de DMP1 en ratones resulta en un fenotipo óseo hipomineralizado.

Recientemente, se han publicado dos estudios independientes sobre el raquitismo hipofosfatémico autosómico recesivo (ARHR), en el cual se detectaron mutaciones en el gen que codifica la DMP1 (Lorenz-Depiereux, 2006; Feng y col., 2006) dando lugar a hipofosfatemia, aumento de la excreción de PO_4 en la orina e incremento de FGF-23. MEPE y DMP1 están predominantemente expresadas en los osteocitos donde respectivamente inhiben o inducen mineralización ósea (figura 23). A su vez estas dos proteínas regulan la expresión del FGF-23: MEPE inhibiendo la actividad de la ectoenzima PHEX que actuaría sobre algún factor desconocido (factor X) que disminuye la expresión

del FGF-23 y DMP1 inhibiendo directamente la expresión del FGF-23. Así cuando MEPE inhibe la mineralización, aumenta la producción de FGF-23 para producir fosfaturia, ya que en ese caso el P no se necesita para la mineralización. Por el otro lado cuando DMP1 aumenta, se estimula la mineralización y se reduce la producción de FGF-23, ya que se necesita conservar el P para favorecer la mineralización (Negri, 2007).

Figura n° 23. Eje hueso-riñón (Negri, 2007).



Los factores que influyen en la homeostasis del P quedan resumidos en la siguiente tabla:

Tabla nº 9. Factores que influyen en la absorción y reabsorción de P en el intestino y en el riñón (modificado de Berndt y Kumar, 2009).

INTESTINO	RIÑÓN
<p><i>Factores que aumentan la absorción de Pi</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Ingesta dietética de P reducida 2. Niveles séricos de 1,25(OH)₂D₃ elevados <p><i>Factores que reducen la absorción de Pi</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 3. Niveles séricos de 1,25(OH)₂D₃ reducidos 4. Elevada concentración de Ca en el lumen intestinal 5. MEPE 	<p><i>Factores que aumentan la reabsorción de Pi</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Depleción de fosfato 2. Extirpación de la glándula paratiroidea 3. 1,25(OH)₂D₃ 4. Contracción del volumen 5. Hipocalcemia 6. Hipocapnia <p><i>Factores que disminuyen la reabsorción de Pi</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 7. Sobrecarga de Pi 8. Hormona paratiroidea/AMPC 9. Expansión del volumen 10. Hipercalcemia 11. Inhibidores de la anhidrasa carbónica 12. Dopamina 13. Glucosa y Alanina 14. Desequilibrios ácido-base 15. Incrementos de bicarbonato 16. Hiperapnia 17. Inhibidores metabólicos 18. Arsénico 19. FGF-23 20. sFRP-4 21. MEPE 22. FGF-7

2.4. EL HIERRO COMO NUTRIENTE

El Fe es un elemento muy abundante en la naturaleza y esencial para la vida de prácticamente todas las formas biológicas. Contradictoriamente, las mismas propiedades que hacen a este metal de transición imprescindible para procesos biológicos vitales, como el transporte de O₂ y de electrones, lo pueden hacer dañino, pues la sobrecarga de Fe conduce a la toxicidad y la muerte celular por la formación de radicales libres y la peroxidación lipídica, por ello, la homeostasis del Fe tiene que estar perfectamente regulada (Andrews, 1999; Muñoz y col., 2005; Fleming y Bacon, 2005). Dado que el organismo no dispone de ningún medio eficaz para excretar el Fe, la regulación de la absorción de Fe dietético en el duodeno juega un papel crítico en la homeostasis de este micronutriente (Siah y col., 2006).

En un hombre adulto la cantidad aproximada de Fe es de 4 g, distribuidos en: la hemoglobina (~2,5 g), las reservas principalmente hepáticas (~1 g) y en la mioglobina y otras proteínas enzimáticas que son dependientes del metal (~0,3 g). Diariamente, un adulto sano pierde ~0,025% de su Fe total (equivalente a 1 mg), el cual debe ser reemplazado por la dieta (Conrad y Umbreit, 2002); estas pérdidas son producidas por la descamación de las células epidérmicas y epiteliales del tracto gastrointestinal y por el micro sangrado fisiológico intestinal, para el caso de las mujeres, los niños y adolescentes en crecimiento esta cifra aumenta debido al sangrado menstrual y a las necesidades del crecimiento (FAO/OMS, 2002).

2.4.1. FUENTES ALIMENTARIAS DE HIERRO

En los alimentos, el Fe puede encontrarse como Fe hémico o Fe no hémico (Dallman, 1990). El Fe de tipo hémico, es el que forma parte de la hemoglobina, mioglobina, citocromos y muchas otras hemoproteínas, que se encuentran principalmente en los alimentos de origen animal: en las carnes (rojas y blancas) y la sangre; también existe un contenido muy bajo de Fe hemo en las semillas de las plantas, asociado a los anillos tetrapirrólicos de la clorofila, el sirohemo y la fitocromobilina (Santana y col., 1998). El grupo hemo presente en dichas proteínas está formado por un anillo orgánico complejo, llamado protoporfirina, a la que se une un átomo de Fe divalente, que forma 6 uniones coordinadas; cuatro de ellas se forman con la protoporfirina y de las dos restantes, una lo

hace con el N de la fracción proteica y la otra queda libre como sitio de unión para una molécula de O₂ (Lehninger y col., 1995). El Fe de tipo no hémico corresponde a aquel que no se encuentra unido al grupo hemo; básicamente está formado por sales inorgánicas de este metal y está presente principalmente en los alimentos de origen vegetal, en la leche, los huevos, así como en la mayoría de los preparados farmacéuticos utilizados en la terapia contra la deficiencia de este mineral (Dallman, 1990; Goodman, 1996).

Las mejores fuentes de Fe son el hígado, la carne roja y magra (principalmente la carne de res), ostras, huevos (especialmente las yemas) y pescados (salmón o atún). La carne de cordero, la carne de cerdo y los mariscos presentan cantidades moderadas. El Fe procedente de hortalizas, frutas, granos y suplementos es más difícil de absorber. Estas fuentes abarcan: frutos secos (almendras, nueces, pistachos), frutas deshidratadas (ciruelas pasas, uvas pasas y albaricoques), legumbres (habas, semillas de soja, habichuelas), verduras (brócoli, espinaca, col rizada, coles, espárragos) y granos enteros (trigo, avena, arroz integral).

Tabla n° 10. Contenido en Fe de algunos alimentos (modificado de Sorace y Patzan, 2007).

ALIMENTOS QUE CONTIENEN HIERRO HEMÁTICO		
Alimento	Porción	Cantidad aproximada de Fe (mg)
Hígado (cerdo)	85g	16,0
Hígado (pollo)	85g	7,5
Ostras	85g	8,0
Mejillones	85g	5,7
Aguja	85g	3,2
Pavo	85g	2,0
ALIMENTOS QUE CONTIENEN HIERRO NO HEMÁTICO		
Alimento	Porción	Cantidad aproximada de Fe (mg)
Cereal enriquecido	1 porción	3,9-5,3
Semillas de soja	½ taza, cocida	4,7
Lentejas	½ taza, cocida	3,5
Tofu	85g	2,7
Espinacas	½ taza, cocida	2,0
Arroz integral	1 taza, cocido	1,0

La fortificación con Fe de los cereales, harinas y pastas ha aumentado de forma significativa la ingesta total de Fe en ciertos países. Los cereales enriquecidos suponen un aporte importante de este micronutriente para niños, así como para adolescentes y adultos (Whittaker y col., 2001). La leche y productos lácteos están prácticamente desprovistos de este mineral (Díaz-Castro, 2007). Esta intervención presenta beneficios no sólo desde un punto de vista nutricional, pues Oppenheimer en 2001, demostró que el fortalecimiento con Fe de la leche o cereales no aumenta la morbilidad relacionada con la infección en niños menores de 18 meses. Y en un análisis de cuatro estudios realizados en niños que recibieron alimentos fortificados con Fe, se observó que el régimen no causó efectos adversos visibles y protegió considerablemente contra el desarrollo de infecciones de vías respiratorias (Gera y Sachdev, 2002).

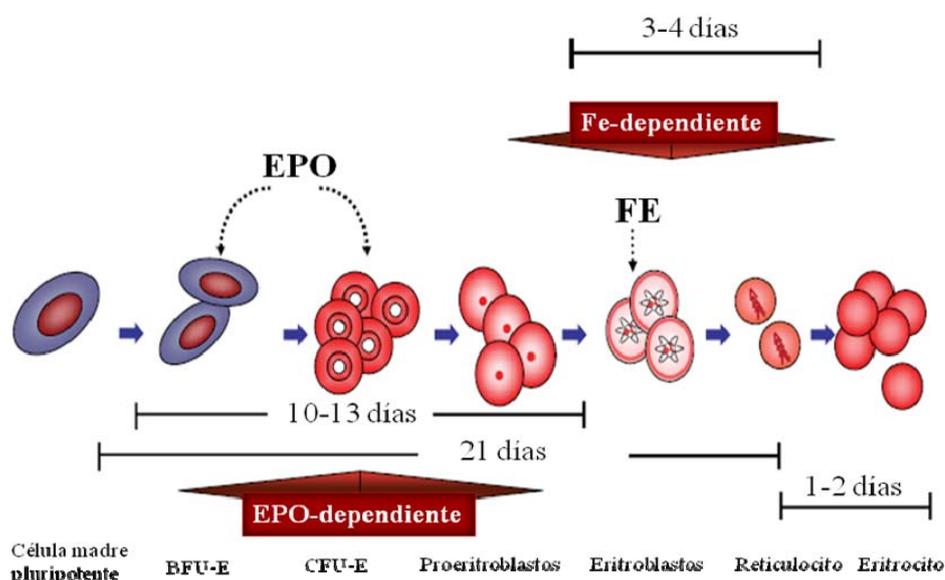
2.4.2. FUNCIONES DEL HIERRO

Transporte y almacenamiento de oxígeno: el Fe es un constituyente de la molécula de hemoglobina, que se encuentra en los hematíes y contiene más del 65% del Fe total del organismo. Esta proteína es un tetrámero formado por 4 cadenas de globina, cada una de ellas con un grupo hemo que contiene un átomo de Fe capaz de unirse al O₂ reversiblemente en los capilares pulmonares formando oxihemoglobina, la cual, discurre por el torrente sanguíneo para llegar a los tejidos, donde el O₂ es liberado para intervenir en los procesos oxidativos. Parte del CO₂ que se forma entonces es transportado por la misma hemoglobina que se libera de ella en los pulmones para iniciar nuevamente el ciclo (Martínez Monzó y García Segovia, 2006). La mioglobina, otra proteína con Fe en su estructura, se encuentra en el músculo y está formada por una molécula de globina y un grupo hemo. Ésta tiene como función el transporte y almacenamiento de O₂ para ser utilizado durante el proceso de contracción muscular. Desde el punto de vista cuantitativo, la mioglobina contiene aproximadamente el 10% del total del Fe del organismo (Dallman, 1990; Lehninger y col., 1995).

Eritropoyesis: la eritropoyetina (EPO) y el Fe son vitales para la eritropoyesis, pues están involucrados en diferentes etapas del proceso diferenciación y maduración de las células madre pluripotentes a eritrocitos (figura 24). La EPO es crucial a lo largo de aproximadamente 10-13 días cuando los progenitores eritroides BFU-E (burst forming units-erithroid) se transforman en unidades-eritroides formadoras de colonias (CFU-E) que

se diferencian a proeritroblastos, porque, en su ausencia, tiene lugar la apoptosis en las fases CFU-E y BFU-E (Papayannopoulou y col., 2005). Durante este largo período de la eritropoyesis, una pequeña cantidad de Fe es incorporada en la hemoglobina dentro de la célula. En cambio, la incorporación de Fe en la síntesis de hemoglobina es más evidente durante el segundo, posterior y más corto (3-4 días), estadio en el que los eritroblastos se desarrollan a reticulocitos. En este momento, la falta de Fe puede dañar la completa hemoglobinización de los hematíes, dando lugar a una verdadera y grave deficiencia funcional de Fe (Besarab y col., 2009).

Figura nº 24. Importancia de la EPO y el Fe en la eritropoyesis (modificado de Besarab y col., 2009).



Sensibilización al oxígeno: el factor inducible por hipoxia (HIF, hipoxia inducible factor) es un factor de transcripción que regula la respuesta celular a la hipoxia y actúa como regulador de la homeostasis del O_2 (Semenza, 2000; Kaelin, 2002; Semenza, 2003). HIF activa genes que codifican las proteínas que aumentan la disponibilidad del O_2 y permiten la adaptación metabólica en ausencia del mismo, controlando la expresión de decenas de productos de los genes y proteínas implicados en la angiogénesis, la eritropoyesis, la glucólisis, la apoptosis, el tono vascular, la regulación del pH y la homeostasis epitelial (Fraga y col., 2009). En presencia de O_2 , tiene lugar la hidroxilación del residuo de prolina HIF-1 α P564 por una enzima denominada HIF-1 α prolil-hidroxilasa (HIF-PH), necesitando de Fe y O_2 , este proceso transformará el HIF-1 α en un objetivo para la degradación (Masson y col., 2001; Jaakkola y col., 2001; Yu y col., 2001; Min y col., 2002). En condiciones de hipoxia, el O_2

molecular no está disponible y de esta forma las enzimas están inactivas, lo que implica un aumento de los valores del HIF-1 α (Boddy, 2005). El HIF-1 α no es hidroxilado y, por tanto, degradado, provocando su acumulación en la forma heterodimizada con la subunidad beta (HIF- β). Este heterodímero emigra para el núcleo, donde se unirá a las secuencias específicas del ADN, activando genes implicados en la adaptación a la hipoxia, supervivencia celular y angiogénesis (Fraga y col., 2009).

Transporte de electrones, metabolismo energético y detoxificación del organismo: el Fe participa en los procesos redox que se dan en las reacciones de transferencia de electrones en la cadena respiratoria, facilitando la fosforilación oxidativa que permite convertir el ADP a ATP (Mataix, 2008). Los citocromos, son un grupo de moléculas con importantes funciones metabólicas, están formados básicamente por una molécula de globina y un grupo hemo. Los mismos se encuentran principalmente en las mitocondrias y otras organelas celulares. Su función básica es la de intervenir en los procesos de transporte de electrones, como por ejemplo, en las mitocondrias donde intervienen en la producción oxidativa de energía, o en el caso del citocromo P-450 que interviene en los procesos de la degradación oxidativa de compuestos endógenos o de diferentes fármacos (Johnson y col., 1990; Beri y Chandra, 1993; Coon y col., 1998; Boccio y col., 2003).

Antioxidante y funciones pro-oxidantes beneficiosas: las catalasas y las peroxidasas son enzimas que contienen Fe en su forma hemo, catalizan la reacción de reducción del H₂O₂ convirtiéndolo en oxígeno y agua, protegiendo así a las células contra la acumulación de esta especie reactiva del O₂ altamente perjudicial (Brody, 1999). Aunque el contenido total del Fe en las enzimas representa apenas un 3%, fisiológicamente su presencia resulta indispensable, ya que dichas enzimas serían metabólicamente inactivas en ausencia de este metal (Cooper, 1999; Lall y col., 1999).

Sistema inmune: la enzima mieloperoxidasa, que presenta en su composición un grupo hemo, es parte del sistema de defensa de los leucocitos polimorfonucleares (PMN). Es responsable de la actividad microbicida de los mismos contra un amplio espectro de organismos, dado que en los PMN estimulados, esta enzima cataliza la producción ácidos hipohalogenosos, principalmente ácido hipocloroso, y otros intermedios tóxicos que aumentan poderosamente la actividad microbicida (Brody, 1999).

Síntesis del ADN: la ribonucleótido reductasa es una enzima dependiente de Fe requerida para la síntesis del ADN y la división celular, de hecho, esta enzima tiene un papel limitante en la síntesis del ácido desoxirribonucleico (Beard, 2001).

Sistema nervioso: el Fe tiene un papel importante en el sistema nervioso central ya que participa en la regulación los mecanismos bioquímicos del cerebro, en la producción de neurotransmisores y otras funciones encefálicas relacionadas al aprendizaje y la memoria como así también en ciertas funciones motoras y reguladoras de la temperatura.

La deficiencia de Fe afecta la regulación y la conducción de neurotransmisores como son la serotonina, la dopamina y el ácido gamma amino butírico (GABA). Estudios recientes demuestran que la densidad de receptores para serotonina y norepinefrina se encuentra alterada por la deficiencia de Fe en la dieta (Beard y col., 2006; Felt y col., 2006). Los efectos de deficiencia de Fe a temprana edad sobre los neurotransmisores en el cerebro dependen del momento en que se producen y de la severidad de la carencia (Burhans y col., 2005; Beard y col., 2006). La anemia también incide de manera negativa en la formación de la mielina en las neuronas cerebrales (Rama y col., 2002). En ratas sometidas a dietas con déficit de Fe se aprecia una disminución general del volumen de mielina, así como en la composición de proteínas y fosfolípidos. Estas alteraciones persisten hasta la edad adulta del animal, incluso después de suplementar y corregir la deficiencia de Fe en las mismas (Beard, 2007).

2.4.3. UTILIZACIÓN NUTRITIVA DE HERRO

2.4.3.1. REQUERIMIENTOS

El estado nutricional de Fe de una persona depende del balance determinado por la interacción entre contenido en la dieta, biodisponibilidad, pérdidas y requerimientos por crecimiento. Existen períodos de la vida en que este balance es negativo y el organismo debe recurrir al Fe de depósito para sostener una eritropoyesis adecuada. Durante esos períodos, una dieta con insuficiente cantidad o baja biodisponibilidad de Fe agrava el riesgo de desarrollar una anemia ferropénica (Donato y col., 2005).

Para determinar las exigencias de Fe desde el nacimiento hasta el primer año de vida, hay que tener en cuenta los altos niveles de Fe adquiridos durante el período intrauterino, el reemplazo de la hemoglobina fetal, la disminución de la concentración de hemoglobina y el aumento de las demandas relacionadas con el crecimiento (Schümann y col., 2007). Por ello, hasta el momento, no existe evidencia disponible para establecer las exigencias de Fe del niño recién nacido. La ingesta de Fe recomendada para niños de hasta 6 meses se basa en la Ingesta Adecuada (IA) más que en la RDA y refleja el promedio del consumo de Fe de bebés nacidos a término que se alimentan únicamente de leche materna. ($0,78 \text{ L leche/día} \times 0,35 \text{ mg Fe/L} = 0,27 \text{ mg Fe/día}$). En el niño de 7-12 meses las recomendaciones son de 11 mg Fe/día porque la dependencia del Fe alimentario aumenta para garantizar una eritropoyesis eficiente.

Hay que asegurar que el lactante tenga una dieta rica en Fe, garantizando un suministro adecuado para cubrir sus requerimientos (Dallman y col., 1993) puesto que, durante esta etapa, la causa más frecuente de la carencia de Fe es la nutricional, ya que los requerimientos por crecimiento son máximos, mientras que la ingesta es relativamente pobre dado que la dieta habitual en esta etapa es predominantemente láctea (Olivares, 1997). La predisposición a desarrollar anemia es aún mayor en el prematuro debido a que sus depósitos de Fe al nacer son menores y sus requerimientos más elevados. Esta susceptibilidad también es mayor en el niño con lactancia artificial, a menos que reciba fórmulas lácteas fortificadas, pues el contenido de Fe de la leche de vaca es bajo y este mineral es pobremente absorbido (Stekel y col., 1986; Olivares y Walter, 2003). Por el contrario el lactante nacido a término alimentado exclusivamente con leche materna, pese al bajo contenido de Fe de ésta, se encuentra protegido hasta los 6 meses de vida debido a la excelente biodisponibilidad del Fe de esta leche (50%) (Saarinen y col., 1977; Olivares y Walter, 2003).

En la infancia los requerimientos se reducen, alrededor de 10 mg/día, debido a la disminución del ritmo de crecimiento y a una dieta más abundante y variada, siendo la deficiencia una situación que se arrastra desde el período de lactante (Olivares, 1997). Sin embargo, en términos de ingesta relativa, las necesidades continúan siendo elevadas cuando se comparan con las del adulto, por lo que no desaparece el riesgo de desarrollar una ferodeficiencia. En este periodo es fundamental evitar los malos hábitos dietéticos que limitan la ingesta de Fe o alteran su biodisponibilidad (Díaz-Castro, 2007).

Los adolescentes varones presentan requerimientos elevados por el marcado crecimiento que tiene lugar en este periodo y la dieta puede no aportar Fe suficiente. Durante el desarrollo puberal, un adolescente aumenta unos 10 Kg de peso, que debe acompañarse de un incremento de 300 mg de su Fe corporal para lograr mantener constante su hemoglobina, que en este periodo aumenta a razón de 50-100 g/L/año. En consecuencia, un adolescente varón requiere alrededor de 350 mg de Fe por año durante el pico de crecimiento de la pubertad (Uzel y Conrad, 1998). En las mujeres a los elevados requerimientos por crecimiento se agregan las pérdidas menstruales. Como agravante, la dieta, por motivos socioculturales, suele ser marcadamente deficiente en Fe (Donato y col., 2009). El aumento de unos 9 Kg de peso de una adolescente durante la pubertad, implica un aporte de unos 280 mg de Fe para mantener la concentración de hemoglobina en niveles adecuados. Un sangrado menstrual promedio de unos 30 mL de sangre implica la pérdida de unos 75 mg de Fe. En consecuencia, una adolescente en pleno pico de crecimiento requiere unos 455 mg de Fe por año (Conrad y Umbreit, 2000).

En la mujer en edad reproductiva la pérdida de Fe por la menstruación determina un aumento de los requerimientos de este mineral, lo que hace que este grupo sea más vulnerable a experimentar una deficiencia de Fe (Hallberg y Hultén, 1996).

El requerimiento de Fe para afrontar un embarazo es de 1040 mg. De esta cifra 350 mg son destinados al feto y la placenta y 250 mg se pierden durante el parto. En el periodo de gestación se necesitan 450 mg para cubrir la demanda impuesta por la expansión de la masa eritrocitaria materna. Las pérdidas basales normales continúan, excepto la pérdida menstrual, lo que suma aproximadamente 240 mg. Sin embargo, la pérdida neta de Fe es de 840 mg (1040 mg-250 mg perdidos en el parto+450 mg recuperados en el post parto al contraerse la masa eritrocitaria) (Hallberg, 1992). Esta pérdida neta es mayor en partos por cesárea, ya que el sangrado es casi el doble que en un parto normal.

Las recomendaciones de Fe son desiguales durante el embarazo. La cantidad promedio de Fe absorbido requerido diariamente es de 0,8 mg en el primer trimestre (incluso menor que en la mujer no gestante), concentrándose la mayor parte de los requerimientos en los dos últimos trimestres, 4,4 mg en el segundo trimestre y 6,3 mg en el tercero, en mujeres que comienzan su embarazo con depósitos ausentes o mínimos (FAO/OMS, 2004). Por otra parte, la absorción de Fe dietario es baja en el primer

trimestre, para luego aumentar progresivamente a medida que declina la nutrición de Fe, llegando a triplicarse alrededor de la semana 36 de gestación. A pesar de este aumento, es imposible cubrir los elevados requerimientos sólo con el aporte de Fe de la dieta. Se estima que se requieren entre 300 a 500 mg de depósitos de Fe previo a la concepción para cubrir el déficit neto de Fe impuesto por el embarazo (Hallberg, 1992). Esta cuantía de depósitos de Fe es difícil de encontrar aún en sociedades con altos ingresos económicos (Olivares y Walter, 2003).

En hombres adultos, las pérdidas básicas de Fe son el único factor que determina las exigencias de Fe. La FNB (Food and Nutrition Board, Institute of Medicine) asume que éstas suponen unos 14 µg Fe/kg/d.

Las necesidades de la rata, tanto en fase de crecimiento como en la edad adulta, se establecen en 45 mg/Kg de dieta de Fe (Reeves y col., 1993).

Tabla nº 11. Ingestas diarias recomendadas (RDA) de Fe (modificado de Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, 2004).

ETAPA DE LA VIDA	EDAD	♂ (mg/día)	♀ (mg/día)
Lactantes	0-6 meses	0.27	0.27
	7-12 meses	11	11
Niños	1-3 años	7	7
	4-8 años	10	10
	9-13 años	8	8
Adolescentes	14-18 años	11	15
Adultos	19-50 años	8	18
	51 años en adelante	8	8
Embarazo	Todas las edades	-	27
Lactancia materna	18 años o menos	-	10
	19 años en adelante	-	9

2.4.3.2. ABSORCIÓN INTESTINAL DE HIERRO

La absorción del Fe ocurre de manera fundamental en el duodeno y en las primeras porciones del yeyuno. En este proceso están implicados varios pasos, incluyendo la reducción del Fe a un estado ferroso, la absorción en la membrana apical, el almacenaje intracelular o el tráfico transcelular, y la liberación basolateral (figura 25). El Fe dietético puede encontrarse como Fe hemo (el 10%) y como Fe no-hemo (iónico, el 90%), su absorción duodenal en la membrana apical de los enterocitos acontece por mecanismos diferentes.

El Fe no hemo, presente en los vegetales, leche, huevos y sales de Fe solubles, constituye la principal fuente de Fe dietético. Este tipo de Fe es captado por dos mecanismos: difusión a través de las células de la mucosa y mecanismo activo mediante transportadores dependientes de energía (Mataix, 2008).

El ión férrico (Fe^{3+}) es insoluble a $\text{pH} > 3$; en el estómago, si bien no se produce la absorción de este elemento, el mismo contribuye a dicho proceso, a través de la secreción de ácido clorhídrico y enzimas, que ayudan no solo a liberar el Fe de la matriz alimentaria, sino también a solubilizarlo, ya que el ácido clorhídrico favorece la reducción de este catión a la forma ferrosa (Carpenter y Mahoney, 1992; Hernández García, 1993; Boccio y col., 2003). Además en el lumen intestinal se forman cantidades variables de ión ferroso (Fe^{2+}) por acción de agentes dietéticos como el ácido ascórbico (Han y col., 1995; Wienk y col., 1999) β -caroteno (Layrisse y col., 1997; García-Casal y col., 2000) y aminoácidos tales como la cisteína (Glahn y van Campen, 1997) y la histidina (Swain y col., 2002). En la membrana apical del enterocito también se encuentra una enzima con alta eficiencia, la citocromo b duodenal (CytbD) (McKie y col., 2001; Latunde-Dada y col., 2002), con actividad de ferroreductasa, que reduce al ión Fe^{3+} a Fe^{2+} . Éste es luego transportado a través del epitelio intestinal por una proteína trans-membranosa, la proteína transportadora de metales divalentes (DMT-1), conocida también como proteína transportadora de catión divalente (DCT-1) (Gunshin y col., 1997) o como proteína natural de resistencia asociada a macrófago (Nramp-2) (Fleming y col., 1997). La DMT-1 no sólo transporta los iones Fe^{2+} , sino también otros iones divalentes como: Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} por un mecanismo acoplado a protones (Andrews, 1999; Muñoz Gómez y col., 2005). La relevancia de la proteína DMT-1 se ha confirmado a través de estudios genéticos, en ratas

Belgrade. Las ratas portadoras de una mutación genética, en el locus de DMT-1, mostraban anemia hipocrómica microcítica y también trastornos en la absorción, captación y utilización del metal por parte de los tejidos periféricos, incluyendo los precursores eritroides (Fleming y col., 1998).

Los iones férricos (Fe^{3+}) también pueden ser absorbidos directamente por las células enterales, aunque con baja eficiencia, por medio de un mecanismo que es distinto al de DMT-1 (Conrad y Umbreit, 2002). El Fe que ha sido liberado por acción de las proteasas gástricas y pancreáticas se une a ligandos intraluminales (mucinas) que tienen como función estabilizar la forma férrica. El Fe^{3+} es absorbido vía una proteína de membrana miembro de la familia de las integrinas, la $\beta 3$ -integrina, para luego ser transferido a la proteína chaperona mobilferrina (Conrad y col., 1993) ubicada en la cara citoplasmática del enterocito; una vez en el citosol, el ión férrico es cedido a un complejo proteínico-enzimático citoplásmico llamado paraferitina. Este complejo se halla formado por integrina- $\beta 3$, mobilferrina, flavin-mono-oxigenasa, $\beta 2$ -microglobulina y enzimas transportadoras de la cadena de electrones que utiliza NADPH, para reducir el Fe absorbido de Fe^{3+} a Fe^{2+} (Umbreit y col., 1996).

Hay además un camino de absorción del Fe mediado por lipocalina-2, que parece ejercer una respuesta inmune innata frente a la infección bacteriana secuestrando el Fe, pero su papel fisiológico no está totalmente dilucidado (Flo y col., 2004).

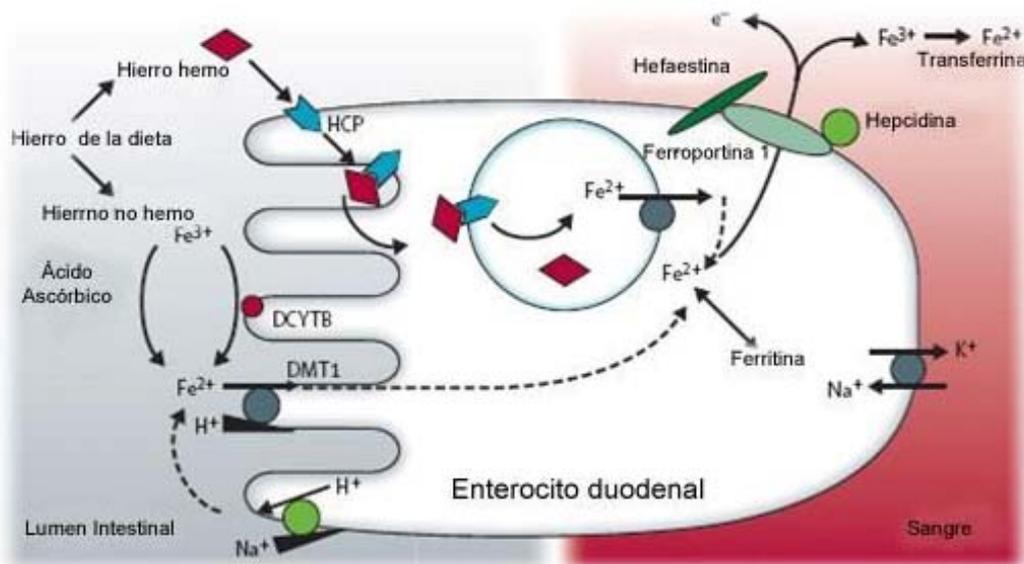
Los alimentos cárnicos, que contienen el Fe hemínico, son digeridos por las enzimas pancreáticas, rescatando el grupo hemo de las globinas existentes en la hemoglobina y mioglobina. El grupo hemo es absorbido, en la membrana apical de los enterocitos como una metalo-porfirina intacta, mediante una proteína transportadora intestinal para el Fe hemo, la HCP-1 (Hem Carrier Protein) recientemente descrita por lo que no está totalmente caracterizada (Shayeghi y col., 2005; Andrews, 2005; Schaer y col., 2008), es una proteína de membrana encontrada en el intestino proximal, donde se produce la mayor absorción del Fe hemo (Krishnamurthy y col., 2007). Una vez en el citoplasma, el grupo hemo, es degradado por la hemo-oxigenasa, liberando el Fe del grupo tetrapirrólico, este Fe^{2+} se incorpora al pool citoplásmico (Andrews, 1999; Muñoz Gómez y col., 2005). Sin embargo, permanece incierto si algún grupo hemo podría atravesar las células intactas, abandonando el enterocito por la acción de los exportadores hemo recientemente

caracterizados, Bcrp/Abcg2 (Krishnamurthy y col., 2007). Si esto realmente ocurre, la disposición subsecuente del grupo hemo en plasma es desconocida. Además, aún no se sabe si la proteína transportadora intestinal para el Fe hemo, la HCP-1, tiene papeles fisiológicos en otros tejidos además del intestino ya que también es expresada en los riñones y el hígado, lo que sugiere que puede actuar en dichos órganos. Así, por ejemplo, podría rescatar el Fe hemo libre o mediar su absorción celular desde su proteína portadora circulante, hemopexina (Andrews, 2005).

En el citoplasma, el Fe procedente de cualquiera de las vías antes puntualizadas, (absorción férrica, ferroso o hemínica), finaliza por efecto enzimático en un *pool* ferroso (Fe^{2+}) que puede seguir diferentes caminos: permanecer en la célula como ferritina para su empleo o almacenaje (este Fe no es absorbido; más bien se pierde cuando los enterocitos envejecen y se produce la descamación de la mucosa intestinal) o ser exportado a través de la membrana basolateral del enterocito a la circulación (Fe absorbido).

El Fe es transferido al plasma por medio de una proteína transportadora transmembrana: la ferroportina 1 (Donovan y col., 2000) también conocida como Ireg1 (iron-regulated transporter 1) (McKie y col., 2000) o MTP1 (metal transporter protein 1) (Abboud y Haile, 2000), éste es el único exportador de Fe identificado hasta el momento. Una vez que el Fe^{2+} es exportado a través de la membrana basal por la ferroportina 1, es oxidado a Fe^{3+} por una oxidasa multi-Cu llamada hefastina (una proteína enzimática similar a la ceruloplasmina plasmática) (Mladenka y col., 2005) para ser captado por la apo-transferrina circulante. La Tf (transferrina) plasmática puede unirse a dos átomos de Fe trivalente, llamada transferrina diférrica $\text{Tf}(\text{Fe}^{3+})_2$, puede estar unida a un solo átomo de Fe^{3+} , forma mono-férrica $\text{Tf}(\text{Fe}^{3+})$ o a ningún átomo de Fe, la apo-transferrina (apo-Tf). La ferroportina 1 es también el exportador de Fe en macrófagos y hepatocitos (Andrews, 1999; Muñoz Gómez y col., 2005). La absorción del metal es dependiente de los niveles de Fe del organismo, la hipoxia y la eritropoyesis. El Fe circula por la sangre unido básicamente a la transferrina, pero en pequeñísimas proporciones, lo hace unido a la albúmina, a moléculas de bajo peso molecular, al citrato u otras pequeñas proteínas plasmáticas; constituyendo el *pool* de Fe no unido a transferrina (FNFT o NTBI: non-transferrin bound iron).

Figura n° 25. Regulación de la absorción intestinal de Fe (Zimmermann y Hurrell, 2007).



Regulación del transporte intestinal de hierro

Debido a que no existe una vía fisiológica para la excreción de este metal esencial, su absorción a nivel duodenal está cuidadosamente regulada para mantener un equilibrio entre la incorporación y la pérdida corporal (Pérez y col., 2005). Se han propuesto dos modelos para explicar cómo se regula la absorción de Fe: el modelo de la cripta programada y el modelo de hepcidina (Muñoz y col., 2009).

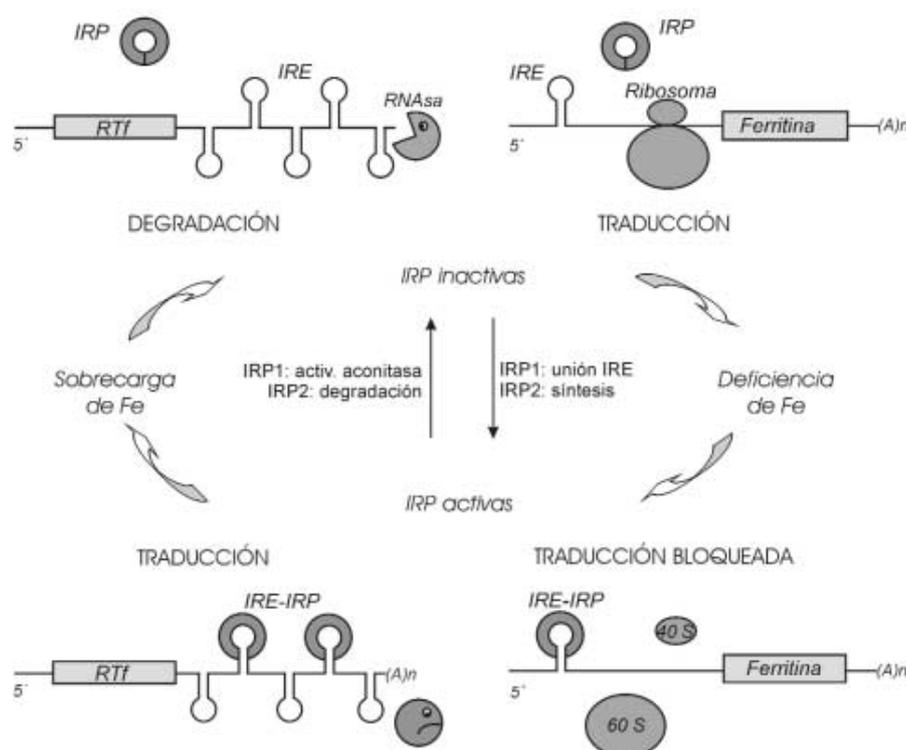
Modelo de la cripta programada: este modelo propone que las células de las criptas del duodeno (células no diferenciadas) captan Fe del plasma, de manera que el nivel intracelular de Fe de las mismas es directamente proporcional a la concentración plasmática de dicho elemento. En la membrana de la cara baso-lateral, de las células crípticas; existen receptores de transferrina (TfR1 y 2) que permite el reingreso del Fe unido a transferrina (Tf) (Muñoz y col., 2005; Siah y col., 2006). Los receptores de transferrina TfR1 se hallan en la superficie de todas las células nucleadas del organismo mientras que TfR2 es restringido a hepatocitos, células crípticas duodenales y células eritroides, lo que sugiere un papel más especializado en el metabolismo de Fe. El número de receptores que contiene cada célula depende de los requerimientos de Fe que tengan las células del tejido.

La unión de la Tf a su ligando el TfR está modulada por HFE, una molécula MHC de clase I que necesita estar asociada con la microglobulina β_2 para el procesado intracelular normal y la expresión en la superficie celular (Feder y col., 1997; Waheed y col., 1997, 2002). El HFE unido a TfR regula la velocidad a la cual la transferrina unida al Fe puede entrar en la célula (Parkkila y col., 1997; Feder y col., 1998). En distintos estudios, se ha sugerido que HFE normalmente facilita más que obstaculiza la incorporación celular de Fe unido a la transferrina mediada por el TfR, y parece que HFE puede también unir otras proteínas o ejercer efecto directo sobre el transporte del mineral inhibiendo la liberación de Fe de la célula vía ferroportina 1 (Waheed y col., 2002; Zhang y col., 2003; Davies y col., 2003; Pietrangelo, 2004). Así se piensa que la concentración celular de Fe establecida como el resultado de la interacción HFE/TfR determina, en último lugar, el nivel de expresión de las proteínas involucradas en la absorción de Fe en las células absortivas maduras en el tercio superior de las vellosidades; es decir, los niveles de proteína transportadora son pre-programados en las células que dejan la cripta y la re-programación en respuesta a cambios en el estado corporal de Fe necesita 2-3 días más para ser establecida (por ejemplo, el tiempo necesario para que se produzca la división de las células de la base de la cripta duodenal y lleguen a convertirse en enterocitos maduros en la punta de la vellosidad) (Díaz-Castro, 2007).

La expresión de las proteínas clave involucradas en el metabolismo del Fe es controlada post-transcripcionalmente por los niveles intracelulares del metal. El mecanismo de regulación es mediado por interacciones específicas entre elementos sensibles al Fe (IRE, iron responsive elements) localizados en los respectivos ARNm y proteínas reguladoras de Fe citosólico (IRP, iron regulatory proteins) (Klausner y col., 1993) (figura 26). En células de mamíferos han sido identificadas dos proteínas IRP (IRP1 e IRP2) que actúan como sensores del contenido celular de Fe. Las IRE, secuencias de nucleótidos filogenéticamente conservadas, están constituidas por 28 bases que forman una estructura secundaria en forma de horquilla, conformación que les permite interactuar con las IRP (Hentze y Kühn, 1996). Estas secuencias IRE están localizadas en las regiones no codificantes o no traducidas (UTRs) situadas en los extremos 5' o 3' de los ARNm y, dependiendo de la posición, difiere el efecto que ocasiona su interacción con las IRP. Los IRE localizados en regiones UTR 5', formados por una sola horquilla, regulan la unión del mensajero al ribosoma; es decir, controlan la iniciación de la traducción. Las IRP unidas a éstos bloquean la síntesis. Los localizados en UTR 3' modulan la estabilidad o degradación

del ARNm por acción de las ribonucleasas. La fijación de las IRP a estos IRE estabiliza al ARNm impidiendo su degradación, por lo que favorece la síntesis de esta proteína. Así, en un estado de depleción de Fe, el objetivo de la célula es incrementar la captación del metal y disminuir su utilización o almacenamiento, por lo que las IRP activas se unen a las secuencias IRE, aumentando la síntesis de TfR, DMT-1 y ferroportina 1, mientras que disminuyen la de ferritina; es decir, un alto grado de unión de IRP refleja bajas reservas de Fe y el resultado es una regulación positiva de estas proteínas en el duodeno y el aumento de la absorción de Fe de la dieta. Inversamente, cuando los niveles de Fe son altos, el metal es utilizado o almacenado y su incorporación debe ser disminuida. Las IRP se disocian de las IRE y, como consecuencia, el ARNm del TfR es degradado y la síntesis de ferritina aumenta (Muñoz Gómez y col., 2005).

Figura n° 26. Mecanismo de homeostasis celular de Fe (Pérez y col., 2005).



Modelo de la hepcidina: parece que el transportador basolateral ferroportina 1 sería el principal punto de regulación de la absorción de Fe dietario en respuesta a los requerimientos sistémicos, mientras que la regulación del transporte apical serviría de mecanismo de seguridad (Nemeth y col., 2004). La hepcidina, un pequeño péptido antimicrobiano producido por el hígado, se perfila como la principal responsable de esta

regulación. De acuerdo con este modelo, la producción hepática de hepcidina estaría regulada por el grado de saturación de la Tf y el nivel de receptores para esta proteína a nivel hepático (TfR1 y 2), de modo que cuando la relación Tf-diférrica/TfR aumenta, se induce la secreción de hepcidina. La unión de esta hormona proteica a la ferroportina 1 induce la internalización y posterior degradación de la proteína transportadora. Como consecuencia de la disminución de la exportación de Fe, se produce la inhibición de su adquisición por parte de la Tf plasmática y el aumento de la concentración del metal en el enterocito que, a su vez, conduciría a una inhibición de su transporte apical. Por el contrario, cuando la relación Tf-diférrica/TfR disminuye, cesa la producción hepática de hepcidina y se restaura la absorción de Fe. La regulación post-traducciona l de la ferroportina 1 por hepcidina completa un círculo homeostático: el Fe regula la secreción de hepcidina, la cual a su vez, controla la concentración de ferroportina 1 en la superficie basolateral de los enterocitos (Nemeth y col., 2004; Leong y Lönerdal, 2004; Muñoz Gómez y col., 2005).

Hay pruebas para apoyar a ambos modelos y es posible que ambos mecanismos de control puedan contribuir a la regulación de la absorción de Fe. En este sentido, hay indicios de que la hepcidina puede actuar directamente en los enterocitos maduros de las vellosidades en lugar de los enterocitos de la cripta. Hay varias situaciones (por ejemplo, la respuesta de fase aguda) en las que la absorción de Fe puede ser modulada más rápidamente (en horas) que a través del mecanismo que involucra la programación y la maduración de los enterocitos de la cripta (en días) (Siah y col., 2006).

Biodisponibilidad del hierro

La biodisponibilidad, definida como la eficiencia con la cual el Fe obtenido de la dieta es utilizado biológicamente (Wienk y col., 1999), depende del tipo de Fe que se suministre en los alimentos, de la cantidad del mismo, de la combinación de alimentos en una comida, el estado nutricional del Fe y de algunos eventos que requieran modificar la movilización de Fe entre los tejidos o la absorción del mismo como: la eritropoyesis aumentada, la hipoxia y las infecciones (Raja y col., 1988; Lynch, 1997; Hallberg y col., 1998). La absorción de Fe se encuentra aumentada durante la deficiencia del metal, ya que como respuesta a una importante disminución del *pool* intracitoplasmático de Fe, se induce el aumento de la expresión de los RTf a través del mecanismo mediado por la interacción

IRE-IRP descrito anteriormente. De esta manera, las células se adecuan para captar el Fe necesario para cubrir sus requerimientos. Bajo condiciones de deficiencia de Fe, su absorción intestinal también se incrementa como consecuencia del aumento de la expresión de la proteína DMT1 (Canonne-Hergaux y col., 1999) y de la reductasa férrica duodenal DcytB (Latunde-Dada y col., 2002). Contrariamente, ha sido reportado que tras una dosis oral elevada del metal se produce una rápida disminución de la expresión de DMT1 y DcytB (Frazer y col., 2003). Las células absorbivas de sujetos con deficiencia del metal esencial contienen elevados niveles de hemooxigenasa (Conrad y Umbreit, 2000), sugiriendo también un aumento del aporte de Fe de origen hémico.

Las anemias hemolíticas y en la hipoxia, igualmente, dan lugar a un incremento de la absorción de Fe, mientras que en los procesos infecciosos o inflamatorios existe una reducción de la absorción del mismo. Por ejemplo: la infección con *Helicobacter pylori* produce atrofia gástrica que, aún en ausencia de la sangría significativa, puede conducir a anemia por deficiencia de Fe profunda. Como es esperado, esta anemia es poco sensible a la terapia oral de Fe, pero puede ser corregida mediante el tratamiento de la infección de *H. pylori* (Marignani y col., 1997).

La cantidad de Fe que puede ser absorbida de los alimentos oscila desde menos de un 1% hasta más de un 50%, aunque se podría establecer como valor medio de absorción, a partir de dietas occidentales, de un 10 a un 15% (Mataix, 2008).

El Fe de tipo no hémico se encuentra en mayor proporción en la dieta; su absorción será significativamente modificada por el status férrico del individuo (el nivel de Fe de los depósitos del organismo). De manera que cuando los depósitos están agotados, existirá un aumento de la absorción de Fe y, si por el contrario los depósitos están repletos, existirá una disminución de su absorción; así los individuos con anemia ferropénica son capaces de absorber entre un 20 y un 30% del Fe presente en la dieta, mientras que un individuo sin anemia solo absorbe un 5-10% del total de Fe ingerido (Zlotkin, 2001). También existen diferentes estados fisiológicos que producen un sustancial incremento en la absorción de este metal, como en el crecimiento y el embarazo, como consecuencia de un aumento de la síntesis de nuevas biomoléculas que poseen Fe en su estructura (Cook, 1990; Hulten y col., 1995). Entre los factores que influyen en la absorción del Fe no hémico a nivel del lumen intestinal, tenemos aquellos que producen un aumento en la

absorción, que son llamados activadores y aquellos que disminuyen la absorción llamados inhibidores (Lynch, 1997; Sandstrom, 2001; Miret y col., 2003).

Activadores de la absorción del Fe no hemo: entre los activadores de la absorción se encuentran sustancias como el ácido ascórbico, que produce no solo la reducción del Fe a su forma ferrosa, sino también su quelación, manteniendo de esta forma al Fe soluble y biológicamente disponible para ser absorbido. También existen otros ácidos orgánicos que producen un aumento de la absorción de este tipo de Fe, como son el ácido cítrico, málico y tartárico (Teucher y col., 2004).

La presencia de carne en una comida no solo proporciona una fuente de Fe hemo sino que también estimula la absorción intestinal de Fe no hemo (Glahn y col., 1996, 1998; Swain y col., 2002) a través de un “factor carne” cuya naturaleza sigue sin estar completamente dilucidada. Existen evidencias experimentales que sugieren que la composición en aminoácidos de las proteínas constitutivas de la carne sería un factor determinante, asignándole a la cisteína (Baech y col., 2003) y a otros aminoácidos azufrados, así como a los péptidos que los contienen, dicho efecto promotor. Ya que los enlaces sulfidrilos promueven la solubilidad del Fe^{2+} y además, facilitan la reducción del Fe^{3+} (Mulvihill y col., 1998). Para el caso del Fe hemo, se reconoce que cuando es consumido junto con proteínas su biodisponibilidad aumenta. Se especula que las proteínas evitan la degradación del anillo de protoporfirina en el lumen gástrico manteniendo indemne el grupo hemo o bien participan en el mecanismo de captación del mismo por el enterocito (Gaitán y col., 2006).

En los últimos años diversos estudios han demostrado que la vitamina A al igual que los β -carotenos aumentan la solubilidad del Fe contenido en el alimento, además de disminuir el efecto inhibitorio que provocan los fitatos y polifenoles presentes en la dieta. Si bien, no se ha dilucidado el mecanismo por el cual estos compuestos producen dicho efecto, se supone que podría ocurrir a través de la formación de complejos que mantendrían soluble al Fe en el lumen intestinal, previniendo de esta forma los efectos inhibitorios de los taninos y polifenoles en su absorción (García-Casal y col., 1998; García-Casal y col., 2000). Además, se ha postulado que esta vitamina es necesaria para la movilización de las reservas de Fe y para la reutilización del mismo durante la hematopoyesis (Bloem, 1995; Gaitán y col., 2006).

Inhibidores de la absorción del hierro no hemo: entre los inhibidores de la absorción se encuentran fundamentalmente los fitatos y taninos, presentes en los alimentos de origen vegetal. Estos compuestos producen la quelación del Fe dentro del lumen intestinal generando compuestos insolubles e impidiendo de esta forma que el mismo se encuentre biológicamente disponible para ser absorbido (Reddy y col., 1996; Sandberg y col., 1999; Agte y col., 2005). Por ello, a pesar de que el contenido de Fe no hemo de las legumbres y cereales es alto, estos alimentos no son buena fuente del metal, debido a que también son ricos en estos inhibidores de su absorción. Dado que las dietas de los países en vías de desarrollo son pobres en carne y ricas en legumbres y cereales, se le ha atribuido al fitato una gran responsabilidad en la génesis de las anemias ferropénicas (Gaitán y col., 2006). En el caso de los taninos (presentes en ciertas frutas, verduras, café, té y especias como el orégano) su efecto inhibitorio se reduce en presencia de la vitamina C (Fairbanks, 1999; Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, 2004).

Entre las proteínas que inhiben la absorción del Fe no hémico, encontramos una amplia variedad, tanto de origen animal como vegetal. Las proteínas de origen animal que poseen un efecto inhibitorio más significativo son la caseína, las proteínas del suero de la leche, la seroalbúmina bovina y las proteínas de la yema del huevo (fosvitina) (Kasdan y Herbert, 1999). De las proteínas de origen vegetal la más importante es una fracción derivada de la proteína de soja denominada 7S conglucina, que demostró poseer un efecto inhibitorio sobre la absorción del Fe no hémico similar al producido por los fitatos (Hurrell y col., 1992; Lynch y col., 1994; Boccio y col., 2003).

Los fosfatos y el Ca están presentes en muchos alimentos y son potenciales inhibidores de la absorción de Fe. Los fosfatos producen compuestos insolubles, principalmente con los iones férricos, inhibiendo consecuentemente su absorción (Sandberg y col., 1999).

En el caso del Ca existen algunas contradicciones con respecto al grado de inhibición que produce en la absorción del Fe, así como con respecto al mecanismo por el cual dicho efecto es ejercido. Minotti y col. (1993) estudiaron el efecto inhibitorio de diferentes fuentes de Ca en la absorción del Fe, demostrando que tanto la forma química en la que se encuentra el Ca como el estado fisiológico con respecto al Fe, son factores determinantes en el efecto inhibitorio que produce el Ca sobre la absorción de Fe (Reddy y

Cook, 1997; Hallberg, 1998). Además es sabido que el efecto del Ca sobre la biodisponibilidad del Fe es dosis dependiente, no teniendo consecuencias a dosis menores a 40 mg de Ca y disminuyendo la biodisponibilidad del Fe hasta en un 50% cuando la dosis es de 300 mg de Ca o más (Hallberg y col., 1991; Gaitán, 2006). El Ca y el Fe no compiten por el transportador DMT-1, lo cual explica el resultado sobre este tipo de Fe. Sin embargo, López-Aliaga y col. (2000), estudiaron la influencia de la leche de cabra y vaca sobre la utilización digestiva y metabólica de Fe y Ca en ratas adultas. Este estudio demostró el efecto beneficioso de la leche de cabra, que favorece la utilización de Fe y Ca y minimiza la interacción entre estos dos minerales.

Otros metales, potencialmente, podrían tener un efecto negativo en la absorción del Fe. De ellos el más significativo es el Zn (que compite con el Fe por el transportador DMT1), ya que es frecuente la utilización de suplementos de Zn y Fe en determinadas condiciones fisiológicas como durante el embarazo y en niños que reciben fórmulas infantiles. Se ha demostrado que el Zn interfiere en la absorción del Fe sólo cuando su concentración molar es muy superior a la del Fe y ambos minerales son suministrados sin ningún alimento. Sin embargo, cuando ambos compuestos se administran en forma conjunta con los alimentos en dosis que están comprendidas dentro de los requerimientos nutricionales diarios, no se ha encontrado ninguna interacción recíproca en la absorción de los mismos (Whittaker, 1998; Arredondo y col., 2006). En este sentido, se ha visto que el consumo de leche de cabra es beneficioso por su contenido en vitamina C y D (Hartiti y col., 1994; Alférez y col., 2006; Díaz-Castro y col., 2009). Sus especiales características nutricionales contribuyen a una mayor biodisponibilidad de Fe y Zn en situación de ferropénica en ratas que consumen dieta basada en leche de cabra (Alférez y col., 2006; Campos y col., 2007; Nestares y col., 2008; Díaz-Castro y col., 2009).

El efecto del Cu sobre la biodisponibilidad del Fe es paradójico, inicialmente, el Cu fue reconocido como un factor antianémico debido a que la suplementación de este metal mejoraba las anemias ferropénicas, independientemente, de la suplementación con Fe, actualmente se sabe que la ceruloplasmina es una enzima dependiente de Cu implicada en la absorción intestinal y la movilización del Fe entre los distintos tejidos (Sharp, 2004) de esta forma, las deficiencias del Cu afectarían la biodisponibilidad de los dos tipos de Fe. Por otra parte, estudios realizados *in vitro* en células caco-2 sugieren que el Cu disminuye la

biodisponibilidad del Fe no hemo, debido a que ambos metales utilizan el transportador de membrana apical DMT-1 para su absorción (Arredondo y Núñez, 2006).

Se ha visto que el Mn tiene un efecto inhibitorio sobre la biodisponibilidad del Fe no hemo, pero aún no hay evidencia de que este efecto sea importante en dietas mixtas, es probable que actué sumado a los otros nutrientes y compuestos inhibidores (Rossander-Hulten y col., 1991; Gaitán, 2006).

La absorción del Fe no hemo también puede verse disminuida debido a la administración conjunta de tetraciclinas, inhibidores de la bomba de protones y antiácidos (Muñoz y col., 2009).

En el caso del Fe hémico, si bien su proporción en el alimento es pequeña comparada con la del Fe no hémico, su absorción es elevada, por lo que la fracción en relación al Fe absorbido pasa a ser significativa. La absorción del Fe hémico es poco variable con respecto al estado nutricional del individuo para este mineral y los inhibidores de la absorción del Fe no hémico tienen poco o ningún efecto sobre la biodisponibilidad de este tipo de Fe, a excepción del Ca que produce una disminución estadísticamente significativa de su absorción cuando los dos minerales se administran en solución (Hallberg y col., 1993) pero no cuando se administran en comidas completas, en donde no se puede aislar el efecto de otros inhibidores (Grinder-Pedersen y col., 2004); a pesar que el transporte del Fe hemo a través de la membrana apical del enterocito es diferente al del Fe no hemo, es probable que el DMT-1 también esté implicado en el efecto del Ca sobre la biodisponibilidad del Fe hemo (Roughead y col., 2005). El cocinado prolongado también afecta a la biodisponibilidad del Fe hemo, pues puede conducir a la degradación de la estructura porfirínica y la “conversión” a Fe no hemo (Lombardi-Boccia y col., 2002).

2.4.4.3. EXCRECIÓN, RETENCIÓN Y BALANCE DE HIERRO

En los adultos sanos, tan solo se absorben 1-2 mg Fe/día en el tracto intestinal; sin embargo, la cantidad total de Fe almacenado en el organismo es mayor: la mioglobina muscular contiene aproximadamente 300 mg de Fe, y 600 mg se encuentran almacenados en los macrófagos retículo endoteliales. La mayor parte del Fe, 1.800-2.000 mg, se incorpora como hemoglobina a los eritrocitos circulantes (figura 27) (Andrews, 1999). El

movimiento de este mineral entre los distintos compartimentos (músculo, intestino, macrófagos, y médula para el desarrollo de los glóbulos rojos), en circunstancias normales, sólo puede producirse a través de la proteína transportadora de Fe plasmático: la transferrina.

Cada día, alrededor de 20-25 mg de Fe son destinados a la médula ósea para la síntesis de la hemoglobina de los nuevos glóbulos rojos; la producción de la misma por los precursores eritroides es el principal uso del Fe. Una alta expresión de TfR1 en estos asegura la absorción de Fe en este compartimento. Para la formación del grupo hemo, el Fe debe volver a cruzar una membrana impermeable a iones para entrar en la mitocondria. El importador Mitocondrial de Fe fue identificado recientemente como mitoferrina (también conocido como SLC25A37), una proteína transmembrana que desempeña un papel crucial en el suministro de Fe a la ferroquelatasa, encargada de la inserción del metal en la protoporfirina IX para formar el grupo hemo (Andrews, 2008). Recientemente, han sido identificados diferentes exportadores del grupo hemo en eritroblastos humanos, y su actividad parece ser esencial en la eritropoyesis, ya que transfieren el grupo hemo de la mitocondria al citosol (Abcb6) y eliminan el exceso del mismo de las células eritroides (FLVCR, Bcrp/Abcg2) (Muñoz y col., 2009).

Los glóbulos rojos que han cumplido con su vida útil tras unos 120 días, son reconocidos por las células del sistema retículo endotelial como eritrocitos viejos y son destruidos. En este proceso, la fracción proteica de la hemoglobina es descompuesta en sus aminoácidos constitutivos y el grupo hemo es degradado por acción de la hemoxigenasa, liberando el Fe que es trasladado al citoplasma a través de la acción de la proteína natural de resistencia asociada a macrófago (Nramp-1), una proteína de transporte similar a la DMT-1 (Schaer y col., 2008). Los macrófagos pueden también obtener Fe de las bacterias y las células apoptóticas del plasma a través de la acción de TfR1 y DMT-1. Dentro de la célula, el Fe puede ser almacenado en dos formas: en el citosol como ferritina y, tras la ruptura de la ferritina dentro de los lisosomas, como hemosiderina. La Hemosiderina representa una fracción muy pequeña de las reservas de Fe normales del cuerpo, principalmente en los macrófagos, pero aumenta drásticamente en la sobrecarga de Fe (Crichton y col., 2008). Es importante destacar que el almacenamiento de Fe en los macrófagos es seguro, ya que no conduce a daños oxidativos. La EPO reduce la retención

de Fe en los macrófagos disminuyendo DMT-1 y aumentando la expresión de ferroportina 1 (Kong y col., 2008).

Pero la mayor parte de este Fe es rápidamente liberado al plasma, la exportación del Fe de los macrófagos a la transferrina se lleva a cabo principalmente por la ferroportina 1, la misma proteína exportadora de Fe expresada en los enterocitos duodenales, y regulada por hefaestina (Muñoz Gómez y col., 2005). Alrededor de un 40% es destinado a la médula ósea para ser reutilizado en la biosíntesis de nuevas moléculas de hemoglobina, que posteriormente son incorporadas a los eritrocitos nuevos, de hecho, la cantidad de Fe necesaria para la producción diaria de 300 mil millones de glóbulos rojos (20-30 mg) es proporcionado principalmente por el reciclaje de Fe por los macrófagos (Andrews, 1999); y el resto va a almacenarse en los depósitos de Fe (Cassanelli y Moulis, 2001). Así, durante la eritropoyesis normal, la transferrina unida a Fe debe renovarse más de 6-7 veces por día (Besarab y col., 2009).

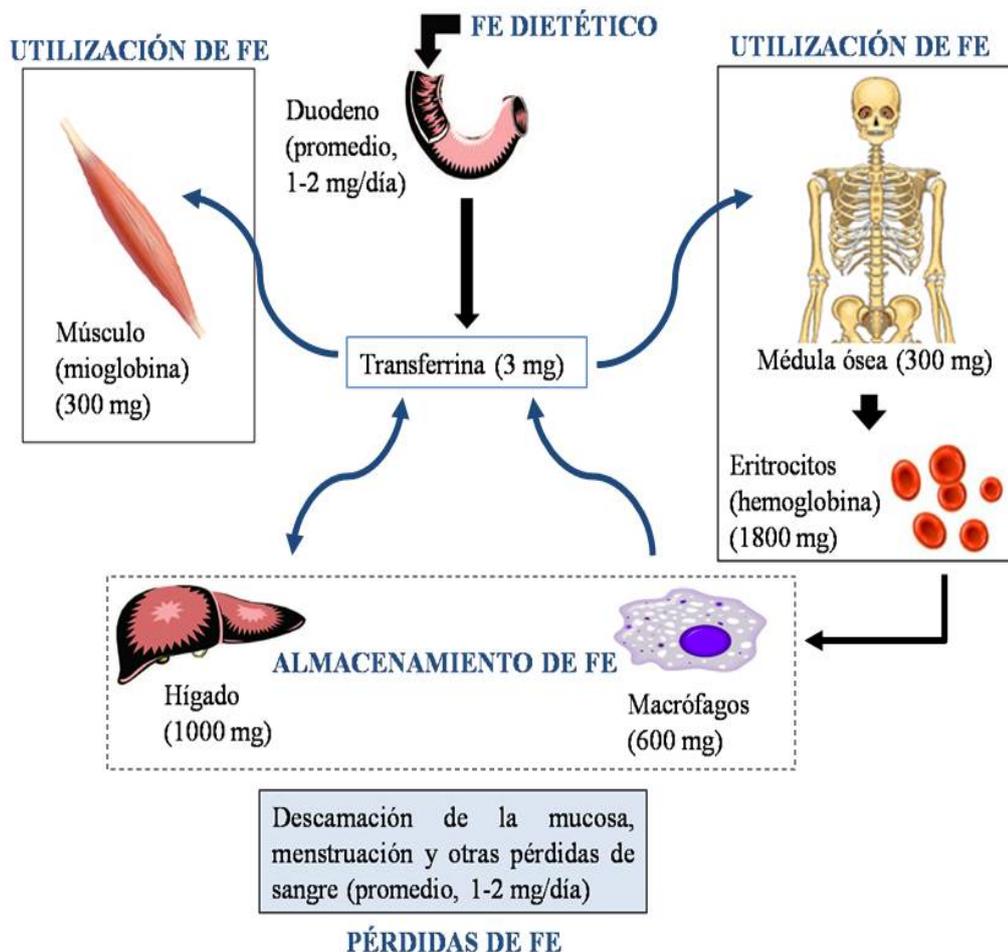
El hígado es el otro órgano fundamental en el almacenamiento de Fe. Cuando existe una sobrecarga de este mineral, la formación de radicales libres y la generación de los productos de la peroxidación lipídica puede provocar la progresiva lesión de los tejidos y, finalmente, cirrosis o carcinoma hepatocelular (Imlay y col., 1988). El Fe es almacenado en los hepatocitos, principalmente en forma de ferritina o hemosiderina. El Fe almacenado en el hepatocito en estos macrocomplejos puede liberarse hacia la Tf, por mecanismos no del todo conocidos, pero también puede liberarse en el interior del mismo, produciendo daño oxidativo (Alla y Bonkovsky, 2005). Para evitar estos efectos nocivos, la regulación de la captación y almacenamiento de Fe a nivel hepático es diferente a la que se produce en los enterocitos y macrófagos. En las células hepáticas, y otras células parenquimatosas, estos procesos parecen estar influenciados por el HFE que reduce la afinidad de TfR por la Tf y posiblemente la expresión de DMT-1, al tiempo que regula los niveles de ferritina (Alla y Bonkovsky, 2005). La captación, desde el plasma, de la transferrina unida a Fe por el hígado, es mediada por TfR1 y TfR2. TfR2 es altamente expresado en el hígado humano, y es probable que desempeñe un papel importante en la carga de Fe hepático en estados de sobrecarga de Fe. A diferencia de TfR1, TfR2 carece de un IRE y de manera que no está regulado mutuamente en respuesta al nivel de Fe plasmático. En cambio, la expresión de proteínas TfR2 está determinada por la saturación de la transferrina (TSAT), y por tanto, aumenta en situación de sobrecarga, mientras que TfR1 disminuye. En condiciones

normales y de sobrecarga de Fe, la expresión de TfR2 excede a TfR1, lo que sugiere que TfR2 desempeña un importante papel en la carga de Fe hepático en la hemocromatosis (Siah y col., 2006), de hecho, una mutación en TfR2 es responsable de la hemocromatosis tipo 3 (Iolascon y col., 2009). La ferroportina 1 es, probablemente, la única proteína exportadora de Fe desde el hepatocito al plasma, que luego es oxidado por la ceruloplasmina y unido a la transferrina (Andrews, 1999; Muñoz Gómez y col., 2005).

El depósito de Fe en los cardiomiocitos es también de gran interés, ya que la insuficiencia cardíaca es la principal causa de muerte entre los pacientes con hemocromatosis hereditaria sin tratar o con hemosiderosis asociada a transfusión. En las células cardíacas, el exceso de Fe puede provocar estrés oxidativo y alteración de la función del miocardio debido al daño en el ADN por el peróxido de hidrógeno a través de la reacción de Fenton (Muñoz Gómez y col., 2005).

El balance corporal de Fe está determinado por las diferencias entre la absorción y las pérdidas del mismo, siendo los humanos los únicos que carecen de un sistema efectivo para excretar el exceso de Fe. Por ello la eliminación de este mineral se realiza a través de las pérdidas diarias: por descamación celular en mucosa y piel, caída de faneras, sudoración, saliva, bilis y otras secreciones. Estas pérdidas ascienden a aproximadamente 1 a 2 mg de Fe/día. La cantidad de Fe eliminado por la orina es relativamente escasa, porque muchas proteínas que contienen Fe son demasiado grandes para filtrar a nivel glomerular. Sin embargo, las pequeñas cantidades de transferrina que son filtradas se unen a cubilina en el borde en cepillo de la membrana del túbulo proximal y son captadas con la ayuda de la mesalina (Kozyraki y col., 2001). De manera que la transferrina, y por lo tanto el Fe, se pueden perder por orina cuando existe un daño renal que da lugar a proteinuria como consecuencia de la falta de cubulina, mesalina o CIC-5 (canal de cloruro voltaje-dependiente necesario para la acidificación de las vesículas de endocitosis y la liberación de Fe unido a la transferrina) (Devuyst y col., 2005).

Figura n° 27. Balance y distribución del Fe (modificado de Besarab y col., 2009).



Incorporación celular de hierro

El Fe, liberado a la circulación unido a la transferrina, es transportado a los lugares de uso y almacenamiento. Alrededor del 30%-40% de los sitios de unión de esta proteína transportadora están ocupados en condiciones fisiológicas normales. Así, aunque la transferrina unida a Fe supone tan sólo unos 3-4 mg, ésta constituye el pool de importación de Fe más dinámico (Crichton y col., 2008).

El Fe transportado por transferrina ingresa en las células diana (principalmente células eritroides, pero también las células inmunes y hepáticas) a través de un proceso de endocitosis mediado por TfR (figura 28). El primer paso es la unión de la transferrina a su receptor situado en la membrana. A pH 7,4 el TfR posee muy baja afinidad por la apo-

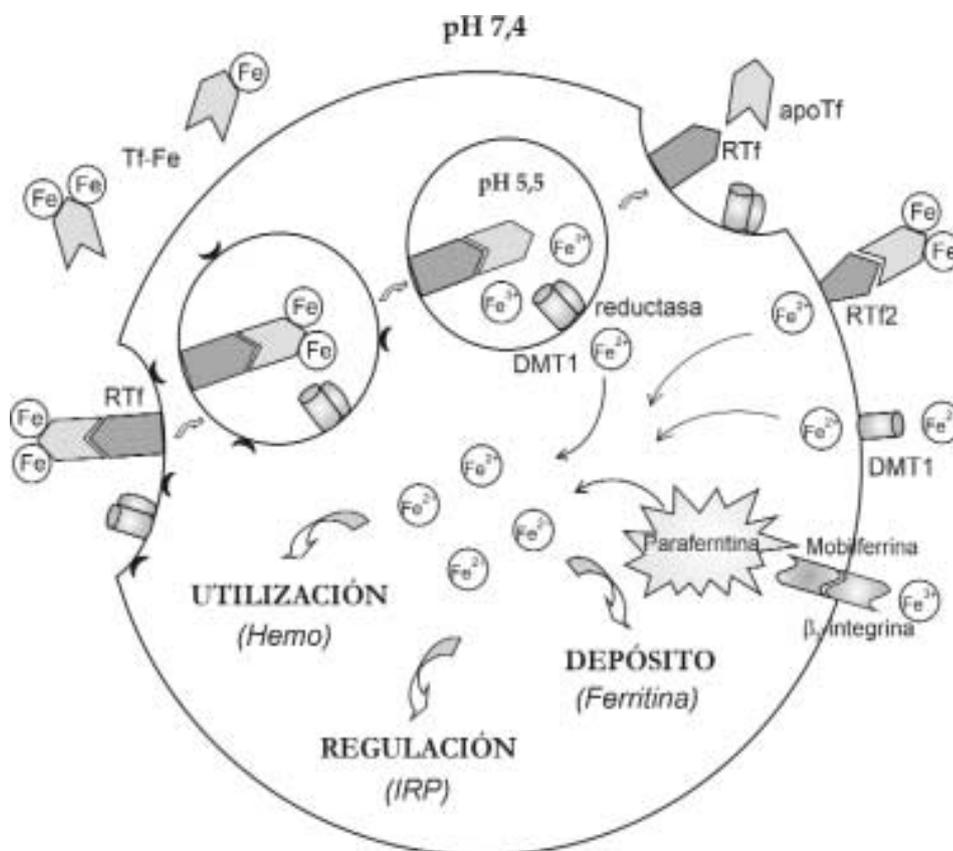
transferrina, intermedia por la transferrina monoférrica y cuatro veces más elevada por la transferrina diférrica (Brittenham, 2000).

Los TfR se encuentran concentrados en fosas (invaginaciones de la membrana plasmática) revestidas internamente por la proteína clatrina. Una vez formado el complejo Tf-TfR, el proceso de invaginación se completa, dando origen a una vesícula revestida que es transportada junto con el complejo ligando-receptor al interior celular. Una vez que la clatrina es retirada, la vesícula resultante se fusiona con un endosoma (siderosomas) (Crichton y col., 2008). El pH del interior del compartimiento endosomal oscila alrededor de 5,5 debido a la acción de una bomba de protones dependiente de ATP presente en su membrana, la cual bombea protones desde el citosol al interior del siderosoma. A este pH, el Fe es liberado del complejo Tf-TfR como ion férrico. Posteriormente, el metal es reducido por una ferri-reductasa endosomal y transportado al citoplasma por el transportador de cationes divalentes DMT-1 (DCT-1, Nramp-2) (Fleming y col., 1998; Gruenheid y col., 1999). En contraste con la mayoría de los ligandos, que se disocian de su receptor y entran en una ruta de fusión con lisosoma y degradación, la elevada afinidad del TfR por apoTf a pH ácido los mantiene unidos (Young y Bomford, 1994).

El complejo apoTf-TfR es transportado intacto hacia la membrana plasmática donde, al tomar contacto nuevamente con el medio extracelular de pH neutro, se disocia. La apoproteína queda entonces disponible para captar Fe nuevamente y comenzar otro ciclo de transporte e internalización (Muñoz Gómez y col. 2005; Andrews, 2008) (figura 28). Una vez en el citoplasma, el ion ferroso incorporado puede seguir tres destinos:

- *pool* de utilización; es decir, las proteínas celulares que requieren Fe
- *pool* de almacenamiento, constituido primariamente por ferritina y hemosiderina, cuya función fundamental es garantizar el depósito intracelular de Fe para su posterior utilización en la síntesis de proteínas y enzimas
- *pool* regulatorio, el cual incluye a las proteínas encargadas de detectar variaciones en los niveles intracelulares del metal (Pérez y col., 2005).

Figura n° 28. Captación y destino celular del Fe (Pérez y col., 2005).



2.4.4. REGULACIÓN HOMEOSTÁTICA DEL HIERRO

La regulación de los niveles de Fe, como se mencionó, es muy sutil. Desde hace muchos años se ha planteado que la absorción intestinal juega un factor crítico para el mismo, debido principalmente a que los seres humanos no disponemos de una vía de excreción del Fe (Andrews, 1999; Mladenka y col., 2005). Clásicamente, tres mecanismos reguladores no comprendidos en su totalidad han sido propuestos para explicar la homeostasis del Fe. El primero es el bloqueo mucosal, en el cual según la carga del Fe dietético el propio enterocito modula su absorción, un segundo mecanismo dependiente de los depósitos de Fe y el tercero llevado a cabo por la eritropoyetina e independiente de los niveles de Fe (Andrews, 1999).

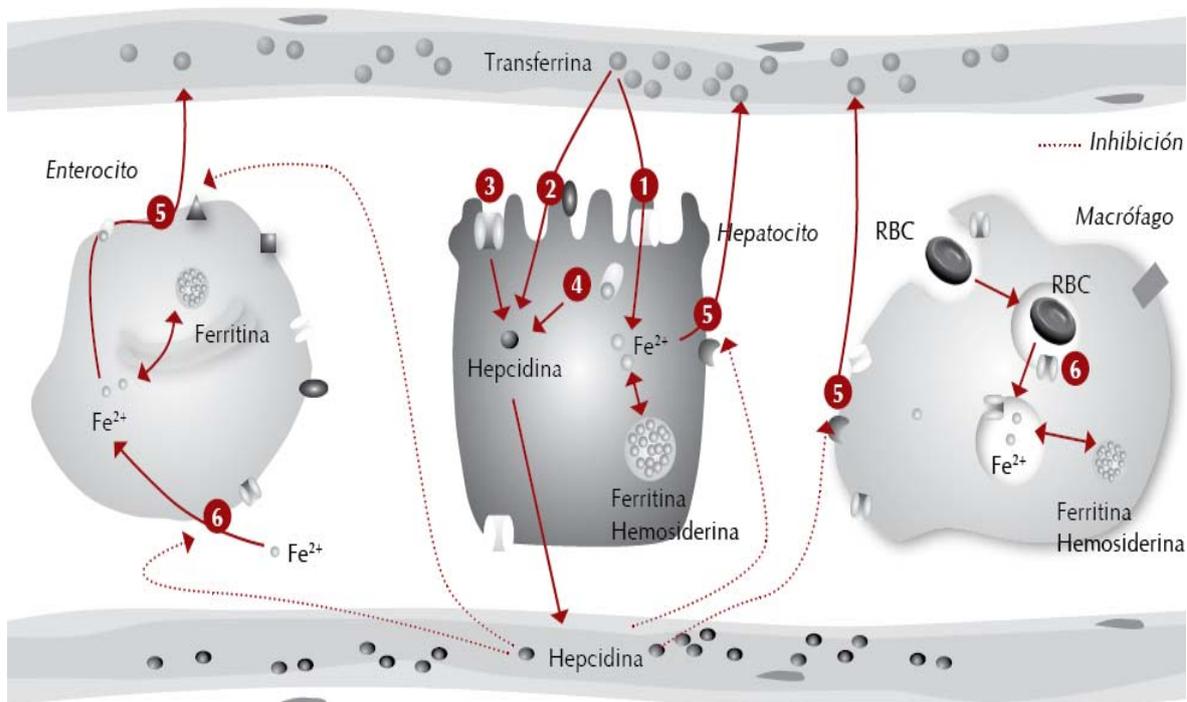
A estos mecanismos regulatorios, recientemente se les añade el llevado a cabo por la Hepsidina (Hepsidin: hepatic bactericidal protein): un péptido de origen hepático formado por 25 aminoácidos codificado por un gen localizado en el cromosoma 19, que fue aislado por Park y col., en el año 2000 (Roy y Enns, 2000; Fleming y Bacon, 2005).

Inicialmente la hepcidina se describió como LEAP-1 (liver-expressed antimicrobial peptide 1) y también es conocida como HAMP (hepatic antimicrobial peptide). La síntesis de este péptido ocurre principalmente en el hígado y una parte en el riñón, por ello, el hígado, juega un papel central en la regulación de la homeostasis del Fe. La hepcidina es considerada actualmente como la hormona reguladora del metabolismo del Fe por establecer el enlace entre los depósitos y la absorción (Hugman, 2006; García-Erce y Muñoz, 2008). Además, forma parte también del sistema inmune innato y posee actividad antimicrobiana (Fleming y Bacon, 2005; García-Erce y Muñoz, 2008).

El conocimiento sobre el mecanismo de acción de este péptido se inició en modelos experimentales de hemocromatosis, donde niveles inapropiadamente bajos de hepcidina producían una absorción aumentada de Fe, mientras que la sobre-expresión de la misma conllevaba a deficiencia y anemia ferropénica (Verga Falzacappa y Muckenthaler, 2004). El aumento de la síntesis de hepcidina conlleva la reducción de la absorción del Fe, debido a que éste péptido disminuye la actividad funcional de la ferroportina 1 por medio de la unión directa con éste y posterior internalización y degradación en el citoplasma celular, por lo que el Fe queda atrapado dentro del enterocito, por no disponer de proteína que lo exporte hacia la sangre (Verga Falzacappa y Muckenthaler, 2004; Hugman, 2006; Nemeth y Ganz, 2006).

Se ha demostrado a su vez, que en presencia de niveles elevados de hepcidina existe una retro-alimentación negativa sobre el DMT-1 intestinal, no estando claro si es un efecto directo de la misma (lo que sugeriría la producción de hepcidina a nivel intestinal), una consecuencia de su unión a la ferroportina 1 en el enterocito, o si es fruto de ambos hechos (Yamaji y col., 2004; Nemeth y Ganz, 2006). La hepcidina igualmente bloquea a los transportadores ferroportina presentes en el hígado (depósito de Fe) y en el sistema retículo endotelial (reutilización de Fe) por lo que la liberación de Fe hacia la sangre se ve totalmente interrumpida en presencia de niveles elevados de hepcidina (figura 29) (Roy y Enns, 2000; Deicher y Höri, 2006).

Figura nº 29. Acción de la hepcidina sobre la regulación del metabolismo del Fe (modificado de Fleming 2005).



Claves: 1, receptor de transferrina 1; 2, receptor de transferrina 2; 3, HFE; 4, hemojuvelina (HJV) 5, ferroportina-1 (freg-1); 6, transportador de metales divalentes (DMT-1).

La síntesis de hepcidina está modulada tanto por los requerimientos de Fe del organismo, como por los estados inflamatorios e infecciosos. Así sus niveles aumentan en la inflamación, explicando las anemias asociadas a las enfermedades infecciosas o inflamatorias crónicas, y en la sobrecarga de Fe de origen no genético, como ocurre con las transfusiones múltiples, y disminuye en la anemia ferropénica, la hipoxia y el estrés oxidativo. Por otra parte, su deficiencia es característica de algunas hemocromatosis hereditarias (Nemeth y Ganz, 2006). Se plantea que el disparador de la síntesis de hepcidina está relacionado con los TfR1 y TfR2 presentes en el hígado, así como con los genes que codifican los receptores hemojuvelina (HJV) y HFE. HFE fue identificado en 1996 como producto del gen de la hemocromatosis hereditaria (Feder, 1996), modula la homeostasia del Fe corporal mediando en la incorporación celular de Fe unido a la transferrina. Se plantea que HFE puede ser un sensor de las reservas corporales de Fe, e incluso se ha sugerido que la relación HFE/TfR es crítica para el mantenimiento de la homeostasia del Fe (Gross y col., 1998; Roy y Enns, 2000). La Hemojuvelina es la más reciente de las nuevas proteínas vinculadas al metabolismo del Fe, fue descubierta en 2004, su gen es el responsable de la hemocromatosis juvenil (Daraio y col., 2005). Se piensa que junto al HFE

y al TfR2, puede ser uno de los elementos de la cascada de señalización que controla la expresión de la hepcidina; parece ser sensible a los niveles de Fe-transferrina presentes en sangre (Verga Falzacappa y Muckenthaler, 2004; Fleming y Bacon, 2005; Hugman, 2006), de tal manera que cuando la relación Tf-diférrica/TfR aumenta, se induce la expresión de la hepcidina y si por el contrario la relación Tf-diférrica/TfR disminuye, cesa la producción hepática de hepcidina restaurándose en consecuencia la absorción de Fe. Esto explica el que los pacientes deficientes de HFE y HJV no manifiestan aumento de la producción de hepcidina en respuesta a la sobrecarga de Fe (Gehrke y col., 2003; Nemeth y col., 2003). La expresión de esta proteína se produce fundamentalmente en el hígado, el corazón y el músculo esquelético, lo que sugiere que su participación en la localización del Fe pudiera ser extendida a otros tejidos además del hígado (Rodríguez Martínez y col., 2004).

Es importante mencionar que el inicio de la absorción de Fe, tras la disminución de los niveles de hepcidina, no ocurre de manera inmediata, existiendo un retraso de unos 4-5 días, tiempo que tarda en disminuir la concentración de ARNm en el citoplasma. Si además existiese un estímulo inflamatorio a pesar de disminuir la relación Tf-diférrica/TfR, el retraso puede ser mucho mayor, ya que la hepcidina se comporta como un reactante de fase aguda. Más recientemente, se ha descrito una inhibición dosis-dependiente directa de la síntesis de hepcidina por los niveles de EPO; esto es, se disminuye la síntesis de hepcidina para permitir el aporte de Fe a la médula ósea estimulada por la EPO (Pinto y col., 2008).

2.5. ALTERACIONES DEL METABOLISMO DE HIERRO

El contenido total de Fe de un adulto normal es de aproximadamente 3,5 a 5 g. En individuos con un estado nutricional óptimo, alrededor del 65% se encuentra formando parte de la hemoglobina, el 15% está contenido en la mioglobina y diversas enzimas, el 20% está como Fe de depósito y sólo entre 0,1 y 0,2% se encuentra unido a la transferrina circulante.

Tal como ya ha sido mencionado, el Fe tiene capacidad de aceptar y donar electrones fácilmente a través de su interconversión entre las formas Fe^{2+} y Fe^{3+} , propiedad que lo convierte en un compuesto sumamente útil. Sin embargo, este metal también puede provocar daños en los tejidos catalizando la conversión de peróxido de hidrógeno en radicales libres que pueden dañar las membranas celulares, las proteínas o el ADN. Por lo tanto, la homeostasis de Fe se halla rigurosamente controlada, ya que tanto la deficiencia como la sobrecarga de este metal esencial son perjudiciales (Pérez y col., 2005).

2.5.1. ANEMIA FERROPÉNICA NUTRICIONAL

La anemia se define como: “disminución de la masa de glóbulos rojos o de la concentración de hemoglobina por debajo del segundo desvío estándar respecto de la media para edad y sexo” (Donato y Buys, 2005); de acuerdo con la OMS, existe anemia cuando la hemoglobina se encuentra por debajo de 130 g/L en hombres y de 120 g/L en mujeres (Ania y col., 1997) ya que la secreción de eritropoyetina aumenta cuando los niveles de hemoglobina descienden por debajo de 120 g/L, indicando, por tanto, que dicha concentración de hemoglobina es necesaria para una oxigenación óptima de los tejidos (Gabilove, 2000).

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. Esta patología es indicador de una pobre nutrición y una mala salud. La carencia de Fe en su forma más severa resulta en anemia ferropénica. 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 Fe (OMS/UNICEF/UNU, 2001). La anemia ferropénica o por deficiencia de Fe es, por tanto, la carencia nutricional

más frecuente de la humanidad. Su importancia radica en la gran cantidad de población de todos los países, estados sociales y edades que la padece, de ahí que haya sido reconocido como uno de los mayores problemas sanitarios.

Los grupos de población más afectados son las mujeres en edad fértil, especialmente las embarazadas, y los niños (Stephenson y col., 2000); y el riesgo de sufrir ferropdeficiencia en las embarazadas adolescentes se multiplica debido a sus pobres hábitos alimentarios y su continuo crecimiento. En países poco desarrollados, la prevalencia de la anemia ferropénica es aún mayor, entre un 40-50% de los niños y las mujeres adultas tienen anemia y la anemia ferropénica representa cerca del 50% en niños de edad escolar y mujeres, y el 80% en niños de edad preescolar (de 2 a 5 años de edad) (Staubli Asobayire F y col., 2001). Estos datos ponen de manifiesto el alcance de esta patología.

2.5.1.1. CAUSAS

Para la eritropoyesis son necesarios unos 20-30 mg de Fe diarios, el 99% del cual proviene del reciclado de la hemoglobina en las células del sistema retículo endotelial. La absorción intestinal sólo aporta el 1% restante, además de compensar las pérdidas diarias a través de heces y riñón. De modo que, cuando se produce un aumento de las demandas, un aumento de las pérdidas o una disminución de la absorción (tabla 12) por distintas circunstancias como: a) pérdida de sangre (uterina en las mujeres, gastrointestinal en ambos sexos), b) dieta deficiente o inadecuada (pobre en Fe o con exceso de inhibidores de la absorción del metal), c) aumento de la demanda (embarazo y crecimiento) y d) mala absorción (patologías gastrointestinales) (Chanarin, 1992); se ha de recurrir a las reservas de Fe asociado a ferritina y hemosiderina; pero si el balance negativo persiste, dichas reservas terminan por agotarse, así en estas situaciones en las que existe escaso Fe disponible, se producen limitaciones en la síntesis de compuestos fisiológicamente activos que contienen este mineral y, por lo tanto, surgen consecuencias deletéreas (Pérez y col., 2005).

El déficit de Fe presenta varios estadios, empezando por la depleción férrica, que es seguida por la eritropoyesis ferropénica que acaba originando anemia cuando no se dispone del Fe suficiente para la síntesis de la hemoglobina (Brittenham, 2000; Vives, 2001). Como consecuencia, se reducen las células rojas en la circulación y se producen cambios en la

citología y morfología de las mismas, dando lugar a hematíes microcíticos e hipocrómicos, además de una disfunción del transporte de oxígeno (Hercberg y Galan, 1992).

Tabla nº 12. Principales causas de la deficiencia de Fe (modificado de Muñoz Gómez y col., 2008).

A. Aumento de las demandas
<ul style="list-style-type: none"> • Crecimiento durante la infancia y la adolescencia • Tratamiento con agentes estimuladores de la eritropoyesis
B. Aumento de las pérdidas
<ul style="list-style-type: none"> • Extracciones sanguíneas • Donación de sangre • Diálisis (especialmente hemodiálisis) • Hemorragias • Cirugía • Traumatismos • Tracto gastrointestinal • Tracto genitourinario • Tracto respiratorio
C. Ingesta insuficiente
<ul style="list-style-type: none"> • Malnutrición • Dieta inapropiada con deficiencia de Fe y/o ácido ascórbico • Malabsorción • Resección gástrica • Infección por <i>Helicobacter pylori</i> • Síndromes malabsortivos (Enf. de Crohn y celiaquía) • Fármacos (antiácidos y antiseoretos gástricos)

2.5.1.2. SIGNOS Y SÍNTOMAS

La anemia por deficiencia de Fe, en su etapa inicial, es probable que sea asintomática, coincidiendo con el estado conocido como “deficiencia de Fe sin anemia” en el

que los depósitos corporales de Fe, la ferritina y la hemosiderina decrecen, mientras que el hematocrito y la hemoglobina permanecen normales. Después, disminuye el nivel de Fe sérico y de forma concomitante aumenta la capacidad de fijación de Fe, reduciéndose el porcentaje de saturación de la transferrina, y por tanto, disminuyen los hematíes circulantes.

En un estado más avanzado de hiposiderosis, caracterizado por baja concentración de hemoglobina y descenso de hematocrito, los pacientes pueden presentar síntomas inespecíficos como falta de energía, puesto que el aporte de oxígeno a la célula no es el adecuado y existe una deficiencia en la cadena de transporte electrónico; cansancio y disnea de esfuerzo que, posiblemente, se produce como consecuencia de una acidosis láctica hipóxica, que obliga a aumentar la ventilación, así como por una fatiga precoz de los músculos respiratorios.

El examen físico puede revelar palidez generalizada y conjuntival (debido a la disminución del pigmento hemático y a una vasoconstricción local, ya que se produce una desviación de la sangre desde la piel y riñón a los órganos vitales). Así como, coiloniquia (cambios en el color, la forma, la textura o el espesor de las uñas), fragilidad del cabello, caída excesiva del mismo y encanecimiento precoz y también alteraciones en las mucosas como glositis y estomatitis puesto que disminuye la proliferación celular ante la falta de Fe.

La taquicardia y los síntomas compatibles con una insuficiencia cardíaca son resultado de la vasodilatación con aumento del gasto cardíaco, lo cual, unido a una sangre más fluida, justifica las palpitaciones, el aumento de la presión diferencial y por tanto la amplitud del pulso y los soplos cardíacos.

Los cambios de comportamiento tales como “pica” (el deseo y el consumo de artículos no alimenticios) y el síndrome de piernas inquietas (consecuencia del escaso aporte de oxígeno a los tejidos) también pueden estar presentes (Grote y col., 2009; Ekbom y Ulfberg, 2009).

Los pacientes ocasionalmente pueden quejarse de síntomas “alarmantes” tales como un cambio de calibre de las heces o en los hábitos intestinales, dolor epigástrico, pérdida de peso, saciedad precoz y poco apetito. Y si la patología se hace crónica pueden aparecer las membranas esofágicas asociadas con la anemia ferropénica que constituyen el

síndrome de Plummer-Vinson (dificultad para deglutir debido a crecimientos de tejido pequeños y delgados que bloquean parcialmente el esófago) (Zhu y col., 2010).

La anemia ferropénica presenta consecuencias negativas en el desarrollo cognitivo de los niños y en la productividad laboral de los adultos (Stoltzfus, 2001). Desde el trabajo pionero de Oski y Honig en 1978, han aparecido decenas de estudios demostrando inequívocamente que la anemia ferropriva en la infancia produce un retraso del desarrollo psicomotor. Más recientemente, se describió que estos efectos deletéreos persisten hasta los 5 y 10 años. La tercera generación de estas investigaciones ha sido categórica en demostrar alteraciones en la maduración del sistema nervioso central que también persisten más allá de la infancia. Lo más inquietante de estos hallazgos, es que parecieran no ser reversibles, aún a largo plazo, a pesar del tratamiento oportuno y satisfactorio de la anemia de acuerdo con las normas pediátricas habituales. Estos hechos ponen énfasis en la importancia de las medidas de prevención de la anemia por carencia de Fe (Olivares y Walter, 2003).

Dado que el Fe es cofactor de múltiples enzimas, la deficiencia de este mineral da lugar también a alteraciones inmunitarias (disminución de la respuesta inmune mediada por células) y del metabolismo hepático.

La identificación de la anemia ferropénica puede realizarse a consecuencia de la sintomatología o tras un examen hematológico en el que se observa: reducción o ausencia de depósitos de Fe, baja concentración de Fe sérico, baja saturación de transferrina, concentración de hemoglobina baja y reducción del hematocrito.

El diagnóstico de la ferropénica se lleva a cabo mediante dos métodos: a) *screening* de los niveles de Fe en la eritropoyesis y b) evaluación del estatus férrico de los tejidos. Los tests más novedosos incluyen porcentaje de eritrocitos hipocrómicos, contenido de hemoglobina en reticulocitos y síntesis de receptores de transferrina (TfRs) (Beutler y col., 2003).

a) Hemograma (Donato y col., 2009):

- Hemoglobina y hematocrito: disminuidos
- Recuento de reticulocitos: normal.

- Recuento de plaquetas: elevado.
- Recuento leucocitario: normal.
- Índices hematimétricos:
 - › Volumen Corpuscular Medio (VCM): disminuido.
 - › Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media (CHCM): disminuida.
 - › Amplitud de Distribución Eritrocitaria (ADE): elevada.
- Morfología eritrocitaria: hipocromía, microcitosis, ovalocitosis, policromatofilia, punteado basófilo (eventualmente).

b) Pruebas que evalúan el estado del Fe (Donato y col., 2009):

- Fe del compartimiento funcional:
 - › Ferremia: disminuida.
 - › Capacidad de fijación del Fe (TIBC): aumentada.
 - › Porcentaje de saturación de la transferrina: disminuido.
 - › Protoporfirina libre eritrocitaria: aumentada.
 - › Receptores solubles de transferrina: aumentados.
- Fe del compartimiento de depósito:
 - › Ferritina sérica: disminuida.
 - › Hemosiderina en médula ósea: disminuida/ausente.

2.5.1.3. TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN

Para prevenir la anemia ferropénica nutricional es necesaria una dieta equilibrada que aporte los requerimientos de este mineral; sin embargo, esto en muchas ocasiones no es posible ya sea por limitaciones económicas o por hábitos dietéticos erróneos muy frecuentes hoy día, especialmente entre adolescentes y niños, grupos de población con un alto riesgo de anemia ferropénica nutricional (Brotanek y col., 2007), por ello en muchos casos será necesario no sólo la modificación de dichos hábitos dietéticos si no también recurrir a alimentos fortificados e incluso la suplementación con Fe.

Las modificaciones de la dieta incluyen aumentar el consumo de alimentos ricos en sustancias que favorecen la absorción de Fe no hemo (ácido ascórbico), disminuir el consumo de inhibidores de la absorción (polifenoles, fitatos) y aumentar el consumo de Fe hemo (carnes rojas, hígado).

La fortificación de alimentos con Fe es probablemente la solución más práctica, sostenible y rentable a largo plazo para controlar la deficiencia de Fe (Baltussen y col., 2004; OMS, 2006; Laxminarayan y col., 2006). Su principal ventaja es que el consumo de estos productos no requiere de una conducta activa por parte del sujeto. Sin embargo, el enriquecimiento de productos alimenticios con este mineral es más difícil que con otras sustancias nutritivas, ya que a pesar de que los compuestos de Fe más biodisponibles son solubles en agua o ácido diluido, a menudo reaccionan con otros componentes del alimento causando pérdida de sabores, oxidación de las grasas y/o cambios en el color (Hurrell, 2002), por ello las formas menos solubles de Fe, aunque menos absorbibles, a menudo son escogidas para el enriquecimiento con objeto de evitar los cambios sensoriales no deseados. El empleo de bajas cantidades de Fe para el fortalecimiento podría ser una intervención más segura que la suplementación pues las dosis son más similares al ambiente fisiológico. (OMS, 2006; OMS, 2007).

Dentro de los programas de fortificación encaminados a prevenir las deficiencias del Fe, se contempla la adición de ácido ascórbico, dado que no sólo aumenta la absorción de este metal sino que además es esencial en la producción de hemoglobina (Killip y col., 2007). Actualmente, la industria alimentaria intenta disminuir el contenido de fitato, mediante el uso de fitasas, asimismo, se están manipulando genéticamente algunas plantas, con el fin de producir alimentos bajos en este inhibidor de la absorción de Fe y de este modo disminuir la incidencia de deficiencias de Fe (Gibson y col., 2003).

El tratamiento de elección de la anemia ferropénica nutricional es la administración de suplementos de Fe por vía oral (sobrecarga oral de Fe). La dosis (calculada en miligramos de Fe elemental) es 3-6 mg/kg/día (300 mg de sulfato ferroso), fraccionada en 1-3 tomas diarias (Comité Nacional de Hematología, 2001; Donato, 2002; Donato y col., 2005). Las sales ferrosas (sulfato ferroso y gluconato ferroso) son las más utilizadas, debido a su mayor solubilidad y disponibilidad al pH del duodeno y yeyuno y por su bajo costo (Cook, 2005). El preparado de elección es el sulfato ferroso (Dallman y col., 1993; Arvas y Gur, 2000; Donato y col., 2007) puesto que su efectividad para corregir la anemia y restablecer los depósitos de Fe no ha sido superada por otros compuestos (Dallman y col., 1993; Lanzkowsky, 2005). El preparado debe administrarse con el estómago vacío, pero muchas personas no lo toleran así y pueden necesitar tomarlo con alimentos; no obstante, es recomendable tomarlo alejado de las comidas (media hora antes o dos horas después)

pues muchos alimentos disminuyen la absorción de Fe hasta un 40-50% (Hallberg y col., 1978), cabe destacar la interferencia que en este sentido ejercen la leche y los antiácidos, por lo que no deben tomarse simultáneamente con los suplementos del mismo.

Cuando la intolerancia al sulfato impida realizar el tratamiento, debe intentarse con otros preparados; de ellos, el que mejor tolerancia presenta es el Fe polimaltosa (Jacobs y col., 2000; Walter y col., 2005; Toblli y Brignoli, 2007), que es un complejo hidrosoluble de hidróxido de Fe^{3+} y polimaltosa (dextrina parcialmente hidrolizada) adecuado para tratamiento por vía oral. Su interacción con otros componentes de la dieta parece ser menor que la del sulfato ferroso, (Jacobs y col 1979; Geisser, 1990) y algunos estudios han informado que presenta mejor tolerancia y similar biodisponibilidad que este último (Jacobs y col., 1984; Johnson y Jacobs, 1990; Walter y col, 2005). Varios autores han comunicado que el Fe polimaltosa es efectivo para corregir estados ferropénicos en adultos, mujeres embarazadas, niños y lactantes (Reddy y col., 2000; Jacobs y col., 2000; Reddy y col., 2001), mientras que para otros su empleo no igualó a los resultados obtenidos con las sales ferrosas (Mehta, 2003; Kavakli y col., 2004; Ruiz-Arguelles y col., 2007). Sin embargo, Donato y col., (2007) demostraron que el sulfato ferroso produce incrementos más precoces y de mayor intensidad para todos los parámetros, permite la normalización de valores en mayor cantidad de pacientes y presenta similar tolerancia y grado de adhesión al tratamiento que el hidróxido férrico polimaltosado.

El tiempo de administración es variable: una vez alcanzados valores normales de hemoglobina y hematocrito debe continuarse, a igual dosis, durante un tiempo similar al que fue necesario para alcanzar la normalización (Comité Nacional de Hematología, 2001; Donato y col., 2005). Esta prolongación del tratamiento sirve para reponer depósitos de Fe. Las complicaciones habituales son: intolerancia digestiva (náuseas, estreñimiento, diarrea, vómitos, dolor abdominal) y coloración negruzca de las heces. Estos síntomas varían en proporción a la concentración de Fe ionizable en la parte alta del tracto gastrointestinal y puede ser reducida, como ya se ha comentado, si se acompaña de la ingesta de alimentos, como es comúnmente consumido (Cook, 2005). Por otra parte, debido a que el Fe tiene propiedades pro-oxidantes, la reducción en la cantidad y/o frecuencia de Fe administrada, además de disminuir la incidencia de los efectos adversos, reduciría el riesgo de estrés oxidativo (Olivares y Walter, 2003). Para asegurar que hay una respuesta al tratamiento, la

anemia debe ser monitorizada. La causa más frecuente del fallo del tratamiento, es el incumplimiento terapéutico.

El Fe intravenoso o intramuscular está indicado para pacientes con hemorragia, en caso de malabsorción intestinal o intolerancia a las formas orales (Killip y col., 2007), con esta forma de administración, se detecta un incremento de Fe sérico tras 1 o 2 horas de la ingesta de 60 mg de Fe como sulfato ferroso. Hasta hace poco el Fe-dextrano ha sido la principal forma disponible de Fe parenteral. El mayor inconveniente del Fe-dextrano son las reacciones anafilácticas, además de otros efectos secundarios como dolor muscular, articular y dolor de cabeza, en un 10% de los pacientes tratados. Estos síntomas son calmados con antiinflamatorios (Beutler y col., 2003).

2.5.2. SOBRECARGA DE HIERRO

Un estado de sobrecarga en el contenido total de Fe resulta de un aporte del metal que excede los requerimientos. Como las necesidades son limitadas y los seres humanos carecen de un mecanismo fisiológico para la excreción del exceso de Fe, un incremento sostenido en su absorción por factores hereditarios, transfusiones repetidas u otras condiciones patológicas puede, eventualmente, resultar en una acumulación del metal. Como consecuencia, si la capacidad del organismo para llevar a cabo su transporte y almacenamiento es excedida, la toxicidad del metal, debida a la producción de especies reactivas de oxígeno, puede producir daño a distintos órganos e, inclusive, desencadenar la muerte. Las manifestaciones tóxicas de la sobrecarga de Fe dependen en parte de la magnitud del exceso, de la velocidad de acumulación y de la distribución del metal entre sitios de depósito relativamente benignos en los macrófagos y los más perjudiciales en las células parenquimatosas (Van Eijk y De Jong, 1992; Chapman, 1992; Crichton y col., 2003) Los rasgos característicos de la sobrecarga de Fe avanzada son la insuficiencia de órganos vitales como el hígado y el corazón, además de disfunciones endocrinas (Kohgo y col., 2008).

Las condiciones patológicas a las que da lugar la sobrecarga de Fe se denominan síndromes de sobrecarga de Fe y son las causas de la disfunción de órganos en los que este metal se deposita, incluida la muerte celular, fibrosis y la carcinogénesis (Kohgo y col.,

2008). Los síndromes de sobrecarga de Fe se clasifican como genéticos (primarios) o secundarios, dependiendo del mecanismo subyacente (Pietrangelo, 2006) (tabla 13).

Tabla nº 13. Clasificación de la sobrecarga de Fe (modificado de Kohgo y col., 2008).

HEMOCROMATOSIS HEREDITARIA Y PATOLOGÍAS RELACIONADAS	
Hemocromatosis Hereditaria	Tipo 1 mutación del gen <i>HFE</i> (6p21.3)
	Tipo 2 Subtipo A: mutación del gen <i>hemojuvelina</i> (1q21) Subtipo B: mutación del gen <i>hepcidina</i> (19q13)
	Tipo 3 mutación del gen <i>receptor de Transferrina 2</i> (7q22)
	Tipo 4 mutación del gen <i>Ferroportina</i> (2q32)
Mutación del gen <i>Ferritina</i>	mutación del gen <i>H-ferritina</i> (mutación en el IRE del ARNm)
Mutación del gen <i>DMT-1</i>	
Mutación del gen <i>Ceruloplasmina</i>	
Atransferrinemia	mutación del gen <i>Transferrina</i>
SOBRECARGA DE HIERRO SECUNDARIA	
Eritropoyesis ineficaz	Talasemia, anemia sideroblástica, síndromes mielodisplásicos
Administración de Fe durante largos períodos	Por vía oral o intravenosa
Transfusión durante largos períodos	
Sobrecarga de Fe dietética	
Disfunción hepática	Lesión hepática alcohólica, hepatitis crónica (tipo C), esteatohepatitis no alcohólica
OTROS	Porfiria

¿Cómo responden los mecanismos que regulan la homeostasis celular de Fe ante una sobrecarga del metal? Contrariamente a lo que sucede bajo condiciones de deficiencia de Fe, el aumento de la saturación de transferrina sérica induce la regulación negativa de la expresión de RTf en células hepáticas y de otros órganos. Por otra parte, el excedente de Fe que circula en la forma de complejos de bajo peso molecular, induciría el aumento de la captación del metal por la vía independiente de transferrina en aquellas células encargadas de la detoxificación del medio, como los macrófagos (Olahanmi y col., 1997). En respuesta a la sobrecarga de Fe, el hígado secreta hepcidina, hormona proteica que controla los niveles plasmáticos del metal, regulando la absorción de Fe dietario. La unión de hepcidina a la ferroportina 1 induce la internalización y posterior degradación de la proteína

transportadora; como consecuencia, disminuye la exportación de Fe desde el enterocito hacia el plasma (Nemeth y col., 2004).

La forma más común de sobrecarga de Fe es la hemocromatosis hereditaria (HH) (Roy y Andrews, 2001), una enfermedad metabólica que se caracteriza por sobrecarga y depósito de Fe en las células parenquimatosas de diferentes órganos, induciendo su deterioro funcional y estructural (EASL International Consensus Conference on Haemochromatosis, 2000) como resultado del estrés oxidativo inducido por Fe en esos tejidos (Pietrangelo, 2004). Se considera la enfermedad genética más frecuente en los países occidentales (Olynyk y col., 1999; Pérez-Aguilar, 2002; Yen y col., 2006). Los pacientes con este desorden autosómico recesivo absorben regularmente dos o tres veces más Fe dietario que las personas normales. Por lo tanto, la cantidad del metal unido a transferrina aumenta, pudiendo alcanzar valores de 50-60% de saturación. El exceso de Fe es depositado en las células parenquimatosas del hígado, corazón, páncreas, glándula pituitaria y paratiroides. Como consecuencia, los pacientes desarrollan hepatomegalia con fibrosis y cirrosis, cardiomiopatías y diversas endocrinopatías como diabetes mellitus, hipopituitarismo, hipogonadismo e hipoparatiroidismo (Andrews, 1999). Curiosamente, esta enfermedad no es causada por un defecto en una proteína involucrada en el transporte de Fe, sino por una anomalía en un regulador del transporte.

En 1996 fue identificada la proteína de membrana HFE que se halla mutada en la mayoría de los pacientes con hemocromatosis hereditaria (Feder y col., 1996). Esta proteína, estructuralmente similar a las del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I, no une ni transporta Fe. Parece ser una molécula regulatoria que influye sobre la eficiencia de la absorción del metal esencial. HFE forma un heterodímero con la β 2-microglobulina, el cual es expresado en la superficie de muchas células, incluyendo las de la cripta duodenal y macrófagos. A pH neutro, el heterodímero forma un complejo estable con el RTf (Waheed y col., 1999), resultando en un cambio conformacional del receptor que provoca modificación de su afinidad por Tf (Roy y col., 1999). De esta manera, HFE modularía la captación de Fe unido a Tf desde el plasma hacia los enterocitos de la cripta duodenal y participaría en el mecanismo por el cual dichas células detectan modificaciones de las reservas corporales de Fe (Waheed y col., 2002). La alteración de este mecanismo desempeña un papel fundamental en la patogénesis de la hemocromatosis hereditaria. Han sido descritas mutaciones en el gen HFE que atenúan la captación de Fe unido a

transferrina por parte de las células duodenales de la cripta, proveyendo de esta manera señales paradójicas que conducen a la regulación positiva de la expresión de DMT-1 en las células absortivas, a pesar de la elevada saturación de la transferrina y del alto contenido hepático de Fe (Fleming y col., 1999; Stuart y col., 2003).

A partir del descubrimiento del HFE, se identificaron nuevos genes implicados en otros síndromes de sobrecarga de Fe menos comunes, que se producen como resultado de mutaciones en los genes que codifican Tfr2, ferroportina 1, hepcidina (HAMP) y hemojuvelina (HJV) (Franchini, 2006), pero todos siguen un modelo similar de depósito de Fe en los tejidos (Bomford, 2002; Pietrangelo, 2006).

Hay que tener en cuenta también que la sobrecarga de Fe se observa con frecuencia como una condición secundaria. Esta circunstancia se produce frecuentemente en pacientes que requieren transfusiones de sangre a largo plazo debido a anemias severas, situación que tiene lugar en trastornos genéticos como la talasemia y la anemia falciforme, y en la anemia refractaria a los tratamientos convencionales. En estos pacientes, la eritropoyesis ineficaz y la acumulación continua de Fe por transfusión exógena se consideran responsables de la sobrecarga de Fe que provoca los fallos orgánicos resultantes, tales como insuficiencia hepática, insuficiencia cardíaca y diabetes mellitus severa (Andrews, 1999). Además de estas condiciones patológicas ya conocidas, existen muchas enfermedades que muestran un depósito de Fe suave o una desregulación de la distribución corporal de Fe, como son la hepatitis C crónica, la enfermedad hepática alcohólica, esteatohepatitis no alcohólica, y resistencia a la insulina, puesto que el Fe es un cofactor importante que modifica estas situaciones. Además, es cada vez más patente la dependencia peligrosa existente entre el exceso de Fe y trastornos relacionados con el estilo de vida, ya que promueve la aterosclerosis, la carcinogénesis o la diabetes entre otros (Bonkovsky y col., 2003).

2.5.2.1. MECANISMOS DE TOXICIDAD DEL HIERRO

En situación de sobrecarga de Fe, la capacidad de saturación de transferrina puede ser excedida, produciéndose un marcado aumento de la proporción de Fe libre en el plasma. Este Fe no unido a transferrina, definido por Esposito y col. (2003) como Fe lábil, tiene actividad redox, es quelable, y capaz de entrar en los órganos e inducir sobrecarga de

Fe en los tejidos; por tanto, es eliminado muy rápidamente del plasma por el hígado y otros órganos (Brissot y col., 1985; Craven y col., 1987) donde se produce una progresiva acumulación del metal que puede llegar a ser dañina (Breuer y col., 2000).

La toxicidad celular del Fe se debe a que su interacción con el oxígeno, cataliza la conversión a peróxido de hidrógeno y a radical superóxido, mediante su participación en las reacciones de Fenton y Haber-Weiss, que terminan generando radicales hidroxilos que inducen riesgos para las membranas celulares, proteínas y ADN (Fiers y col., 1999; Halliwell, 2001).

Los radicales libres son especies químicas con electrones desapareados que les confieren gran reactividad química, hecho que les conducirá a interactuar rápidamente con cualquier molécula biológica con la que entren en contacto. Por su avidez para aceptar electrones de las moléculas diana, los radicales libres pueden modificar la estructura y/o la función de éstas, pudiendo actuar así sobre componentes estructurales como la membrana plasmática y sobre procesos críticos intracelulares, entre los que se incluyen la maquinaria genética y diversos procesos enzimáticos (Halliwell y Chirico, 1993; Cheeseman y Slater, 1993; Liu y col., 2002).

El estrés oxidativo resulta de un desequilibrio entre la formación y neutralización de prooxidantes y se impone en la célula como resultado de uno de los siguientes factores: un incremento en la generación de agentes oxidantes (radicales libres), una disminución de los sistemas de protección antioxidante o un fallo en la reparación del daño oxidativo (Fiers y col., 1999; Halliwell, 2001). La alteración del balance prooxidante/antioxidante se considera también un factor importante en el daño oxidativo a las moléculas, causando roturas y desestabilización de las membranas celulares (Aust y Eveleigh, 1999).

Las condiciones patológicas, el metabolismo del Fe y el del radical superóxido están íntimamente vinculados. Cada uno puede exacerbar la toxicidad de los demás. La sobrecarga de Fe puede amplificar los efectos nocivos de la sobreproducción del radical superóxido. Además, el estrés oxidativo crónico puede modular la absorción del Fe y su almacenamiento, lo que puede llevar a efectos citotóxicos y mutagénicos (Emerit y col., 2001).

Entre las especies reactivas del oxígeno (ROS), el radical hidroxilo es la fracción más tóxica, las moléculas a las que ataca son carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos. Se sabe que la reacción del radical hidroxilo con la base 8-hidroxiguanina (8-OHG) del ácido nucleico está altamente correlacionada con la teratogenicidad y carcinogenicidad inducida por el estrés oxidativo (Kohgo y col., 2008). Los radicales derivados del hidroperóxido son responsables de la peroxidación lipídica en membranas biológicas, provocando desajustes en el funcionamiento de las mismas, cambios de la fluidez, inactivación de enzimas y receptores ligados a la membrana, así como un aumento no específico de la permeabilidad a iones tipo Ca (Yung-Suk y Akeru, 1987; Halliwell y Chirico, 1993; Littarru y Battino, 1994).

Por el contrario, en situación de anemia ferropénica, existe controversia en la comunidad científica acerca de la susceptibilidad de las células al daño oxidativo: algunos autores establecen que no existen diferencias en la susceptibilidad a la oxidación de pacientes con anemia en comparación con individuos sanos (Acharya y col., 1991; Isler y col., 2002, Díaz-Castro y col., 2008), pero otros defienden que la producción de sustancias oxidantes estaba incrementada y los sistemas antioxidantes se encontraban disminuidos, por tanto, el equilibrio oxidativo/antioxidante estaba desequilibrado hacia la zona oxidativa en pacientes con anemia ferropénica (Vives Corrons y col., 1995; Kumerova y col., 1998; Aslan y col., 2006).

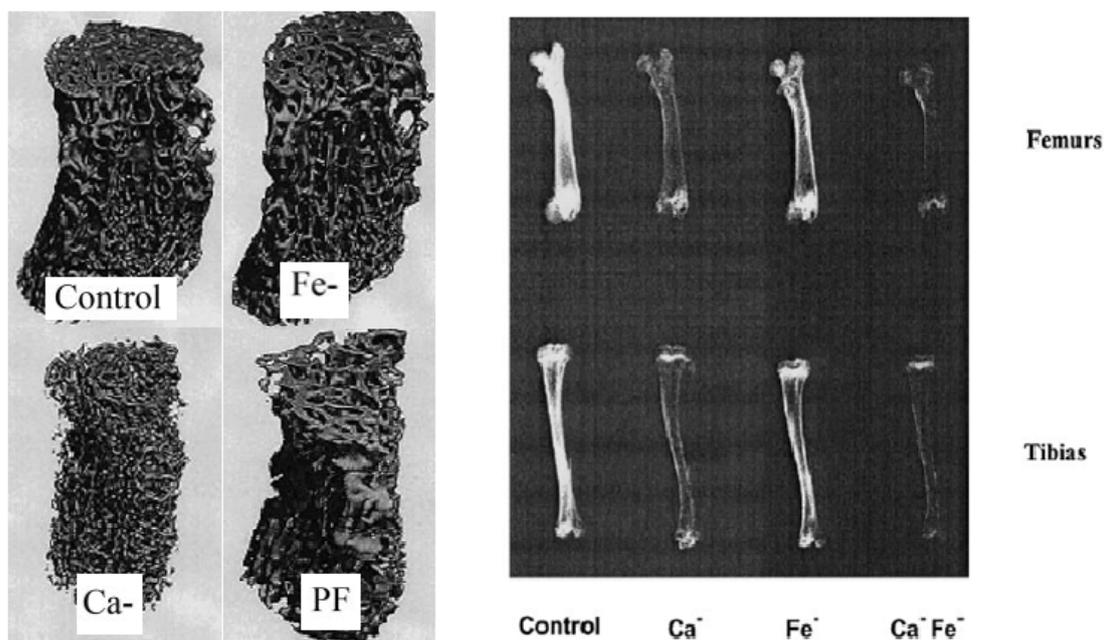
2.5.3. REPERCUSIONES ÓSEAS DE LAS ALTERACIONES DEL METABOLISMO DE HIERRO

2.5.3.1. EFECTO DE LA ANEMIA EN EL COMPARTIMENTO ÓSEO

La deficiencia de Fe provoca no sólo anemia, si no también otros problemas de salud como hiperlipemia, peroxidación lipídica y cambios en el metabolismo vitamínico (Uehara y col., 1997; Stangl y Kirchgessner, 1998; Rosales y col., 1999). Recientemente, se ha estudiado la relación existente entre el Fe y el metabolismo óseo, poniéndose de manifiesto que la ingesta de Fe se asocia con la densidad mineral ósea (DMO) en mujeres posmenopáusicas (Harris y col., 2003; Maurer y col., 2005). Medeiros y col. (1997, 2002, 2004); Parelman y col. (2006) y Katsumata y col. (2006) han demostrado que la deficiencia de Fe disminuye el contenido mineral óseo, la DMO y resistencia mecánica; afectando

negativamente a la microarquitectura del hueso y a la calidad de los huesos largos y vertebras.

Figura nº 30. Impacto de una carencia dietética de Fe o de Ca sobre la calidad del hueso cortical y trabecular y cómo este efecto es exacerbado por una carencia conjunta de Fe y Ca (Izquierda: Medeiros y col., 2004; Derecha: Medeiros y col., 2002).



Control (dieta control AIN-1980), Ca⁻ (dieta restringida en Ca), Fe⁻ (dieta deficiente en Fe), CaFe⁻ (dieta deficiente en Fe y restringida en Ca), PF (dieta control administrada *pair-fed*).

El Fe es un cofactor necesario para las enzimas prolil y lisil hidroxilasa, que catalizan la formación de los puentes cruzados en las fibras adyacentes de colágeno por lo que el metal juega un papel fundamental en la maduración de esta molécula (Tunderman y col., 1977). Además, la conversión de vitamina D₃ a 1,25-(OH)₂ vitamina D₃ se lleva a cabo mediante dos pasos de hidroxilación en el hígado y en el riñón. La hidroxilación final de la vitamina D es Fe-dependiente, ya que requiere un sistema de tres componentes que implica una flavoproteína, una proteína sulfoférrica y un citocromo P-450 (De Luca, 1976). Por lo tanto, en situación de anemia ferropénica, estas enzimas dependientes de Fe podrían inactivarse conduciendo

a un anormal metabolismo del colágeno y de la vitamina D que finalmente provoca la osteomalacia observada.

Campos y col., (2007) indicaron que la anemia produce una clara desmineralización ósea, como se puede deducir del menor depósito de Ca en fémur de ratas anémicas. En un estudio previo se puso de manifiesto que la anemia ferropénica nutricional provoca una significativa alteración en el metabolismo del Ca y P. Asimismo, tras el consumo de una dieta con contenido normal en Fe, en situación de ferodeficiencia, las concentraciones de Ca y P se incrementaron en el esternón, pero no en fémur (Campos et al., 1998), revelando que la desmineralización ósea se mantenía incluso después de la recuperación de la anemia. Esto puede deberse también al incremento de los niveles séricos de PTH (que estimula los osteoclastos) y cortisol (que inhibe los osteoblastos) que provoca la anemia ferropénica (Campos y col., 2007).

La deficiencia de Fe severa parece disminuir no sólo la formación de hueso sino también la resorción ósea, aunque siendo ésta mayor que la formación, desequilibrando de esta manera el proceso de remodelado hacia la destrucción de hueso resultando en pérdida total (Katsumata y col., 2009).

2.5.3.2. EFECTO DE LA SOBRECARGA DE HIERRO EN EL COMPARTIMENTO ÓSEO

Por otra parte, tal y como se ha confirmado por diversos estudios, el Fe en exceso y su inadecuado depósito en el organismo ha sido reconocido como un factor de riesgo para la osteopenia y la osteoporosis (Weinberg, 2006; 2008). Hecho que se demuestra por la osteoporosis que acompaña a la hemocromatosis hereditaria, que puede ser debida a un incremento de la resorción osteoclástica relacionada con el hipogonadismo que causa esta patología, a la supresión de la formación ósea ocasionada por el efecto tóxico del exceso Fe sobre los osteoblastos o a la coincidencia de ambas circunstancias (Valenti y col., 2009). En ensayos realizados en ratas, se ha observado una marcada pérdida de la conectividad del hueso esponjoso en la epífisis y del hueso trabecular en la metáfisis del fémur ante una sobrecarga de Fe (Kudo y col., 2008).

El síndrome de sobrecarga de Fe hepático está asociado con elevados niveles circulantes de fragmentos de PTH conteniendo las regiones 44-68, las cuales parecen intervenir en los cambios osteoarticulares, osteopenia y osteoporosis (Guggenbuhl y col., 2005). Es conocido que los osteoblastos tienen receptores para la PTH, así que el efecto de esta hormona en osteoclastos es indirecto y mediado por osteoblastos (Habener y Potts, 1990). El Fe puede afectar a los osteoblastos y a las células de revestimiento, inhibiendo o disminuyendo la síntesis de la matriz de colágeno, o puede perturbar el efecto de la PTH, posiblemente alterando los receptores de los osteoblastos a esta hormona o afectando a su ruta biológica (Mandalunis y Ubios, 2005).

Además, el Fe actúa de forma directa en la membrana plasmática del osteoblasto y del osteoclasto (Vernejoul y col., 1984; Kazama y col., 1997; Mandalunis y col., 1997; Matsushima y col., 2001). Se hipotetiza que el Fe puede intervenir dinámicamente aumentando el reclutamiento osteoblástico conduciendo a la masiva acumulación de osteoide que excede la capacidad de mineralización; o bien, el Fe intracitoplasmático del osteoblasto que rodea al hueso trabecular puede suprimir el remodelado y llevar a la hiperosteoidosis (Sato y col., 1997; Matsushima y col., 2003).

Sin embargo, distintos estudios *in vitro* demuestran que el Fe causa una disminución en la proliferación celular y en la actividad osteoblástica (Diamond y col., 1991; Mandalunis y Ubios, 2005), y esta inhibición de la formación ósea causada por el Fe es dosis dependiente (Sato y col., 1997). Estos hallazgos *in vitro* son compatibles con estudios *in vivo* que ponen de manifiesto que la sobrecarga de Fe deteriora el remodelado y la formación ósea (Ebina y col., 1991; Sato y col., 1997; Mandalunis y col., 1997). La inactividad osteoblástica y la reducida tasa de formación ósea puede ser asociada a un descenso en IGF-1 debida a los cambios causados en las células hematopoyéticas por la presencia de los depósitos de Fe (Mahachokletwattan y col., 2003; Mandalunis y Ubios, 2005). A esta acción a nivel celular ejercida por el Fe, hay que añadir un efecto tóxico directo del ion, recientemente descubierto por Guggenbuhl y col. (2008), que han mostrado que el Fe inhibe el crecimiento y altera la calidad de los cristales de hidroxapatita *in vitro*, en un modelo de calcificación acelular y no enzimático. Esto sugiere un efecto directo del Fe sobre la mineralización del hueso y, en consecuencia, sobre la calidad del mismo, independientemente de células, proteínas y enzimas.

El mecanismo propuesto para la acción del Fe involucra, a nivel sistémico, la formación de radicales libres o disminución del pH por estrés oxidativo lo cual es causa de la peroxidación lipídica de membranas plasmáticas (Matsushima y col., 2003). A nivel del hueso afecta la matriz ósea, incrementa la resorción y en menor medida la formación ósea. El efecto neto es por tanto, la disminución de la masa ósea (Vernejoul y col., 1984; Mandalunis y col., 1997; Matsushima y col., 2003). Así pues, se puede afirmar que el Fe jugaría un papel en la remodelación ósea por acción directa sobre la actividad del osteoblasto tal y como queda patente por la inhibición de la producción del colágeno tipo I y de los marcadores de la diferenciación osteoblástica que tiene lugar en situación de sobrecarga de Fe (Yamasaki y Hagiwara, 2009).

La acción del Fe en el metabolismo óseo y mineral debería explorarse en todos los pacientes con síndromes de sobrecarga de Fe o en caso de una sobrecarga oral de Fe prolongada.

2.6. CARACTERÍSTICAS NUTRICIONALES DE LA LECHE DE CABRA

La leche es uno de los alimentos más completos desde un punto de vista nutricional, ya que no sólo constituye una buena fuente de macro y micronutrientes, sino que además contiene compuestos activos que juegan un papel significativo tanto en la nutrición como en la protección de la salud (Boza y Sanz-Sampelayo, 1997); de ahí su importancia en cualquier etapa de la vida, pero especialmente en la infancia y la adolescencia, períodos críticos en el desarrollo del individuo.

La cabra ha sido considerada como uno de los animales domésticos de mayor aprovechamiento, sobre todo por su leche y carne que posee una alta calidad nutricional, que se traduce en un bajo contenido de grasas saturadas y de grasas totales, sólo comparable a la carne de pollo, además de ser baja en calorías, presenta un nivel de proteínas similar al de las otras carnes; sin olvidar la utilidad de su piel y otras partes de su cuerpo (Sánchez, 2004).

La cría de la cabra como animal suministrador de leche se remonta a la prehistoria, ya que el hombre, desde la antigüedad, reconoció sus propiedades lecheras (Boza y Sanz Sampelayo, 1984). Su talla pequeña, pocas exigencias, capacidad de adaptación, docilidad y elevada producción, tuvieron que hacerla muy apreciada por el hombre primitivo, como lo ponen de manifiesto las pinturas y tallas del arte rupestre, que hablan de su proximidad al hombre (Boza y Sanz Sampelayo, 1997).

La leche de cabra ha sido un componente esencial de la “dieta mediterránea” desde sus orígenes (los murales egipcios o los textos bíblicos hablan de su consumo) especialmente mediante su transformación en queso. Tradicionalmente se ha dado a bebés y niños que no podían tomar leche materna y no toleraban la de vaca.

La leche de cabra es un alimento con unas características nutricionales altamente beneficiosas, que le confieren un alto interés como alimento y objeto de investigación. A pesar de su bajo consumo, la leche de cabra está adquiriendo un gran interés nutricional en la tendencia actual de buscar alimentos más saludables en los países desarrollados (Chandan y col., 1992).

De hecho, ya existen numerosas experiencias que han probado la condición de alimento funcional de la leche caprina, entendiendo como “alimento funcional” aquel que contiene compuestos beneficiosos desde un punto de vista fisiológico para el consumidor, además del valor nutritivo básico, este tipo de alimentos se diferencian de los alimentos nutracéuticos por el hecho de que a los alimentos funcionales no se les añade ningún producto farmacéutico, sino que los componentes que hacen que un alimento sea funcional han estado siempre presentes en la naturaleza.

Se ha observado que el consumo de leche de cabra o de los productos derivados de ésta, es una alternativa real a la leche bovina en grupos que presentan ciertas patologías, como alergia a la proteína de la leche bovina (Infante y col., 2003; Haenlein, 2004) o intolerancia a la lactosa (Bevilacqua y col., 2001; Lara-Villoslada y col., 2004; Sanz Ceballos, 2007), problema que, de acuerdo a algunas estimaciones, lo sufre alrededor del 10% de la población mundial. Además, su consumo habitual ayuda a prevenir y tratar algunas enfermedades y dolencias habituales en nuestros días, tales como anemia (Alfárez y col., 2006), arteriosclerosis y osteoporosis.

Estudios en niños han demostrado que los resultados obtenidos en cuanto a ganancia de peso, aumento en la estatura, mineralización esquelética, densidad de hueso y contenido de vitaminas en sangre (vitamina A, niacina, tiamina y riboflavina) son superiores cuando se suministra una alimentación con leche de cabra (Chacón, 2005). No obstante, los pediatras no la recomiendan como sustituto total de la leche materna en niños menores de un año dado su alto nivel proteico y mineral, y por su bajo contenido de carbohidratos, ácido fólico y vitaminas B₆ y B₁₂ (Darnton y col., 1987).

2.6.1. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS

Una particularidad de la leche de cabra es la ausencia de caroteno, lo que le da su color completamente blanco (a diferencia de la vaca que el caroteno le confiere color a su grasa). El caroteno, precursor de la vitamina A, debe ser convertido por el organismo en la glándula tiroides. En la leche de cabra no encontramos caroteno sino directamente vitamina A completamente disponible para su asimilación, sin intervención de dicha glándula. Esto es muy importante en el caso de niños pequeños cuya actividad tiroidea no está totalmente desarrollada.

El fuerte olor y sabor que caracteriza la leche caprina se produce como consecuencia de la absorción de compuestos aromáticos durante su manejo. Sin embargo, estas características organolépticas poco atractivas desde el punto de vista del consumo humano, pueden eliminarse en gran parte por un sencillo tratamiento de desodorización al vacío (Borrás, 1968). Sin embargo, si la leche de cabra es manipulada adecuadamente no tiene por qué producirse ese característico olor de la misma que en muchas personas provoca rechazo, ya que los los ácidos grasos de cadena media se encuentran encapsulados dentro del glóbulo graso y las lipasas necesarias para liberarlos de los triglicéridos que los contienen se destruyen en el proceso de pasteurización. Además hay que añadir, que una vez rota la integridad de los glóbulos, la leche es más propensa a enranciarse (Chacón, 2005).

El sabor se debe, según Kim Ha y Lindsay (1991), a los ácidos grasos libres, especialmente a los de cadena ramificada 4-metiloctanoico y 4-etiloctanoico. También contribuyen al fuerte sabor de la leche caprina las mayores concentraciones de ácidos grasos caproico, caprílico y cáprico, de 6, 8 y 10 átomos de carbono respectivamente. Además, su mayor contenido con respecto a otras leches en Cl y minerales, le confieren un sabor ligeramente salobre.

Se diferencia de la leche de vaca en que ésta es ligeramente ácida, mientras que la de cabra es casi alcalina (pH 6,7), debido a su mayor contenido proteico y a las diferentes combinaciones de sus fosfatos (Saini y Gill, 1991), por lo que esta leche se utiliza en personas con problemas de acidez (Jandal, 1996).

La dieta caprina constituye un elemento clave en las características organolépticas de la leche. Diversos tipos de alimentos vegetales como especies de los géneros *Brassica sp.*, *Lupinus sp.*, *Verbena sp.*, *Xanthium sp.*, *Digital sp.*, *Eupatorium sp.*, *Capsella sp.*, así como diversas plantas aromáticas o la pulpa de la remolacha, comunican sabores extraños y poco atractivos a la leche (Arbiza, 1986).

2.6.2. COMPOSICIÓN DE LA LECHE DE CABRA

Los componentes de la leche de cabra son sintetizados desde precursores presentes en el plasma sanguíneo (glucosa, acetato, ácidos grasos no esterificados, etc.), que son captados por las células de la glándula mamaria y usados para la síntesis de los componentes de la leche, o como sustrato energético para dicha síntesis, según el estado nutricional del animal (Fehr y col., 1982).

La composición general de la leche de cabra varía dentro de un amplio margen dependiendo de las características genéticas propias de cada raza. Estas diferencias genéticas tienen una considerable influencia en la digestión de esta leche. Aún más, el estado y el momento de lactancia en que se hace el ordeño, así como la dieta del animal, su salud y su estado fisiológico general tiene un efecto directo sobre todos los constituyentes mayores y menores de la leche (Chacón, 2005).

De manera que el contenido graso puede variar desde un mínimo del 3,00% hasta un máximo de 6,63% la proteína desde un 2,90% hasta un 4,60%, la lactosa puede oscilar entre un 3.80-5.12% mientras que la caseína se altera menos por esos factores: 2.45-2.72% (Gnan y col., 1985; Espie y Mullan, 1990; Faria y col., 1999):

El efecto de la estación del año es multifactorial sobre la calidad nutricional de la leche pues en función de la estación suele variar la alimentación, el estado de preñez, el estado fisiológico del animal, etc. Por ello es difícil hablar de efectos aislados. Se encuentra documentado, el hecho de que los ácidos grasos C18:1, C18:2 y C18:3, suelen incrementarse en las épocas de verano, mientras que los ácidos grasos C:4 y C:16 se reducen significativamente en los países que experimentan las cuatro estaciones (Chacón, 2005).

En términos de composición, la etapa de lactancia es más importante en la leche de cabra (Samarzija y col., 2001) que en la de vaca.

Sin embargo, con total seguridad, es la dieta del animal la que incide en mayor medida sobre la composición de la leche, especialmente en su contenido proteico, graso y

vitamínico, además de condicionar las características organolépticas de la misma (Boza, 1992).

Sobre la proteína, los factores que ejercen mayor influencia son las características energéticas y nivel proteico de la dieta. Además también desempeña un papel importante la propia carga genética del animal, siendo la ausencia de degradación proteica en el rumen el factor que modifica principalmente el contenido proteico.

En cuanto al porcentaje de materia grasa y su composición, como ya se ha comentado, depende en gran medida de la dieta y carga genética del animal, así como de la naturaleza y composición de la dieta que recibe, puesto que ésta determina cambios en la fermentación ruminal, modificando la producción de los diferentes ácidos grasos y con ello el contenido graso de la leche. La modificación de la composición láctea en los rumiantes es más difícil que la de los animales monogástricos, debido al proceso de hidrogenación que sufre la grasa de piensos y forrajes en el rumen, incrementando el contenido de ácidos grasos saturados y reduciendo el de los esenciales en la leche. Las grasas “protegidas” suministradas en los piensos, salvan el obstáculo del rumen y parecen una buena estrategia para mejorar la calidad láctea, aumentando el contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), con marcados efectos beneficiosos en el metabolismo lipídico humano (Sanz-Sampelayo y col., 2004).

Así pues, las diferencias en la composición de las leches de vaca y cabra queda resumida en la siguiente tabla:

Tabla nº 14. Composición química de la leche de cabra en comparación con la de vaca (modificado de Sanz Ceballos y col., 2009).

	Leche cabra (%)	Leche vaca (%)	Diferencias para leche de cabra (%)
Sólidos totales	13.57	11.36	+16.3
Proteínas	3.48	2.82	+19.0
Grasa	5.23	3.42	+34.6
Cenizas	0.75	0.65	+13.3
Lactosa	4.11	4.47	- 8.8

2.6.2.1. PROTEÍNA Y AMINOÁCIDOS

Dado que la leche de cabra se destina en gran medida a la fabricación de queso, la proteína es el componente más importante desde un punto de vista tecnológico.

La fracción proteica de la leche caprina está ligada a la genética y no tanto a la alimentación del animal, ya que este macronutriente se modifica mucho de una raza a otra, debido a la gran variabilidad genética que caracteriza a la cabra (Martin, 1996).

En general, la composición y calidad proteica es similar en la leche de cabra y vaca, aunque algunos estudios han afirmado que la proteína caprina puede tener un mayor valor biológico que la vacuna (Belewu y Aiyegbusi, 2002). Sin embargo, y aunque la proporción caseínas/proteínas del lactosuero es también similar (80/20), las caseínas de la leche de cabra son más solubles y por tanto su absorción es mucho más fácil (Boza y Sanz-Sampelayo, 1997). Así pues, la mayor calidad de la proteína de la leche de cabra comparada con la leche de vaca quedó demostrada en un estudio realizado en ratas con resección parcial de intestino delgado, en el que se observó que los animales que consumieron dieta elaborada a base de leche de cabra tenían un índice de crecimiento superior, con una mejor utilización digestiva y metabólica de la proteína, que las que consumieron dieta basada en leche de vaca (López-Aliaga y col., 2003).

Según Boza y Sanz Sampelayo (1997), el contenido de Nitrógeno de la leche de cabra es de 5.2 g/Kg, lo cual representa 33.2 g de proteína. Los diferentes tipos de proteína que se pueden encontrar en la leche (ya sea de cabra o vaca) son: las proteínas coagulables, termorresistentes o caseínas que constituyen la fracción proteica mayoritaria y precipitan a un pH= 4.6; se distinguen tres tipos distintos: α -caseína, β -caseína y κ -caseína. Las proteínas que permanecen en solución a dicho pH son las proteínas hidrosolubles, termosensibles y no coagulables que forman parte del lactosuero: α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, albúmina, inmunoglobulinas, péptidos y otras proteínas menores, algunas con carácter enzimático; éstas se pierden en la elaboración del queso por el suero y se desnaturalizan por los tratamientos térmicos para la conservación de la leche.

Tabla nº 15. Fracción proteica de la leche de cabra (modificado de Sanz Ceballos y col., 2009).

	Leche cabra (g/100 g)	Leche vaca (g/100 g)	Diferencias para leche de cabra (%)
Caseína (Cn)	82.70	82.65	
α 1-Cn	18.92	30.80	- 62.8
α 2-Cn	8.52	7.50	
β + κ -Cn	55.26	44.35	+19.7
Proteínas Séricas	17.30	17.35	

La leche caprina tiene menos α 1-caseína que la leche de vaca (5% del total de proteínas en la cabra, frente al 35% de la vaca) (Martin, 1996) y más β -caseína y κ -caseína (Park, 2006). La α 1-caseína, proteína, que no está presente en la leche humana, es considerada uno de los principales alérgenos responsables de la alergia a la proteína de la leche de vaca (Bianca-María y col., 2001).

Algunos estudios prospectivos han estimado que la alergia a las proteínas de la leche de vaca afecta aproximadamente el 3-5% de los lactantes en países industrializados, aunque en nuestro país la incidencia puede ser algo más baja (García Ara y col., 2003). Infante y col., (2003) demostraron que una vez asegurada la tolerancia de estos pacientes a la proteína de la leche caprina, ésta constituye un excelente sustituto en el 25% de los niños de más de dos años de vida. Y según Haenlein (2004), en diversos estudios realizados en Francia así como en otros países, la sustitución de la leche de vaca por la de cabra produjo efectos positivos hasta en un 93% de los niños con alergia a la leche de vaca; lo cual pone de manifiesto que la leche de cabra es más tolerable y menos alérgica (Bevilacqua y col., 2001; Lara-Villoslada y col., 2004; Sanz Ceballos, 2007). La patología se produce como consecuencia de la generación de inmunoglobulinas E al entrar en contacto con las proteínas de la leche, especialmente en niños donde éstas suelen ser las primeras proteínas extrañas con las que tienen contacto. En este sentido las α -lactoalbúminas y β -lactoglobulinas que se encuentran en la fracción acuosa de la leche (el suero), son menos problemáticas ya que son alterables por la acción del calor, al ser termosensibles, y por lo tanto su poder alérgico se inactiva en productos tratados térmicamente como son las

leches en polvo o de larga duración pasteurizadas con un sistema de ultra alta temperatura a 100 °C durante 10 segundos por UHT; sin embargo, las caseínas son termoestables a los tratamientos estándar, y por lo tanto las personas sensibles a ellas reaccionarán ante cualquier producto que las contengan aunque haya sido tratado térmicamente (Chacón, 2005).

El menor contenido de α 1-caseína que caracteriza a la leche de cabra, puede contribuir al mayor valor nutritivo de la proteína de la misma, ya que el tamaño de los conjuntos de caseínas o micelas es más pequeño en la leche de cabra (50 nm) respecto a la vaca (75 nm) reduciendo el tiempo de coagulación, de manera que son más fácilmente degradadas por las proteasas mejorando el aprovechamiento de la proteína a nivel digestivo (Park, 1994; Haenlein, 2004; Park, 2006; Haenlein, 2007).

Las caseínas de la leche de cabra se caracterizan por contener más glicina, así como menos arginina y aminoácidos sulfurados, especialmente metionina (Chacón, 2005).

Seis de los 10 aminoácidos esenciales se encuentran en cantidades superiores en la leche de cabra *vs.* vaca (Haelein, 2004). Cabe destacar el alto contenido de lisina de la leche de cabra a pesar de tener menor cantidad de α 1-caseína (Sanz Ceballos, 2007).

De acuerdo con Chandan y col. (1992), la concentración enzimática en las leches de cabra y vaca son bastante diferentes. La actividad proteolítica de la leche de cabra fresca es más alta que la de vaca, mientras que la actividad xantina-oxidasa (XO) es un 10% menor en la leche de cabra. La lipólisis de la leche de cabra es muy diferente a la de vaca, generándose en aquella ácidos grasos libres y productos aromáticos característicos, debidos a la distribución de la lipoprotein-lipasa (LPL) en varias de sus fracciones.

2.6.2.2. HIDRATOS DE CARBONO

En cualquier leche el hidrato de carbono mayoritario es la lactosa (4,7-4,8%).

Antes de ser absorbido por el intestino delgado y pasar a la sangre, este disacárido tiene que descomponerse en azúcares simples (glucosa y galactosa). Este paso se realiza en la superficie de las células de la mucosa intestinal por medio de una enzima llamada lactasa,

que determina la capacidad de digestión de la leche. Si existe una insuficiencia de lactasa, el azúcar de la leche se acumula en el intestino, fermenta y produce gas, más tarde será evacuada mediante deposiciones líquidas (diarrea), debido al aumento en la luz intestinal de este disacárido osmóticamente activo. Así, valores bajos de lactasa se asocian a la intolerancia láctea (Ganong, 2004).

El contenido de lactosa en la leche de cabra es bajo en comparación con la leche de otras especies animales (aproximadamente de 1% a 13% menos que la de vaca y hasta 41% menos que la humana), lo cual está directamente relacionado con que esta leche presente menos problemas asociados con la intolerancia (Chacón, 2005).

Debido a la ya mencionada digestibilidad de la leche caprina, en el proceso digestivo experimenta un menor tiempo de tránsito gástrico, de manera que la liberación de nutrientes desde el estómago al intestino se realiza a un ritmo más adecuado facilitando la digestión de la lactosa (Boza y Sanz Sampelayo, 1997).

Una diferencia muy importante en la composición glucídica de la leche de cabra y vaca reside en los oligosacáridos: la leche de vaca solo contiene trazas de estos compuestos, mientras que en la de cabra se encuentran concentraciones 10 veces superiores. Además, los oligosacáridos caprinos se caracterizan por su gran variabilidad estructural, lo que hace que la leche de cabra sea la más semejante a la leche materna (Martínez-Férez, 2006). Esta similitud sugiere que estos compuestos podrían tener una bioactividad similar. En este sentido, se ha demostrado *in vitro* que los oligosacáridos de la leche de cabra inducen la maduración del epitelio intestinal, ya que favorecen la diferenciación de células Caco-2 (Martínez-Férez, 2004).

Otra característica importante del componente glucídico de la leche de cabra es su elevado contenido en galactosa, muy importante para el desarrollo cerebral en las primeras etapas de vida (Martínez-Férez, 2004).

2.6.2.3. LÍPIDOS

El contenido graso de la leche de cabra es superior al de vaca (4,14% *vs.* 3,34%), similar al de la leche humana (4,38%) e inferior al de la leche de oveja (7,00%) (Boza y Sanz Sampelayo, 1997).

Los glóbulos grasos que forma la emulsión lipídica están formados principalmente por un núcleo de triglicéridos, rodeado de una capa externa constituida por lípidos polares (principalmente fosfolípidos) y proteínas. Una característica de la leche de cabra es el pequeño tamaño de estos glóbulos grasos comparados con el de los glóbulos en la leche de vaca (2 μm en la leche de cabra y un promedio de 3-5 μm en la de vaca), además, la leche caprina, no contiene aglutinina, proteína encargada de agrupar los glóbulos grasos para formar estructuras de mayor tamaño, por esta razón sus glóbulos están más dispersos, son atacados más fácilmente por la enzimas digestivas (lipasas) y por lo tanto la velocidad de digestión es mayor (Chacón, 2005).

Esta mejor digestibilidad de la grasa de la leche de cabra se debe igualmente a la elevada cantidad de la enzima lipoprotein-lipasa (LPL) presente también en la leche de vaca. Esta enzima juega un papel crucial en la lipólisis espontánea de la leche (hidrólisis de triglicéridos, principalmente en posición 3, para producir ácidos grasos libres). En el caso de la leche de vaca, la LPL se encuentra ligada a las moléculas de caseína, mientras que en la leche de cabra está más ligada a los glóbulos de grasa, facilitando la hidrólisis. Esta es la razón por la cual la leche de cabra presenta mayor porcentaje de ácidos grasos libres (0.6% del total de grasa frente al 0.4% en la leche de vaca), lo que también contribuye a su mayor digestibilidad (Chilliard, 1996).

La leche de cabra es más saludable que la de otros rumiantes, en gran medida, gracias a su perfil de ácidos grasos (Haelein, 2004). Una de las principales diferencias en la composición lipídica de las leches de cabra y vaca está en el tipo de ácidos grasos que componen los triglicéridos. En la leche de cabra el porcentaje de ácidos grasos de cadena media (C6:0 caproico, C8:0 caprílico, C10:0 cáprico) es superior al de la leche de vaca (en un 46%). Así, la leche de cabra es más rica en triglicéridos de cadena media (MCT). Estos triglicéridos son una fuente de energía rápida, ya que se absorben directamente en el intestino delgado proximal y no necesitan la participación de las sales biliares para su

absorción. Por ello son muy útiles en dietas para pacientes con insuficiencia pancreática, fibrosis quística, déficit o ausencia de sales biliares, hepatitis crónica o neonatal, cirrosis biliar o alcohólica, ictericia obstructiva e hiperlipoproteinemia (Boza y Sanz Sampelayo, 1997). Además, la oxidación mitocondrial de los ácidos grasos de cadena media es, en parte, independiente de los niveles de carnitina, lo cual supone una ventaja en casos de déficits de este enzima (Odle, 1997). Debido a su rápida absorción, los MCT han sido utilizados en la prevención de la obesidad. Los ácidos grasos derivados de estos triglicéridos son rápidamente oxidados en el hígado, por lo que estimulan la saciedad de forma rápida, disminuyen los depósitos de grasa y facilitan el control de peso, sin modificar el aporte energético (St-Onge y Jones 2002).

En un estudio realizado en ratas con resección intestinal del 50% de intestino delgado distal, la utilización digestiva de la grasa fue mayor en los animales que consumieron dieta elaborada a base de leche de cabra (rica en MCT), con respecto a los que consumían dieta basada en leche de vaca (Alfárez y col., 2001).

La leche de cabra excede a la de vaca en la cantidad de ácidos grasos esenciales que no son sintetizados por el organismo humano como el linoleico, linolénico, araquidónico que también presentan beneficios para la salud humana (Haelein, 2004), lo cual es muy valioso en términos de la aceptación de este alimento debido a la creciente preocupación por la nutrición. Se ha demostrado que la leche de cabra es un alimento cardiosaludable, ya que reduce los niveles de LDL-colesterol, manteniendo dentro del rango fisiológico los niveles de triglicéridos, HDL-colesterol y transaminasas (GOT y GPT) (López-Aliaga y col., 2005). Varios estudios han investigado, los posibles efectos del ácido linoleico conjugado (CLA) sobre la salud humana, sus propiedades están relacionadas con isómeros específicos, con propiedades anticancerígenas (Ip y col., 1999), antiaterogénicas, (McGuire y McGuire, 2000) y antidiabéticas (tipo II) (Ryder y col., 2001), alterando la división de sustancia nutritiva y el metabolismo lipídico (Park y col., 1999), reduciendo la hiperglucemia, con modulación inmune y mejora de la mineralización de hueso (McGuire y McGuire, 2000; Pariza y col., 2001). El contenido de CLA está muy relacionado con la dieta del animal.

2.6.2.4. MINERALES

La composición mineral de las leches de cabra y vaca no presenta grandes diferencias (Haenlein, 2001). Sin embargo, es destacable la mayor cantidad de Ca, P, K, Mg y Cl, y la menor de Na y S, de la leche de cabra respecto a la de vaca (Park, 2006). Asimismo, existen estudios científicos que demuestran que la biodisponibilidad de ciertos minerales si es diferente, siendo mucho más ventajosa en la leche de cabra (Gueguen, 1996). La composición mineral de la leche depende de la especie animal y de la alimentación proporcionada.

Tabla nº 16. Contenido mineral de la leche de cabra (modificado de Sanz Ceballos y col., 2009).

	Leche cabra (g/100 g)	Leche vaca (g/100 g)	Diferencias para leche de cabra (%)
Ca	158.57	113.58	+28.4
P	118.97	87.04	+26.8
Mg	12.92	9.40	+27.2
Fe	0.15	0.09	+40.0
Cu	0.042	0.014	+66.6
Zn	0.528	0.463	+12.3

La leche de cabra contiene una cantidad de Fe ligeramente superior a la de vaca, sin embargo, la biodisponibilidad de este elemento es mucho mayor en la primera. En un estudio realizado por López-Aliaga y col., (2000), la utilización digestiva del Fe y Ca, así como el depósito en órganos diana fue superior en los animales que ingirieron dietas basadas en leche de cabra, lo cual sugiere que la leche de cabra minimiza las interacciones Fe-Ca, y por tanto, favorece su metabolismo. Además, Alférez y col., (2006) estudiaron el efecto de la leche de cabra comparativamente a la de vaca en ratas con anemia ferropénica nutricional inducida, concluyendo que el Fe presente en la leche de cabra favorece su depósito en órganos diana y la vuelta a la normalidad de los parámetros hematológicos alterados como consecuencia de la anemia ferropénica nutricional. El efecto beneficioso de

la leche de cabra sobre la utilización digestiva de Fe puede deberse a varios factores nutricionales que se encuentran en la leche de cabra en mayor proporción como son: la cisteína y la lisina, por la solubilización de Fe ferroso o férrico formando quelatos tridentados, son el principal factor asociado con una mayor absorción del metal (Van Campen, 1973). Por otra parte, el mayor contenido de ácido ascórbico (vitamina C) en la leche de cabra, contribuye a aumentar la absorción de Fe en las ratas alimentadas con dieta elaborada con leche de cabra, ya que es conocido que la vitamina C forma un quelato con este mineral que permanece soluble a un pH más alto del intestino delgado (Czajka-Narins, 1998).

Comparativamente, la leche de cabra aporta un 13% más de Ca que la leche de vaca (Chacón, 2006), a lo que hay que añadir que la leche de cabra favorece la absorción del Ca debido a su mayor contenido en Vitamina D (Alfárez y col., 1996) y lisina, aminoácido que parece estar relacionado con el transporte pasivo de Ca (Díaz-Castro, 2007).

Además, la leche de cabra tiene un alto contenido en MCT frente a la leche de vaca que, según Tappenden y col. (1997), favorece el transporte de nutrientes a través de la membrana basolateral del enterocito, por una más rápida utilización de la energía disponible a partir de esos triglicéridos de cadena media.

Dado su contenido en P (en forma de fosfatos), la leche de cabra es un alimento altamente recomendable en individuos que presentan una dieta vegetariana ya que es habitual que en estas personas se produzcan deficiencias de este mineral. Además, el P, contribuye, junto con las proteínas, a la alta capacidad buffer de la leche de cabra, de ahí su utilidad en úlceras gástricas, especialmente cuando la constante irritación causada por la acción de los jugos gástricos es dañina para el revestimiento del tracto digestivo (Chacón, 2005).

El Ca y el P se encuentran en proporciones óptimas para su absorción, Campos y col. (2003) demostraron que el consumo de leche de cabra en ratas con resección intestinal mejoraba la absorción de de estos minerales, así como su destino metabólico en los órganos diana.

La leche de la cabra contiene Se en una cantidad similar a la leche materna (13,3 μL vs. 15,2 μL) y muy superior a la leche de vaca (9,5 μL). Este mineral se caracteriza por su acción antioxidante (USDA, 2004) puesto que actúa como cofactor de la enzima glutatión peroxidasa, implicada en los procesos de eliminación de radicales libres del organismo. Así pues, el aporte de Se es muy importante no sólo porque suele ser deficiente en el cuerpo humano, si no porque ayuda a controlar el sistema inmunológico y actúa directamente sobre ciertos virus impidiendo su multiplicación. El Se se vincula más con la parte acuosa que con la fracción grasa de la leche, pues en la leche descremada queda el 94% del Se total, del cual un 69% se asocia con la fracción de caseína (Dael y col., 1992).

2.6.2.5. VITAMINAS

La leche de cabra contiene niveles más altos de vitaminas del grupo B que la leche de vaca, a excepción de las vitaminas B₆ y B₁₂ que están en menor cantidad (Jaubert y Kalantzopoulos, 1996). El contenido en vitamina D y ácido nicotínico también es superior en la leche de cabra.

La leche de cabra provee aproximadamente el doble de vitamina A que la leche de vaca. El alto contenido de esta vitamina, explica la ausencia de carotenoides en la leche de cabra, pues todos estos se encuentran ya como vitamina A. A esto se suma el hecho de que la leche de cabra es muy rica en riboflavina, importante como factor del crecimiento (Chacón, 2005).

El principal inconveniente de la leche de cabra es su bajo contenido en ácido fólico (vitamina B₉) en comparación con el de la leche de vaca y la humana. Algunos casos descritos de anemia megaloblástica (patología asociada al déficit de esta vitamina) en niños de 3 a 12 meses alimentados exclusivamente con leche de cabra, fue una de las razones del descrédito que sufrió la leche caprina en los años 60 y 70 (Sullivan y col., 1966). Esta carencia se debe a una glicoproteína que presenta la capacidad de unir ácido fólico y que no se encuentra en la leche de vaca (Chandan y col., 1992). Esta patología responde muy bien al tratamiento con ácido fólico. Trabajos experimentales han demostrado que la fortificación de la leche de cabra con ácido fólico no solo eleva su nivel nutricional si no que debería ser un estándar cuando esta leche se destina a dietas infantiles (Maree, 1978; Chacón, 2005).

Tabla n° 17. Composición vitamínica de las leches de cabra y vaca (modificado de Chandan y col., 1992; O'Connor, 1994).

Vitaminas	Leche de cabra	Leche de vaca
A, UI/L	2030.0	1260.0
D, µg/L	0.6	0.3
E, mg/L	0.3	1.0
K, µg/L	12.0	-
B₁, mg/L	0.5	0.1
B₂, mg/L	1.4	1.4
Niacina, mg/L	2.7	0.8
Ácido Ascórbico, mg/L	21.0	15.6
Ácido pantoténico, mg/L	3.1	3.0
B₆, mg/L	0.5	0.7
B₁₂, µg/L	0.7	3.5
Ácido fólico, µg/L	6.0	50.0
Colina, mg/L	119.9	120.0
Inositol, mg/L	110.5	109.3

2.6.2.6. FACTORES BIOACTIVOS

Las poliaminas (espermidina, espermina y putrescina) son compuestos nitrogenados presentes en la leche de diferentes mamíferos que parecen jugar un papel importante en el desarrollo intestinal de los neonatos de distintas especies; su concentración en la leche varía en función del periodo de lactancia, probablemente debido a una adaptación de las necesidades del neonato (Ploszaj y col., 1997). En la leche de vaca, la concentración de espermina y espermidina es máxima en el calostro, debido a que la capacidad de síntesis es máxima; durante el primer mes de lactancia, la concentración de estas sustancias disminuye y permanece baja hasta el final de la lactancia. Mientras que en la leche de cabra permanece estable durante todo el periodo de lactación (a excepción de la putrescina que disminuye durante las primeras semanas) y siempre los niveles son superiores a los de la leche de vaca

(Ploszaj y col., 1997). Este patrón de secreción es parecido al que ocurre en la leche humana.

La mayor concentración de poliaminas se ha relacionado con la reducción del riesgo de padecer alergias alimentarias, ya que al favorecer la maduración intestinal, dificultan el paso de alérgenos alimentarios. En este sentido, diferentes estudios sugieren que el menor riesgo de padecer este tipo de reacciones alérgicas en niños amamantados podría explicarse, al menos parcialmente, por la mayor concentración de espermina y espermidina en la leche humana, comparada con las fórmulas infantiles disponibles en el mercado (Dandriofosse y col., 2000).

La leche de cabra también es más rica en nucleótidos. Al contrario de lo que ocurre con las poliaminas, el patrón de secreción de nucleótidos es muy similar en las leches caprina y bovina. En el calostro, la concentración es máxima, y a partir de las primeras semanas, disminuye. Sin embargo, el contenido en nucleótidos totales es siempre mayor en la leche de cabra. La leche de vaca sólo es más rica en ácido orótico (73 mg/L) (Belitz y Grosch, 1997), producto intermedio de la biosíntesis de los nucleótidos de pirimidina asociado con el síndrome del hígado graso, del que solo existen trazas en la leche humana (Jauber, 1996).

La leche de cabra es particularmente rica en la Coenzima Q, por lo que también se le ha atribuido cierta actividad anticancerígena (Chacón, 2005).

Otros factores bioactivos presentes en cantidades traza se recogen en la siguiente tabla:

Tabla n° 18. Factores bioactivos presentes en la leche de cabra (Chacón, 2005).

FACTOR BIOACTIVO	FUNCIONALIDAD
β-linfocitos	Producción de anticuerpos
Macrófagos	Respuesta inmune
Neutrófilos	Respuesta inmune
T-linfocitos	Respuesta inmune
Anticuerpos IgA/IgG	Respuesta inmune
Proteína ligante de B₁₂	Reduce la vitamina B12 en colon evitando así crecimientos bacterianos indeseables
Factor Bifidum	Promueve el desarrollo de bifidobacterium en colon
Fibronectina	Favorece a los macrófagos
Gama Interferón	Favorece a los macrófagos
Lisozima	Ruptura de paredes celulares microbianas
Mucinas y oligosacáridos	Probióticos
Hormonas y factores de crecimiento	Estímulo del sistema digestivo y del crecimiento



3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

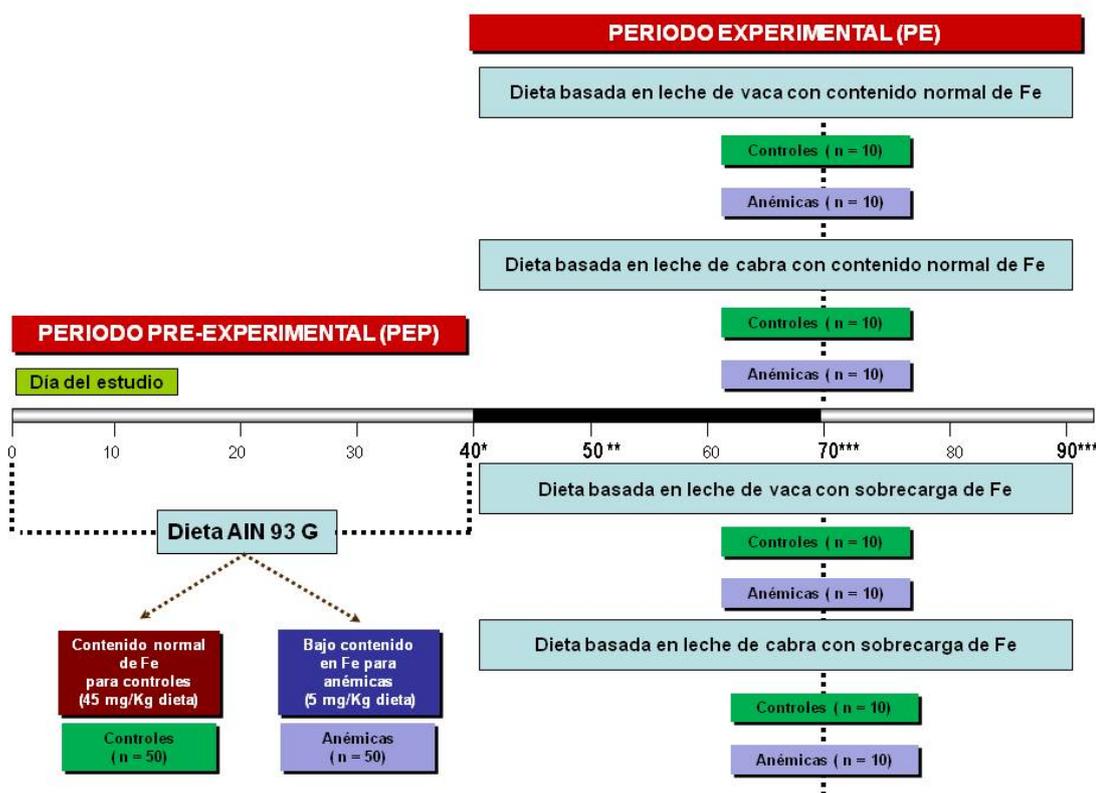
Se han empleado 100 ratas macho (*Ratus norvegicus*, raza Wistar albina) recién destetadas, procedentes del Servicio de Animales de Laboratorio de la Universidad de Granada. Los protocolos de manejo, cuidado y sacrificio de animales empleados fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de Granada y de acuerdo con las directrices comunitarias de la Unión Europea.

Tras el destete, las ratas son divididas en dos grupos experimentales. La ferropdeficiencia es inducida en uno de ellos por la técnica desarrollada previamente por nuestro grupo de investigación (Pallarés y col., 1993): los animales son sometidos a un periodo pre-experimental (PPE) de 40 días, en los cuales se les suministra dieta estándar IAN-93G (Reeves y col., 1993), pero con bajo contenido en Fe (5 mg Fe/kg dieta). La dieta baja en Fe utilizada para inducir la anemia se obtiene omitiendo el Fe del suplemento mineral de la dieta. El grupo control recibe la misma dieta, pero con un contenido normal en Fe (45 mg Fe/kg dieta) (Reeves y col., 1993). El último día del PPE, se separan 10 ratas por grupo, se someten a un ayuno de 12 horas y posteriormente, son 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 son desangrados por canulación de la aorta abdominal y se procede a la extracción del fémur y esternón. También se toman muestras de sangre periférica de la vena caudal para el control hematológico de la anemia y se evalúa el remodelado óseo en todos los animales, determinando los marcadores del mismo (25-OH vitamina D, PTH, Rat/Mouse PINP como marcador de osteogénesis y RatLaps, RatTRAP, como marcadores de osteoclasia) en ambos grupos de animales al final del PPE.

Tras el PPE, las ratas se someten a un periodo experimental (PE) en el cual, controles y anémicas son divididas en cuatro subgrupos, alimentados durante 50 días con 4 tipos diferentes de dieta: basadas en leche de cabra o vaca con contenido normal (45 mg/kg dieta) o sobrecarga de Fe (450 mg/kg dieta). La dosis de 450 mg Fe/kg dieta es la más común para inducir la sobrecarga crónica de Fe en estudios animales (Raja y col., 1994). Durante el PE, los animales son sacrificados del mismo modo que en el periodo

anterior para la extracción del fémur y esternón (día 70 y 90 del estudio). El remodelado óseo, se determina (en los días 50, 70 y 90 del estudio) estudiando los marcadores mencionados en el PPE. La figura 31 muestra el diseño experimental del estudio.

Figura n° 31. Diseño experimental del estudio.



* Toma de sangre de vena caudal, determinación de parámetros de remodelado óseo y sacrificio de 10 animales por grupo para extracción de fémur y esternón.

** Determinación de parámetros de remodelado óseo.

*** Determinación de parámetros de remodelado óseo y sacrificio para extracción de fémur y esternón.

Desde el comienzo del estudio, las ratas se alojan en células individuales de metabolismo con recogida separada de heces y orina. Estas células se encuentran situadas 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 está disponible “*ad libitum*”, mientras que la ingesta de alimento se controla, de manera que los animales ingieren 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.

3.2 DIETAS ENSAYADAS

La tabla 19 muestra la composición de las dietas ensayadas durante el PEP y PE.

Tabla nº 19. Dietas ensayadas durante el PPE y PE.

Componente	Cantidad (g/kg)
PPE	
Dieta IAN 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
PE	
Dietas con leche de vaca (contenido normal o sobrecarga de Fe)^c	
Proteína de leche de vaca	200
Lactosa de leche de vaca	353
Grasa de leche de vaca	100
Almidón de trigo	148
Ingredientes constantes ^b	199
Dietas con leche de cabra (contenido normal o sobrecarga de Fe)^c	
Proteína de leche de cabra	200
Lactosa de leche de cabra	341
Grasa de leche de cabra	100
Almidón de trigo	160
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 se preparó de acuerdo a las directrices del Instituto Americano de nutrición (Reeves y col., 1993). El corrector mineral se reparó de acuerdo a las recomendaciones del Instituto Americano de Nutrición (Reeves y col., 1993) para las dietas en el PPE y para las dietas basadas en leche de cabra y vaca empleadas en el PE se formularon correctores minerales específicos teniendo en cuenta el contenido mineral que aportaban las leches para alcanzar dichas recomendaciones.

^c Las dietas se prepararon de acuerdo a las recomendaciones del del Instituto Americano de Nutrición (Reeves y col., 1993) para los grupos control (45 mg/kg dieta) y con elevado contenido en Fe (450 mg/kg dieta) para los grupos de sobrecarga.

Durante el PPE las ratas se alimentaron con la dieta estándar IAN 93-G, los suplementos minerales y vitamínicos son preparados de acuerdo a las recomendaciones del Instituto Americano de Nutrición (Reeves y col., 1993), pero con ligeras modificaciones en la fuente y nivel de grasa: ésta 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) siendo la proporción de grasa del 10% en lugar del 7%. Se emplea caseína como fuente proteica y el Fe se aporta como citrato férrico. El contenido en este mineral obtenido por análisis en las dietas ensayadas durante el PPE es: 44,71 mg/kg en la dieta para los animales controles y 6,31 mg/kg en la dieta que recibieron las ratas anémicas.

Las dietas usadas en el PE se elaboran con leche en polvo desnatada de vaca (raza Holstein) o cabra (raza Murciano-granadina). Se toman las cantidades necesarias de leche en polvo de cabra o vaca para obtener una dieta con un 20% de proteína cogiendo 553,71 g/kg dieta de leche de cabra y 570,13 g/kg dieta de leche de vaca. Puesto que el contenido de grasa en la dieta era indetectable (<0,01%, debido a que se trata de leches desnatadas), ésta se añade para conseguir una dieta con un 10% de grasa. La grasa se obtuvo por purificación de nata o mantequilla (de cabra o vaca, respectivamente). Ambos tipos se funden al baño maría y posteriormente se centrifugan a 300 g (Hetticj, Universal 30 RF, Germany) durante 15 min a 4 °C, para separar el sobrenadante que constituye la grasa pura.

El contenido en Fe, Ca y P (mg/kg dieta) en las dietas ensayadas durante el PE, es el siguiente:

Tabla nº 20. Contenido mineral de las dietas ensayadas durante el PE.

	Contenido normal en Fe		Sobrecarga de Fe	
	Vaca	Cabra	Vaca	Cabra
Fe	39,6	40,5	481,87	476,44
Ca	5146	5136	5100	5093
P	3217	3067	3181	3105

3.3. TÉCNICAS ANÁLITICAS

3.3.1. 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. La materia seca se determina en las distintas dietas ensayadas, heces, orina y en los órganos objeto de estudio.

3.3.2. MATERIA GRASA

El contenido graso de las leches y las dietas se determina tras hidrólisis hidroclicónica por extracción con éter de petróleo (Sanderson, 1986).

3.3.3. CONTENIDO PROTEICO

El contenido en nitrógeno de las leches y dietas se determina por el método Kjeldahl usando un factor de conversión de 6.25 para la dieta estándar y 6.38 para la proteína aportada por las leches en polvo y las dietas basadas en leche (Kjeldahl, 1883).

3.3.4. MINERALIZACIÓN POR VÍA HÚMEDA

Un gramo de muestra en sustancia seca en el caso de las dietas o el hueso completo se colocan en un vaso de precipitado, se añaden 10-12 mL de ácido nítrico concentrado (riqueza del 69%) y se tapa con un vidrio de reloj. Se coloca en un baño de arena SELECTA (Selecta, Barcelona, España) a una temperatura de $70-80^\circ\text{C}$ y se espera la aparición de vapores rojizos/anaranjados de óxido nítrico. Se añaden 2 mL de ácido nítrico (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) a la muestra, tantas veces como se 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 finalizada la mineralización, 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 obtenemos una solución transparente que emplearemos en la posterior determinación de minerales.

3.3.4.1. DETERMINACIÓN DE HIERRO Y CALCIO

Las concentraciones de Fe y Ca en dietas, fémur y esternón se determinan 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 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 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 ha realizado el trabajo.

3.3.4.2. DETERMINACIÓN DE FÓSFORO

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

3.3.5. RECUENTO DE HEMATIES, HEMOGLOBINA, HEMATOCRITO, VOLUMEN CORPUSCULAR MEDIO Y PLAQUETAS

Efectuado en el día 40 a partir de sangre periférica obtenida de la vena caudal y recogida en un tubo con EDTA, para el control de la anemia. Las determinaciones se han llevado a cabo con un autoanalizador hematológico SYSMEX KX-21 (Sysmex, Tokyo, Japan).

3.3.6. FERRITINA SÉRICA

Los niveles de ferritina sérica se determinan usando un sistema de quimioluminiscencia CHIRON DIAGNOSTICS ACS: 180 (Chiron Diagnostics Corporation, Norwood, MA, USA). La quimioluminiscencia es el fenómeno de emisión de radiación electromagnética, ultravioleta o visible, que se observa cuando una especie electrónicamente excitada, producida por una reacción química a temperatura ambiente regresa a su estado fundamental. En este caso la intensidad de emisión de luz es función de la concentración de la ferritina.

3.3.7. HIERRO SÉRICO, TIBC (CAPACIDAD TOTAL DE UNIÓN AL HIERRO) Y PORCENTAJE DE SATURACIÓN DE TRANSFERRINA

Para calcular la tasa de saturación de transferrina, primero se determina el TIBC colorimétricamente (capacidad total de fijación al Fe) y los niveles de Fe sérico enzimáticamente, usando un kit comercial SIGMA(iron and total iron-binding capacity) (Sigma Diagnostics, St. Louis, MI, USA). El porcentaje de saturación de la transferrina ha sido calculado usando la siguiente ecuación:

$$\text{Saturación de transferrina (\%)} = \text{concentración de Fe sérico } [\mu\text{g/l}] / \text{TIBC } [\mu\text{g/l}] \times 100$$

3.3.8. MARCADORES DE REMODELADO ÓSEO

Los marcadores determinados para evaluar el remodelado óseo son los más frecuentemente utilizados en estudios con ratas en la bibliografía consultada (Meyer y col., 1994; Holick y col., 1996; Melkko y col., 1996; Garnero y col., 2003; Seidlova-Wuttke y col., 2003; Alatalo y col., 2003).

3.3.8.1. 25-OH VITAMINA D

El kit 25-Hydroxy Vitamin D RIA de IDS (INMUNODIAGNOSTICS SYSTEMS LTD, BOLDON, UK) es un radioinmunoensayo de fase líquida destinado a la extracción y cuantificación de la 25-OH CC y otros metabolitos hidroxilados en suero o plasma. La adición de los reactivos de extracción a las muestras y calibradores provoca la precipitación de

proteínas séricas y permite extraer la 25-OH vitamina D. Después de centrifugar, se incuban alícuotas del sobrenadante con 25-OH vitamina D marcada con ^{125}I y un anticuerpo ovino de alta especificidad frente a la 25-OH vitamina D. Tras una breve incubación con Sac-Cel® (anti-IgG ovina unida a celulosa), seguida de centrifugación y decantación, se separa el trazador unido al anticuerpo del trazador libre. La radiactividad del complejo ligado es inversamente proporcional a la concentración de 25-OH vitamina D.

La concentración sérica de 25-OH vitamina D está considerada como la medida más fiable para valorar el estado general de la Vitamina-hormona D, y por tanto puede emplearse para determinar si el individuo objeto de estudio dispone de un aporte suficiente de ésta (Holick y col., 1996).

3.3.8.2. PARATHORMONA (PTH)

El Kit de ALPCO DIAGNOSTIC para PTH de rata ha sido validado para determinar esta hormona según el método descrito por Meyer y col., (1994). Se trata de un ensayo inmunoradiométrico (IRMA) para la medida de hormona paratiroidea de rata en el suero, el plasma o cultivos celulares. Se han purificado por cromatografía de alta afinidad dos anticuerpos de cabra diferentes para la región N-Terminal de n (1-34) de la PTH de rata. Uno de los anticuerpos es inmovilizado en esferas de plástico para secuestrar las moléculas de PTH y el otro anticuerpo es marcado radiactivamente para la detección.

La muestra que contiene PTH de rata se incuba simultáneamente con esferas recubiertas del anticuerpo y con el anticuerpo marcado con ^{125}I . Tanto la PTH intacta (1-84) y la PTH N-terminal (1-34) contenidas en la muestra se unen mediante una reacción inmunológica al anticuerpo inmovilizado y al anticuerpo marcado radiactivamente para formar un “complejo sándwich”:



Al final del periodo de incubación, las esferas se lavan para eliminar el exceso de anticuerpo marcado no unido y el resto de componentes. Posteriormente se determina la radiactividad del radioisótopo unido a la esfera en un contador gamma. La radiactividad del “complejo sándwich” es directamente proporcional a la cantidad de PTH en la muestra.

La cuantificación de las formas intactas biológicamente activas y N-Terminales de la PTH de rata con este equipo puede proporcionar una evaluación exacta y sensible de los cambios del hueso y el metabolismo mineral.

3.3.8.3. RAT/MOUSE PINP

El Rat/Mouse PINP es un método específico para determinar el propéptido aminoterminal del procolágeno tipo I liberado durante la síntesis del colágeno del hueso de rata/ratón. Se usa para conocer la tasa de formación de hueso en muestras de suero de rata/ratón, y en medios de cultivo de osteoblastos de rata/ratón.

La determinación se llevó a cabo mediante un kit de enzimoimmunoensayo de IDS (INMUNODIAGNOSTICS SYSTEMS LTD, BOLDON, UK) empleando anticuerpos policlonales anti-PINP de conejo adheridos a la superficie interna de los pocillos de poliestireno. Los patrones, controles y muestras, se adicionan a los pocillos seguidos de PINP marcado con biotina y la placa se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente antes de la aspiración y el lavado. Se adiciona la enzima (peroxidasa de rábano) marcada con avidina y ésta se une selectivamente al complejo de biotina. Tras el paso siguiente (lavado), el color se desarrolla usando un sustrato cromógeno (TMB). La absorbancia final se determina en un lector de microplacas, siendo la intensidad de color inversamente proporcional a la concentración de PINP.

El PINP es probablemente el marcador de formación ósea más específico y sensitivo (Melkko y col., 1996).

3.3.8.4. RATLAPS

El RatLaps está basado en la observación de los telopéptidos C-terminales (productos de la degradación del colágeno tipo I) liberados durante la acción osteoclástica. Mediante este kit es posible para medir estos productos de degradación en el suero de rata/ratón, en la orina y en medios de cultivo celulares de hueso (Garnero y col., 2003; Seidlova-Wuttke y col., 2003). La medida consiste en un enzimoimmunoensayo de IDS (INMUNODIAGNOSTICS SYSTEMS LTD, BOLDON, UK). Este kit está basado en la unión competitiva de un anticuerpo policlonal a los antígenos solubles de RatLaps EKSQDGGR o a los antígenos

insolubles Rat Laps. Durante un breve periodo de tiempo, el anticuerpo policlonal, se enfrenta a un péptido sintético que posee la secuencia (EKSQDGGR), específica para la porción C-terminal de las cadenas $\alpha 1$ del colágeno tipo I de rata. Durante el periodo de pre-incubación, la secuencia EKSQDGGR biotinilada es inmovilizada por unión a los pocillos recubiertos de estreptavidina. Posteriormente los pocillos se vacían y se lavan. Las muestras y los patrones son pipeteadas a los pocillos apropiados, seguido de una solución de anticuerpo primario (anticuerpo policlonal de conejo). Tras la primera incubación, los pocillos se vacían y se lavan. En la segunda incubación, se añade una solución de anticuerpo anti-conejo procedente de cabra conjugado con peroxidasa (anticuerpo secundario) y se une al anticuerpo policlonal de conejo. Tras el tercer lavado, se añade el sustrato cromógeno (TMB) y se detiene la reacción con ácido sulfúrico. Por último, se determina la absorbancia a 450 nm. La absorbancia está inversamente relacionada con la concentración de antígenos de RatLaps en la muestra.

3.3.8.5. RATTRAP

El RatTRAP es un método específico para la determinación de la actividad de TRACP 5b en muestras de suero de rata (Alatalo y col., 2003). El ensayo consiste en un kit comercial IDS (INMUNODIAGNOSTICS SYSTEMS LTD, BOLDON, UK), que emplea un anticuerpo monoclonal generado en baculovirus, usando Rat Trap C recombinante como antígeno. En este ensayo, el anticuerpo monoclonal es incubado en pocillos recubiertos de IgG anti-ratón. Tras el lavado, los controles y las muestras de suero se incuban en los pocillos y la actividad del TRACP 5b ligado, se determina con una sustancia cromógena que produce color. La reacción se detiene y la absorbancia se determina en un lector de microplacas, siendo la intensidad de color directamente proporcional a la actividad del TRACP 5b presente en la muestra.

Los valores de TRACP 5b en suero pueden ser usados para sustituir la determinación histológica del número de osteoclastos en hueso de rata (Alatalo y col., 2003; Rissanen y col., 2006).

3.3.9. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Los datos se presentan como valor medio \pm EEM. Para comprobar las diferencias entre grupos (controles *vs.* anémicas, y contenido normal de Fe *vs.* sobrecarga de Fe) se usa el test de la “*t de Student*” para muestras independientes. Se usa el análisis de la varianza (One-Way ANOVA) para comparar las diferentes dietas suministradas a los dos grupos de animales (controles y anémicas) durante el PE. Las medias individuales se compararon usando el test “*post hoc*” de Tukey, cuando los efectos principales y sus interacciones resultaban significativas. Los datos fueron analizados mediante three-way ANOVA para determinar los efectos de la anemia, tipo de dieta y sus interacciones (dieta x anemia, dieta x contenido de Fe, anemia x contenido de Fe, dieta x anemia x contenido de Fe). Las diferencias son consideradas significativas para todos los tratamientos estadísticos 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).



Resultados y
discusión

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ESTUDIO HEMATOLÓGICO EN SITUACIÓN DE ANEMIA FERROPÉNICA NUTRICIONAL INDUCIDA

Las ratas, tras consumir una dieta con bajo contenido de Fe (5 mg/Kg de dieta, PPE) durante 40 días, presentan un cuadro de anemia ferropénica severa con una concentración de hemoglobina media de $77,3 \pm 2,6$ g/L. Además, el hematocrito, el Fe sérico, ferritina sérica y la saturación de transferrina son bajos ($P < 0.001$) y los niveles de plaquetas y TIBC están marcadamente elevados ($P < 0.001$), debido a la depleción progresiva de Fe desde los depósitos corporales, mientras que en ratas controles que han consumido una dieta con un contenido de Fe de 45mg/Kg de dieta, establecido por el IAN (Reeves y col. 1993) todos los parámetros hematológicos estudiados (recuento de hematíes, VCM, hematocrito, plaquetas, hemoglobina, Fe sérico, ferritina sérica, porcentaje de saturación de transferrina y TIBC) están dentro de los límites normales para esta especie al comienzo y al final del periodo principal del experimento (tabla 21). Estos resultados eran esperados y consistentes con la anemia ferropénica severa inducida experimentalmente tras 40 días de deprivación de Fe en la dieta.

4.2. REMODELADO ÓSEO Y DESTINO METABÓLICO DE HIERRO, CALCIO Y FÓSFORO EN RATAS CON ANEMIA FERROPÉNICA (DÍA 40 DEL ESTUDIO)

Bajo nuestras condiciones experimentales, se observa un importante grado de osteomalacia inducida por la ferrodeficiencia, como se pone de manifiesto por los bajos niveles séricos del marcador de formación Rat/Mouse PINP encontrados en el grupo anémico ($P < 0.001$), junto con un acusado incremento en el marcador de resorción RatTRAP ($P < 0.001$) y parathormona ($P < 0.001$) (tabla 22). Varios mecanismos han sido propuestos como causantes de la pérdida de densidad mineral y resistencia mecánica ósea en el transcurso de la ferrodeficiencia, como se expone a continuación.

El Rat/Mouse PINP es, probablemente, el marcador más sensible del que se dispone en la actualidad para evaluar la formación ósea (Claudon y col., 2008). Durante la síntesis de colágeno tipo I, se liberan fragmentos peptídicos amino (PINP) y carboxiterminales (PICP)

de la molécula precursora (el pro-colágeno) y son liberados a la circulación (Risteli y Risteli, 2006). Los productos fraccionados de este proceso son el PICP y el PINP. Estas extensiones de péptidos de pro-colágeno tipo I reflejan la cantidad de matriz ósea sintetizada (Cons-Molina, 2003). En nuestro estudio, se ha encontrado un claro descenso ($P < 0.001$) ($6,16 \pm 0,20$ en controles *vs.* $4,48 \pm 0,28$ en anémicas) en este marcador de formación ósea en ratas anémicas al final del período pre-experimental (PPE), indicando que el *turnover* óseo ha sufrido un desequilibrio y que las ratas tienen un grado considerable de osteomalacia.

Los niveles séricos de PTH se encuentran elevados en el grupo ferrodeficiente ($P < 0.001$) ($12,98 \pm 0,51$ en controles *vs.* $17,64 \pm 1,16$ en anémicas), indicando un incremento del tráfico de Ca en el organismo, entre el compartimento óseo y el plasmático. De hecho, la disminución en los niveles séricos de Ca iónico son el estímulo para la secreción de la PTH, incrementándose sus niveles (Masuyama y col., 2000). Estudios previos demostraron que una disminución en la tasa de secreción de PTH conlleva un incremento en la utilización de Ca, por estar aumentada la absorción de dicho mineral (Calvo, 1994; Campos y col., 2007). Así, los mayores niveles de PTH en el día 40 del estudio, justifican la osteomalacia inducida por la anemia.

Por otra parte, Katsumata y col. (2006), encontraron una amplia reducción (56%) de la osteocalcina en ratas anémicas obtenidas en condiciones experimentales muy similares a las nuestras. Este resultado sugiere que la deficiencia de Fe en la dieta también podría disminuir la formación ósea mediante un descenso en la función osteoblástica. La osteocalcina es un péptido voluminoso sintetizado por los osteoblastos, se une a la hidroxiapatita y la mayor parte se incorpora a la matriz del hueso. Como los fragmentos de osteocalcina son liberados de la matriz durante la resorción, los ensayos para determinar la osteocalcina y sus fragmentos reflejan tanto formación como resorción (Cloos y Christgau, 2004). Además, la expresión de la osteocalcina está regulada por la $1,25\text{-(OH)}_2$ Vitamina D_3 , la forma activa de la hormona-vitamina D (Yoon y col., 1988; Theofan y Price, 1989). La conversión de vitamina D_3 a $1,25\text{-(OH)}_2$ Vitamina D_3 requiere dos pasos de hidroxilación en el hígado y en el riñón. La hidroxilación final de la vitamina D es Fe-dependiente, ya que requiere un sistema de tres componentes que implica una flavoproteína, una proteína sulfoférica y un citocromo P-450 (De Luca, 1976). Por tanto estas actividades enzimáticas Fe-dependientes, estarán disminuidas

como consecuencia de la ferropdeficiencia, produciendo una vez más pérdida de masa ósea durante la anemia.

Con respecto a los marcadores de resorción, los macrófagos activados y los osteoclastos en fase de resorción ósea expresan una alta cantidad de fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP o TRACP) (Yaziji y col., 1995). En sangre, circulan dos formas de TRACP: TRACP 5a y TRACP 5b (Lam y col., 1981). La TRACP 5b procede de los osteoclastos (juega un papel importante en la resorción ósea) y la TRACP 5a de macrófagos inflamatorios (Halleen y col., 2000; Janckila y col., 2002). Los osteoclastos secretan TRACP 5b al torrente sanguíneo como una enzima activa que posteriormente es inactivada y degradada a fragmentos más pequeños antes de ser eliminada de la circulación; de manera que la actividad de TRACP 5b no se acumula en caso de fracaso renal o hepático (Halleen y col., 2001; Hannon y col., 2004). Bajo nuestras condiciones experimentales, los niveles plasmáticos de RatTRAP (TRACP 5b) están elevados al final del periodo experimental en ratas ferropdeficientes ($P < 0.001$) ($0,51 \pm 0,01$ en controles *vs.* $0,72 \pm 0,08$ en anémicas), indicando, una vez más, un claro incremento en la resorción ósea. Éste es el único de los marcadores de remodelado que evalúa la actividad directa del osteoclasto, ya que el resto de los marcadores de resorción son indicadores del grado de destrucción de la matriz ósea (Cons-Molina, 2003).

El RatLaps determina los fragmentos C-terminales de colágeno tipo I, liberados a la circulación, procedentes de la degradación de la matriz orgánica del hueso. El hueso es un tejido conectivo que consiste esencialmente en una matriz extracelular mineralizada y células especializadas. El principal componente orgánico de la matriz es el colágeno tipo I, que supone alrededor del 90%; el 10% restante lo componen una serie de proteínas no estructurales de menor tamaño entre las que se encuentran la osteocalcina, osteonectina, algunas fosfoproteínas, sialoproteínas, factores de crecimiento y proteínas séricas (Ehrlich y Lanyon, 2002). También se ha observado un incremento no significativo de este marcador en el grupo anémico, parámetro que una vez más revela la tendencia a la resorción ósea en situación de ferropdeficiencia. El Fe es un cofactor esencial para la prolil y lisil hidroxilasa en la síntesis y maduración de colágeno, por tanto juega un papel fundamental en la matriz orgánica del hueso (Tunderman y col., 1977), así una disminución en la síntesis de colágeno inducida por la deficiencia de Fe, conduce inevitablemente a la pérdida de masa ósea.

A pesar de que es evidente un acusado grado de osteomalacia inducida por la anemia, es destacable que los valores de Rat/Mouse PINP y de RatLaps son bastante elevados en comparación a los periodos posteriores (figura 33 y 34), esto se debe a que las ratas se encuentran en una etapa de crecimiento activo muy elevado (Sisk y Zehr, 2005; McCutcheon y Marinelli, 2009).

Al final del PPE (día 40), el contenido de Ca y P en el fémur es significativamente menor para el grupo anémico ($P < 0.001$), mientras que no hubo diferencias en el esternón (tabla 26). Estos datos confirman los obtenidos en estudios previos de nuestro grupo de investigación, que encontraron un importante grado de desmineralización ósea causada por la ferodeficiencia, con el menor depósito de Ca en fémur de ratas anémicas (Campos y col., 2007). En este sentido, otros autores han indicado que la deficiencia de Fe conduce a una disminución de la densidad mineral y resistencia mecánica en ratas jóvenes (Medeiros y col., 1997; Medeiros y col., 2002; Medeiros y col., 2004). Por otra parte el depósito de Ca y P no se altera en el esternón de ratas ferodeficientes, pero como era de esperar por el consumo de una dieta con bajo contenido en Fe durante 40 días, se produjo una drástica disminución ($P < 0.001$) ($77,65 \pm 4,35$ en controles *vs.* $61,90 \pm 2,85$ en anémicas) en el contenido de Fe en esternón, hecho que incide de manera negativa en el proceso hematopoyético.

4.3. REMODELADO ÓSEO TRAS LA REPLECIÓN DE HIERRO DURANTE DIEZ DÍAS CON DIETAS BASADAS EN LECHE CON Y SIN SOBRECARGA DE HIERRO (DÍA 50 DEL ESTUDIO)

4.3.1. EFECTO DE LA ANEMIA

No se encuentra efecto de la anemia en los niveles séricos de 25 OH vitamina D, con ninguna de las dos dietas basadas en leche con contenido normal de Fe (tabla 23). Sin embargo, se observa un aumento de esta vitamina en animales anémicos que consumen dieta basada en leche de cabra con sobrecarga de Fe con respecto a sus controles ($P < 0.05$) ($77,14 \pm 5,58$ en controles *vs.* $97,72 \pm 6,08$ en anémicas), mientras que la dieta de leche de vaca con sobrecarga de Fe provoca una disminución significativa en animales anémicos, con respecto a sus controles ($P < 0.01$) ($97,00 \pm 4,08$ en controles *vs.* $80,84 \pm 3,21$ en anémicas). Es bien conocido que la tasa de absorción de Fe depende del status férrico del individuo, es decir, de los depósitos del organismo. Una baja cantidad de Fe en los depósitos corporales implica

una mayor tasa de absorción, así en situación de anemia ferropénica se incrementa considerablemente la absorción de Fe (Zlotkin, 2001; Nestares y col., 2008). Como se ha comprobado previamente, la mayor avidez por el Fe en los animales anémicos, junto con el incremento en la biodisponibilidad de dicho mineral que produce la leche de cabra da lugar a una mayor absorción de Fe (Alfárez y col., 2001; Alfárez y col., 2006; Campos y col., 2007; Nestares y col., 2008; Díaz-Castro y col., 2009), que estaría disponible como cofactor en los procesos de hidroxilación y por tanto en la síntesis de hormona-vitamina D (De Luca, 1976).

El Rat/Mouse PINP aumenta entre los animales anémicos en comparación a sus controles cuando se suministra la dieta basada en leche de cabra tanto con contenido normal de Fe ($P<0.05$) como con sobrecarga ($P<0.001$), sin embargo, este marcador de formación ósea no se modifica en animales con anemia ferropénica respecto a sus controles cuando consumen las dietas basadas en leche de vaca, tanto con contenido normal como con sobrecarga de Fe (tabla 23). Varios estudios de Medeiros y colaboradores en 1997, 2002, y 2004 han comprobado que el Fe ejerce su influencia en el hueso a través de la síntesis de colágeno. El Fe, como ya se ha mencionado, es un cofactor requerido para las enzimas prolil y lisil hidroxilasa, que catalizan la formación de los puentes cruzados en las fibras adyacentes de colágeno (Tunderman y col., 1977). Por tanto en la anemia, existe menos Fe disponible como cofactor de las actividades enzimáticas prolil y lisil hidroxilasa, lo cual conducirá a una disminución en los enlaces entre fibras de colágeno y por consiguiente debilidad de la matriz orgánica del hueso. El consumo de leche de cabra, mejora la biodisponibilidad de Fe (Alfárez y col., 2006; Nestares y col., 2008), lo cual favorecería las actividades enzimáticas implicadas en la síntesis de colágeno, mejorando la cohesión entre las fibras del mismo y por tanto incidiría de manera positiva en la formación ósea a la vista del incremento del Rat/Mouse PINP, índice que refleja la cantidad de matriz ósea sintetizada.

Es bien conocido por nuestro grupo de investigación el efecto beneficioso sobre el metabolismo mineral de la leche de cabra, que mejora la biodisponibilidad de Fe (Alfárez y col., 2006; Nestares y col., 2008), debido a varios factores nutricionales que se encuentran en la leche de cabra, como la solubilidad de su proteína (Boza y Sanz-Sampelayo, 1997) de origen animal (Sharp y col., 2003). Además, la calidad lipídica de la grasa es distinta: la leche de cabra es más rica en triglicéridos de cadena media (MCT) que la leche de vaca (36% frente al 21%) (Alfárez y col., 2001; Alfárez y col., 2006; Campos y col., 2007; Nestares y col., 2008; Díaz-Castro y col., 2009). Los MCT de la dieta son rápidamente absorbidos a nivel intestinal y

metabolizados para obtener energía (García-Unciti, 1996), lo cual contribuiría a incrementar la síntesis de proteínas transportadoras y por tanto la absorción de Fe.

El RatLaps se eleva ($P<0.05$) en los animales anémicos respecto a sus controles tras consumir la dieta basada en leche de cabra con contenido normal de Fe, indicando que existe cierto grado de resorción residual inducida por la anemia. En cambio, no existen diferencias en dicho parámetro entre los animales controles y anémicos que consumen la dieta basada en leche de vaca con contenido normal de Fe (tabla 23). El consumo de la dieta basada en leche de cabra ha comenzado a normalizar el proceso de remodelado, como ponen de manifiesto los parámetros de formación y resorción estudiados, lo que justificaría el mayor recambio encontrado respecto a la dieta basada en leche de vaca.

No existen diferencias significativas en el RatTRAP entre animales controles y anémicos que consumen ambas dietas basadas en leche, ya sea con contenido normal o sobrecarga de Fe, excepto en el grupo control que consume la dieta basada en leche de vaca con sobrecarga de Fe, donde se observa un acusado incremento de dicho marcador ($P<0.001$) (tabla 23). Esto pone de manifiesto que existe un proceso de resorción activo en el grupo alimentado con leche de vaca y que como indicaron Irie y col. (2000), existe una correlación funcional entre la actividad del RatTRAP en osteocitos y la osteolisis. En los osteoclastos, el TRACP 5b (RatTRAP) genera radicales libres, participando directamente en la resorción ósea (Hayman y Cox, 1994), para desfosforilar la osteopontina y la sialoproteína ósea, por tanto sirve como factor de separación para los osteoclastos (Ek-Rylander y col., 1994), que se movilizan hacia la zona de destrucción y, seguidamente, se adhieren a la superficie ósea mineralizada comenzando el proceso de resorción. Este efecto negativo en el proceso de *turnover* óseo no se observa cuando las ratas consumen dieta basada en leche cabra (figura 35), indicando una vez más un efecto positivo en el proceso de recuperación de osteomalacia inducida por la ferropenia.

Los resultados expresados para los dos parámetros de resorción estudiados, RatLaps y RatTRAP, podrían resultar contradictorios; sin embargo, las diferencias obtenidas son lógicas ya que el RatLaps mide los fragmentos de colágeno liberados durante la resorción mientras que el RatTRAP refleja la actividad de la enzima fosfatasa ácida tartrato resistente.

En cuanto a los niveles de PTH, no encontramos diferencias significativas entre grupos controles y ferodeficientes que consumen ambas dietas con sobrecarga de Fe, mientras que el suministro de las dietas con contenido normal produce una disminución de esta hormona en los animales anémicos que consumen la dieta basada en leche de cabra ($P<0.001$) ($28,48\pm 1,63$ en controles *vs.* $16,68\pm 1,72$ en anémicas) y un aumento en las ratas anémicas que consumen dieta basada en leche de vaca ($P<0.001$) ($16,96\pm 1,05$ en controles *vs.* $27,76\pm 2,60$ en anémicas) (tabla 23). La disminución de los niveles de PTH en ratas anémicas alimentadas con dieta basada en leche de cabra con contenido normal en Fe, indica un incremento en la utilización de Ca, consecuencia de la mayor absorción de dicho mineral, lo que coincide con resultados previos de nuestro grupo de investigación (Campos y col., 2007).

4.3.2. EFECTO DE LA SOBRECARGA DE HIERRO

La sobrecarga de Fe no induce cambios en los niveles de 25 OH vitamina D en ninguno de los grupos, excepto en animales anémicos que consumen dieta basada en leche de vaca, donde se produce una disminución ($P<0.05$) ($106,06\pm 10,06$ con contenido normal de Fe *vs.* $80,84\pm 3,21$ con sobrecarga de Fe). Esto se debe, como hemos comentado anteriormente, a que la anemia se recupera de manera menos eficiente con la leche de vaca (Alfárez y col., 2001; Alfárez y col., 2006; Campos y col., 2007; Nestares y col., 2008) conduciendo esta patología a una deficiencia moderada de vitamina D, ya que como ya hemos comentado, la conversión de colecalciferol a 1,25-(OH)₂-colecalciferol requiere dos pasos de hidroxilación en el hígado y el riñón, siendo el último paso dependiente de Fe (De Luca, 1976).

El Rat/Mouse PINP no se modifica por efecto de la sobrecarga de Fe en ninguno de los grupos experimentales, excepto en las ratas anémicas que consumen la dieta basada en leche cabra, donde se observa una disminución de dicho parámetro ($P<0.001$) ($5,10\pm 0,36$ con contenido normal de Fe *vs.* $2,12\pm 0,29$ con sobrecarga de Fe). Como se menciona a continuación, los niveles séricos de marcadores de resorción son mucho más bajos en animales anémicos alimentados con dieta basada en leche de cabra (figura 33B), de manera que el incremento del proceso resortivo en el hueso inducido por la anemia parece detenerse en este punto, debido a que el *turnover* óseo, que es un proceso dinámico y continuo, se mantiene mediante el incremento de los procesos de recambio encaminados a conservar la homeostasis. El remodelado mantiene la masa esquelética prácticamente invariable, por

tanto un incremento en la actividad osteoblástica conduce a un aumento proporcional de la actividad osteoclástica (Arnett y col., 2003; Arnett, 2004).

La sobrecarga de Fe en ratas controles que consumen dieta basada en leche de cabra conduce a un incremento en el RatLaps ($P<0.01$), mientras que en las anémicas no se observan diferencias. En ratas controles que consumen dieta elaborada con leche de vaca, no se observan diferencias por la sobrecarga de Fe, en cambio en las anémicas el RatLaps disminuye ($P<0.001$). En cuanto a los niveles séricos de RatTRAP, descienden por efecto de la sobrecarga de Fe en controles y anémicas que toman leche de cabra ($P<0.001$ para ambos grupos) y también en anémicas que toman leche de vaca ($P<0.001$), mientras que el RatTRAP se eleva en los controles que toman leche de vaca ($P<0.05$) (tabla 23). Este es el marcador de remodelado que evalúa la actividad directa del osteoclasto ya que el RatLaps indica el grado de destrucción de la matriz ósea (Cons-Molina, 2003). En los osteoclastos, el RatTRAP genera radicales libres, participando directamente en la resorción ósea (Hayman y Cox, 1994), por tanto en condiciones de sobrecarga de Fe el exceso de radicales libres catalizados por él incidirán de manera negativa en el proceso de *turnover* óseo, desequilibrándolo hacia la zona de resorción. Sin embargo, podemos afirmar a la vista de los resultados que la actividad osteoclástica y por tanto la resorción ósea es menor en ambos grupos de animales que consumen leche de cabra y en anémicas que consumen leche de vaca. Esto es debido a la mayor afección por el Fe que presentan los animales anémicos, de manera que habría menos Fe disponible para catalizar la formación de radicales libres, y junto con las características nutricionales beneficiosas de la leche de cabra que mejora la biodisponibilidad de minerales antioxidantes (Cu, Zn) protegerán frente a la generación de especies reactivas del oxígeno (Barrionuevo y col., 2002; Díaz-Castro y col., 2009).

La sobrecarga de Fe produce un claro descenso en los niveles de PTH en animales controles que consumen dieta basada en leche de cabra ($P<0.001$) ($28,48\pm 1,63$ con contenido normal de Fe *vs.* $14,16\pm 1,81$ con sobrecarga de Fe), mientras que en los alimentados con dieta basada en leche de vaca se observa un incremento ($P<0.05$) ($16,96\pm 1,05$ con contenido normal de Fe *vs.* $24,38\pm 2,54$ con sobrecarga de Fe). No se observan diferencias por efecto de la sobrecarga de Fe en animales anémicos. Los niveles séricos de Ca iónico son el principal estímulo para la secreción de la PTH (Masuyama y col., 2000). En estudios previos de nuestro grupo se ha comprobado que el consumo de leche de cabra induce un aumento del Ca iónico, disminuyéndose los niveles de PTH debido a una mejor utilización nutritiva del Ca

(Campos y col., 2007). La disminución de la PTH tras el consumo de leche de cabra incide de manera positiva en el proceso de mineralización ósea.

4.3.3. EFECTO DE LA DIETA

El consumo de las distintas dietas, tanto con contenido normal como con sobrecarga de Fe no produce cambios significativos en la 25 OH vitamina D en ninguno de los grupos experimentales (tabla 23). El suministro de las dietas durante 10 días, probablemente no ha sido suficiente para observar cambios en este parámetro.

No se observan diferencias en el Rat/Mouse PINP de animales controles que consumen ambas dietas tanto con contenido normal como con sobrecarga de Fe. Sin embargo, si se comparan los grupos ferodeficientes con contenido normal de Fe se observa que este parámetro de formación aumenta ($P < 0.001$) en los que consumen la dieta basada en leche de cabra con respecto a la vaca, hecho que no se observa entre los grupos que reciben dietas con sobrecarga de Fe (tabla 23). Estos resultados pueden ser debidos al hecho de que la leche de cabra mejora la utilización nutritiva de Fe y Ca, minimizando las interacciones entre ambos minerales (Barrionuevo y col., 2002; Campos y col., 2003). Como se ha mencionado anteriormente, el Fe es requerido para la síntesis de colágeno tipo I y la mejora de la utilización de ambos minerales incide de manera positiva en el proceso de formación ósea, ya que el Fe actuaría como cofactor en la síntesis de fibras de colágeno tipo I que sirven de soporte para la hidroxapatita, cuyo principal componente es el Ca. Estos cristales se incrustan en las fibras de colágeno para formar un material que reúne las características adecuadas de rigidez, flexibilidad y resistencia, actuando como reservorio de Ca que puede ser liberado en caso de necesidad (Ehrlich y Lanyon, 2002).

El consumo de leche de cabra mejora la biodisponibilidad de Fe (Alfárez y col., 2006) e incrementa la actividades enzimáticas de la prolil y lisil hidroxilasas, lo que favorece la cohesión entre fibras de colágeno y aumenta la formación de hueso, como ponen de manifiesto los mayores niveles del marcador de formación Rat/Mouse PINP, que refleja la cantidad de matriz ósea sintetizada.

En relación al marcador de resorción ósea RatLaps, no se observan diferencias por la dieta, excepto en ratas anémicas alimentadas con dieta basada en leche de cabra con

sobrecarga de Fe, donde se encuentra un aumento de este parámetro ($P<0.01$). El RatTRAP disminuye en animales controles que consumen dieta basada en leche de vaca en comparación con la de cabra ($P<0.001$), mientras que aumenta ($P<0.01$) en animales controles que consumen dieta basada en leche de vaca con sobrecarga de Fe. La PTH desciende ($P<0.001$) en animales controles que consumen dieta basada en leche de vaca con contenido normal en Fe, sin embargo se eleva en animales controles que consumen dieta basada en leche de vaca con sobrecarga de Fe ($P<0.05$). En cuanto a los animales anémicos, observamos un aumento de los niveles de PTH ($P<0.05$) en los alimentados con leche de vaca en comparación a los de leche de cabra con contenido normal de Fe. Cuando se suministran dietas con sobrecarga de Fe, no se observan diferencias significativas en los niveles de esta hormona (tabla 23).

En general, a la vista de los resultados obtenidos, este primer periodo experimental puede ser considerado como de transición, destacando que en los animales que consumen dieta basada en leche de cabra, ya ha comenzado a estabilizarse el proceso de remodelado óseo, si bien dado el escaso tiempo de suministro de las dietas, aún podemos observar cierto desajuste en los marcadores estudiados.

4.4. REMODELADO ÓSEO Y DESTINO METABÓLICO DE HIERRO, CALCIO Y FÓSFORO TRAS LA REPLECIÓN DE HIERRO DURANTE TREINTA Y CINCUENTA DÍAS CON DIETAS BASADAS EN LECHE CON Y SIN SOBRECARGA DE HIERRO (DÍA 70 Y 90 DEL ESTUDIO)

4.4.1. EFECTO DE LA ANEMIA

Los niveles de 25 OH vitamina D son significativamente más elevados en ratas anémicas que, durante 30 días (tabla 24), consumen la dieta basada en leche de cabra con contenido normal de Fe, respecto a sus controles ($P<0.01$) ($94,38\pm 4,86$ en controles *vs.* $111,00\pm 2,92$ en anémicas), en cambio estas diferencias no se observan cuando se suministra la misma dieta con sobrecarga de Fe o con la dieta basada en leche de vaca, ya sea con contenido normal o con sobrecarga de Fe. En el día 90 del estudio (tabla 25), no se modifican los niveles de 25 OH vitamina D por efecto de la anemia, cuando se suministra la dieta basada en leche de cabra, ya sea con contenido normal o con sobrecarga de Fe, mientras que son significativamente mayores en ratas anémicas que consumen dieta basada en leche de vaca con sobrecarga de Fe ($P<0.001$) ($38,43\pm 9,27$ en controles *vs.* $89,50\pm 4,39$ en anémicas).

Transcurridos 30 días del consumo de las dietas basadas en leche (día 70 del estudio), con contenido normal o sobrecarga de Fe, el marcador de formación ósea Rat/Mouse PINP no presenta diferencias en los distintos grupos experimentales, poniendo de manifiesto que la osteomalacia inducida por la anemia ferropénica está prácticamente recuperada, si bien el proceso de estabilización del *turnover* comenzó antes en los animales alimentados con dieta basada en leche de cabra, como indican los niveles de este marcador tan sólo 10 días después del consumo de dietas basadas en leche (tabla 24, figura 33). Sin embargo, tras 50 días del consumo de las dietas basadas en leche, sólo se observa una disminución de este marcador de formación ósea en ratas anémicas que consumen la dieta basada en leche de vaca con sobrecarga en Fe ($P<0.01$) ($2,20\pm 0,12$ en controles *vs.* $1,54\pm 0,25$ en anémicas), lo que pone de manifiesto que tras este periodo de suministro de las dietas, la osteomalacia inducida por la ferropenia se encuentra prácticamente recuperada en los animales que consumen leche de cabra con contenido normal o sobrecarga de Fe, y no ocurre así en los que consumen la dieta de vaca con sobrecarga, probablemente debido a que la leche de cabra minimiza las interacciones Fe-Ca (Barrionuevo y col., 2002; Campos y col., 2003).

En cuanto a los marcadores de resorción ósea (RatLaps y RatTRAP) en el día 70 del estudio (30 días de suministro de las dietas basadas en leche) no se observa efecto de la anemia con ninguna de las dietas ensayadas, con contenido normal o sobrecarga de Fe, lo que pone de manifiesto una vez más que el proceso de remodelado óseo alterado por la ferrodeficiencia está prácticamente restablecido (tabla 24). Sin embargo cuando se prolonga el suministro de dietas con sobrecarga de Fe durante 50 días (día 90 del estudio), sólo se observa un ligero aumento en el factor de resorción RatLaps ($P<0.05$) (tabla 25), al suministrar la dieta basada en leche de cabra, lo que puede atribuirse al prolongado suministro de dieta con alto contenido en Fe y una disminución del RatTRAP ($P<0.001$) en animales anémicos que consumen dieta basada en leche de cabra con contenido normal de Fe, lo cual confirma que el remodelado óseo está prácticamente normalizado tras 50 días de suministro de esta dieta.

En las ratas anémicas que consumen la dieta basada en leche de cabra con contenido normal de Fe, hay un descenso acusado en los niveles de PTH respecto a sus controles ($P<0.001$) ($38,10\pm 3,39$ en controles *vs.* $14,36\pm 0,74$ en anémicas), y no existen diferencias significativas cuando consumen esta dieta con sobrecarga de Fe, si bien existe una clara tendencia a que disminuya también en estos animales (tabla 24). Si la dieta es elaborada con leche de vaca y contenido normal de Fe, la PTH desciende en los animales ferrodeficientes en

comparación a sus controles ($P<0.001$) ($17,58\pm 0,71$ en controles *vs.* $12,96\pm 0,80$ en anémicas), probablemente como resultado del incremento en la utilización de Ca, consecuencia de la mayor absorción de este mineral. En este sentido, estudios previos han demostrado que una disminución en la tasa de secreción de PTH conlleva un incremento en la utilización nutritiva de Ca (Calvo, 1994; Campos y col., 2007). Sin embargo, al suministrar la dieta basada en leche de vaca con sobrecarga de Fe, los niveles de esta hormona aumentan en animales anémicos ($P<0.05$) ($28,90\pm 3,19$ en controles *vs.* $47,76\pm 6,38$ en anémicas), probablemente debido a la disminución en los niveles séricos de Ca iónico como ya habían indicado previamente Masuyama y col. (2000) en situación de ferodeficiencia. Por otra parte, cuando se prolonga el suministro de las dietas basadas en leche durante 50 días, se elevan los niveles de PTH en animales anémicos que consumen la dieta basada en leche de cabra tanto con contenido normal ($P<0.001$) como con sobrecarga de Fe ($P<0.05$) (tabla 25). Según Hale y col. (2007), los niveles de Rat/Mouse PINP pueden correlacionarse de forma directa con los niveles de PTH y estudios recientes revelan que a dosis intermitentes y dentro del rango fisiológico, la PTH favorece la formación de hueso, a través de un aumento del número de osteoblastos y de la tasa de formación (Cosman y col., 2004) ya que estimula la transformación de osteocitos en osteoblastos activos (Langub y col., 2001) y disminuye la apoptosis de los mismos (Bringham y col., 2002).

En relación al depósito de Ca en fémur, al suministrar las dietas con contenido normal de Fe durante 30 o 50 días no se observa efecto de la anemia en los animales que consumen la dieta basada en leche de cabra y hay un ligero incremento ($P<0.05$) cuando consumen la dieta basada en leche de vaca durante 30 días, mientras que si se prolonga el tiempo de suministro de esta dieta durante 50 días, disminuye el depósito de Ca en animales anémicos ($P<0.05$) y en este mismo grupo de animales, si esta dieta tiene sobrecarga de Fe, aumenta el P ($P<0.001$) y disminuye el depósito de Ca en fémur ($P<0.05$) (tabla 27, 28). Si bien, el depósito de Ca en fémur en el día 70 del estudio es mayor en los animales que consumen la dieta basada en leche de cabra (figura 37B). El mayor depósito de Ca en animales que consumen la dieta de leche de cabra en el fémur, se puede atribuir a que este tipo de leche tiene un mayor contenido de vitamina D, que favorece el transporte transcelular saturable de Ca dependiente de energía. Además, también se puede atribuir a que la lactosa presente en la leche de cabra es más digestiva y su absorción óptima (Martínez-Férez, 2004) y de acuerdo con Heaney (1996) estos factores favorecen la absorción de Ca vía paracelular, por lo que la leche de cabra proporciona Ca con una “absorción asegurada”, insensible a factores externos.

Con respecto al contenido de Ca y P en esternón no se observan diferencias en ratas ferropdeficientes cuando se comparan con sus respectivos controles que consumen la dieta basada en leche de cabra durante 30 ó 50 días, tanto con contenido normal como con sobrecarga de Fe. Sin embargo, el depósito de Ca es superior en ratas anémicas que consumen la dieta basada en leche de vaca, sólo si tiene sobrecarga de Fe ($P<0.001$) y se suministra durante 30 días, mientras que si se suministra durante 50 días, el contenido de Ca disminuye ($P<0.05$) y el de P no se modifica (tabla 27, 28). La recuperación del contenido de Ca y P en esternón (figura 39, 40) se puede atribuir a que la dieta basada en leche de cabra produce una mejor recuperación del metabolismo del Fe (Alférez y col., 2006) y bajo estas condiciones, la cantidad de oxígeno disponible y de ATP se incrementa, recuperándose los transportadores de Ca de forma más eficiente y favorece la absorción del mineral por transporte activo (Conrad y Umbreit, 1993). Además la leche de cabra por sus peculiares características nutricionales reduce la interacción Fe-Ca e incrementa la utilización nutritiva de ambos (Barrionuevo y col., 2002; Campos y col., 2003), hecho que ocurre incluso en condiciones de sobrecarga crónica de Fe.

En relación al depósito de Fe en esternón a los 30 días de suministro de la dieta basada en leche de vaca, los animales anémicos presentan una disminución del contenido de dicho mineral cuando la dieta tiene contenido normal ($P<0.001$) o sobrecarga de Fe ($P<0.01$), diferencias que no se observan con la dieta basada en leche de cabra (tabla 27). Sin embargo, sólo hay un incremento en el depósito de Fe en esternón en el día 90 del estudio si la dieta es a base de leche de vaca ($P<0.01$) (tabla 28), revelando que es necesario un consumo más prolongado de esta leche para replecionar los depósitos de Fe en esternón que con la leche de cabra estaban ya replecionados en el día 70. A la vista de estos resultados, es evidente que la repleción de Fe durante 30 días, da lugar a un mayor depósito de Fe en el esternón sólo en los animales anémicos que consumen la dieta basada en leche de cabra (figura 41, línea azul) y este órgano tiene una importante función hematopoyética. Dado que la incorporación de Fe en la síntesis de hemoglobina es fundamental en el proceso de desarrollo de eritroblastos a reticulocitos, es en este momento, donde la falta de Fe puede dañar la completa hemoglobinización de los hematíes, dando lugar a una verdadera y grave deficiencia funcional de Fe (Besarab y col., 2009). Por tanto, a la vista de la evolución de la concentración de Fe en esternón, se puede afirmar que con la leche de cabra se ha normalizado el proceso hematopoyético, alterado como consecuencia de la restricción de Fe

para inducir la anemia ferropénica, tan sólo 30 días después del suministro de la dieta, mientras que es necesario un tiempo más prolongado (50 días) con la leche de vaca.

4.4.2. EFECTO DE LA SOBRECARGA DE HIERRO

Los niveles de 25 OH vitamina D disminuyen en ratas controles ($P<0.01$) ($126,80\pm 10,43$ con contenido normal de Fe *vs.* $73,40\pm 6,80$ con sobrecarga de Fe) que consumen dieta basada en leche de vaca y también en ratas anémicas ($P<0.001$) ($111,00\pm 2,92$ con contenido normal de Fe *vs.* $76,48\pm 4,66$ con sobrecarga de Fe) con la dieta basada en leche de cabra suministrada durante 30 días. La sobrecarga de Fe durante 50 días provoca una disminución de la 25 OH vitamina D en los animales controles que reciben ambas dietas basadas en leche ($P<0.001$), si bien esta disminución es más acusada entre los animales que consumen la dieta basada en leche de vaca (77%), que en los que consumen la dieta basada en leche de cabra (27%) (tabla 25). Este descenso en los niveles séricos de 25 OH vitamina D, se relaciona con la disminución de los procesos de resorción ósea a la vista de los marcadores RatLaps y RatTRAP, ya que esta vitamina estimula la resorción del hueso, probablemente a través de su acción sobre la maduración de las células precursoras hematopoyéticas que se diferenciarán hacia osteoclastos; además, estudios recientes sugieren que la vitamina D produce la liberación de factores de resorción por parte de los osteoblastos, que estimulan la actividad osteoclástica (Holick, 2003).

En cuanto al marcador formación ósea Rat/Mouse PINP, tras 30 ó 50 días de consumo de ambas dietas basadas en leche con sobrecarga de Fe, no se observan diferencias en ninguna de las condiciones experimentales estudiadas (tabla 24, 25), lo que pone de manifiesto que la osteomalacia inducida por la ferropenia está prácticamente recuperada al consumir durante estos periodos las dietas con contenido normal o sobrecarga de Fe. Si bien, como muestra la evolución de este parámetro (figura 33), la formación ósea es menor a los 90 días del estudio en comparación con los períodos anteriores dado que en este punto la rata se encuentra ya en la etapa adulta (McCutcheon y Marinelli, 2009), el crecimiento activo ha finalizado y el remodelado óseo se ha estabilizado.

En cuanto a los marcadores de resorción ósea (RatLaps y RatTRAP) hay una marcada disminución del RatTRAP ($P<0.001$) en los animales anémicos que consumen la dieta basada en leche de cabra, descenso que es de menor entidad en los animales alimentados con la dieta

basada en leche de vaca ($P<0.05$) (tabla 24). Estos resultados ponen de manifiesto, una vez más, que el proceso de remodelado óseo se está normalizando con ambas dietas pero es más patente con la leche de cabra que con la de vaca en el día 70 del estudio. Posteriormente, en el día 90 y como consecuencia del suministro prolongado de dietas con sobrecarga de Fe, se observa una disminución de ambos parámetros de resorción en animales controles que consumen dieta basada en leche de cabra ($P<0.01$), mientras que el que el RatLaps aumenta en anémicas ($P<0.01$) y el RatTRAP no se modifica. Si los animales consumen la dieta basada en leche de vaca, la sobrecarga produce una disminución del RatLaps en controles ($P<0.01$) y anémicas ($P<0.05$), y no se modifica tampoco el RatTRAP con este tipo de leche (tabla 25). A la vista de los resultados de los marcadores de resorción ósea se puede afirmar, que aunque la osteomalacia se ha recuperado, aun queda cierta actividad resorptiva residual, probablemente como consecuencia del exceso de Fe en el organismo.

Por efecto de la sobrecarga de Fe, en el día 70 del estudio, los niveles de PTH aumentan en todos los grupos experimentales (tabla 24, figura 36B). Este resultado se puede justificar porque esta hormona incrementa la velocidad de recambio óseo y la movilización de los depósitos de Ca en el organismo, lo que coincide con los resultados de Pawlostky y col. (1999) y Dimitriadou y col. (2009), quienes afirman que hay un incremento en los niveles séricos de PTH en individuos con sobrecarga de Fe. Posteriormente, a los 50 días de suministro de las dietas con sobrecarga de Fe, no hay diferencias en los niveles de PTH, en ninguno de los grupos experimentales (tabla 25). Este hallazgo es un indicador de que el tráfico de Ca entre los compartimentos plasmático y óseo se ha normalizado, tras el consumo de ambas dietas basadas en leche. Este hecho una vez más apoya la teoría de que el *turnover* óseo se ha restablecido al final del periodo experimental, incluso en situación de sobrecarga de Fe.

En el depósito de Ca en fémur a los 30 y 50 días de suministro de las dietas basadas en leche con sobrecarga de Fe, se observa una tendencia al incremento en todos los grupos experimentales (tabla 27, 28) especialmente evidente en el día 70 del estudio (figura 37B), lo que está de acuerdo con Anghileri y Thouvenot (1998) que indican que la sobrecarga de Fe aumenta la captación celular de Ca, disminuye la actividad de la ATPasa-Ca dependiente dificultando la salida del Ca hacia el líquido extracelular y favorece por tanto su acumulación en la célula. En relación al depósito de P en fémur, es mayor en animales controles y anémicos alimentados durante 30 días con ambas dietas basadas en leche,

diferencia que es sólo estadísticamente significativa con la dieta de leche de vaca ($P<0.001$), y que no se observa tras 50 días de suministro de las dietas (tabla 27, 28).

El contenido de Ca y P en esternón tras 30 días de suministro de las dietas presenta una tendencia a aumentar en todos los grupos experimentales por efecto de la sobrecarga de Fe (tabla 27, figura 39B, 40B). Sin embargo, tras 50 días de suministro de las dietas con alto contenido en Fe, sigue un patrón bastante irregular, tal y como muestra la evolución de estos minerales en el día 90 del PE.

El depósito de Fe en esternón aumenta por efecto de la sobrecarga en el día 70 del estudio en todos los grupos experimentales y es estadísticamente significativo en ambos grupos de animales alimentados con la dieta basada en leche de vaca y en anémicas alimentados con la dieta basada en leche de cabra ($P<0.001$) (tabla 27), mientras que en el día 90 el contenido de Fe en el esternón aumenta en animales controles ($P<0.001$) y anémicos ($P<0.01$) alimentados con dieta basada en leche de cabra. Los animales controles que consumen dieta basada en leche de vaca, presentan un mayor contenido de Fe en esternón ($P<0.001$) y no se modifica en los anémicos (tabla 28). Todos estos resultados pueden ser debidos a la sobrecarga crónica de Fe durante periodos de tiempo prolongados (figura 41B).

4.4.3. EFECTO DE LA DIETA

Tras consumir durante 30 y 50 días la dieta basada en leche de cabra con contenido normal de Fe se observa una disminución de la 25 OH vitamina D en los animales controles ($P<0.05$ en el día 70, $P<0.001$ en el día 90), hecho que no ocurre en ratas anémicas. Cuando las ratas consumen estas dietas pero con sobrecarga de Fe, sólo se encuentran diferencias en el día 90 del estudio, si bien el comportamiento de este metabolito sigue un patrón irregular (tabla 24, 25).

Tras 30 días de suministro de las dietas basadas en leche, se observa un incremento en el marcador de formación Rat/Mouse PINP tan sólo en los animales controles que consumen dieta basada en leche de cabra con contenido normal de Fe ($P<0.05$) (tabla 24), lo que pone de manifiesto que en estas condiciones, se forma más hueso con este tipo de leche. En este periodo, se puede indicar que se ha restablecido el metabolismo del hueso perjudicado por la anemia inducida, lo que se ratifica con los marcadores de resorción ósea (RatLaps y

RatTRAP), que no presentan diferencias entre los distintos grupos experimentales. Por otra parte, tras 50 días de suministro de las dietas, el Rat/Mouse PINP aumenta en todos los grupos experimentales alimentados con la dieta basada en leche de cabra ($P<0.001$ para controles con contenido normal de Fe y anémicas con sobrecarga de Fe; $P<0.01$ para animales anémicos con contenido normal de Fe) (tabla 25). Como hemos mencionado anteriormente, la leche de cabra mejora la utilización nutritiva de Fe y Ca, minimizando las interacciones entre los dos minerales (Barrionuevo y col., 2002; Campos y col., 2003). El Ca incide de manera muy positiva en el proceso de formación ósea, dejando patente, una vez más que se está formando tejido óseo con la dieta basada en leche de cabra, tanto con contenido normal como con sobrecarga de Fe. Sin embargo, los parámetros de resorción ósea (RatLaps y RatTRAP), en general aumentan con la dieta basada en leche de cabra en este periodo, debido a que la formación de tejido óseo es muy elevada a la vista de los resultados del Rat/Mouse PINP, el *turnover* óseo, que es un proceso dinámico y continuo, se mantiene, mediante el incremento de procesos resorptivos encaminados a mantener la homeostasis. En circunstancias normales, el remodelado mantiene la masa ósea prácticamente invariable, por tanto un incremento en la actividad osteoblástica conduce a un aumento proporcional de la actividad osteoclástica (Arnett y col., 2003; Arnett, 2004).

En animales controles alimentados con dieta basada en leche de cabra durante 30 días, tanto con contenido normal como con sobrecarga de Fe, se aprecia un incremento en los niveles de PTH ($P<0.001$), mientras que no se modifica en ratas anémicas con ninguna de las dietas ensayadas (tabla 24). Una vez más, podemos afirmar que el *turnover* óseo se ha recuperado en animales ferodeficientes, mientras que las variaciones de PTH en animales controles se pueden deber a que como han indicado previamente otros autores (Sisk y Zehr, 2005; McCutcheon y Marinelli, 2009), en este tiempo, las ratas se encuentran en el inicio de la etapa adulta y por tanto, aún existe crecimiento activo. Sin embargo, tras 50 días de consumo de las dietas basadas en leche, los niveles de PTH no se modifican por efecto de la dieta en ninguno de los grupos experimentales, indicando que la velocidad de remodelado óseo ha descendido, como consecuencia de la recuperación completa del metabolismo del hueso, tanto con un contenido normal como con sobrecarga.

En cuanto al depósito mineral en fémur en el día 70 del estudio, se observa un incremento de Ca en animales controles ($P<0.001$) y anémicos ($P<0.01$) alimentados con la dieta basada en leche de cabra. En relación al destino metabólico de P en fémur, se observa

que sólo en ratas controles alimentadas con dieta basada en leche de cabra y contenido normal de Fe, hay un mayor depósito de dicho mineral ($P<0.001$). En esternón, el contenido de Ca y P no presenta diferencias significativas cuando los animales consumen dieta basada en leche de cabra con contenido normal en Fe, pero si reciben esta misma dieta con sobrecarga de Fe, el Ca en esternón aumenta ($P<0.05$) y no se modifica el depósito de P. En los animales anémicos, que reciben dieta basada en leche de cabra con contenido normal de Fe, el depósito de Ca en esternón aumenta considerablemente ($P<0.001$), hecho que no se observa con sobrecarga de Fe (tabla 27). Este mayor depósito de Ca puede ser debido a que el consumo de la dieta basada en leche de cabra recupera más eficientemente el metabolismo del Fe y bajo estas condiciones la cantidad de oxígeno disponible y de ATP se incrementa, recuperándose los transportadores de Ca de forma más eficiente, lo que favorece la absorción de Ca por transporte activo (Conrad y Umbreit, 1993). Algo similar ocurre con el P, ya que la absorción de este elemento se realiza, en parte, a través de transporte activo (López-Aliaga y col., 1994). Además, como se ha observado previamente, la dieta basada en leche de cabra reduce la interacción entre Fe y Ca y por tanto incrementa la utilización digestiva de ambos (Barrionuevo y col., 2002; Campos y col., 2003). La menor interacción Ca-Fe en animales alimentados con la dieta elaborada con leche de cabra puede contribuir a la mejor utilización nutritiva de Ca, comprobada en estudios previos de nuestro grupo de investigación (Alfárez y col., 2006; Barrionuevo y col., 2002; Campos y col., 2003). El mayor depósito de Ca y P en fémur favorece la formación de la matriz inorgánica del hueso, ya que son los principales constituyentes de los cristales de hidroxiapatita que se incrustan en las fibras de colágeno para formar un material que reúne las características adecuadas de rigidez, flexibilidad y resistencia para constituir la matriz inorgánica del tejido óseo (Ehrlich y Lanyon, 2002).

Con respecto al depósito de Ca y P en fémur tras 50 días de suministro de las dietas se observa una ligera disminución del depósito de Ca en este órgano ($P<0.05$) y un aumento del depósito de P ($P<0.05$) en animales que consumen la dieta basada en leche de cabra, mientras que en animales controles que consumen esta misma dieta pero con sobrecarga de Fe, hay una disminución del depósito de Ca en fémur ($P<0.05$) y el P no se modifica (tabla 28). A pesar de esta ligera disminución del depósito de Ca en fémur, se puede afirmar que el remodelado óseo es normal en el día 90, a la vista de los resultados del marcador de formación ósea Rat/Mouse PINP y niveles de PTH. En ratas anémicas no hay efecto de las dietas basadas en leche ya sea con contenido normal o con sobrecarga. El

depósito de Ca y P en esternón no se modifica por efecto de la dieta en ninguno de los grupos experimentales, excepto en animales anémicos alimentados con dieta basada en leche de cabra con sobrecarga de Fe, donde se observa un aumento ($P < 0.001$ para el Ca y $P < 0.05$ para el P) (tabla 28). Este incremento del depósito de Ca en el esternón favorece la eritropoyesis que estaba disminuida en las ratas con ferropdeficiencia, ya que el Ca está implicado en la iniciación de la síntesis de ADN, en la agrupación de los cromosomas, regulación de la división y proliferación celular. La estimulación de receptores sensibles al Ca, promueve la diferenciación de células, entre ellas las células madre pluripotenciales (Bikle y col., 2001).

El suministro durante 30 días de la dieta basada en leche de cabra con contenido normal de Fe aumenta su depósito en esternón de animales anémicos ($P < 0.05$) (tabla 27). Lo que se atribuye a varios factores nutricionales de la leche de cabra: su proteína más soluble (Boza y Sanz-Sampelayo, 1997) y de origen animal favorece la absorción de Fe (Sharp y col., 2003); es más rica en triglicéridos de cadena media (MCT) (Alfárez y col., 2001) que son rápidamente absorbidos y metabolizados para obtener energía (García-Unciti, 1996), lo que contribuye a incrementar la síntesis de proteínas transportadoras y por tanto la absorción de Fe. Por otra parte, cuando se prolonga el tiempo de suministro de las dietas (50 días), no se aprecian cambios importantes en el destino metabólico de Fe en esternón (tabla 28), lo que pone de manifiesto que los depósitos están ya replecionados.

A decorative banner featuring a variety of scientific and natural elements. On the left, there are red flowers, a green leaf with a white flower, and a bundle of wheat. In the center, there are several pieces of laboratory glassware, including a blue flask, a clear flask, a red flask, and a yellow flask. On the right, there are colorful circles in red, orange, and green. The banner is set against a light blue background with a subtle pattern.

Tablas y figuras

Tabla n° 21. Parámetros hematológicos de ratas controles y anémicas en el día 40 del PPE (datos expresados como media \pm error estándar de la media).

Parámetro hematológico	<u>Dieta Estándar</u>	
	Grupo Control (contenido normal en Fe)	Grupo Anémico (bajo contenido en Fe)
Fe sérico ($\mu\text{g/L}$)	1387 \pm 122	699 \pm 56 *
Concentración de Hb (g/L)	127,7 \pm 2,7	77,3 \pm 2,6 *
Glóbulos rojos ($10^{12}/\text{L}$)	7,1 \pm 0,15	6,47 \pm 0,17 *
Hematocrito (%)	38,8 \pm 0,76	27,5 \pm 0,48 *
Plaquetas ($10^9/\text{L}$)	737 \pm 24,5	1361 \pm 67,2 *
VCM (fL)	55,2 \pm 0,2	39,3 \pm 0,7 *
Ferritina sérica ($\mu\text{g/L}$)	82,5 \pm 2,7	50,1 \pm 1,3 *
Saturación transferrina (%)	47,5 \pm 7,2	3,7 \pm 0,3 *
TIBC ($\mu\text{g/L}$)	2842 \pm 202	17899 \pm 731 *

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

Tabla n° 22. Parámetros de remodelado óseo de ratas controles y anémicas en el día 40 del PPE (datos expresados como media \pm error estándar de la media).

Parámetro de remodelado (40 días)	<u>Dieta Estándar</u>	
	Grupo Control (contenido normal en Fe)	Grupo Anémico (bajo contenido en Fe)
25 OH Vit D	101,20 \pm 8,61	105,40 \pm 5,36
Rat/Mouse PINP (F)	6,16 \pm 0,20	4,48 \pm 0,28*
RatLaps (R)	30,14 \pm 1,97	37,11 \pm 3,80
RatTRAP (R)	0,51 \pm 0,01	0,72 \pm 0,08*
PTH (R)	12,98 \pm 0,51	17,64 \pm 1,16*

*Valores estadísticamente distintos de sus respectivos controles ($P < 0.001$) mediante el test de la “*t de Student*”.

Tabla n° 23. Parámetros de remodelado óseo en ratas controles y anémicas alimentadas con dieta basada en leche de cabra o vaca con o sin sobrecarga de Fe en el día 50 del estudio (datos expresados como media \pm error estándar de la media).

Parámetro de remodelado (50 días)	Dieta basada en leche de cabra		Dieta basada en leche de vaca		Valor de P (three-way ANOVA)							
	Grupo Control	Grupo Anémico	Grupo Control	Grupo Anémico	Dieta* (D)	Anemia (A)	Dieta x Anemia (D x A)	Sobrecarga de Fe (S)	A x S	D x S	D x S x A	
25 OH Vit D	(Fe normal)	96,68 \pm 11,83a	116,66 \pm 11,75A	102,40 \pm 12,86a	106,06 \pm 10,06A	< 0.001	NS	< 0.05	NS	NS	< 0.05	NS
	(sobrecarga)	77,14 \pm 5,58a	97,72 \pm 6,08cA	97,00 \pm 4,08a	80,84 \pm 3,21cCA	< 0.001	NS	< 0.05				
Rat/Mouse PINP	(Fe normal)	3,38 \pm 0,48a	5,10 \pm 0,36cA	2,96 \pm 0,09a	2,90 \pm 0,11B	< 0.001	< 0.05	< 0.01	NS	NS	NS	NS
	(sobrecarga)	4,40 \pm 0,46a	2,12 \pm 0,29cCA	3,68 \pm 0,38a	4,18 \pm 1,11A	NS ¹	NS	NS				
RatLaps	(Fe normal)	18,78 \pm 1,55a	22,82 \pm 0,59cA	23,36 \pm 1,00a	23,96 \pm 0,95A	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	(sobrecarga)	24,60 \pm 1,09Ca	28,32 \pm 3,03A	24,32 \pm 5,63a	17,58 \pm 1,13CB	NS	NS	NS				
RatTRAP	(Fe normal)	0,72 \pm 0,02a	0,75 \pm 0,06A	0,58 \pm 0,03b	0,68 \pm 0,04A	< 0.01	< 0.01	< 0.01	NS	NS	NS	NS
	(sobrecarga)	0,50 \pm 0,008Ca	0,51 \pm 0,014CA	0,83 \pm 0,089Cb	0,51 \pm 0,016cCA	NS	< 0.05	NS				
PTH	(Fe normal)	28,48 \pm 1,63a	16,68 \pm 1,72cA	16,96 \pm 1,05b	27,76 \pm 2,60cB	< 0.05	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	(sobrecarga)	14,16 \pm 1,81Ca	20,00 \pm 2,98A	24,38 \pm 2,54Cb	22,36 \pm 3,88A	NS	NS	NS				

¹NS, no significativo.

a, b Valores entre grupos de animales controles con diferente superíndice minúscula en la misma fila, fueron estadísticamente diferentes ($P < 0.05$, mediante el test de Tukey).

A, B Valores entre grupos de animales anémicos con distinto superíndice mayúscula en la misma fila, fueron estadísticamente diferentes ($P < 0.05$, mediante el test de Tukey).

c Valores estadísticamente diferentes del correspondiente grupo de animales controles ($P < 0.05$, mediante el test de la “*t de Student*”).

C Valores estadísticamente diferentes del correspondiente grupos de animales alimentados con dietas con contenido normal en Fe ($P < 0.05$, mediante el test de la “*t de Student*”).

* Dieta, efecto principal de la dieta (D); Anemia, efecto principal de la anemia (A); Sobrecarga de Fe, efecto principal de la sobrecarga en la dieta (S). Interacciones: D x A, A x S, D x S y D x S x A.

Tabla n° 24. Parámetros de remodelado óseo en ratas controles y anémicas alimentadas con dieta basada en leche de cabra o vaca con o sin sobrecarga de Fe en el día 70 del PE (datos expresados como media \pm error estándar de la media).

Parámetro de remodelado (70 días)	Dieta basada en leche de cabra		Dieta basada en leche de vaca		Valor de P (three-way ANOVA)							
	Grupo Control	Grupo Anémico	Grupo Control	Grupo Anémico	Dieta* (D)	Anemia (A)	Dieta x Anemia (D x A)	Sobrecarga de Fe (S)	A x S	D x S	D x S x A	
25 OH Vit D	(Fe normal)	94,38 \pm 4,86a	111,00 \pm 2,92cA	126,80 \pm 10,43b	111,00 \pm 6,90A	< 0.001	NS	< 0.01	< 0.001	< 0.01	< 0.01	< 0.05
	(sobrecarga)	84,53 \pm 7,66a	76,48 \pm 4,66CA	73,40 \pm 6,80Ca	92,58 \pm 16,54A	< 0.05	NS	NS				
Rat/mouse PINP	(Fe normal)	3,53 \pm 0,13a	3,12 \pm 0,19A	2,46 \pm 0,35b	3,08 \pm 0,09A	NS ¹	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	(sobrecarga)	3,45 \pm 0,61a	3,13 \pm 0,45A	2,47 \pm 0,24a	3,90 \pm 0,47A	NS	NS	NS				
RatLaps	(Fe normal)	22,48 \pm 0,49a	23,26 \pm 0,33A	19,06 \pm 1,20a	24,90 \pm 2,47A	NS	< 0.001	< 0.01	NS	< 0.05	< 0.05	< 0.05
	(sobrecarga)	26,85 \pm 3,43a	29,53 \pm 2,99CA	22,83 \pm 4,39a	24,63 \pm 2,52A	< 0.001	NS	< 0.01				
RatTRAP	(Fe normal)	0,63 \pm 0,04a	0,75 \pm 0,05A	0,74 \pm 0,06a	0,84 \pm 0,08A	NS	NS	NS	< 0.01	< 0.05	< 0.05	NS
	(sobrecarga)	0,61 \pm 0,11a	0,50 \pm 0,05CA	0,63 \pm 0,11a	0,56 \pm 0,03CA	NS	NS	NS				
PTH	(Fe normal)	38,10 \pm 3,39a	14,36 \pm 0,74cA	17,58 \pm 0,71b	12,96 \pm 0,80cA	< 0.01	NS	< 0.05	< 0.01	< 0.05	< 0.05	NS
	(sobrecarga)	56,08 \pm 1,89Ca	34,55 \pm 9,12CA	28,90 \pm 3,19Cb	47,76 \pm 6,38cCA	< 0.001	NS	< 0.01				

¹NS, no significativo.

a, b Valores entre grupos de animales controles con diferente superíndice minúscula en la misma fila, fueron estadísticamente diferentes ($P < 0.05$, mediante el test de Tukey).

A, B Valores entre grupos de animales anémicos con distinto superíndice mayúscula en la misma fila, fueron estadísticamente diferentes ($P < 0.05$, mediante el test de Tukey).

c Valores estadísticamente diferentes del correspondiente grupo de animales controles ($P < 0.05$, mediante el test de la “*t de Student*”).

C Valores estadísticamente diferentes del correspondiente grupos de animales alimentados con dietas con contenido normal en Fe ($P < 0.05$, mediante el test de la “*t de Student*”).

* Dieta, efecto principal de la dieta (D); Anemia, efecto principal de la anemia (A); Sobrecarga de Fe, efecto principal de la sobrecarga en la dieta (S). Interacciones: D x A, A x S, D x S y D x S x A.

Tabla n° 25. Parámetros de remodelado óseo en ratas controles y anémicas alimentadas con dieta basada en leche de cabra o vaca con o sin sobrecarga de Fe en el día 90 del PE (datos expresados como media \pm error estándar de la media).

Parámetro de remodelado (90 días)	Dieta basada en leche de cabra		Dieta basada en leche de vaca		Valor de P (three-way ANOVA)							
	Grupo Control	Grupo Anémico	Grupo Control	Grupo Anémico	Dieta* (D)	Anemia (A)	Dieta x Anemia (D x A)	Sobrecarga de Fe (S)	A x S	D x S	D x S x A	
25 OH Vit D	(Fe normal)	94,98 \pm 2,47a	81,58 \pm 7,21A	116,17 \pm 4,71b	93,90 \pm 2,79cA	< 0.001	NS	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.05
	(sobrecarga)	69,53 \pm 3,95Ca	63,80 \pm 0,90A	38,43 \pm 9,27Cb	89,50 \pm 4,39cB	< 0.05	NS	NS				
Rat/Mouse PINP	(Fe normal)	2,30 \pm 0,20a	2,26 \pm 0,14A	1,62 \pm 0,21b	1,42 \pm 0,13B	< 0.001	NS	< 0.01	NS	< 0.05	< 0.05	< 0.05
	(sobrecarga)	2,13 \pm 0,20a	2,10 \pm 0,10A	2,20 \pm 0,12a	1,54 \pm 0,25cB	NS ¹	< 0.001	< 0.01				
RatLaps	(Fe normal)	26,28 \pm 2,12a	18,06 \pm 1,06cA	24,03 \pm 2,12a	23,58 \pm 2,17A	NS	NS	NS	< 0.001	< 0.01	< 0.05	NS
	(sobrecarga)	15,43 \pm 1,89Ca	26,90 \pm 3,60cA	16,43 \pm 1,84Ca	16,17 \pm 0,75cB	NS	< 0.05	NS				
RatTRAP	(Fe normal)	0,79 \pm 0,02a	0,69 \pm 0,02cA	0,49 \pm 0,03b	0,52 \pm 0,04B	< 0.001	NS	< 0.01	NS	< 0.05	< 0.05	NS
	(sobrecarga)	0,70 \pm 0,02Ca	0,73 \pm 0,11A	0,56 \pm 0,02b	0,60 \pm 0,02A	< 0.05	NS	NS				
PTH	(Fe normal)	12,12 \pm 1,88a	21,98 \pm 0,84cA	15,37 \pm 1,99a	20,63 \pm 3,83A	NS	< 0.01	< 0.05	NS	NS	NS	< 0.05
	(sobrecarga)	13,60 \pm 0,59a	21,25 \pm 2,05cA	25,35 \pm 4,69b	35,17 \pm 6,63A	NS	< 0.001	< 0.01				

¹NS, no significativo.

a, b Valores entre grupos de animales controles con diferente superíndice minúscula en la misma fila, fueron estadísticamente diferentes ($P < 0.05$, mediante el test de Tukey).

A, B Valores entre grupos de animales anémicos con distinto superíndice mayúscula en la misma fila, fueron estadísticamente diferentes ($P < 0.05$, mediante el test de Tukey).

c Valores estadísticamente diferentes del correspondiente grupo de animales controles ($P < 0.05$, mediante el test de la “*t de Student*”).

C Valores estadísticamente diferentes del correspondiente grupos de animales alimentados con dietas con contenido normal en Fe ($P < 0.05$, mediante el test de la “*t de Student*”).

*Dieta, efecto principal de la dieta (D); Anemia, efecto principal de la anemia (A); Sobrecarga de Fe, efecto principal de la sobrecarga en la dieta (S). Interacciones: D x A, A x S, D x S y D x S x A.

Tabla n° 26. Contenido mineral en órganos diana de ratas controles y anémicas en el día 40 del PPE (datos expresados como media \pm error estándar de la media).

Órganos 40 días	<u>Dieta Estándar</u>	
	Grupo Control (contenido normal en Fe)	Grupo Anémico (bajo contenido en Fe)
Ca en fémur (mg/g SS)	168,31 \pm 3,50	99,42 \pm 3,7*
P en fémur (mg/g SS)	122,83 \pm 2,60	102,62 \pm 2,64*
Ca en esternón (mg/g SS)	76,59 \pm 2,42	75,91 \pm 2,73
Fe en esternón (μ g/g SS)	77,65 \pm 4,35	61,90 \pm 2,85*
P en esternón (mg/g SS)	56,22 \pm 2,1	54,87 \pm 2,89

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

Tabla n° 27. Contenido mineral en órganos diana de ratas controles y anémicas alimentadas con dieta basada en leche de cabra o vaca con o sin sobrecarga de Fe en el día 70 del PE (datos expresados como media \pm error estándar de la media).

Órganos 70 días	Dieta basada en leche de cabra		Dieta basada en leche de vaca		Valor de P (three-way ANOVA)						
	Grupo Control	Grupo Anémico	Grupo Control	Grupo Anémico	Dieta* (D)	Anemia (A)	Dieta x Anemia (D x A)	Sobrecarga de Fe (S)	A x S	D x S	D x S x A
Ca en fémur (mg/g SS) (Fe normal)	143,84 \pm 12,34a	133,30 \pm 10,19A	97,17 \pm 5,87b	113,95 \pm 2,13cB	< 0.001	NS	< 0.05	< 0.001	< 0.05	< 0.001	< 0.05
(sobrecarga)	230,74 \pm 4,86Ca	155,93 \pm 5,205cCA	237,29 \pm 13,22Ca	252,23 \pm 8,27CB	< 0.001	NS	< 0.05				
P en fémur (mg/g SS) (Fe normal)	104,99 \pm 5,22a	93,88 \pm 5,71A	83,21 \pm 3,86b	94,19 \pm 3,88A	NS ¹	NS	NS	< 0.001	< 0.05	< 0.05	NS
(sobrecarga)	120,11 \pm 4,92a	117,01 \pm 13,63A	113,67 \pm 4,06Ca	125,94 \pm 5,10CA	NS	NS	NS				
Ca en esternón (mg/g SS) (Fe normal)	80,65 \pm 17,77a	90,92 \pm 5,96A	57,91 \pm 3,73a	58,74 \pm 2,50B	< 0.001	NS	< 0.05	< 0.001	< 0.05	< 0.05	NS
(sobrecarga)	105,47 \pm 12,27a	111,13 \pm 5,06CA	88,31 \pm 7,14Cb	117,56 \pm 4,10cCA	NS	NS	NS				
Fe en esternón (μg/g SS) (Fe normal)	76,08 \pm 6,78a	66,44 \pm 1,57A	77,63 \pm 5,55a	47,16 \pm 3,96cB	NS	< 0.001	< 0.05	< 0.001	< 0.01	< 0.05	< 0.05
(sobrecarga)	94,26 \pm 7,31a	108,16 \pm 12,11CA	119,22 \pm 6,61Ca	90,10 \pm 8,84cCA	NS	NS	NS				
P en esternón (mg/g SS) (Fe normal)	63,75 \pm 6,73a	58,94 \pm 2,76A	60,88 \pm 1,54a	68,39 \pm 6,34A	NS	NS	NS	< 0.001	< 0.05	NS	NS
(sobrecarga)	74,07 \pm 2,32a	77,91 \pm 6,18CA	79,44 \pm 5,59Ca	79,09 \pm 1,82A	NS	NS	NS				

¹NS, no significativo.

a, b Valores entre grupos de animales controles con diferente superíndice minúscula en la misma fila, fueron estadísticamente diferentes ($P < 0.05$, mediante el test de Tukey).

A, B Valores entre grupos de animales anémicos con distinto superíndice mayúscula en la misma fila, fueron estadísticamente diferentes ($P < 0.05$, mediante el test de Tukey).

c Valores estadísticamente diferentes del correspondiente grupo de animales controles ($P < 0.05$, el test de la “*t de Student*”).

C Valores estadísticamente diferentes del correspondiente grupos de animales alimentados con dietas con contenido normal en Fe ($P < 0.05$, el test de la “*t de Student*”).

* Dieta, efecto principal de la dieta (D); Anemia, efecto principal de la anemia (A); Sobrecarga de Fe, efecto principal de la sobrecarga en la dieta (S). Interacciones: D x A, A x S, D x S y D x S x A.

Tabla n° 28. Contenido mineral en órganos diana de ratas controles y anémicas alimentadas con dieta basada en leche de cabra o vaca con o sin sobrecarga de Fe en el día 90 del PE (datos expresados como media \pm error estándar de la media).

Órganos 90 días	Dieta basada en leche de cabra		Dieta basada en leche de vaca		Valor de P (three-way ANOVA)							
	Grupo Control	Grupo Anémico	Grupo Control	Grupo Anémico	Dieta* (D)	Anemia (A)	Dieta x Anemia (D x A)	Sobrecarga de Fe (S)	A x S	D x S	D x S x A	
Ca en fémur (mg/g SS) (Fe normal)	105,04 \pm 5,92a	120,01 \pm 7,07A	128,93 \pm 7,01b	110,52 \pm 2,60cA	< 0.001	NS ¹	< 0.05					
	(sobrecarga)	130,00 \pm 2,89Ca	127,03 \pm 6,93A	163,97 \pm 8,41Cb	136,50 \pm 6,00cCA	< 0.001	NS	< 0.05	< 0.01	NS	< 0.01	NS
P en fémur (mg/g SS) (Fe normal)	117,21 \pm 5,49a	105,92 \pm 1,6A8	88,48 \pm 2,38b	112,71 \pm 4,38cA	< 0.01	NS	NS		NS	NS	NS	NS
	(sobrecarga)	117,92 \pm 5,90a	126,75 \pm 8,12CA	120,67 \pm 14,30Ca	126,44 \pm 6,76A	< 0.001	NS	< 0.05	NS	NS	NS	NS
Ca en esternón (mg/g SS) (Fe normal)	119,18 \pm 2,94a	109,43 \pm 3,82A	113,85 \pm 1,81a	105,38 \pm 3,31cA	< 0.01	NS	NS		< 0.01	NS	NS	NS
	(sobrecarga)	104,79 \pm 2,16Ca	96,19 \pm 5,38A	75,10 \pm 12,19Ca	39,69 \pm 7,23cCB	< 0.001	NS	< 0.05	< 0.01	NS	NS	NS
Fe en esternón (μg/g SS) (Fe normal)	64,55 \pm 8,32a	81,21 \pm 7,18A	44,28 \pm 4,46a	66,73 \pm 7,01cA	< 0.001	NS	< 0.05		< 0.001	< 0.05	< 0.01	NS
	(sobrecarga)	127,91 \pm 4,97Ca	123,13 \pm 11,16CA	85,95 \pm 2,47Cb	73,79 \pm 21,41A	< 0.001	NS	< 0.05	< 0.001	< 0.05	< 0.01	NS
P en esternón (mg/g SS) (Fe normal)	76,33 \pm 3,64a	67,04 \pm 4,34A	68,51 \pm 3,99a	76,80 \pm 2,38A	< 0.001	NS	< 0.05		NS	NS	< 0.05	NS
	(sobrecarga)	80,44 \pm 2,13a	82,65 \pm 3,79CA	71,84 \pm 7,70a	65,65 \pm 3,30CB	< 0.01	NS	NS	NS	NS	< 0.05	NS

¹NS, no significativo.

a, b Valores entre grupos de animales controles con diferente superíndice minúscula en la misma fila, fueron estadísticamente diferentes ($P < 0.05$, mediante el test de Tukey).

A, B Valores entre grupos de animales anémicos con distinto superíndice mayúscula en la misma fila, fueron estadísticamente diferentes ($P < 0.05$, mediante el test de Tukey).

c Valores estadísticamente diferentes del correspondiente grupo de animales controles ($P < 0.05$, el test de la “*t de Student*”).

C Valores estadísticamente diferentes del correspondiente grupos de animales alimentados con dietas con contenido normal en Fe ($P < 0.05$, el test de la “*t de Student*”).

* Dieta, efecto principal de la dieta (D); Anemia, efecto principal de la anemia (A); Sobrecarga de Fe, efecto principal de la sobrecarga en la dieta (S). Interacciones: D x A, A x S, D x S y D x S x A

Figura nº 32A. Evolución de la 25-OH vitamina D en dietas basadas en leche sin sobrecarga de Fe.

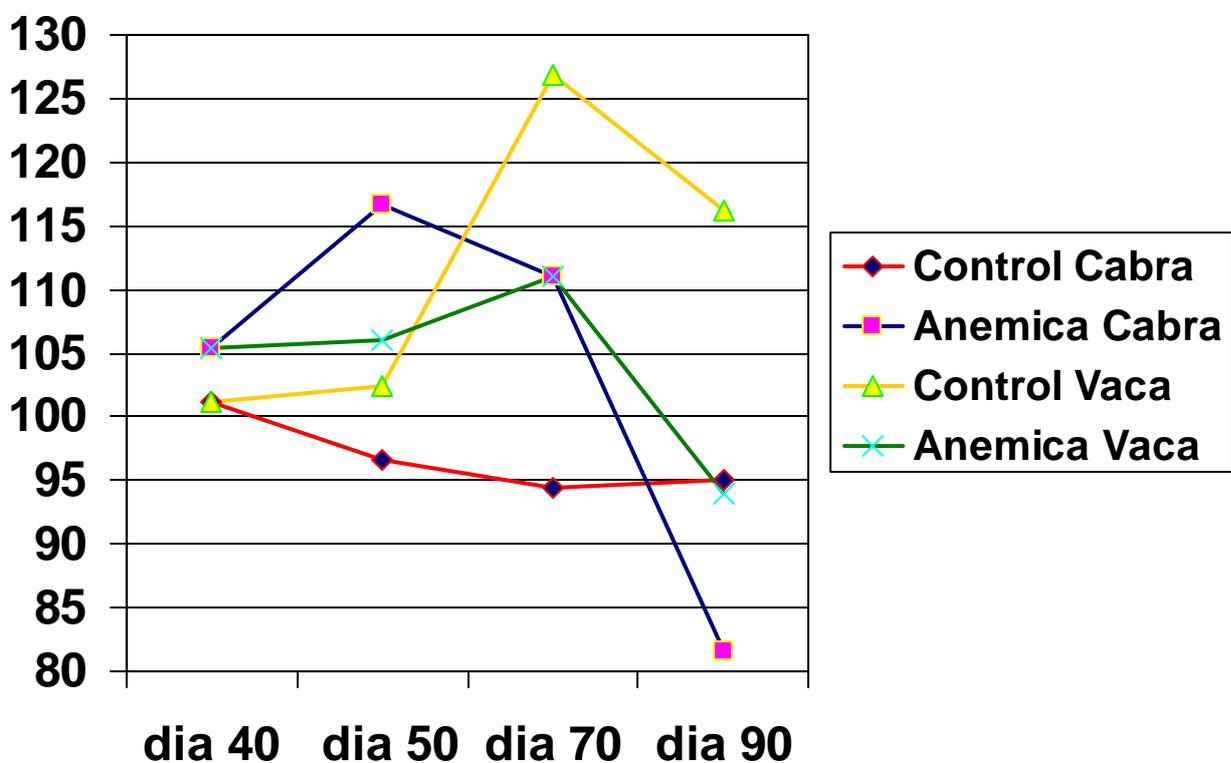


Figura nº 32B. Evolución de la 25-OH vitamina D en dietas basadas en leche con sobrecarga de Fe.

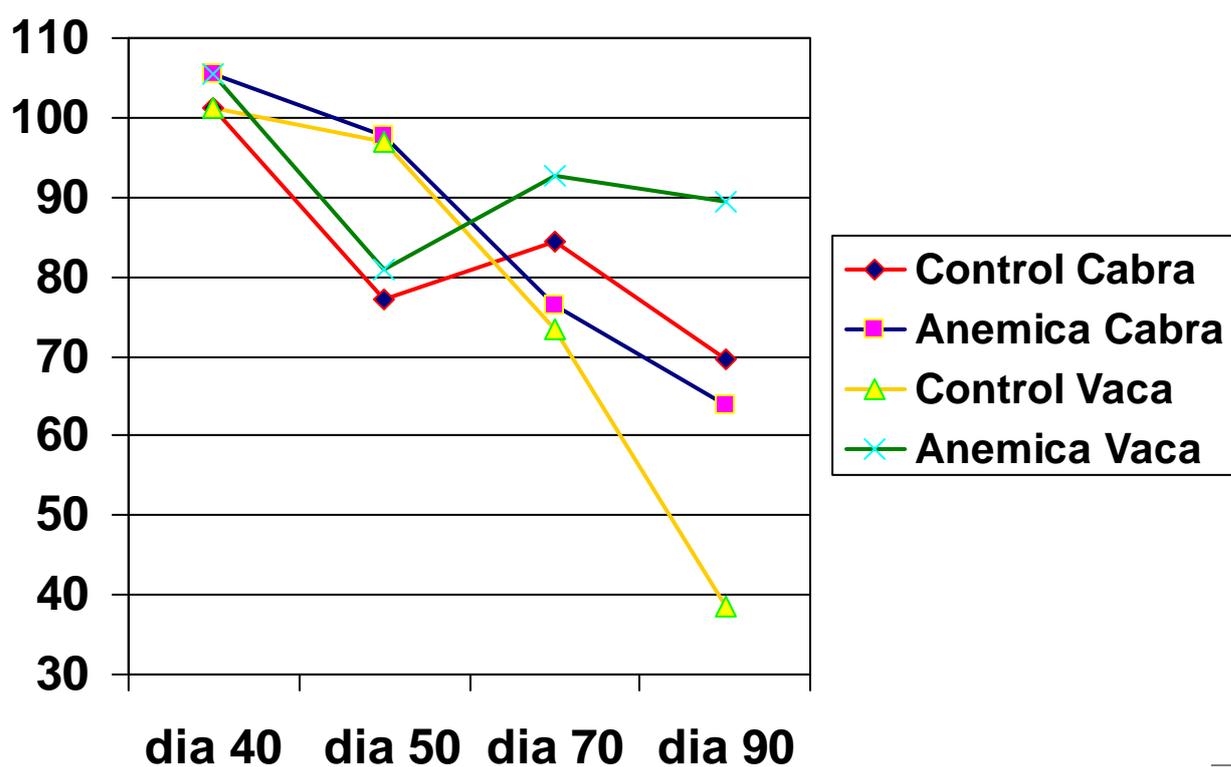


Figura nº 33A. Evolución del Rat/Mouse PINP en dietas basadas en leche sin sobrecarga de Fe.

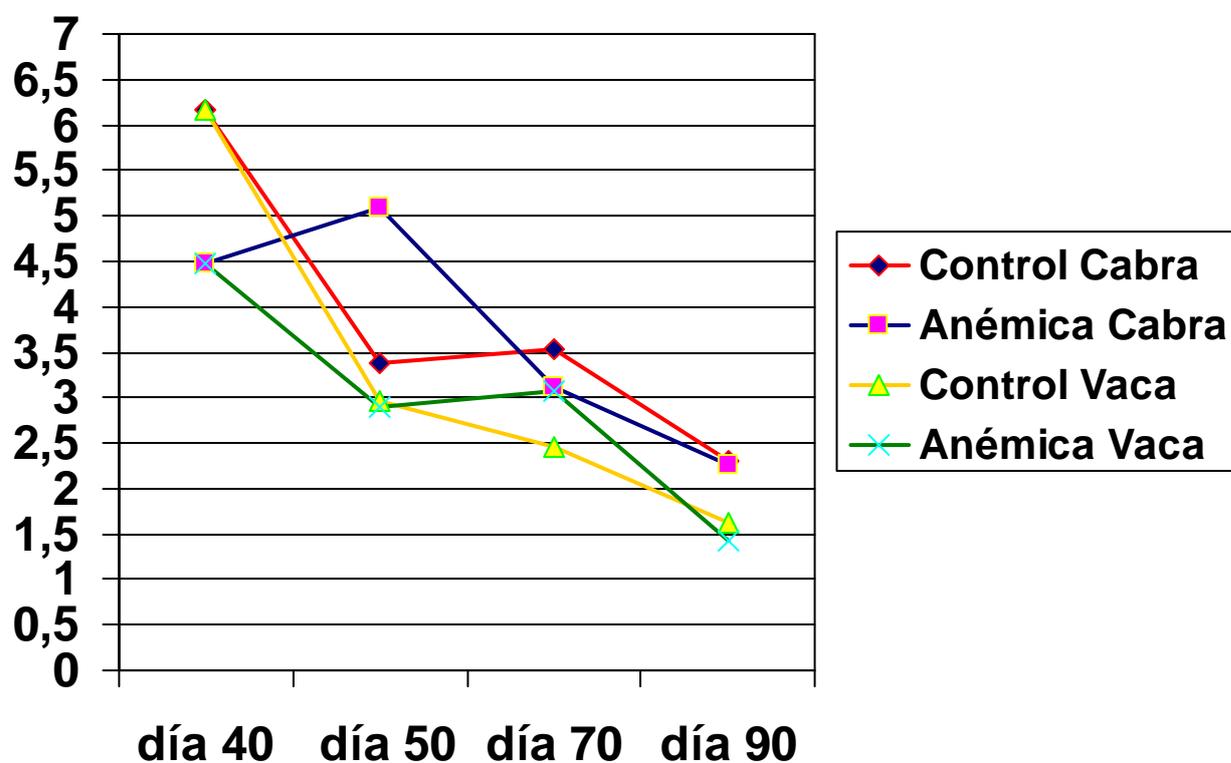


Figura nº 33B. Evolución del Rat/Mouse PINP en dietas basadas en leche con sobrecarga de Fe.

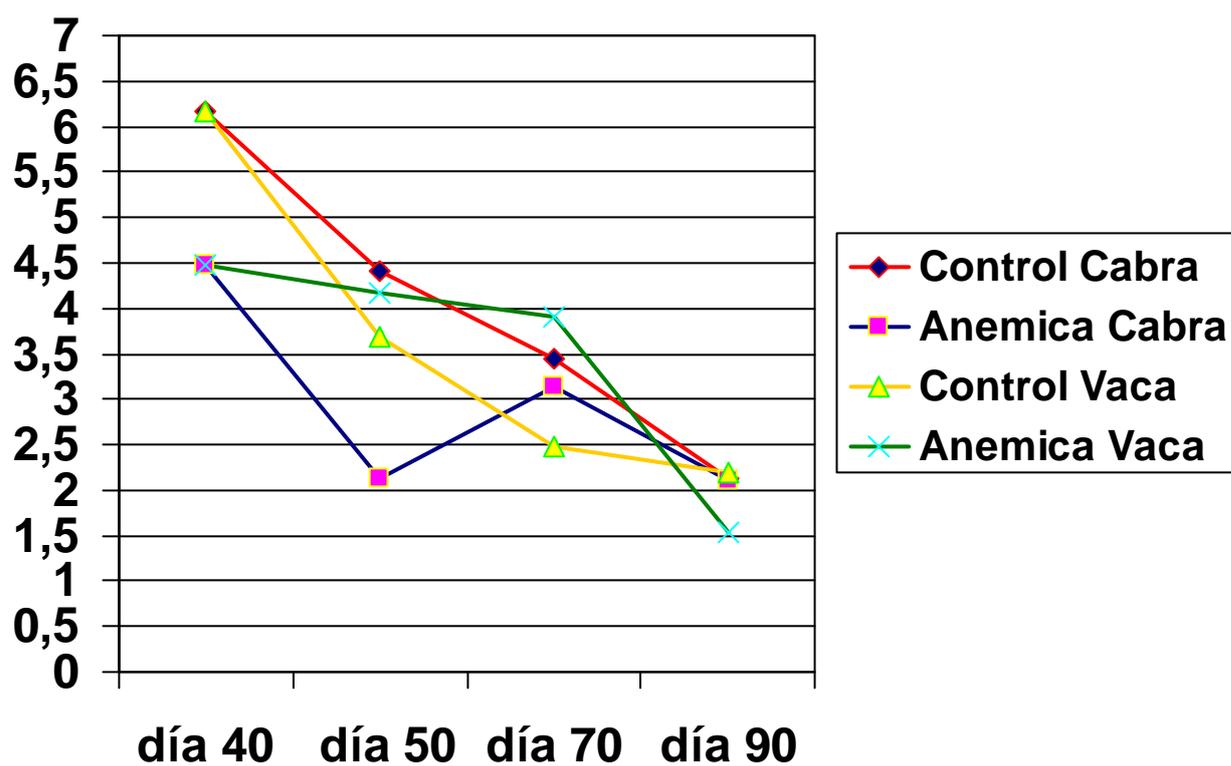


Figura n° 34A. Evolución del RatLaps en dietas basadas en leche sin sobrecarga de Fe.

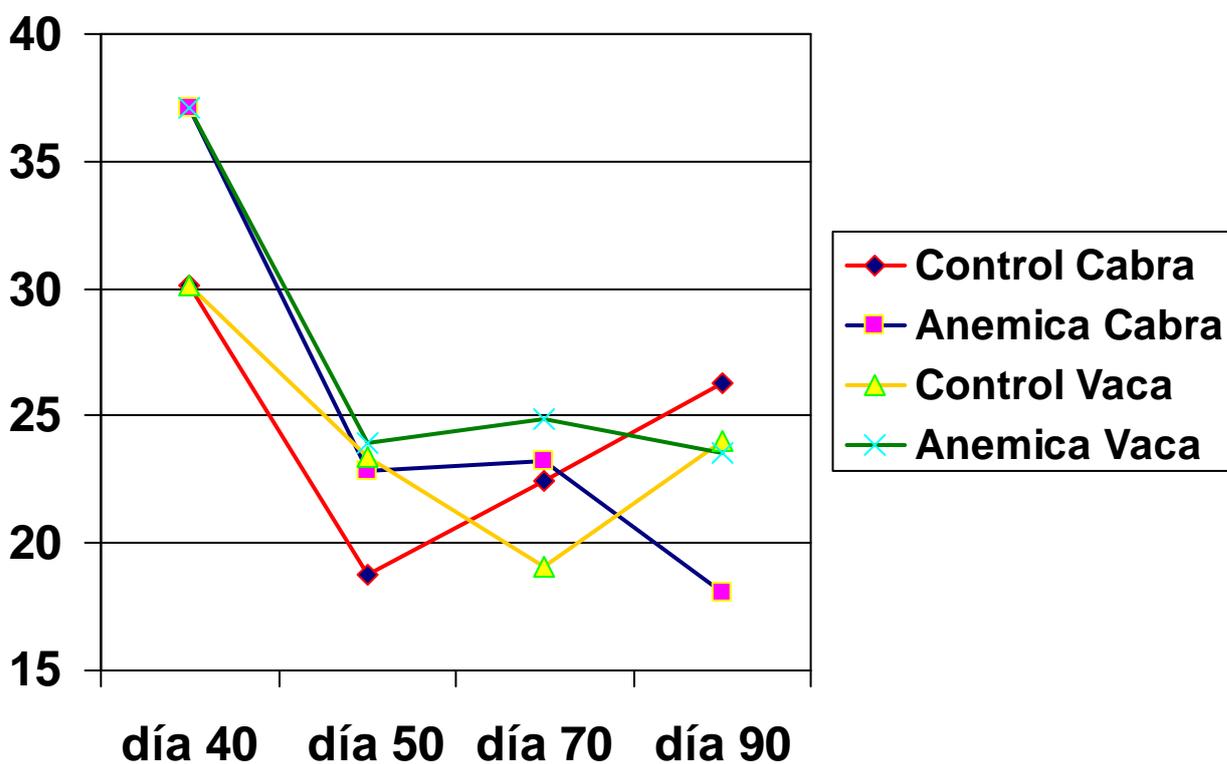


Figura n° 34B. Evolución del RatLaps en dietas basadas en leche con sobrecarga de Fe.

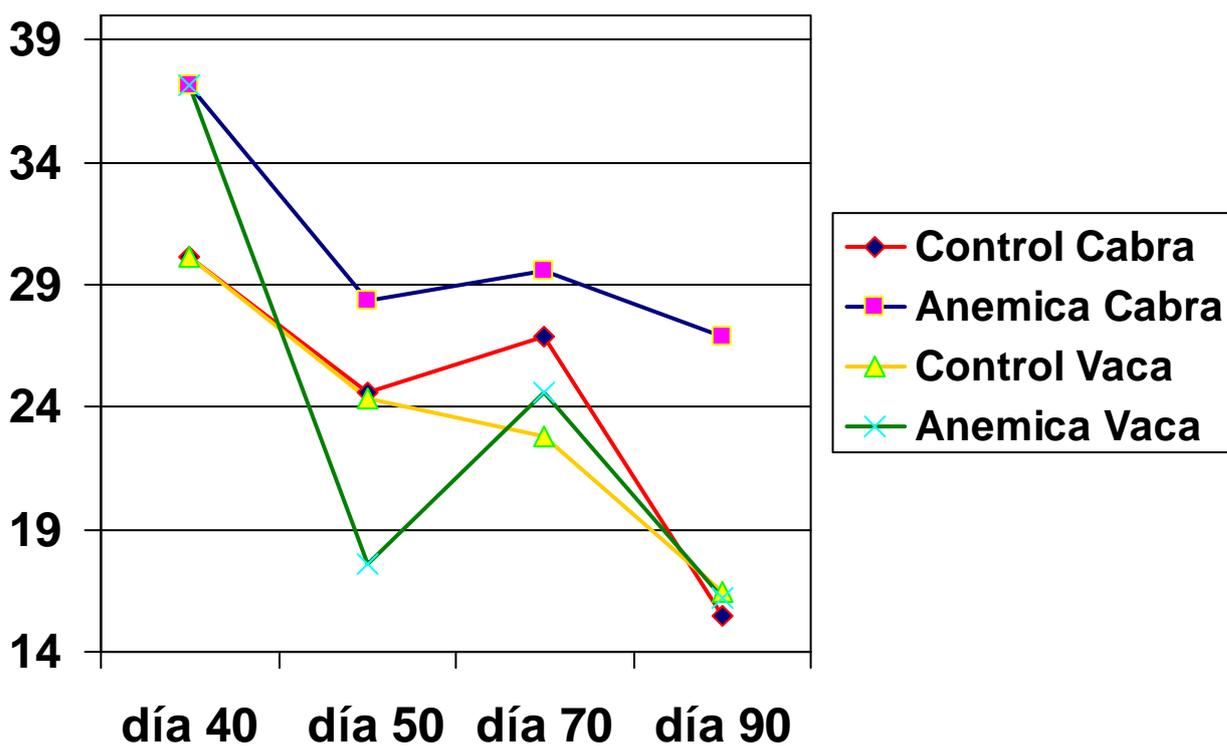


Figura n° 35A. Evolución del RatTRAP en dietas basadas en leche sin sobrecarga de Fe.

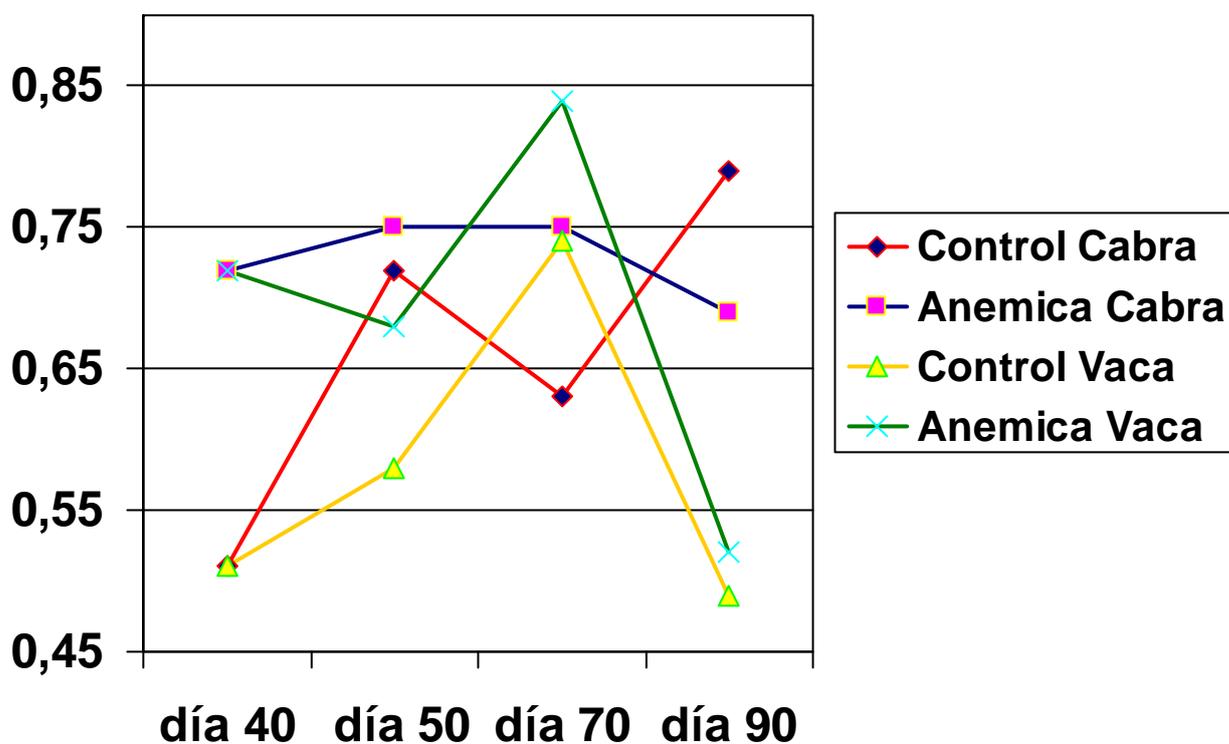


Figura n° 35B. Evolución del RatTRAP en dietas basadas en leche con sobrecarga de Fe.

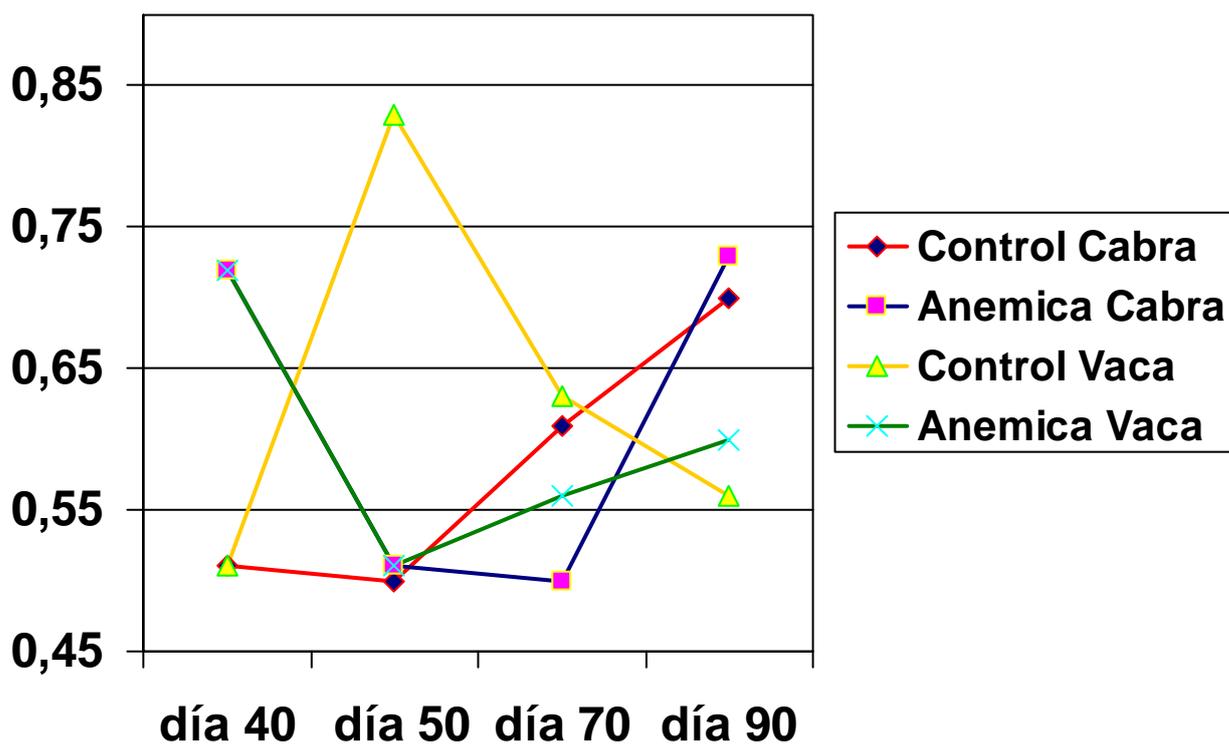


Figura nº 36A. Evolución de la PTH en dietas basadas en leche sin sobrecarga de Fe.

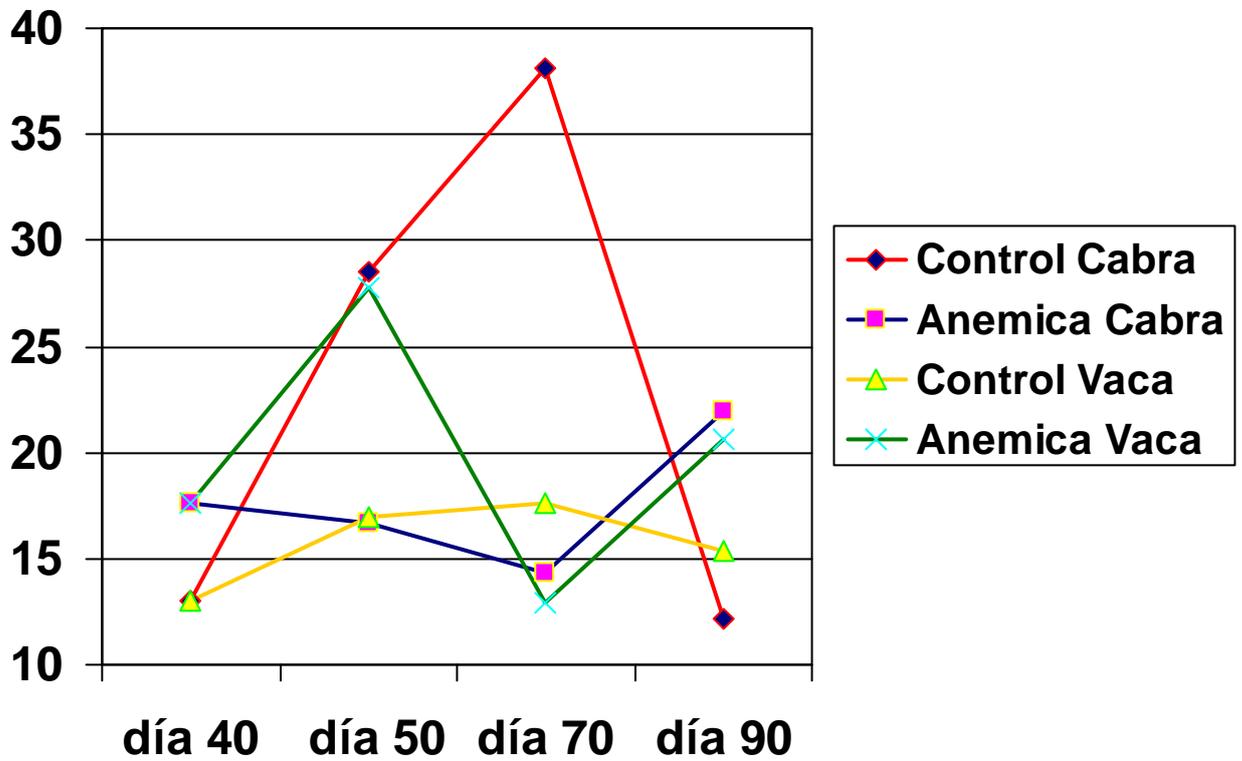


Figura nº 36B. Evolución de la PTH en dietas basadas en leche con sobrecarga de Fe.

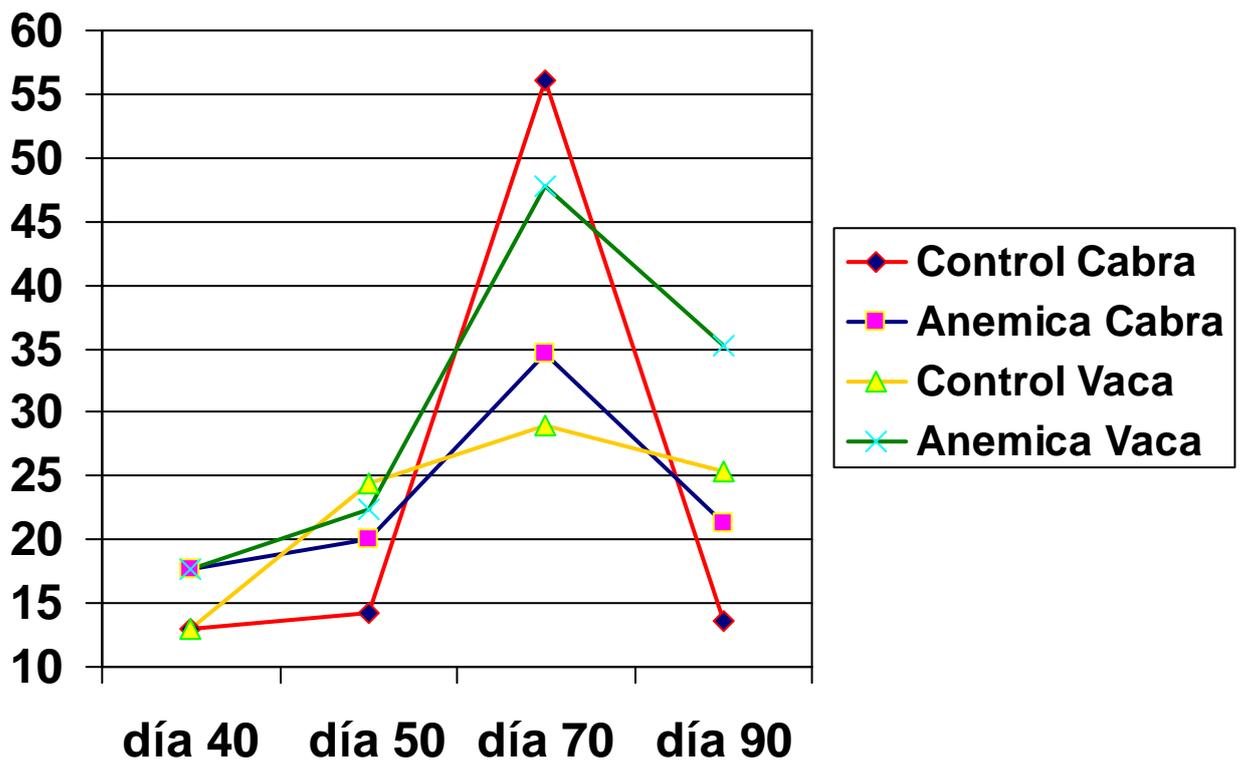


Figura n° 37A. Evolución del Ca en fémur en dietas basadas en leche sin sobrecarga de Fe.

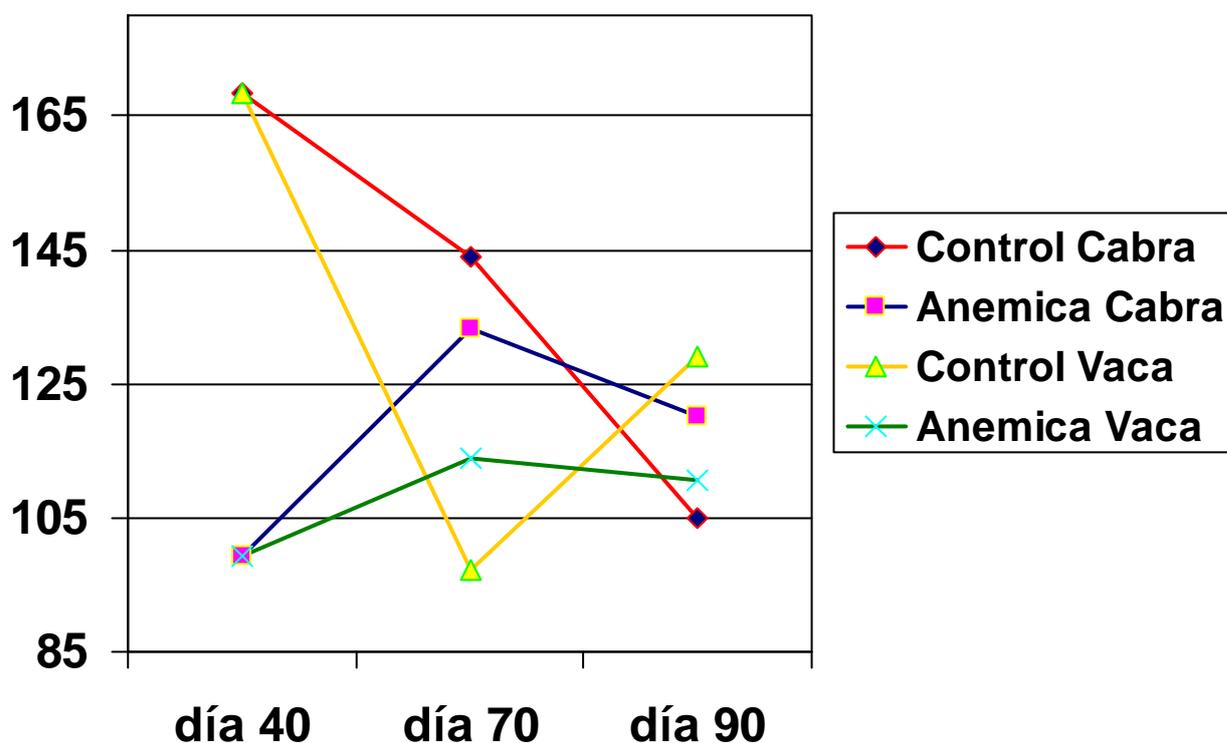


Figura n° 37B. Evolución del Ca en fémur en dietas basadas en leche con sobrecarga de Fe.

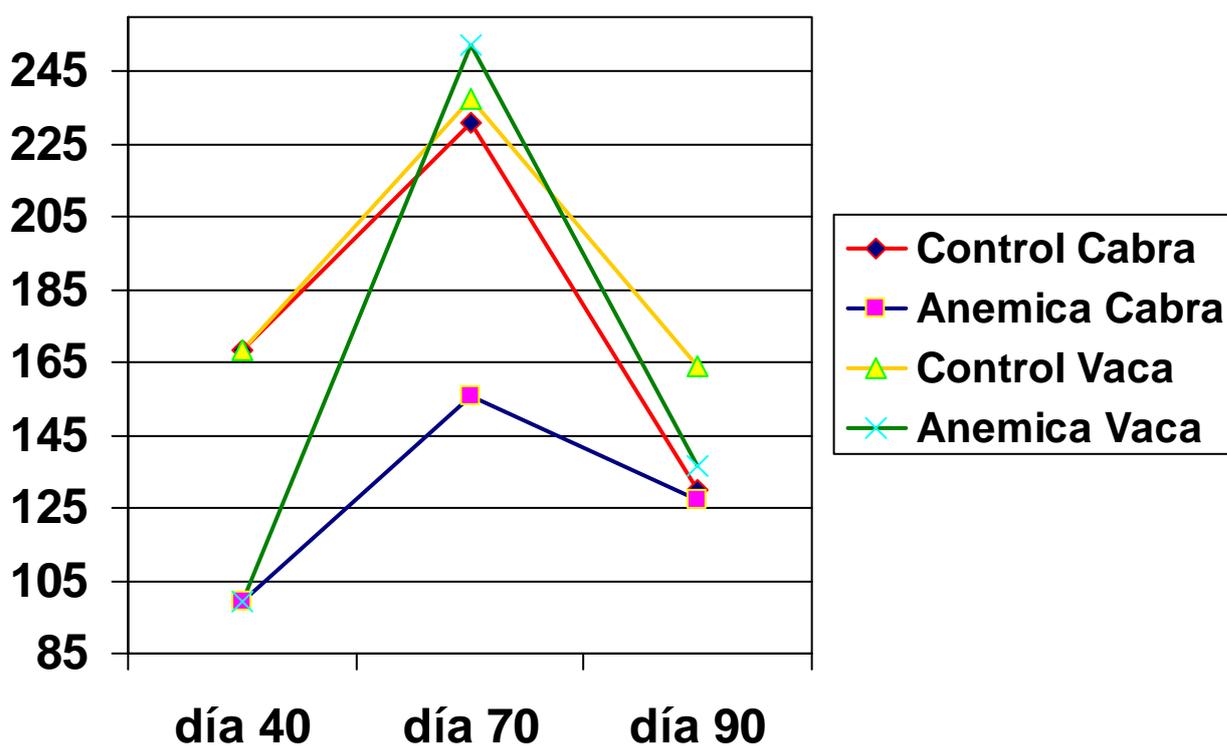


Figura n° 38A. Evolución del P en fémur en dietas basadas en leche sin sobrecarga de Fe.

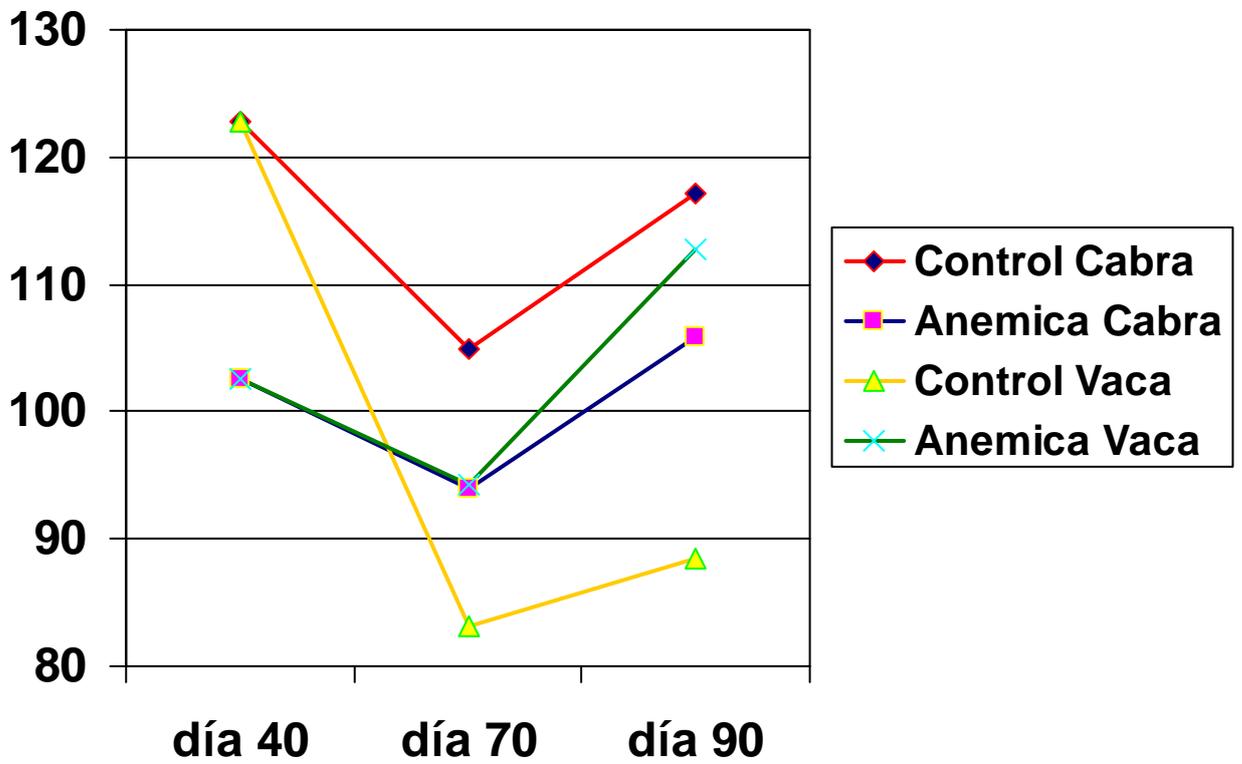


Figura n° 38B. Evolución del P en fémur en dietas basadas en leche con sobrecarga de Fe.

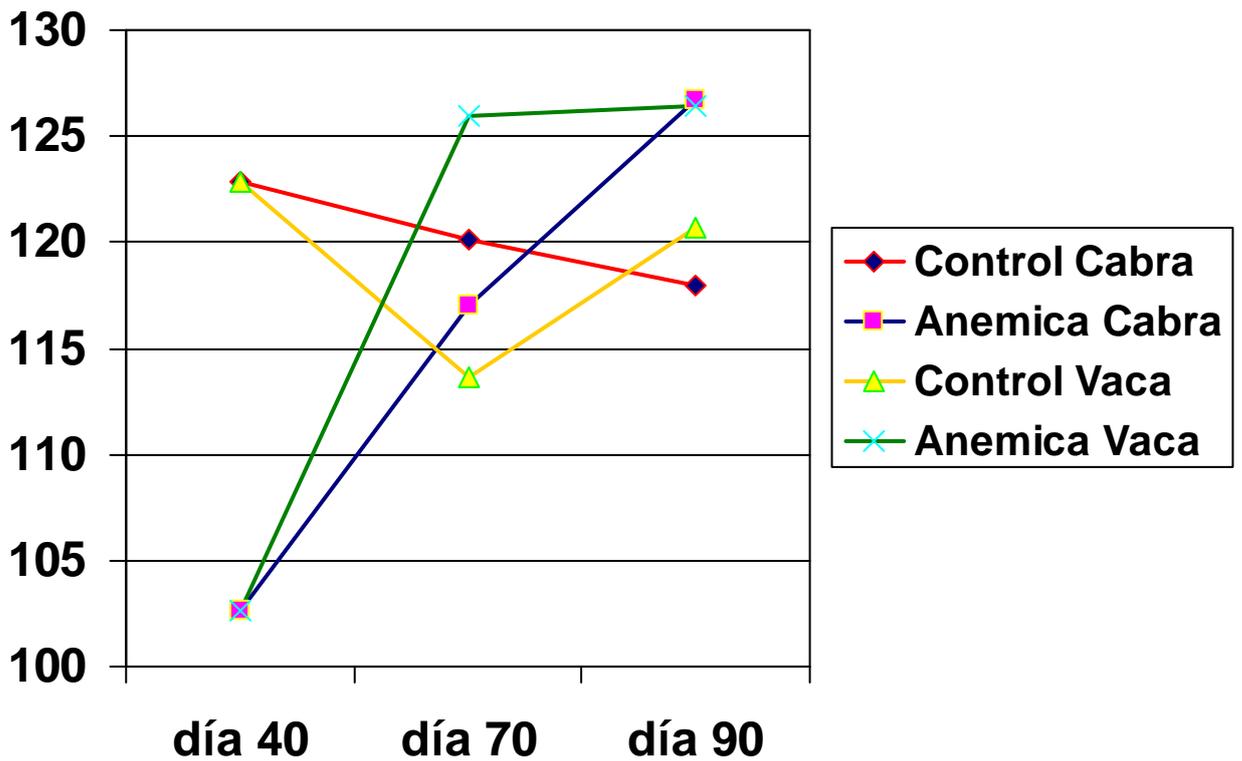


Figura nº 39A. Evolución del Ca en esternón en dietas basadas en leche sin sobrecarga de Fe.

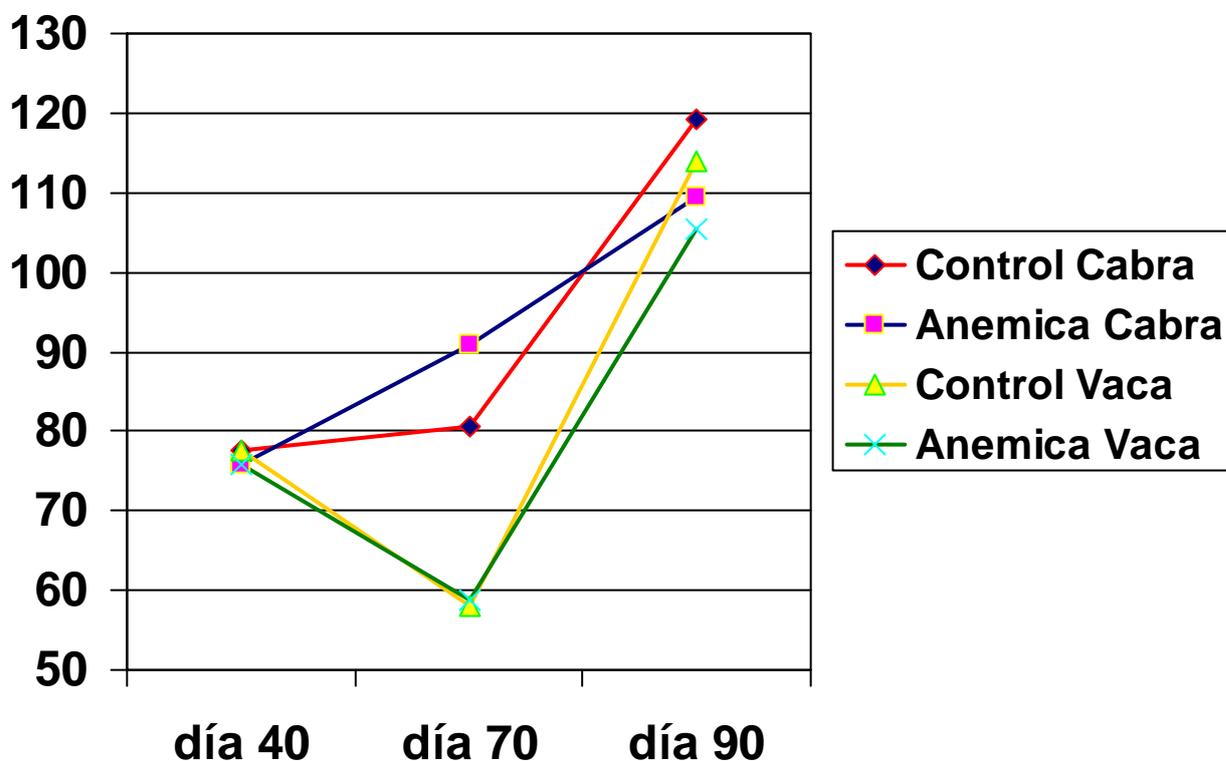


Figura nº 39B. Evolución del Ca en esternón en dietas basadas en leche con sobrecarga de Fe.

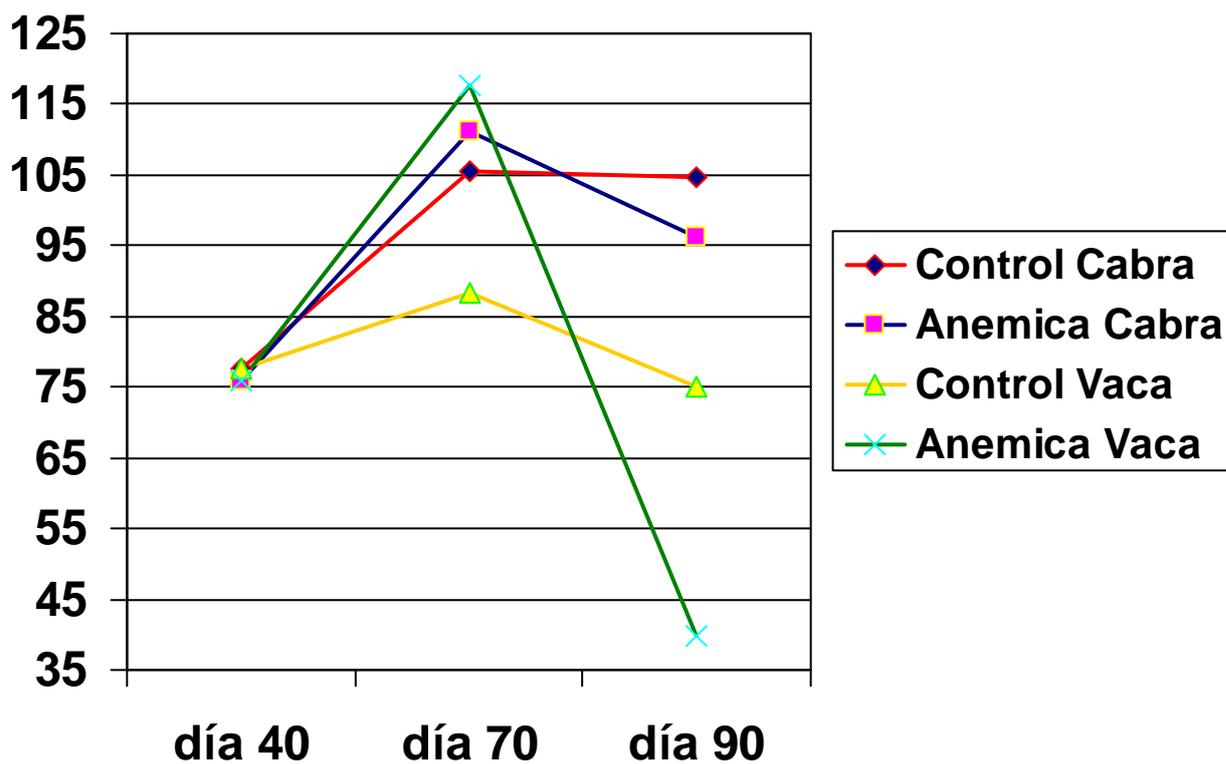


Figura n° 40A. Evolución del P en esternón en dietas basadas en leche sin sobrecarga de Fe.

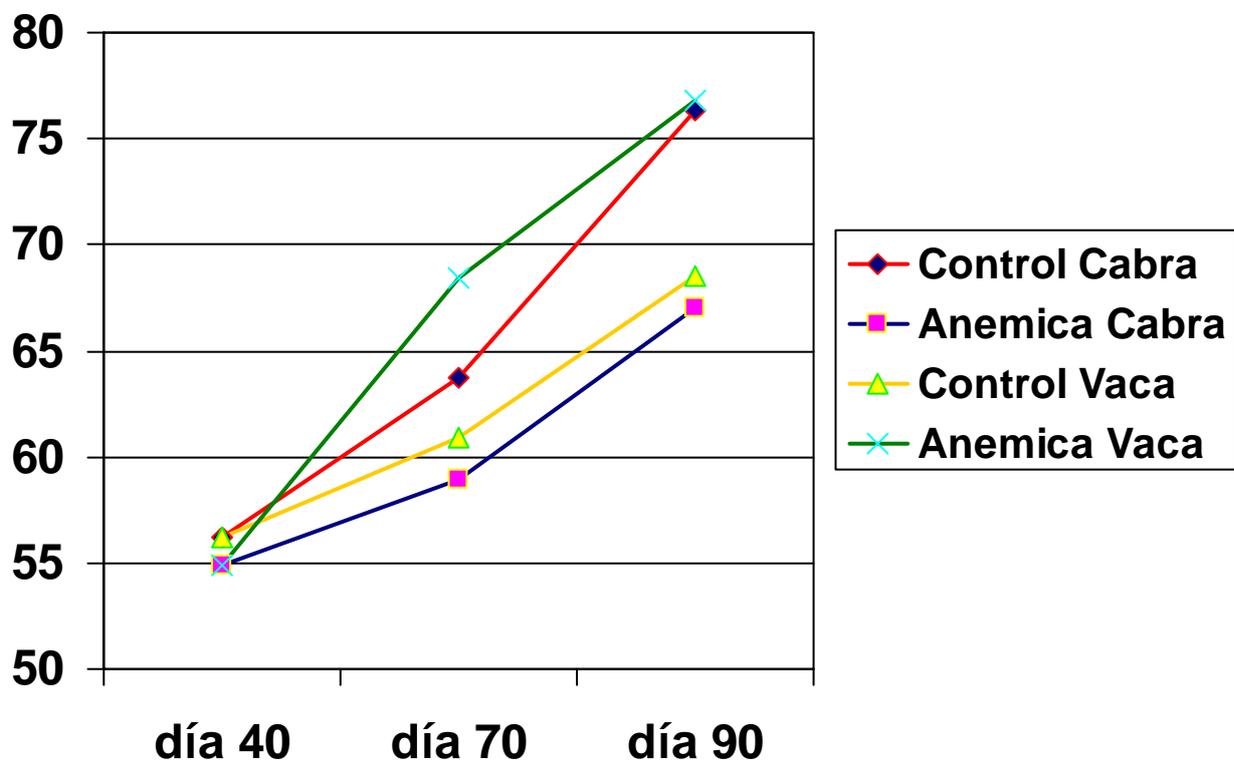


Figura n° 40B. Evolución del P en esternón en dietas basadas en leche con sobrecarga de Fe.

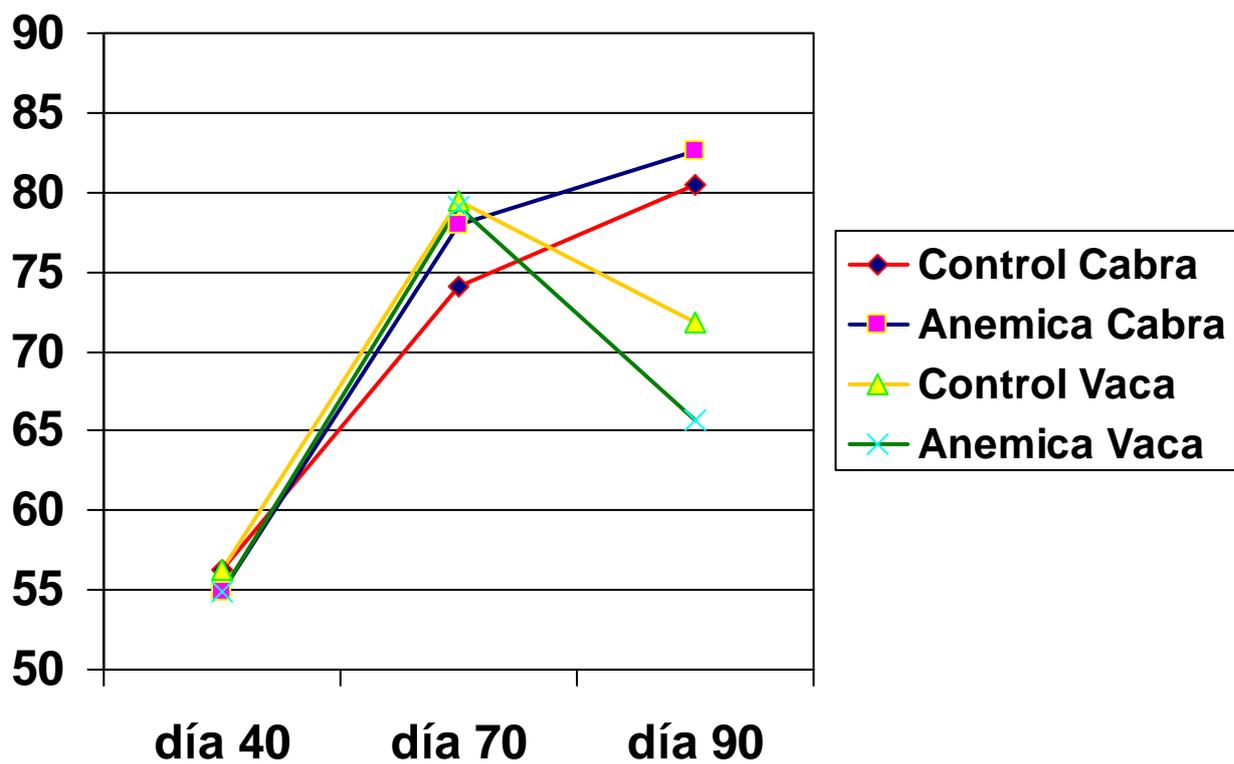


Figura n° 41A. Evolución del Fe en esternón en dietas basadas en leche sin sobrecarga de Fe.

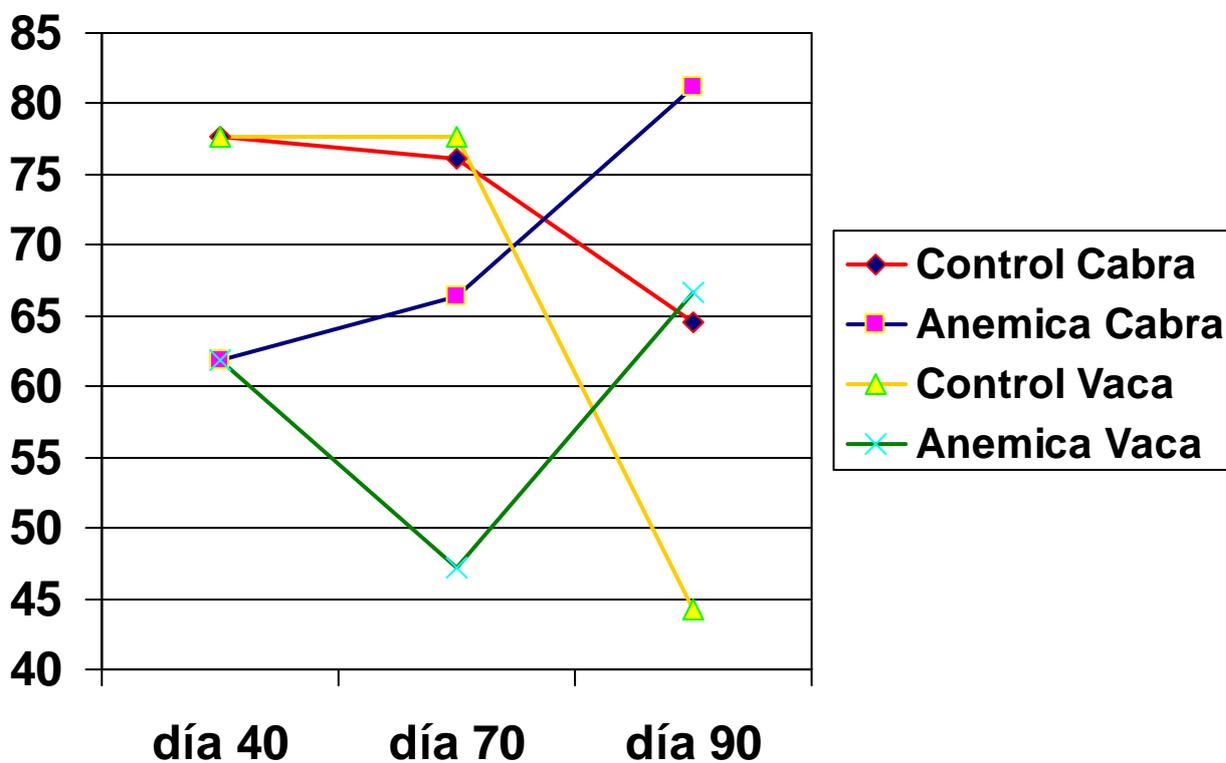
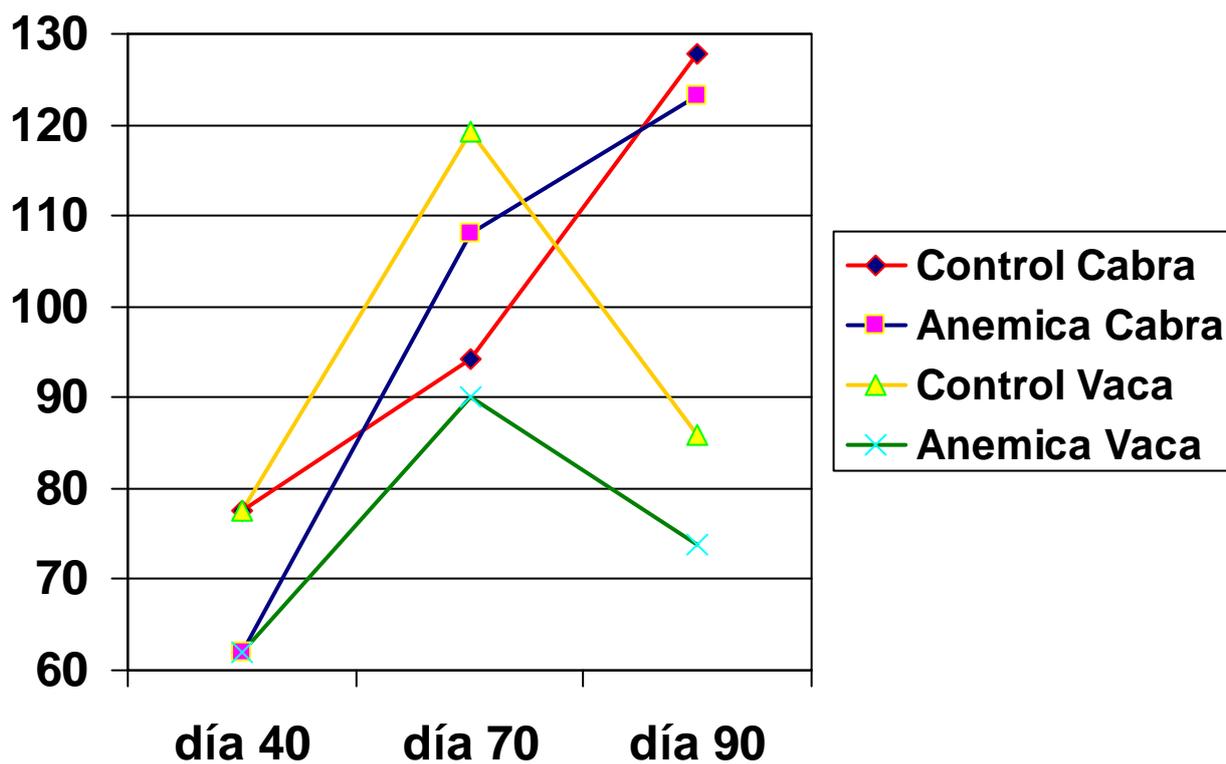


Figura n° 41B. Evolución del Fe en esternón en dietas basadas en leche con sobrecarga de Fe.





5. RESUMEN Y CONCLUSIONES

La investigación llevada a cabo estudia los parámetros de remodelado óseo, así como el depósito mineral en hueso de ratas controles y con anemia ferropénica nutricional inducida experimentalmente y en el proceso de repleción de hierro mediante dietas basadas en leche de cabra o vaca, con un aporte normal o sobrecarga de Fe.

Para inducir la anemia, los animales se someten a un periodo preexperimental de 40 días, en los que un grupo se alimenta con dieta estándar siguiendo la directrices del IAN (excepto el contenido de grasa que es de 10% y procede de aceite de oliva), con un contenido normal de Fe (45 mg/Kg dieta) en animales controles o bajo contenido de Fe (5 mg/Kg dieta) en animales anémicos. Tras suministrar las dietas con contenido normal o bajo contenido en Fe, se determinan los siguientes parámetros hematológicos en ambos grupos: recuento de hematíes, volumen corpuscular medio, hematocrito, plaquetas, hemoglobina, Fe sérico, saturación de transferrina, ferritina y TIBC. Así como parámetros de remodelado óseo, para comprobar la influencia de la ferrodeficiencia en el *turnover* óseo.

Posteriormente, los animales se someten a un periodo experimental, en los que son alimentados con dietas basadas en leche de cabra o vaca (elaboradas con un 10% de grasa y un 20% de proteína, aportada por cada tipo de leche), con un contenido normal (45 mg/kg dieta) o sobrecarga de Fe (450 mg/Kg dieta). Tras 10, 30 y 50 días del consumo de las dietas basadas en leche, (días 50, 70 y 90 del estudio) se determinan los parámetros de remodelado óseo (25-OH vitamina D, Rat/Mouse PINP, RatTRAP, RatLaps, PTH) en todos los grupos, además del contenido de Ca y P en fémur y esternón y Fe en esternón.

Los resultados obtenidos nos han permitido llegar a las siguientes CONCLUSIONES:

CONCLUSIÓN PRIMERA

La anemia ferropénica severa causa un considerable grado de osteomalacia, a la vista de la considerable disminución del marcador de formación ósea Rat/Mouse PINP, junto con un acusado incremento en el marcador de resorción RatTRAP y niveles de PTH.

CONCLUSIÓN SEGUNDA

En ratas anémicas la dieta basada en leche de cabra con contenido normal de Fe, eleva el marcador de formación ósea Rat/MousePINP y disminuye los niveles de PTH en tan sólo 10 días de suministro de esta dieta, indicando el comienzo de la restauración de la osteomalacia inducida por la anemia, hecho que no ocurre con la leche de vaca.

CONCLUSIÓN TERCERA

En ratas controles, la dieta basada en leche de cabra con sobrecarga de Fe, suministrada durante 10 días, produce un descenso de los niveles de PTH lo que incide de manera positiva en el proceso de mineralización ósea.

CONCLUSIÓN CUARTA

Tras 30 días de suministro de las dietas basadas en leche, con contenido normal o sobrecarga de Fe, los marcadores de formación (Rat/Mouse PINP) y resorción (RatLaps y RatTRAP) no presentan diferencias entre ratas anémicas y controles, lo que indica que la osteomalacia inducida por la anemia ferropénica se ha recuperado, si bien el proceso de estabilización del *turnover* óseo comienza antes en los animales alimentados con dieta basada en leche de cabra. Además hay un mayor depósito de Ca en fémur, hecho que incide positivamente en la mineralización del hueso, así como un incremento de Fe en esternón lo cual refleja que la hematopoyesis se ha normalizado prácticamente con la dieta basada en leche de cabra.

CONCLUSIÓN QUINTA

Al final del estudio, tras 50 días de suministro de las dietas basadas en leche, en los animales que consumen la dieta de leche de cabra con contenido normal o sobrecarga de Fe, la osteomalacia producida por la ferropenia se encuentra recuperada, aunque los marcadores de formación y resorción indican que está activo el remodelado del hueso, si bien, su velocidad ha descendido ya que los niveles de PTH no se modifican.

CONCLUSIÓN GENERAL

La anemia causa un considerable grado de osteomalacia. La repleción de Fe mediante el consumo de una dieta basada en leche de cabra, ya sea con contenido normal o sobrecarga de Fe, recupera el estatus óseo en tan sólo 10 días y al prolongar el consumo de las dietas basadas en leche, los parámetros de remodelado óseo se normalizan con ambas dietas, si bien la leche de cabra restablece antes este proceso y favorece el depósito mineral. Los resultados obtenidos en la presente Tesis nos permiten aconsejar la inclusión de la leche de cabra en la dieta de poblaciones que sufren anemia ferropénica nutricional, ya que este tipo de leche ayuda a paliar los efectos adversos producidos en el hueso tanto por la deficiencia como por la sobrecarga de Fe.





- Abboud S y Haile DJ (2000). A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J Biol Chem.* 265: 19906-19912.
- Abrams SA, Griffin IJ y Davila PM (2002). Calcium and zinc absorption from lactose-containing and lactose-free infant formulas. *Am J Clin Nutr.* 76: 442-446.
- Abrams SA, Griffin IJ, Davila P y Liang L (2001). Calcium fortification of breakfast cereal enhances calcium absorption in children without affecting iron absorption. *J Pediatr.* 139: 522-526.
- Abrams SA, O'Brien KO, Wen J, Liang LK y Stuff JE (1996). Absorption by 1-year-old children of an iron supplement given with cow milk or juice. *Pediatr Res.* 39: 171-175.
- Acharya J, Panchard NA, Taylor IA, Tompson RPH y Pearson TC (1991). Red Cell peroxidation and antioxidant enzymes in iron deficiency. *Eur J Haematol.* 47: 287-291.
- Agte V, Jahagirdar M y Chiplonkar S (2005). Apparent absorption of eight micronutrients and phytic acid from vegetarian meals in ileostomized human volunteers. *Nutrition.* 21: 678-685.
- Ahlen J, Andersson S, Mukohyama H, Roth C, Bäckman A, Conaway HH y Lerner UH (2002). Characterization of the bone resorptive effect of interleukin-11 in cultured mouse calvarial bones. *Bone.* 31: 242-251.

- Alatalo SL, Ivaska KK, Waguespack SG, Econs MJ, Väänänen HK y Halleen JM (2004). Osteoclast-derived serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b in Albers-Schonberg disease (type II autosomal dominant osteopetrosis). *Clin Chem.* 50: 883-890.
- Alatalo SL, Penq Z, Janckila AJ, Kaija H, Vihko P, Väänänen HK y Halleen JM (2003). A novel immunoassay for the determination of tartrate-resistant acid phosphatase 5b from rat serum. *J Bone Miner Res.* 18: 134-139.
- Alfárez MJM, Barrionuevo M, López-Aliaga I, Sanz-Sampelayo MR, Lisbona F, Robles JC y Campos MS (2001). Digestive utilization of goat and cow milk fat in malabsorption syndrome. *J Dairy Res.* 68: 451-461.
- Alfárez MJM, López-Aliaga I, Barrionuevo M, Lisbona F, Hartiti S, Pallarés I y Campos MS (1996). Calcium absorption in rats with distal intestinal resection: influence of dietary fat, cholecalciferol and nature of the adaptive response. *Int J Vit Nutr Res.* 66: 59-65.
- Alfárez MJM, López-Aliaga I, Nestares T, Díaz-Castro J, Barrionuevo M, Ros PB y Campos MS (2006). Dietary goat milk improves iron bioavailability in rats with induced nutritional ferropernic anaemia in comparison with cow milk. *Int Dairy J.* 16: 813-821.
- .Alla V y Bonkovsky HL (2005). Iron in nonhemochromatotic liver disorders. *Semin Liver Dis.* 25: 461-472.
- Amaro MA y Cámara F (2004). Nutritional aspect of zinc availability. *Int J Food Sci Nutr.* 55: 597-606.
- Anderson HC (2003). Matrix vesicles and calcification. *Curr Rheumatol Re.* 5: 222-226.
- Anderson JJB (2003). Nutrição para a saúde óssea. En: Mahan LK y Escott-Stump S (eds). *Krause Alimentos, nutrição e dietoterapia.* 10ª ed. São Paulo: Editora Roca. pp: 591-611.
- Andrews NC (1999). Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med.* 341: 1986-1995.

- Andrews NC (2005). Understanding heme transport. *N Engl J Med.* 353: 2508-2509.
- Andrews NC (2008). Forging a field: the golden age of iron biology. *Blood.* 112: 219-230.
- Anghileri LJ y Thouvenot P (1998). ATP in iron overload-induced intracellular calcium changes. *Int J Mol Med.* 1: 869-873.
- Ania BJ, Suman VJ y Fairbanks VF (1997). Incidence of anemia in older people: an epidemiologic study in a well defined population. *J Am Geriatr Soc.* 45: 825-831.
- Appel LJ, Moore TJ, Obarzanek E, Vollmer WM, Svetkey LP, Sacks FM, Bray GA, Vogt TM, Cutler JA, Windhauser MM, Lin PH y Karanja N (1997). A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure. DASH Collaborative Research Group. *N Engl J Med.* 336: 1117-1124.
- Arbiza SF (1986). *Producción de caprino.* México: AGT Editores. pp: 105-128.
- Arnett T (2004). Estructura y remodelado del hueso. En: Riancho Moral JA y González Macías J (eds). *Manual práctico de osteoporosis y enfermedades del metabolismo mineral.* Madrid: Jarpyo S.A. pp: 1-7.
- Arnett TR, Gibbons DC, Untting JC, Orris IR, Hoebertz A y Meghji S (2003). Hypoxia is a major stimulator of osteoclast formation and bone resorption. *J Cell Physiol.* 196: 2-8.
- Arredondo M y Núñez MT (2005). Iron and copper metabolism. *Mol Aspects Med.* 26: 313-327.
- Arredondo M, Martínez R, Núñez MT, Ruz M y Olivares M (2006). Inhibition of iron and copper uptake by iron, copper and zinc. *Biol Res.* 39: 95-102.
- Arvas A y Gur E (2000). Are ferric compounds useful in treatment of iron deficiency anemia? *Turk J Pediatr.* 42: 352-353.

Aslan M, Horoz M, Kocyigit A, Ozgonul S, Celik H, Celik M y Erel O (2006). Lymphocyte DNA damage and oxidative stress in patients with iron deficiency anemia. *Mutat Res.* 601: 144-149.

Aubin JE y Bonnelye E (2000). Osteoprotegerin and its ligand: A new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption. *Osteoporos Int.* 11: 905-913.

Aubin JE y Liu F (1996). The osteoblasts lineage. En: Bilezikian JP, Raisz LG y Rodan GA (eds). *Principles of Bone Biology*. San Diego, California: Academic Press. pp: 51-67.

Aust AE y Eveleigh JF (1999). Mechanisms of DNA oxidation. *Proc Soc Exp Biol Med.* 222: 246-252.

Awumey EM y Bukoski RD (2006). Cellular functions and fluxes of calcium. En: Weaver CM y Heaney RP (eds). *Calcium in Human Health*. New Jersey: Humana Press. pp: 13-35.



Baech SB, Hansen M, Bukhave K, Jensen M, Sorensen SS, Kristensen L, Purslow PP, Skibsted LH y Sandström B (2003). Nonheme-iron absorption from a phytate-rich meal is increased by the addition of small amounts of pork meat. *Am J Clin Nutr.* 77: 173-179.

Baltussen R, Knai C y Sharan M (2004). Iron fortification and iron supplementation are cost-effective interventions to reduce iron deficiency in four subregions of the world. *J Nutr.* 134: 2678-2684.

Barrionuevo M, Alférez MJM, López-Aliaga I, Sanz Sampelayo MR y Campos MS (2002). Beneficial effect of goat milk on nutritive utilization of iron and copper in malabsorption syndrome. *J Dairy Sci.* 85: 657-664.

- Beard JL (2007). Recent evidence from human and animal studies regarding iron status and infant development. *J Nutr.* 137: 524-530.
- Beard JL (2001). Iron biology in immune function, muscle, metabolism, and neuronal functioning. *J Nutr.* 131: 568S-579S.
- Beard JL, Felt B, Schallert T, Burhans M, Connor JR y Georgieff MK (2006). Moderate iron deficiency in infancy: Biology and behavior in young rats. *Behav Brain Res.* 170: 224-232.
- Belewu MA y Aiyegbusi OF (2002). Comparison of the mineral content and apparent biological value of milk from human, cow and goat. *The Journal of Food Technology in Africa.* 7: 9-11.
- Belitz HD y Grosch W (1997). *Química de los alimentos.* 2ª ed. Zaragoza: Acribia. pp: 813.
- Benais-Pont G, Punn A, Flores-Maldonado C, Eckert J, Raposo G, Fleming TP, Cerejido M, Balda MS y Matter K (2003). Identification of a tight junction-associated guanine nucleotide exchange factor that activates Rho and regulates paracellular permeability. *J Cell Biol.* 160: 729-740.
- Beri R y Chandra R (1993). Chemistry and biology of heme. Effect of metal salts, organometals, and metalloporphyrins on heme synthesis and catabolism, with special reference to clinical implications and interactions with cytochrome P-450. *Drug Metab Rev.* 25: 49-152.
- Berndt T y Kumar R (2007). Phosphatonins and the regulation of phosphate homeostasis. *Annu Rev Physiol.* 69: 341-359.
- Berndt T y Kumar R (2009). Novel Mechanisms in the Regulation of Phosphorus Homeostasis. *Physiology.* 24: 17-25.

- Berndt T, Craig TA, Bowe AE, Vassiliadis J, Reczek D, Finnegan R, Jan De Beur SM, Schiavi SC y Kumar R (2003). Secreted frizzled-related protein 4 is a potent tumor-derived phosphaturic agent. *J Clin Invest.* 112: 785-794.
- Berndt TJ y Knox FG (1992). Renal regulation of phosphate excretion. En: Selding DW, Giebish G (eds). *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*. New York, U.S.A.: Raven Press. pp: 2511-2532.
- Bertolo RFP, Bettger WJ y Atkinson SA (2001). Divalent metals inhibit and lactosa stimulates zinc transport across brush border membrane vesicles from piglets. *J Nut Biochem.* 12: 73-80.
- Besarab A, Hörl WH y Silverberg D (2009). Iron metabolism, iron deficiency, thrombocytosis, and the cardiorenal anemia syndrome. *Oncologist.* 14: 22-33.
- Bessman SP y Carpenter CL (1985). The creatine-creatine phosphate energy shuttle. *Annu Rev Biochem.* 54: 831-862.
- Beutler E, Hoffbrand VA y Cook JD (2003). Iron Deficiency and Overload. *Hematology.* 40-61.
- Bevilacqua C, Martin P, Candalh C, Fauquant J, Piot M, Roucayrol AM, Pilla F y Heyman M (2001). Goats' milk of defective α S1-casein genotype decreases intestinal and systemic sensitization to b-lactoglobulin in guinea pigs. *J Dairy Sci.* 68: 217-222.
- Bianca-María E, Ravilacqua C, Martin P y Chandal C (2001). Goat's milk of defective α S1-casein genotype decreases intestinal and systemic sensibilization to β -lactoglobulin in guinea pigs. *J Dairy Res.* 68: 217-227.
- Bikle DD, Ng D, Tu CL, Oda Y y Zie X (2001). Calcium- and vitamin D-regulated keratinocyte differentiation. *Mol Cell Endocrinol.* 177: 161-171.
- Bloem MW (1995). Interdependence of vitamin A and iron: an important association for programmes of anaemia control. *Proc Nutr Soc.* 54: 501-508.

- Boccio J, Salgueiro J, Lysionek A, Zubillaga M, Goldman C, Weill R y Caro R (2003). Metabolismo del hierro: conceptos actuales sobre un micronutriente esencial. *ALAN*. 53: 119-132.
- Boddy JL (2005). The androgen receptor is significantly associated with vascular endothelial growth factor and hypoxia sensing via HIF1a, HIF2a and the prolyl hydroxylases in human prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 11: 7658-7663.
- Boffa LC, Mariani MR y Newmark H (1989). Calcium as modulator of nucleosomal histones acetylation in cultured cells. *Proc Am Assoc Cancer Res*. 30:8 (abstr).
- Boland AR y Nemere I (1992). Rapid actions of vitamin D compounds. *J Cell Biochem*. 49: 32-36.
- Boland AR y Norman AW (1990a). Evidence for involvement of protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase in the 1,25(OH)₂-vitamin D₃-mediated rapid stimulation of intestinal Ca²⁺ transport. *Endocrinology*. 127: 39-45.
- Boland AR y Norman AW (1990b). Influx of extracellular calcium mediates 1,25(OH)₂-vitamin D₃-dependent rapid stimulation of duodenal Ca²⁺ transport. *Endocrinology*. 127: 2475-2480.
- Boland AR, Facchinetti MM, Balogh G, Massheimer V y Boland RL (1996). Age-associated decrease in inositol 1,4,5-trisphosphate and diacylglycerol generation by 1,25(OH)₂ vitamin D₃ in rat intestine. *Cellular Signalling*. 8: 153-157.
- Bomford A (2002). Genetics of haemochromatosis. *Lancet*. 360: 1673-1681.
- Bonewald L y Mundy GR (1990). Role of transforming growth factor beta in bone remodeling. *Clin Orthop Rel Re*. 2S: 35-40.
- Bonkovsky HL, Lambrecht RW y Shan Y (2003). Iron as a co-morbid factor in nonhemochromatotic liver disease. *Alcohol*. 30: 137-144.

- Borghi L, Schianchi T, Meschi T, Guerra A, Allegri F, Maggiore U y Novarini A (2002). Comparison of two diets for the prevention of recurrent stones in idiopathic hypercalciuria. *N Engl J Med.* 346: 77-84.
- Boron WF y Boulpaep EL (2003). The Parathyroid Glands and Vitamin D. En: *Medical Physiology: A Cellular And Molecular Approach*. Elsevier/Saunders. pp: 1300.
- Borrás A (1968). Cómo comer y beber leche. *Comité Nacional Lechero.* 8: 7-130.
- Bouillon R (2001). Vitamin D: from photosynthesis, metabolism, and action to clinical applications. En: DeGroot LJ y Jameson JL (eds). *Endocrinology*. Philadelphia: W.B. Saunders. pp: 1009-1028.
- Boyle WJ, Simonet WS y Lacey DL (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 423: 337-342.
- Boza J (1992). Obtención de hidrolizados enzimáticos de proteínas lácteas. Estudio del valor nutritivo y de la capacidad antigénica. *Tesis Doctoral*. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.
- Boza J y Sanz Sampelayo MR (1984). Antecedentes históricos de la cabra en Andalucía. *Jábega.* 45: 69-75.
- Boza J y Sanz-Sampelayo MR (1997). Nutritional aspects of goat milk. *An Acad Cienc Vet Andalucía Oriental.* 10: 109-139.
- Brandao-Burch A, Utting JC, Orriss IR y Arnett TR (2005). Acidosis inhibits bone formation by osteoblasts in vitro by preventing mineralization. *Calcif Tissue Int.* 77: 167-174.
- Breuer W, Hershko C y Cabantchik ZI (2000). The importance of non-transferrin bound iron in disorders of iron metabolism. *Transfus Sci.* 23: 185-192.

- Bringham FR (2002). PTH receptors and apoptosis in osteocytes. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2: 245-251.
- Brissot P, Wright TL, Ma WL y Weisiger RA (1985). Efficient clearance of non-transferrin-bound iron by rat liver. Implications for hepatic iron loading in iron overload states. *J Clin Invest.* 76: 1463-1470.
- Brittenham GM (2000). Disorders of Iron Metabolism: Iron deficiency and overload. En Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE y McGlave P (eds). *Hematology: Basic Principles and Practice.* 3ª ed. New York: Churchill Livingstone. pp: 397-427.
- Broadus AE (1993). Physiological functions of calcium, magnesium and phosphorus and mineral ion balance. En: Favus MJ. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism.* 2ª ed. New York: Raven Press. pp: 41-46.
- Brody T (1999). Inorganic nutrients. En: *Nutritional Biochemistry.* 2ª ed. San Diego: Academic Press. pp: 693-878.
- Bronner F (2003). Mechanisms and functional aspects of intestinal calcium absorption. *J Exp Zool.* 300: A47-A52.
- Bronner F (2009). Recent developments in intestinal calcium absorption. *Nutr Reviews.* 62: 109-113.
- Brotanek JM, Gosz J, Weitzman M y Flores G (2007). Iron deficiency in early childhood in the United States: risk factors and racial/ethnic disparities. *Pediatrics.* 120: 568-575.
- Brown EM (2000). The extracellular Ca²⁺-sensing receptor: central mediator of systemic calcium homeostasis. *Annu Rev Nutr.* 20: 507-533.
- Brown EM y MacLeod RJ (2001). Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. *Physiol Rev.* 81: 239-297.

Buchowski MS y Miller DD (1990). Calcium bioavailability from ripening cheddar cheese. *J Food Sci.* 55: 1293-1295.

Burgess TL, Quian Y, Kaufman S, Ring BD, Van G, Capparelli C, Kelley M, Hsu H, Boyle WJ, Dunstan CR, Hu S y Lacey DL (1999). The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol.* 145: 527-538.

Burguera B, Hofbauer LC, Thomas T, Gori F, Evans GL, Koshla S, Riggs BL y Turner RT (2001). Leptin reduces ovariectomy induced bone loss in rats. *Endocrinology.* 142: 3546-3553.

Burhans MS, Dailey C, Beard Z, Wiesinger J, Murray-Kolb L, Jones BC y Beard JL (2005). Iron deficiency: differential effects on monoamine transporters. *Nutr Neurosci.* 8: 31-38.

Burr DB (2002). Targeted and nontargeted remodeling. *Bone.* 30: 2-4.

Butters RR Jr, Chattopadhyay N, Nielsen P, Smith CP, Mithal A, Kifor O, Bai M, Quinn S, Goldsmith P, Hurwitz S, Krapcho K, Busby J y Brown EM (1997). Cloning and characterization of a calcium-sensing receptor from the hypercalcemic New Zealand white rabbit reveals unaltered responsiveness to extracellular calcium. *J Bone Miner Res.* 12: 568-579.

Buzinaro EF, Almeida RN y Mazeto GM (2006). Biodisponibilidade do cálcio dietético. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 50: 852-861.



Cáceres E, García ML, Toro J y Selgas MD (2003). Aspectos fisiológicos y nutritivos del calcio. *Aliment Equipos Tecno.* 64-72.

- Caetano-Lopes J, Helena C y Fonseca JE (2007). Osteoblasts and bone formation. *Órgão Oficial da Sociedade Portuguesa de Reumatologia - Acta Reum Port.* 32: 103-110.
- Calvo MS (1994). The effects of high phosphorus intake on calcium homeostasis. *Adv Nutr Res.* 9: 183-207.
- Calvo MS y Park YK (1996). Changing phosphorus content of the U.S. diet: potential for adverse effects on bone. *J Nutr.* 126: 1168S-1180S.
- Calvo MS, Eyre DR y Gundberg CM (1996). Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover. *Endocr Rev.* 17: 333-368.
- Campos MS, Barrionuevo M, Alférez MJ, Gómez-Ayala AE, Rodríguez-Matas MC, López Aliaga I y Lisboa F (1998). Interactions among iron, calcium, phosphorus and magnesium in the nutritionally iron-deficient rat. *Exp Physiol.* 83: 771-781.
- 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. *In Dairy J.* 17: 412-419.
- Campos MS, López-Aliaga I, Alférez MJM, Nestares T y Barrionuevo M (2003). Effects of goats' or cows' milks on nutritive utilization of calcium and phosphorus in rats with intestinal resection. *Br J Nutr.* 90: 61-67.
- Cañadillas S, Canalejo A, Santamaria R, Rodriguez ME, Estepa JC, Martín-Malo A, Bravo J, Ramos B, Aguilera-Tejero E, Rodríguez M y Almadén Y (2005). Calcium-sensing receptor expression and parathyroid hormone secretion in hyperplastic parathyroid glands from humans. *J Am Soc Nephrol.* 16: 2190-2197.
- Canalis E, Economides AN y Gazzero E (2003). Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev.* 24: 218-235.

- Canalis E, McCarthy TL y Centrella M (1989). The role of growth factors in skeletal remodeling. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 18: 903-918.
- Canfield AE, Doherty MJ y Ashton BA (2000). Osteogenic potential of vascular pericytes. En: *Bone Engineering*. Toronto: Davies JE ed. pp: 143-151.
- Canonne-Hergaux F, Gruenheid S, Ponka P y Gros P (1999). Cellular and subcellular localization of the Nramp2 iron transporter in the intestinal brush border and regulation by dietary iron. *Blood.* 93: 4406-4417.
- Carpenter C y Mahoney A (1992). Contributions of heme and nonheme iron to human nutrition. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 31: 333-367.
- Carpenter TO, Ellis BK, Insogna KL, Philbrick WM, Sterpka J y Shimkets R (2005). Fibroblast growth factor 7: an inhibitor of phosphate transport derived from oncogenic osteomalacia-causing tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 90: 1012-1020.
- Carrillo-López N, Fernández-Martín JL y Cannata-Andía JB (2009). Papel de calcio, calcitriol y sus receptores en la regulación de la paratiroides. *Nefrología.* 29: 103-108.
- Cashman JD (2002). Calcium intake, calcium bioavailability and bone health. *Br J Nutr.* 87: S169- S177.
- Cassanelli S y Moullis J (2001). Sulphide is an efficient iron releasing agent from mammalian ferritins. *Biochim Biophys Acta.* 1547: 174-182.
- Chacón A (2005). Aspectos nutricionales de la leche de cabra (*Capra hircus*) y sus variaciones en el proceso agroindustrial. *Agronomía Mesoamericana.* 16: 239-225.
- Chacón A (2006). Comparación de la titulación de la acidez de leche caprina y bovina con hidróxido de sodio y cal común saturada. *Agronomía Mesoamericana.* 17: 55-61.
- Chambers TJ (2000). Regulation of the differentiation and function of osteoclasts. *J Pathol.* 192: 4-13.

- Chanarin I (1992). Anaemia and red blood cell hyperplasia. En: McGee J, Isaacson P y Wright N (eds). *Oxford Textbook of Pathology*. New York: Oxford University Press. pp: 1692-1695.
- Chandan RC, Attaie R y Sahani KM (1992). Nutritional aspects of goat milk and its products. En: *Recent advances in goat production*. Pre-Conference Proceedings, Vol. I, part II. pp: 399-420.
- Chang GM, Hofman K y McMurry M (1995). Effects of dairy products on bone and body composition in puberals girls. *J Pediatr*. 126: 551-556.
- Chapman RW (1992). Iron overload of the liver. En: McGee J, Isaacson P y Wright N (eds). *Oxford Textbook of Pathology*. New York: Oxford University Press. pp: 1369-1372.
- Charney D, Nestler E y Bunney B (1999). *Neurobiology of mental illness*. Oxford: Oxford University Press. pp: 958.
- Chattopadhyay N y Brown EM (2000). Cellular "sensing" of extracellular calcium (Ca²⁺)_o): emerging roles in regulating diverse physiological functions. *Cell Signal*. 12: 361-366.
- Chen P, Satterwhite JH, Licata AA, Lewiecki EM, Sipos AA, Misurski DM y Wagman RB (2005). Early changes in biochemical markers of bone formation predict BMD response to teriparatide in postmenopausal women with osteoporosis. *J Bone Miner Res*. 20: 962-970.
- Cheng SX, Okuda M, Hall AE, Geibel JP y Hebert SC (2002). Expression of calcium-sensing receptor in rat colonic epithelium: evidence for modulation of fluid secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 283: 240-250.
- Chilliard Y (1996). Caractéristiques biochimies des lipids du lait de chèvre. Comparision avec les laits de vache et humain. En: *Intérêts nutritionnel et diététique du lait de chèvre*. INRA editions. pp: 51-65.

- Chiu KC, Chu A, Go VI y Saad MF (2004). Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and P cell dysfunction. *Am J Clin Nutr.* 79: 820-825.
- Choudhary S, Wadhwa S, Raisz LG, Alander C y Pilbeam CC (2003). Extracellular calcium is a potent inducer of cyclo-oxygenase-2 in murine osteoblasts through an ERK signaling pathway. *J Bone Miner Res.* 18: 1813-1824.
- Christakos S, Barletta F, Huening M, Dhawan P, Liu Y, Porta A y Peng X (2003). Vitamin D target proteins: function and regulation. *J Cell Biochem.* 88: 238-244.
- Clarke B (2008). Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol* 3: S131-S139.
- Claudon A, Vergnaud P, Valverde C, Mayr A, Klause U y Garnero P (2008). New automated multiplex assay for bone turnover markers in osteoporosis. *Clin Chem.* 54: 1554-1563.
- Cloos PA y Christgau S (2004). Characterization of aged osteocalcin fragments derived from bone resorption. *Clin Lab.* 50: 585-598.
- Cohen MM Jr (2006). The new bone biology: Pathologic, molecular, clinical correlates. *Am J Med Genet A.* 140: 2646-2706.
- Cohen P (1989). The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu Rev Biochem.* 58: 453-508.
- Cohick WS y Clemmons DR (1993). The insulin-like growth factors. *Ann Rev Physiol.* 55: 131-153.
- Comité Nacional de Hematología (2001). Anemia ferropénica. Normas de diagnóstico y tratamiento. *Arch Argent Pediatr.* 99: 162-167.

- Conrad ME y Umbreit JN (1993). A concise review: Iron absorption. The mucin-mobilferrin-integrin pathway. A competitive pathway for metal absorption. *Am J Hematol.* 42: 67-73.
- Conrad ME y Umbreit JN (2000). Iron absorption and transport. *Am J Hematol.* 64: 287-298.
- Conrad ME y Umbreit JN (2002). Pathways of iron absorption. *Blood Cells Mol Dis.* 29: 336-355.
- Conrad ME, Umbreit JN, Peterson RD, Moore EG y Harper KP (1993). Function of integrin in duodenal mucosal uptake of iron. *Blood.* 81: 517-521.
- Cons-Molina F (2003). Marcadores Bioquímicos de Remodelado Óseo. *Rev Metab Oseo Min.* 1: 91-98.
- Cook J (1990). Adaptation in iron metabolism. *Am J Clin Nutr.* 51: 301-308.
- Cook JD (2005). Diagnosis and management of iron-deficiency anaemia. *Best Practice & Research Clinical Haematology.* 18: 319-332.
- Coon M, Vaz A, McGinnity D y Peng H (1998). Multiple activated oxygen species in P-450 catalysis: contributions to specificity in drug metabolism. *Drug Metab Dispos.* 26: 1190-1193.
- Cooper C (1999). Nitric oxide and iron proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1411: 290-309.
- Cosman F y Lindsay R (2004). Therapeutic potential of parathyroid hormone. *Curr Osteoporos Rep.* 2: 5-11.
- Coudray C, Bellanger J, Castiglia-Delavaud C, Remesy C, Vermorel M y Rayssiguier Y (1997). Effect of soluble or partly soluble dietary fibres supplementation on absorption and balance of calcium, magnesium, iron and zinc in healthy young men. *Eur J Clin Nutr.* 51: 375-380.

- Craven CM, Alexander J, Eldridge M, Kushner JP, Bernstein S y Kaplan J (1987). Tissue distribution and clearance kinetics of non-transferrin-bound iron in the hypotransferrinemic mouse: A rodent model for hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 84: 3457-3461.
- Crichton RR, Danielsson BG y Geisser P (2008). Iron metabolism: biologic and molecular aspects. En: Crichton RR, Danielsson BG y Geisser P (eds). *Iron therapy with special emphasis on intravenous administration*. 4ª ed. Bremen: UNI-Med Verlag AG. pp: 14-24.
- Crichton RR, Wilmet S, Legssyer R y Ward RJ (2002). Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. *J Inorg Biochem*. 91: 9-18.
- Cummings SR, Black DM, Nevitt MC, Browner W, Cauley J, Ensrud K, Genant HK, Palermo L, Scott J y Vogt TM (1993). Bone density at various sites for prediction of hip fractures. The Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Lancet*. 341: 72-75.
- Curhan GC, Willett WC, Rimm EB y Stampfer MJ (1993). A Prospective Study of Dietary Calcium and Other Nutrients and the Risk of Symptomatic Kidney Stones. *N Engl J Med*. 328: 833-838.
- Curhan GC, Willett WC, Speizer FE, Spiegelman D y Stampfer MJ (1997). Comparison of dietary calcium with supplemental calcium and other nutrients as factors affecting the risk for kidney stones in women. *Ann Intern Med*. 126: 497-504.
- Czajka-Narins DM (1998). Minerals. En: *Krause's Food, Nutrition and Diet Therapy*. 9ª ed. México D.F: Mc-Graw-Hill Interamericana. pp: 123-167.



- Dael P, Shen L, Renterghem R y Deelstra H (1992). Selenium content of goat milk and its distribution in protein fractions. *Zeitschrift fuer Lebensmittel Untersuchung und Forschung*. 195: 3-7.
- Dallas SL, Rosser JL, Mundy GR y Bonewald LF (2002). Proteolysis of latent transforming growth factor-beta (TGF- β) binding protein by osteoclasts: A mechanism for release of TGF- β from bone matrix. *J Biol Chem*. 277: 2152-2160.
- Dallman PR (1990). Iron. En: Brown ML (ed). *Present knowledge in nutrition*. 6^a ed. Washington, DC: International Life Sciences Institute/Nutritional Foundation. pp: 241.
- Dallman PR, Yip R y Oski FA (1993). Iron deficiency and related nutritional anemias. En: Nathan DG, Oski FA (eds). *Hematology of infancy and childhood*. 4^a ed. Filadelfia: WB Saunders. pp: 413-450.
- Dalton MA, Sargent JD, O'Connor GT, Olmstead EM y Klein RZ (1997). Calcium and phosphorus supplementation of iron-fortified infant formula: no effect on iron status of healthy full-term infants. *Am J Clin Nutr*. 65: 921-926.
- Dandrifosse G, Peulen O, El Khefif N, Deloyer P, Dandrifosse AC y Grandfils C (2000). Are milk polyamines preventive agents against food allergy? *Proc Nutr Soc*. 59: 81-86.
- Daraio F, Ryan E, Gleeson F, Roetto, Crowe J y Camaschella C (2005). Juvenil hemochromatosis due to G320V/Q116V compound heterozygosity of hemojuvelin in an Irish patient. *Blood Cells Mol Dis*. 35: 174-176.
- Darnton I, Coveney J y Davey GR (1987). Goat milk, nutritional and public health aspects: a review. *Food Technology in Australia*. 39: 572-688.

- Davies KM, Heaney RP, Recker RR, Lappe JM, Barger-Lux MJ, Rafferty K y Hinders S (2000). Calcium intake and body weight. *J Clin Endocrinol Metab.* 85: 4635-4638.
- Davies PS, Zhang AS, Anderson EL, Roy CN, Lampson MA, Mc Graw TE y Enns CA (2003). Evidence for the interaction of the hereditary haemochromatosis protein HFE, with the transferrin receptor in the endocytic compartments. *Biochem J.* 373: 145-153.
- Dawson-Hughes B, Dallal GE, Krall EA, Sadowski L, Sahyoun N y Tannenbaum S (1990). A controlled trial of the effect of calcium supplementation on bone density in postmenopausal women. *N Engl J Med.* 323: 878-883.
- Dawson-Hughes B, Harris SS, Krall EA y Dallal GE (1997). Effect of calcium and vitamin D supplementation on bone density in men and women 65 years of age or older. *N Engl J Med.* 337: 670-676.
- De la Fuente MA, Belloque J y Juárez M (2004). Mineral contents and distribution between the soluble and the micellar phases in calcium-enriched UHT milks. *J Sci Food Agric.* 84: 1708-1714.
- De la Higuera López-Frías M (2004). El sistema OPG/RANKL en la osteoporosis postmenopáusica. *Tesis Doctoral.* Facultad de Medicina. Universidad de Granada.
- De Luca HF (1976). Metabolism of Vitamin D: current status. *Am J Clin Nutr.* 29: 1258-1270.
- De Luca HF (2004). Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr.* 80: 1689S-1696S.
- De Vernejool MC (2001). Nutrition et maladies osseuses. En: Basdevant A, Laville M y Lerebours E (eds). *Traité de nutrition clinique de L'adulte.* Paris: Flammarion. pp: 583-587.

- Deicher R y Höri W (2006). New insights into the regulation of iron homeostasis. *Eur J Clin Invest.* 36: 301-309.
- Dempster DW, Hughes-Begos C, Plavetic-Chee K, Brandao-Burch A, Cosman F, Nieves J, Neubort S, Lu S, Iida-Klein A, Arnett T y Lindsay R (2005). Normal human osteoclasts formed from peripheral blood monocytes express PTH type 1 receptors and are stimulated by PTH in the absence of osteoblasts. *Journal of Cellular Biochemistry.* 95: 139-148.
- Devuyst O, Jouret F, Auzanneau C y Courtoy PJ (2005). Chloride channels and endocytosis: new insights from Dent's disease and ClC-5 knockout mice. *Nephron Physiol.* 99: 69-73.
- DHHS (PHS) (2004). Bone Health and Osteoporosis: A Report of the Surgeon General.
- Diamond T, Pojer R, Stiel D, Alfrey A y Posen S (1991). Does iron affect osteoblast function? Studies in vitro and in patients with chronic liver disease. *Calcif Tissue Int.* 48: 373-379.
- Díaz-Castro J (2007). Efecto de la leche de cabra o vaca enriquecida o no en Ca sobre la biodisponibilidad de Fe, Ca, P y Mg en situación de anemia ferropénica nutricional. *Tesis Doctoral.* Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.
- Díaz-Castro J, Alférez MJ, López-Aliaga I, Nestares T, Granados S, Barrionuevo M y Campos MS (2008). Influence of nutritional iron deficiency anemia on DNA stability and lipid peroxidation in rats. *Nutrition.* 24: 1167-73.
- Díaz-Castro J, Alférez MJM, López-Aliaga I, Nestares T y Campos MS (2009). Effect of calcium-supplemented goat or cow milk on zinc status in rats with nutritional ferroperenic anaemia. *Int Dairy J.* 19: 116-121.
- Diem K y Lentner C (1970). *Geigy Scientific Tables.* New York: Geigy Pharmaceuticals.

- Dimitriadou M, Christoforidis A, Economou M, Tsatra I, Vlachaki E, Fidani L, Katzos G y Athanassiou-Metaxa M (2009). Elevated serum parathormone levels are associated with myocardial iron overload in patients with b-thalassaemia major. *Europ J Haematol.* 84: 64-71.
- Dobnig H y Turner RT (1995). Evidence that intermittent treatment with parathyroid hormone increases bone formation in adult rats by activation of bone lining cells. *Endocrinology.* 136: 3632-3638.
- Donato H (2002). Anemias: detección, tratamiento y profilaxis. En: Boggiano E, Bonadeo M, Breitman F y Rapetti MC (eds). *Guías para la supervisión de la salud de niños y adolescentes.* Buenos Aires: Sociedad Argentina de Pediatría. pp: 257-262.
- Donato H y Buys MC (2005). Eritropoyesis normal. En: Donato H y Rapetti C (eds). *Anemias en Pediatría.* Buenos Aires: Fundasap. pp: 11-32.
- Donato H, Cedola A, Rapetti MC, Buys MC, Gutiérrez M, Nucci RP, Rossi N y Schwartzman G (2009). Iron deficiency anemia. Guideline for diagnosis and treatment. *Arch Argent Pediatr.* 107: 353-361.
- Donato H, Rapetti C, Crisp R y Buys MC (2005). Anemias carenciales. En: Donato H y Rapetti C (eds). *Anemias en Pediatría.* Buenos Aires: Fundasap Ed. pp: 39-86.
- Donato H, Rapetti MC, Morán L y Cavo M (2007). Comparación entre hierro polimaltosa y sulfato ferroso para el tratamiento de la anemia ferropénica: estudio prospectivo aleatorizado. *Arch Argent Pediatr.* 105: 491-497.
- Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, Shepard J, Pratt SJ, Moynihan J, Paw BH, Drejer A, Barut B, Zapata A, Law TC, Brugnara C, Lux SE, Pinkus GS, Pinkus JL, Kingsley PD, Palis J, Fleming MD, Andrews NC y Zon LI (2000). Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature.* 403: 777-781.

Drewes PA (1972). Direct colorimetric determination of phosphorus in serum and urine. *Clin Chim Acta*. 39: 81-8.



EASL International Consensus Conference on Haemochromatosis (2000). *J Hepatol*. 33: 485-504.

Eastell R, Barton I, Hannon RA, Chines A, Garnero P y Delmas PD (2003). Relationship of early changes in bone resorption to the reduction in fracture risk with risedronate. *J Bone Miner Res*. 18: 1051-1056.

Ebina Y, Okada S, Hamazaki S Toda Y y Midorikawa O (1991). Impairment of bone formation with aluminum and ferric nitrilotriacetate complexes. *Calcif Tissue Int*. 48: 28-36.

Eguiagaray JG, Egea J, Bravo-Cordero JJ y García AG (2004). Neurotransmitters, calcium signalling and neuronal communication. *Neurocirugia*. 15: 109-118.

Ehrlich PJ y Lanyon LE (2002). Mechanical strain and bone cell function: a review. *Osteoporosis Int*. 13: 688-700.

Ekblom K y Ulfberg J (2009). Restless legs syndrome. *J Intern Med*. 266: 419-431.

Ek-Rylander B, Flores M, Wendel M, Heinegard D y Andersson G (1994). Dephosphorylation of osteopontin and bone sialoprotein by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. Modulation of osteoclast adhesion in vitro. *J Biol Chem*. 269: 14853-14856.

Emerit J, Beamont C y Trivin F (2001). Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. *Biomed Pharmacol*. 55: 333-339.

Erba D, Ciapellauo S y Testolin G (2001). Effect of caseinphosphopeptides on inhibition of calcium intestinal absorption due to phosphate. *Nutr Res.* 28: 649-656.

Escobar-Gómez F y Hawkins F (2009). Receptor Wnt: Fisiología, fisiopatología y potenciales nuevas dianas terapéuticas. *Reemo.* 18: 39-44.

Espie WH y Mullan WMA (1990). Compositional aspects of goat milk in northern Ireland. *Milchwissenschaft.* 145: 361-362.

Esposito BP, Breuer W, Sirankapracha P, Pootrakul P, Hershko C y Cabantchik ZI (2003). Labile plasma iron in iron overload: Redox activity and susceptibility to chelation. *Blood.* 102: 2670-2677.

Eyre DR, Dickson IR y Van Ness K (1988). Collagen cross-linking in human bone and articular cartilage. Age-related changes in the content of mature hydroxypyridinium residues. *Biochem J.* 252: 495-500.



Fairbanks VF (1999). Iron in medicine and Nutrition. En: Shils M, Olson JA, Shike M y Ross AC (eds). *Nutrition in health and disease.* 9ª ed. Baltimore: Williams & Wilkins. pp: 223-239.

Fairweather-Tait SJ, Teucher B (2002). Calcium bioavailability in relation to bone health. *Int J Vitam Nutr Res.* 72: 13-18.

FAO (2002). Declaration of the World Food Summit: five years later. International Alliance against Hunger. World Food Summit: five years later.

- FAO/OMS (1988/revisión 2004). Requirements of vitamin A, iron, folate and vitamin B₁₂.
FAO Food and Nutrition Series, N° 23. Roma: FAO. pp: 33-50 (revisión 2004, pp:
246-278).
- FAO/OMS (Food and Agriculture Organization/World Health Organization) Roma, 1966.
Necesidades en proteínas. Reuniones sobre la nutrición, n° 37.
- Faria RJF, García A, Allara M, García A, Olivares Y y Ríos G (1999). Some physico-chemical
and microbiological characteristics of goat milk produced in Quisiro. *Rev Fac Agron.*
16: 99-106.
- Farré Rovira R y Frasset Pons I (1999). Calcio, fosforo y magnesio. En: Hernández
Rodríguez M y Sastre Gallego A. *Tratado de nutrición*. Madrid, Ed. Díaz de Santos,
S.A. pp: 219-228.
- Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, Dormishian F,
Domingo R Jr, Ellis MC, Fullan A, Hinton LM, Jones NL, Kimmel BE, Kronmal
GS, Lauer P, Lee VK, Loeb DB, Mapa FA, McClelland E, Meyer NC, Mintier GA,
Moeller N, Moore T, Morikang E, Prass CE, Quintana L, Starnes SM, Schatzman
RC, Brunke KJ, Drayna DT, Risch NJ, Bacon BR y Wolff RK (1996). A novel
MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis.
Nat Genet. 13: 399-408.
- Feder JN, Penny DM, Irrinki A, Lee VK, Lebron JA, Watson N, Tsuchihashi Z, Sigal E,
Bjorkman PJ y Schatzman RC (1998). The hemochromatosis gene product
complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding.
Proc Natl Acad Sci USA. 95: 1472-1477.
- Feder JN, Tsuchihashi Z, Irrinki A, Lee VK, Mapa FA, Morikang E, Prass CE, Stranes SM,
Wolff RK, Parkkila S, Sly WS y Schatzman RC (1997). The hemochromatosis
founder mutation in HLA-H disrupts β_2 -microglobulin interaction and cell surface
expression. *J Biol Chem.* 272: 10425-10428.

- Fehr P, Chilliard Y y Sauvant D (1982). Goat milk and its components. *Proc Int Conf Goat. Production and Disease*. pp: 113-121.
- Felt BT, Beard JL, Schallert T, Shao J, Aldridge JW, Connor JR, Georgieff MK y Lozoff B (2006). Persistent neurochemical and behavioral abnormalities in adulthood despite early iron supplementation for perinatal iron deficiency anemia in rats. *Brain Behav Res*. 171: 261-270.
- Feng JQ, Ward LM, Liu S, Lu Y, Xie Y, Yuan B, Yu X, Rauch F, Davis SI, Zhang S, Rios H, Drezner MK, Quarles LD, Bonewald LF y White KE (2006). Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism. *Nat Genet*. 38: 1310-1315.
- Fernández-García D (2007). Efecto de raloxifeno sobre los marcadores de osteoclastogénesis en mujeres con osteoporosis postmenopáusica. *Tesis Doctoral*. Facultad de Medicina. Universidad de Granada.
- Fernández-Tresguerres I, Alobera-Gracia MA, Del Canto-Pingarrón M y Blanco-Jerez L (2006). Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 11: E151-E157.
- Fiers W, Beyaert R, Declercq W y Vandenabeele P (1999). More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene*. 18: 7719-7730.
- Finkelstein JS, Leder BZ, Burnett SA, Wyland JJ, Lee H, De la Paz AV, Gibson K y Neer RM (2006). Effects of teriparatide, alendronate, or both on bone turnover in osteoporotic men. *J Clin Endocrinol Metab*. 91: 2882-2887.
- Fiske CH y Subbarow Y (1925). The colorimetric determination of phosphorus. *The Journal of Biological Chemistry*. 66: 375-400.
- Fiter J y Nolla JM (2004). Fisiopatología: Remodelado óseo en el anciano. En: Sociedad Española de Geriatria y Gerontología. *Osteoporosis. Guía de la buena práctica clínica en Geriatria*. pp: 21-34.

- Fleming MD, Romano MA, Su MA, Garrick LM, Garrick MD y Andrews NC (1998). Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95: 1148-1153.
- Fleming MD, Trenor CC, Su MA, Foernzler D, Beier DR, Dietrich WF y Andrews NC (1997). Mycrocytic anemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. *Nat Genet*. 16: 383-386.
- Fleming RE y Bacon BR (2005). Orchestration of iron homeostasis. *N Engl J Med*. 352: 1741-1744.
- Fleming RE, Migas MC, Zhou X, Jiang J, Britton RS, Brunt EM, Tomatsu S, Waheed A, Bacon BR y Sly WS (1999). Mechanism of increased iron absorption in murine model of hereditary hemochromatosis: increased duodenal expression of the iron transporter DMT-1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96: 3143-3148.
- Flo TH, Smith KD, Sato S, Rodriguez DJ, Holmes MA, Strong RK, Akira S y Aderem A (2004). Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature*. 432: 917-921.
- Flynn A (2003). The role of dietary calcium in bone health. *Proc Nutr Soc*. 62: 851-858.
- Food and Nutrition Board and Institute of Medicine (2002). Dietary reference intakes for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D and fluoride. Washington DC: National Academy Press. pp: 432.
- Food and Nutrition Board, Institute of Medicine (2004). Dietary reference intakes for Arsenic, Boron, Calcium, Chromium, Copper, Fluoride, Iodine, Iron, Magnesium, Manganese, Molybdenum, Nickel, Phosphorus, Selenium, Silicon, Vanadium and Zinc. Washington D.C.: National Academy Press. pp: 290-393.
- Fraga A, Ribeiro R y Medeiros R (2009). Hipoxia tumoral. Papel del factor inducible por hipoxia. *Actas Urol Esp*. 33: 941-951.

Franchini M (2006). Hereditary iron overload: update on pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Am J Hematol.* 81: 202-209.

Frazer DM, Wilkins SJ, Becker EM, Murphy TL, Vulpe CD, McKie AT y Anderson GJ (2003). A rapid decrease in the expression of DMT1 and Dcytb but not Ireg1 or hephaestin explains the mucosal block phenomenon of iron absorption. *Gut.* 52: 340-346.

Fruman DA, Meyers RE y Cantley LC (1998). Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem.* 67: 481-507.



Gabrilove J (2000). Overview: erythropoiesis, anemia and the impact of erythropoietin. *Semin Hematol.* 37: 1-13.

Gaitan CD, Olivares GM, Arredondo OM y Pizarro AF (2006). Biodisponibilidad de hierro en humanos. *Rev chil nutr.* 33: 142-148.

Ganong WF (2004). *Fisiología médica.* 19ª ed. Editorial Manual Moderno. pp: 513-514.

García Ara MC, Boyano Martínez MT, Díaz Peña JM, Martín Muñoz F, Pascual Marcos C, García Sánchez C y Martín Esteban M (2003). Incidence of allergy to cow's milk protein in the first year of life and its effect on consumption of hydrolyzed formulae. *An Pediatr (Barc).* 58: 100-105.

García-Casal M, Layrisse M, Solano L, Baron M, Arguello F, Llovera D, Ramírez J, Leets I y Tropper E (1998). Vitamin A and beta-carotene can improve nonheme iron absorption from rice, wheat and corn by humans. *J Nutr.* 128: 646-650.

- García-Casal MN, Leets I y Layrisse, M (2000). Beta-carotene and inhibitors of iron absorption modify iron uptake by Caco-2 cells. *J Nutr.* 130: 5-9.
- García-Erce JA y Muñoz M (2008). Hecidina: una molécula clave para explicar la fisiopatología de la anemia. *GH continuada.* 7: 119-123.
- García-Unciti MS (1996). Therapeutic utility of medium chain triglycerides (MCT). Ketogenic diets in infant epilepsy. *Nutr Clin.* 16: 7-35.
- Garnero P, Ferreras M, Karsdal MA, Nicamhlaobh R, Risteli J, Borel O, Qvist P, Delmas PD, Foged NT y Delaissé JM (2003). The type I collagen fragments ICTP and CTX reveal distinct enzymatic pathways of bone collagen degradation. *J Bone Miner Res.* 18: 859-867.
- Gaucheron F (2005). The minerals of milk. *Reprod Nutr Dev.* 45: 473-483.
- Gehrke SG, KulaksezH , Hemann T, Riedel HD, Bents K, Veltkamp C y Stremmel W (2003). Expression of hepcidin in hereditary hemochromatosis: evidence for a regulation in response to the serum transferrin saturation and to non- transferrin - bound iron. *Blood.* 102: 6371-6376.
- Geisser P (1990). In vitro studies on interactions of iron salts and complexes with foodstuffs and medicaments. *Drug Res.* 40: 754-759.
- Gera T y Sachdev HP (2002). Effect of iron supplementation on incidence of infectious illness in children: systematic review. *BMJ.* 325: 1142.
- Giachelli CM, Jono S, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K y Morii H (2001). Vascular calcification and inorganic phosphate. *Am J Kidney Dis.* 38: S34-S37.
- Gibson RS, Yeudall F, Drost N, Mtitimuni BM y Cullinan TR (2003). Experiences of a community-based dietary intervention to enhance micronutrient adequacy of diets low in animal source foods and high in phytate: a case study in rural Malawian children. *J Nutr.* 133: 3992S-3999S.

- Glahn RP y Van Campen DR (1997). Iron uptake is enhanced in Caco-2 cells monolayers by cysteine and reduced cysteinyl glycine. *J Nutr.* 127: 642-647.
- Glahn RP, Lee OA, Yeung A, Goldman MI y Miller DD (1998). Caco-2 cells ferritin formation predicts nonradiolabeled food iron availability in vitro digestion / Caco-2 cells culture model. *J Nutr.* 128: 1555-1561.
- Glahn RP, Wien EM, Van Campen DR y Miller DD (1996). Caco-2 cells iron uptake from meat and casein digest parallels in vivo studies use of a novel in vitro method for rapid estimation of iron bioavailability. *J Nutr.* 2126: 332-339.
- Gnan SO, Erabti HA y Rana MS (1985). The composition of libyan goat milk. *Aust J Dairy Technol.* 40: 165-166.
- Goodenough DA (1999). Plugging the leaks. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96: 319-321.
- Goodman MT, Wu AH, Tung KH, McDuffie K, Kolonel LN, Nomura AM, Terada K, Wilkens LR, Murphy S y Hankin JH (2002). Association of dairy products, lactose, and calcium with the risk of ovarian cancer. *Am J Epidemiol.* 156: 148-157.
- Goodman WG (2004). Calcium-sensing receptors. *Semin Nephrol.* 24: 17-24.
- Goodman y Gilman (1996). *The pharmacological basis of therapeutics.* 9^a ed. Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB y Ruddon RW (eds). New York: McGraw-Hill. pp: 1905
- Gopalakrishnan S, DunnKW y Marrs JA (2002). Rac1, but not RhoA, signaling protects epithelial adherens junction assembly during ATP depletion. *Am J Physiol Cell Physiol.* 283: C261- C272.
- Gordon CM, DePeter KC, Feldman HA, Grace E y Emans SJ (2004). Prevalence of vitamin D deficiency among healthy adolescents. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 158: 531-537.

- Gorny G, Shaw A y Oursler MJ (2004). IL-6, LIF and TNF- α regulation of GM-CSF inhibition of osteoclastogenesis in vivo. *Exp Cell Res.* 294: 149-185.
- Gozdeladze JO, Drevon CA, Syrversen U y Reseland JE (2002). Leptin stimulates human osteoblastic cells proliferation, de novo collagen synthesis and mineralization. *J Cell Biochem.* 85: 825-836.
- Grant AM (2005). Oral vitamin D3 and calcium for secondary prevention of low-trauma fractures in elderly people (Randomised Evaluation of Calcium or vitamin D, RECORD): a randomized placebo-controlled trial. *Lancet.* 365: 1621-1628.
- Grant SFA y Ralston SH (1997). Genes and osteoporosis. *Endocrinology.* 8: 232-239.
- Griffith LE, Guyatt GH, Cook RJ, Bucher HC y Cook DJ (1999). The influence of dietary and nondietary calcium supplementation on blood pressure: an updated metaanalysis of randomized controlled trials. *Am J Hypertens.* 12: 84-92.
- Grinder-Pedersen L, Bukhave K, Jensen M, Hojgaard L y Hansen M (2004). Calcium from milk or calcium-fortified foods does not inhibit nonheme-iron absorption from a whole diet consumed over a 4-d period. *Am J Clin Nutr.* 80: 404-409.
- Groff JL y Gropper SS (2000). *Advanced nutrition and human metabolism.* 3^a ed. Belmont, CA: Wadsworth Thomson Learning.
- Gross CN, Irrinki A, Feder JN y Enns CA (1998). Co-trafficking of HFE, a nonclassical major histocompatibility complex class I protein, with the transferrin receptor implies a role in intracellular iron regulation. *J Biol Chem.* 273: 22068-22074.
- Grote L, Leissner L, Hedner J y Ulfberg J (2009). A randomized, double-blind, placebo controlled, multi-center study of intravenous iron sucrose and placebo in the treatment of restless legs syndrome. *Mov Disord.* 24: 1445-1452.

- Gruenheid S, Canonne-Hergaux F, Gauthier S, Hackam DJ, Grinstein S y Gros P (1999). The iron transport protein NRAMP2 is an integral membrane glycoprotein that colocalizes with transferrin in recycling endosomes. *J Exp Med.* 189: 831-841.
- Guéguen L (1992). Interactions lipides-calcium et biodisponibilité du calcium du fromage. *Cah Nutr Diét.* 27: 311-315.
- Guéguen L y Pointillart A (2000). The bioavailability of dietary calcium. *J Am Coll Nutr.* 19: 119S-136S.
- Guggenbuhl P, Deugnier Y, Boisdet JF, Rolland Y, Perdriger A, Pawlotsky Y y Chales G (2005). Bone mineral density in men with genetic hemochromatosis and HFE gene mutation. *Osteoporos Int.* 16: 1809-1814.
- Guggenbuhl P, Filmon A, Mabileau G, Baslé MF y Chappard D (2008). Iron inhibits hydroxyapatite crystal growth in vitro. *Metabolism.* 57: 903-910.
- Gunshin H, Mckenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL y Hediger MA (1997). Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metalion transporter. *Nature.* 388: 482-487.
- Guyton Arthur C y Hall John E (1998). Efecto de la insulina sobre el metabolismo óseo y sobre el crecimiento. En: Guyton Arthur C y Hall John E (eds). *Tratado de Fisiología.* New York: Interamericana. pp: 1069-1070.
- Guyton KZ, Kenslev TW (1993). Oxidative mechanisms in carcinogenesis. En: Cheeseman KH y Slater TF (eds). *Free Radicals in Medicine.* London, UK: Churchill Livingstone. pp: 523-544.



- Habener JF y Potts JT Jr (1990). Fundamental considerations in the physiology, biology, and biochemistry of parathyroid hormone. En: Avioli LV y Krane SM (eds). *Metabolic Bone Disease and Clinically Related Disorders*. 2ª ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company. pp: 69-130.
- Haderslev KV, Jeppesen PB, Mortensen PB y Staun M (2000). Absorption of calcium and magnesium in patients with intestinal resections treated with medium chain fatty acids. *Gut*. 46: 819-823.
- Haelein GFW (2001). Past, present, and future perspectives of small ruminant dairy research. *J Dairy Sci*. 84: 2097-2115.
- Haelein GFW (2004). Goat milk in human nutrition. *Small Rumin Res*. 51: 155-163.
- Haenlein GFW (2007). About the evolution of goat and sheep milk production. *Small Rumin Res*. 68:3.
- Hale LV, Sells Galvin RJ, Risteli J, Ma YL, Harvey AK, Yang X, Cain RL, Zeng Q, Frolik CA, Sato M, Schmidt AL y Geiser AG (2007). PINP: A serum biomarker of bone formation in the rat. *Bone*. 40: 1103-1109.
- Hallberg L (1992). Iron balance in pregnancy and lactation. En: Fomon SJ y Zlotkin S (eds). *Nutritional anemias*. Nestlé Nutrition Workshop Series Vol. 30. Nestec/Raven Press, Vevey/New York. pp:13-28.
- Hallberg L (1998). Does calcium interfere with iron absorption? *Am J Clin Nutr*. 68: 3-4.

- Hallberg L y Hultén L (1996). Iron requirements, iron balance and iron deficiency in menstruating and pregnant women. En: Hallberg L y Asp N-G (eds). *Iron nutrition in health and disease*. Londres: John Libbey & Co. pp: 165-181.
- Hallberg L, Björn-Rasmussen E, Ekenved G, Garby L, Rossander L, Pleehachinda R, Suwanik R y Arvidsson B (1978). Absorption from iron tablets given with different types of meals. *Scand J Haematol*. 21: 215-224.
- Hallberg L, Brune M, Erlandsson M, Sandberg AS y Rossander-Hulten L (1991). Calcium: effect of different amounts on nonheme- and heme-iron absorption in humans. *Am J Clin Nutr*. 53: 112-119.
- Hallberg L, Hulthen L y Garby L (1998). Iron stores in man in relation to diet and iron requirements. *Eur J Clin Nutr*. 52: 623-631.
- Hallberg L, Rossander-Hulthen L, Brune M y Glerup A (1993). Inhibition of haem-iron absorption in man by calcium. *Br J Nutr*. 69: 533-540.
- Halleen JM, Alatalo SL, Janckila AJ, Woitge HW, Seibel MJ y Väänänen HK (2001). Serum Tartrate-resistant acid phosphatase is a specific and sensitive marker of bone resorption. *Clin Chem*. 47: 597-600.
- Halleen JM, Alatalo SL, Suominen H, Cheng S, Janckila AJ y Väänänen HK (2000). Tartrate-resistant acid phosphatase 5b: a novel serum marker of bone resorption. *J Bone Miner Res*. 15: 1337-1345.
- Halliwell B (2001). Role of free radicals in neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging*. 18: 685-716.
- Halliwell B y Chirico S (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am J Clin Nutr*. 57: 715-722.
- Han O, Failla ML, Hill AD, Morris ER y Smith JC (1995). Reduction of Fe (III) is required for uptake of nonheme iron by Caco-2 cells. *J Nutr*. 125: 1291-1299.

- Hannon RA, Clowes JA, Eagleton AC, Al Hadari AA, Eastell R y Blumsohn A (2004). Clinical performance of immunoreactive tartrate resistant acid phosphatase isoform 5b as a marker of bone resorption. *Bone*. 34:187-194.
- Hansen NM, Felix R, Bisaz S y Fleisch H (1976). Aggregation of hydroxyapatite crystals. *Biochim Biophys Acta*. 451: 549-559.
- Harris MM, Houtkooper LB, Stanford VA, Parkhill C, Weber JL, Flint-Wagner H, Weiss L, Going SB y Lohman TG (2003). Dietary iron is associated with bone mineral density in healthy postmenopausal women. *J Nutr*. 133: 3598-3602.
- Hartiti S, López-Aliaga I, Barrionuevo M, Lisbona F, Pallarés SI, Alférez MJM, Gómez-Ayala AE y Campos MS (1994). Zinc metabolism in rats: effects of intestinal resection, cholecalciferol and ascorbic acid. *Nutr Res*. 14: 1523-1534.
- Harvey S y Hull KL (1998). Growth hormone: A paracrine growth factor? *Endocrine*. 7: 267-279.
- Hayman AR y Cox TM (1994). Purple acid phosphatase of the human macrophage and osteoclast. Characterization, molecular properties, and crystallization of the recombinant di-iron-oxo protein secreted by baculovirus-infected insect cells. *J Biol Chem*. 269: 1294-1300.
- Heaney RP (1996). Calcium. En: Bilezikian JP, Raisz GA, Rodan GA. *Principles of bone Biology*. New York: Academic Press. pp: 1007-1018.
- Heaney RP (2003). Is the paradigm shifting? *Bone*. 33: 457-465.
- Heaney RP (2006). Bone as the calcium nutrient reserve. En: Weaver CM y Heaney RP (eds). *Calcium in Human Health*. New Jersey: Humana Press. pp: 7-12.
- Heaney RP y Rafferty K (2006). Letter re: the settling problem in calcium fortified soybean drinks. *J Am Diet Assoc*. 106: 1753.

- Heaney RP y Robert P (2006). Calcium intake and disease prevention. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 50: 685-693.
- Heaney RP, Dowell MS, Rafferty K y Bierman J (2000). Bioavailability of the calcium in fortified soy imitation milk, with some observations on method. *Am J Clin Nutr.* 71: 1166-1169.
- Heaney RP, Rafferty K y Bierman J (2005). Not all calcium-fortified beverages are equal. *Nutr Today.* 40: 39-44.
- Heaney RP, Weaver CM y Fitzsimmons ML (1991). Soybean phytate content: effect on calcium absorption. *Am J Clin Nutr.* 53: 745-747.
- Heaney RP, Weaver CM y Recker RR (1998). Calcium absorption from spinach. *Am J Clin Nutr.* 47: 707-709.
- Hentze MW y Kühn LC (1996). Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93: 8175-8182.
- Hercberg S y Galan P (1992). Nutritional anemias. *Bailleres Clin Haematol.* 5: 143-168.
- Hernández García M (1993). Anemia ferropénica. *Medicine.* 10: 545-554.
- Hock JM, Centrella M y Canalis E (2004). Insulin-like growth factor I (IGF-I) has independent effects on bone matrix formation and cell replication. *Endocrinology* 122: 254-260.
- Hoenderop JG, Nilius B y Bindels RJ (2003). Epithelial calcium channels: from identification to function and regulation. *Pflugers Arch.* 446: 304-308.
- Hoenderop JG, Nilius B y Bindels RJ (2005). Calcium absorption across epithelia. *Physiol Rev.* 85: 373-422.

- Hofbauer LC, Kuhne CA y Viereck V (2004). Clinical implications of OPG/RANK/RANKL system on bone and vascular diseases. *JAMA*. 292: 40-45.
- Holick MF (1996). Vitamin D: Photobiology, Metabolism, etc. En: *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. American Society for Bone and Mineral Research. 3ª ed. Philadelphia: Lippincott-Raven. pp: 74-81.
- Holick MF (2002). Vitamin D: The underappreciated D-light hormone that is important for skeletal and cellular health. *Curr Opin Endocrinol Diabetes*. 9: 87-98.
- Holick MF (2004). Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*. 80: 1678S-1688S.
- Holick MF (2004). Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *Am J Clin Nutr*. 79: 362-371.
- Holick MF (2005). Vitamin D. En: Shils M, Olson JA, Shike M y Ross AC (eds). *Modern nutrition in health and disease*. 10ª ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins. pp: 329-345.
- Holick MF (2006). High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. *Mayo Clin Proc*. 81: 353-373.
- Holick MF (2006). Resurrection of Vitamin D deficiency and rickets. *J Clin Invest*. 116: 2062-2072.
- Holick MF (2007). Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*. 357: 266-281.
- Holick MF (2003). Vitamin D: Photobiology, metabolism, mechanism of action and clinical applications. En: Favus MJ (ed). *Primer on metabolic bone diseases disorders of mineral metabolism*. 5ª ed. American Society for bone and mineral research. pp: 129-137.
- Holt PR (2006). Calcium, vitamin D, and cancer. En: Weaver CM y Heaney RP (eds). *Calcium in Human Health*. New Jersey: Humana Press. pp: 387-400.

- Holt PR, Wolper C, Moss SF, Yang K y Lipkin M (2001). Comparison of calcium supplementation or low-fat dairy foods on epithelial cell proliferation and differentiation. *Nutr Cancer*. 41: 150-155.
- Horowitz M (2003). Matrix proteins versus cytokines in the regulation of osteoblasts function and bone formation. *Calcif Tissue Int*. 72: 5-7.
- Hubbard SR y Till JH (2000). Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu Rev Biochem*. 69: 373-398.
- Huber DM, Benedissen AC, Pathrose P, Sivastava S, Dienger KM, Shevde NK y Pike JW (2001). Androgens suppress osteoclast formation induced by RANKL and macrophage-colony stimulating factor. *Endocrinology*. 142: 3800-3808.
- Hugman A (2006). Hepcidin: an important new regulator of iron homeostasis. *Clin Lab Haem*. 28: 75-83.
- Hulten L, Gramatkovski E, Glerup A y Hallberg L (1995). Iron absorption from the whole diet. Relation to meal composition, iron requirements and iron stores. *Eur J Clin Nutr*. 49: 794-808.
- Hunter T y Cooper JA (1985). Protein-tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem*. 54: 897-930.
- Hurrell R, Jullerat M, Reddy M, Lynch S, Dassenko S y Cook J (1992). Soy protein, phytate, and iron absorption in humans. *Am J Clin Nutr*. 56: 573-578.
- Hurrell RF (2002). How to ensure adequate iron absorption from iron-fortified food. *Nutr Rev*. 60: S7-S15.
- Huth PJ, DiRienzo DB y Miller GD (2006). Major scientific advances with dairy foods in nutrition and health. *J Dairy Sci*. 89: 1207-1221.



- Imlay JA, Chin SM y Linn S (1988). Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science*. 240: 640-642.
- Infante D, Tormo R y Martín B (2001). ¿Ha pasado de moda el agua? Los hábitos de bebida de la edad pediátrica: su repercusión nutricional. Premios nutrición infantil 2001. Espulgues de Llobregat: Nestlé España.
- Infante D, Tormo R y Zanduetta M (2003). Empleo de leche de cabra en pacientes con alergia a las proteínas de la leche de vaca. *An Pediatr (Barc)*. 59: 138-142.
- Iolascon A, De Falco L y Beaumont C (2009). Molecular basis of inherited microcytic anemia due to defects in iron acquisition or heme synthesis. *Haematologica*. 94: 395-408.
- Ip C, Banni S, Angioni E, Carta G, Mcginley J, Thompson HJ, Barbano D y Bauman DE (1999). Conjugated linoleic acid-enriched butter fat alters mammary gland morphogenesis and reduces cancer risk in rats. *J Nutr*. 129: 2135-2142.
- Irie K, Ozawa H y Yajima T (2000). The histochemical and cytochemical changes from formative to resorptive osteocytes. *Acta Histochem Cytochem*. 33: 385-391.
- Isler M, Delibas N, Guclu M, Gultekin F, Sutcu R, Bahceci M y Kosar A (2002). Superoxide dismutase and glutathione peroxidase in erythrocytes of patients with iron deficiency anemia: effects of different treatment modalities. *Coat Med J*. 43: 16-19.



Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim AV, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW y Ratcliffe PJ (2001). Targeting of HIF-alpha to the von Hippel- Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. *Science*. 292: 468-472.

Jackson KA y Savaiano DA (2001). Lactose maldigestion, calcium intake and osteoporosis in African-, Asian-, and Hispanic-Americans. *J Am Coll Nutr*. 20: 198S-207S.

Jackson RD, LaCroix AZ, Gass M, Wallace RB, Robbins J, Lewis CE, Bassford T, Beresford SA, Black HR, Blanchette P, Bonds DE, Brunner RL, Brzyski RG, Caan B, Cauley JA, Chlebowski RT, Cummings SR, Granek I, Hays J, Heiss G, Hendrix SL, Howard BV, Hsia J, Hubbell FA, Johnson KC, Judd H, Kotchen JM, Kuller LH, Langer RD, Lasser NL, Limacher MC, Ludlam S, Manson JE, Margolis KL, McGowan J, Ockene JK, O'Sullivan MJ, Phillips L, Prentice RL, Sarto GE, Stefanick ML, Van Horn L, Wactawski-Wende J, Whitlock E, Anderson GL, Assaf AR, Barad D y Women's Health Initiative Investigators (2006). Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of fractures. *N Engl J Med*. 354: 669-683.

Jacobs P, Johnson G y Wood L (1984). Oral iron therapy in human subjects. Comparative absorption between ferrous salts and iron polymaltose. *J Med*. 15: 367-377.

Jacobs P, Wood L y Bird AR (2000). Better tolerance of iron polymaltose complex compared with ferrous sulphate in the treatment of anaemia. *Hematology*. 5: 77-83.

Jacobs P, Wormald L y Gregory M (1979). Absorption of iron polymaltose and ferrous sulphate in rats and humans. *S Afr Med J*. 55: 1065-1070.

- Janckila AJ, Neustadt DH, Nakasato YR, Halleen JM, Hentunen T y Yam LT (2002). Serum tartrate-resistant acid phosphatase isoforms in rheumatoid arthritis. *Clin Chim Acta*. 320: 49-58.
- Jandal JM (1996). Comparative aspects of goat and sheep milk. *Small Rumin Res*. 22: 177-185.
- Janssens K, ten Dijke P, Janssens S y Van Hul W (2005). Transforming growth factor-beta 1 to the bone. *Endocr Rev*. 26: 743-774.
- Jarvinen R, Knekt P, Hakulinen T y Aromaa A (2001). Prospective study on milk products, calcium and cancers of the colon and rectum. *Eur J Clin Nutr*. 55: 1000-1007.
- Jauber O y Kalantzopoulos O (1996). Quality of goat milk for cheese and other products. *VI Int Conf Goats Int*. 1: 274-284.
- Jencks WP (1997). From chemistry to biochemistry to catalysis to movement. *Annu Rev Biochem*. 66: 1-18.
- Jilka RL (2003). Biology of the basic multicellular unit and the pathophysiology of osteoporosis. *Med Pediatr Oncol*. 41: 182-185.
- Jódar Gimeno E, Muñoz-Torres M, Escobar-Jiménez F, Quesada Charneco M, Luna del Castillo JD y Olea N (1997). Identification of metabolic bone disease in patients with endogenous hypertiroidism: Role of biological markers of bone turn-over. *Calcif Tissue Int*. 61: 370-376.
- Johnson G y Jacobs P (1990). Bioavailability and the mechanisms of intestinal absorption of iron from ferrous ascorbate and ferric polymaltose in experimental animals. *Exp Hematol*. 18: 1064-1069.
- Johnson J, Willis W, Dallman P y Brooks G (1990). Muscle mitochondrial ultrastructure in exercise-trained iron-deficient rats. *J Appl Physiol*. 68: 113-118.

Jonsson KB, Zahradnik R, Larsson T, White KE, Sugimoto T, Imanishi Y, Yamamoto T, Hampson G, Koshiyama H, Ljunggren O, Oba K, Yang IM, Miyauchi A, Econs MJ, Lavigne J y Jüppner H (2003). Fibroblast growth factor 23 in oncogenic osteomalacia and X-linked hypophosphatemia. *N Engl J Med.* 348: 1656-1663.

Jovaní M, Barberá R y Farré R (2001). Review: effect of some components of milk and soybased infants formulas on mineral bioavailability. *Food Sci Technol Int.* 7: 191-198.



Kaelin WG Jr (2002). Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome. *Nat Rev Cancer.* 2: 673-682.

Kanis JA (1996). Patogénesis de la osteoporosis y fractura. En: Kanis JA (ed). *Osteoporosis.* Oxford: Blackwell Science Ltd Publishers. pp: 26-64.

Kasdan TS y Herbert V (1999). *Nutrition ETC* for the Millennium (*Exercise, Training, and Counseling).* New York: Nutrition E.T.C. Inc., Plainview.

Kato K, Takada Y, Matsuyama H, Kawasaki Y, Aoe S, Yano H y Toba Y (2002). Milk calcium taken with cheese increases bone mineral density and bone strength in growing rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* 66: 2342-2346.

Katsumata S, Tsuboi R, Uehara M y Suzuki K (2009). Severe iron deficiency decreases both bone formation and bone resorption in rats. *J Nutr.* 139: 238-243.

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.

Kaup SM (1998). Aspects of mineral bioavailability in infant nutrition. *Int Dairy J.* 8: 435-441.

- Kavakli K, Yilmaz D, Cetinkaya B, Balkan C, Sözmen EY y Sağın FG (2004). Safety profiles of Fe²⁺ and Fe³⁺ oral preparations in the treatment of iron deficiency anemia in children. *Pediatr Hematol Oncol*. 21: 403-410.
- Kawaguchi H, Pilbean CC, Harrison JR y Raisz LG (1995). The role of prostaglandins in the regulation of bone metabolism. *Clin Orthop*. 313: 36-46.
- Kazama JJ, Arakawa M, Gejyo F y Nakazawa R (1997). Intraosteoblastic iron assimilation in two dialysis cases with iron overload. *Nephrol Dial Transplant*. 12: 2807-2808.
- Kearns AE y Kallmes DF (2008). Osteoporosis primer for the vertebroplasty practitioner: expanding the focus beyond needles and cement. *AJNR Am J Neuroradiol*. 29: 1816-1822.
- Khosla S (2001). The OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*. 142: 5050-5055.
- Khosla S, Atkinson EJ, Dunstan CR y O'Fallon WM (2002). Effect of estrogen versus testosterone on circulating osteoprotegerin and other cytokine levels in normal elderly men. *J Clin Endocrinol Metab*. 87: 1550-1554.
- Killip S, Bennett JM y Chambers MD (2007). Iron deficiency anemia. *Am Fam Physician*. 75: 671-678.
- Kim Ha J y Lindsay R (1991). Contributions of cow, sheep and goat milk to characterizing branched-chain fatty acid and phenolic flavors in varietal cheeses. *J Dairy Sci*. 74: 3267-3274.
- Kim JG, Lim KS, Ku SY, Kim SH, Choi YM y Moon SY (2006). Relations between interleukin 1, its receptor antagonist gene polymorphism and bone mineral density in postmenopausal Korean women. *J Bone Miner Metab*. 24: 53-57.
- Kim YH, Kim JM, Kim SN, Kim GS y Baek JH (2003). p44/42 MAPK activation is necessary for receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand induction by high extracellular calcium. *Biochem Biophys Res Commun*. 304: 729-735.

- Kjeldahl JZ (1883). Neue Methode zur Bestimmung des stickstoffs in organischen Körpern. *Z. Anal. Chem.* 22: 366-382.
- Klausner RD, Rouault TA y Harford JB (1993). Regulating the fate of mRNA: the control of cellular iron metabolism. *Cell.* 72: 19-28.
- Knekt P, Jarvinen R, Seppanen R, Pukkala E y Aromaa A (1996). Intake of dairy products and the risk of breast cancer. *Br J Cancer.* 73: 687-691.
- Knochel JP (1977). The pathophysiology and clinical characteristics of severe hypophosphatemia. *Arch Intern Med.* 137: 203-220.
- Knochel JP, Barcenas C, Cotton JR, Fuller TJ, Haller R y Carter NW (1978). Hypophosphatemia and rhabdomyolysis. *Trans Assoc Am Physicians.* 91: 156-168.
- Kohgo Y, Ikuta K, Ohtake T, Torimoto Y y Kato J (2008). Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload. *Int J Hematol.* 88: 7-15.
- Kohlmeier M (2003). Phosphorus. En: Kohlmeier M (ed). *Nutrient Metabolism.* New York: Academic Press. pp: 700-708.
- Kohls K. Calcium bioavailability from calcium fortified food products (1991). *J Nutr Sci Vitaminol.* 37: 319-328.
- Kong WN, Zhao SE, Duan XL, Yang Z, Qian ZM y Chang YZ (2008). Decreased DMT1 and increased ferroportin 1 expression is the mechanisms of reduced iron retention in macrophages by erythropoietin in rats. *J Cell Biochem.* 104: 629-641.
- Kornberg A (1979). The enzymatic replication of DNA. *CRC Crit Rev Biochem.* 7: 23-43.
- Kousteni S, Bellido T, Plotkin CA, O'Brien DL, Bodenner L, Han K, DI Gregorio DB y Manolagas SC (2001). Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen and androgens receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell.* 104: 719-730.

- Kozyraki R, Fyfe J, Verroust PJ, Jacobsen C, Dautry-Varsat A, Gburek J, Willnow TE, Christensen EI y Moestrup SK (2001). Megalin-dependent cubilin-mediated endocytosis is a major pathway for the apical uptake of transferrin in polarized epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98: 12491-12496.
- Krall EA y Dawson-Hughes B (2002). Osteoporosis: En: Shils ME, Olson JA y Ross AC (eds). *Nutrición en Salud y Enfermedad*. México: Interamericana. pp: 1563-1576.
- Krebs EG y Beavo JA (1979). Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes. *Annu Rev Biochem*. 48: 923-959.
- Krieger NS, Sessler NE y Bushinsky DA (1992). Acidosis inhibits osteoblastic and stimulates osteoclastic activity in vitro. *Am J Physiol*. 262: F442- F448.
- Krishnamurthy P, Xie T y Schuetz JD (2007). The role of transporters in cellular heme and porphyrin homeostasis. *Pharmacol Ther*. 114: 345-358.
- Kudo H, Suzuki S, Watanabe A, Kikuchi H, Sassa S y Sakamoto S (2008). Effects of colloidal iron overload on renal and hepatic siderosis and the femur in male rats. *Toxicology*. 246: 143-147.
- Kumar R (1997). Phosphatonin-a new phosphatoretic hormone? (lessons from tumour-induced osteomalacia and X-linked hypophosphataemia). *Nephrol Dial Transplant*. 12: 11-13.
- Kumar R (2000). Tumor-induced osteomalacia and the regulation of phosphate homeostasis. *Bone*. 27: 333-338.
- Kumerova A, Lece A, Skesters A, Silova A y Petuhovs V (1998). Anaemia and antioxidant defence of the red blood cells. *Mater Med Pol*. 30: 2-5.

Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E, Iwasaki H, Iida A, Shiraki-Iida T, Nishikawa S, Nagai R y Nabeshima YI (1997). Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*. 390: 45-51.



Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burguess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Coppabella C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J y Boyle WJ (1998). Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclasts differentiation and activation. *Cell*. 93: 165-176.

Lall S, Singh B, Gulati K y Seth S (1999). Role of nutrition in toxic injury. *J Exp Biol*. 37: 109-116.

Lam KW, Li CY, Yam LT y Desnick RJ (1981). Comparison of the tartrate-resistant acid phosphatase in Gaucher's disease and leukemic reticuloendotheliosis. *Clin Biochem*. 14: 177-181.

Lamarche MG, Wanner BL, Crepin S y Harel J (2008). The phosphate regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. *FEMS Microbiol Rev*. 32: 461-473.

Langub MC, Monier-Faugere MC, Qi Q, Geng Z, Koszewski NJ y Malluche HH (2001). Parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide type 1 receptor in human bone. *J Bone Min Res*. 16: 448-456.

Lanyon L (1993). Osteocytes, strain detection, bone remodeling and remodeling. *Calcified Tissue Int*. 53: 102-107.

- Lanzkowsky P (2005). En: Lanzkowsky P (ed). *Manual of Pediatric Hematology and Oncology*. Burlington: Elsevier. pp: 31-46.
- Lara-Villoslada F, Olivares M, Jiménez J, Boza J y Xaus J (2004). Goat milk is less immunogenic than cow milk in a murine model of atopy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 39: 354-360.
- Lardy HA y Ferguson SM (1969). Oxidative phosphorylation in mitochondria. *Annu Rev Biochem*. 38: 991-1034.
- Latunde-Dada GO, Van der Westhuizen J, Vulpe CD, Anderson GJ, Simpson RJ y McKie AT (2002). Molecular and functional roles of duodenal cytochrome B (Dcytb) in iron metabolism. *Blood Cells Mol Dis*. 29: 356-60.
- Laurence G (1997). Homeostasis of phosphate revisited. *Nephron*. 77: 249-266.
- Laxminarayan R, Mills AJ, Breman JG, Measham AR, Alleyne G, Claeson M, Jha P, Musgrove P, Chow J, Shahid-Salles S y Jamison DT (2006). Advancement of global health: key messages from the Disease Control Priorities Project. *Lancet*. 367: 1193-1208.
- Layrisse M, García-Casal MN, Solano L, Baron MA, Aguello F, Llovera D, Ramirez J, Leets I y Tropper E (1997). The role of vitamin A on the inhibitors of nonheme iron absorption. *J Nutr Biochem*. 8: 61-67.
- Lee WT, Leung SS, Leung DM y Cheng JC (1996). A follow-up study on the effects of calcium-supplement withdrawal and puberty on bone acquisition of children. *Am J Clin Nutr*. 64: 71-77.
- Lehninger A, Nelson D y Cox M (1995). *Principles of Biochemistry*. 2ª ed. New York: Worth Publisher. pp: 642-461.
- Lehninger AL y Wadkins CL (1962). Oxidative phosphorylation. *Annu Rev Biochem*. 31: 47-78.

- Leong W-I y Lönerdal B (2004). Hepcidin, the recently identified peptide that appears to regulate iron absorption. *J Nutr.* 134: 1-4.
- Li Y (2003). Vitamin D regulation of the renin-angiotensin system. *J Cell Biochem.* 88: 327-331.
- Liebman M y Chai W (1997). Effect of dietary calcium on urinary oxalate excretion after oxalate loads. *Am J Clin Nutr.* 65: 1453-1459.
- Lind M, Deleuran B, Thestrup-Pedersen K, Soballe K, Eriksen EF y Bunger C (1995). Chemotaxis of human osteoblasts. Effects of osteotropic growth factors. *APMIS.* 103: 140-146.
- Littarru GP y Battino M (1994). Natural antioxidants and sports medicine. *Int J Sports Cardiol.* 2: 127-130.
- Liu J, Atamna H, Kuratsune H y Ames BN (2002). Delaying brain mitochondrial decay and aging with mitochondrial antioxidants and metabolites. *Ann NY Acad Sci.* 959: 133-166.
- Liu S, Rowe PS, Vierthaler L, Zhou J y Quarles LD (2007). Phosphorylated acidic serine-aspartate-rich MEPE-associated motif peptide from matrix extracellular phosphoglycoprotein inhibits phosphate regulating gene with homologies to endopeptidases on the X-chromosome enzyme activity. *J Endocrinol.* 192: 261-267.
- Locklin RM, Oreffo RO y Triffitt JT (1999). Effects of TGFbeta and bFGF on the differentiation of human bone marrow stromal fibroblasts. *Cell Biol Int.* 23: 185-194.
- Lombardi-Boccia G, Martínez-Domínguez B y Aguzzi A (2002). Total heme and non-heme iron in raw and cooked meats. *J Food Sci.* 67: 1738-1741.
- Lönerdal B (1997). Effects of milk and milk components on calcium, magnesium and trace element absorption during infancy. *Physiol Rev.* 77: 643-669.

- López HW, Coudray C, Levrat-Verny MA, Feillet-Coudray C, Demigné C y Rémesy C (2000). Fructooligosaccharides enhance mineral apparent absorption and counteract the deleterious effects on phytic acid on mineral homeostasis in rats. *J Nutr Biochem.* 11: 500-508.
- López JE, López-Salazar JE, López Salazar Y y Fasanella H (2007). Osteoporosis: alimentación, calcio, vitamina D y ejercicio. *Gac Méd Caracas.* 115: 286-291.
- López-Aliaga I, Alférez MJM, Barrionuevo M, Lisbona F y Campos MS (2000). Influence of goat and cow milk on the digestive and metabolic utilization of calcium and iron. *J Physiol Biochem.* 56: 201-208.
- López-Aliaga I, Alférez MJM, Barrionuevo M, Nestares T, Sanz Sampelayo MR y Campos MS (2003). Study of nutritive utilization of protein and magnesium in rats with resection of the distal small intestine: beneficial effect of goat milk. *J Dairy Sci.* 86: 2958-2966.
- López-Aliaga I, Alférez MJM, Lisbona F, Barrionuevo M, Hartiti S, Gómez-Ayala AE y Campos MS (1994). Influence of vitamin D3 and type of dietary fat on phosphorus absorption in rats with intestinal resection. *Nutr Res.* 14: 47-57.
- López-Aliaga I, Alférez MJM, Nestares T, Ros PB, Barrionuevo M y Campos MS (2005). Goat milk feeding causes an increase in biliary secretion of cholesterol and a decrease in plasma cholesterol levels in rats. *J Dairy Sci.* 88: 1024-1030.
- Lorenz-Depiereux B, Bastepe M, Benet-Pagès A, Amyere M, Wagenstaller J, Müller-Barth U, Badenhop K, Kaiser SM, Rittmaster RS, Shlossberg AH, Olivares JL, Loris C, Ramos FJ, Glorieux F, Vikkula M, Jüppner H y Strom TM (2006). DMP1 mutations in autosomal recessive hypophosphatemia implicate a bone matrix protein in the regulation of phosphate homeostasis. *Nat Genet.* 38: 1248-1250.
- Lupton JR, Steinbach G, Chang WC, O'Brien BC, Wiese S, Stoltzfus CL, Glober GA, Wargovich MJ, McPherson RS y Winn RJ (1996). Calcium supplementation modifies the relative amounts of bile acids in bile and affects key aspects of human colon physiology. *J Nutr.* 126: 1421-1428.

Lynch S, Dassenko S, Cook J, Jullerat M y Hurrell R (1994). Inhibitory effect of a soybean-protein-related moiety on iron absorption in humans. *Am J Clin Nutr.* 60: 567-572.

Lynch SR (1997). Interaction of iron with other nutrients. *Nutr Rev.* 55: 102-110.



Ma J, Giovannucci E, Pollak M, Chan JM, Gaziano JM, Willett W y Stampfer MJ (2001). Milk intake, circulating levels of insulin-like growth factor-I, and risk of colorectal cancer in men. *J Natl Cancer Inst.* 93: 1330-1336.

Ma YL, Cain RL, Halladay DL, Yang X, Zeng Q, Miles RR, Chandrasekhar S, Martin TJ y Onyia JE (2001). Catabolic effects of continuous human PTH (1-38) in vivo is associated with sustained stimulation of RANKL and inhibition of osteoprotegerin and gene-associated bone formation. *Endocrinology.* 142: 4047-4054.

Mahachoklertwattana P, Sirikulchayanonta V, Chuansumrit A, Karnsombat P, Choubtum L, Sriphrapradang A, Domrongkitchaiporn S, Sirisriro R y Rajatanavin R (2003). Bone histomorphometry in children and adolescents with β -thalassemia disease: Iron-associated focal osteomalacia. *J Clin Endocrinol Metab.* 88: 3966-3972.

Mandalunis PM, Cabrini RL y Ubios AM (1997). Iron overloading inhibits endochondral ossification. *Acta Odont Latinoam.* 10: 55-61.

Mandalunis PM, Ubios AM (2005). Experimental renal failure and iron overload: a histomorphometric study in rat tibia. *Toxicol Pathol.* 33: 398-403.

Manolagas SC (2000). Birth and death of bone cells: Basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrine Rev.* 21: 115-137.

- Marcus CS y Lengemann FW (1962). Absorption of Ca⁴⁵ and Sr⁸⁵ from solid and liquid food at various levels of the alimentary tract of the rat. *J Nutr.* 77: 155-160.
- Maree HP (1978). Goat milk and its use as hypo-allergenic infant food. *Dairy Goat Journal.* 43: 363-365.
- Marignani M, Angeletti S, Bordi C, Malagnino F, Mancino C, Delle Fave G y Annibale B (1997). Reversal of long-standing iron deficiency anaemia after eradication of *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol.* 32: 617-622.
- Martin P (1996). La composition protéique du lait de chèvre: ses particularités. En: *Intérêts nutritionnel et diététique du lait de chèvre*. INRA Editions. pp: 27-49.
- Martínez Monzó J y García Segovia P (2006). Elementos minerales. En: *Nutrición humana*. Ed: Universidad Politécnica de Valencia. pp: 247.
- Martínez-Férez A (2004). Obtención de oligosacáridos de la leche de diferentes especies por tecnología de membranas. *Tesis Doctoral*. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada.
- Martínez-Ferez A, Rudloff S, Guadix A, Henkel CA, Pohlentz G, Boza JJ, Guadix EM, Kunz C (2006). Goat's milk as a natural source of lactose-derived oligosaccharides: isolation by membrane technology. *Int Dairy J.* 16: 173-181.
- Massheimer V, Boland RL y Boland AR (1994). Rapid 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ stimulation of calcium uptake by rat intestinal cells involves a dihydropyridinesensitive cAMP-dependent pathway. *Cellular Signalling.* 6: 299-304.
- Masson N, Willam C, Maxwell PH, Pugh CW y Ratcliffe PJ (2001). Independent function of two destruction domains in hypoxia inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J.* 20: 5196-5197.

- Masuyama R, Uehara M y Suzuki K (2000). High P diet induces acute secretion parathyroidhormone without alteration of serum calcium levels in rats. *Biosci Biotech Biochem.* 64: 2316-2319.
- Mataix J (2000). Dieta y biodisponibilidad del calcio alimentario. *Rev Esp Nutr Comunitaria.* 6: 109-110.
- Mataix J y Llopis J (2008). Minerales. En: Mataix Verdú J. *Nutrición y Alimentación Humana.* Madrid: Ergon. pp: 211-247.
- Matkovic V, Fontana D, Tominac C, Goel P y Chesnut CH (1990). Factors that influence peak bone mass formation: a study of calcium balance and the inheritance of bone mass in adolescent females. *Am J Clin Nutr.* 52: 878-88.
- Matsushima S, Hoshimoto M, Torii M, Ozaki K y Narama I (2001). Iron lactate-induced osteopenia in male Sprague-Dawley rats. *Toxicol Pathol.* 29: 623-629.
- Matsushima S, Torii M, Ozaki K y Narama I (2003). Iron lactate induced osteomalacia in association with osteoblast dynamics. *Toxicologic Pathol.* 31: 646-654.
- Maurer J, Harris MM, Stanford VA, Lohman TG, Cussler E, Going SB y Houtkooper LB (2005). Dietary iron positively influences bone mineral density in postmenopausal women on hormone replacement therapy. *J Nutr.* 135: 863-869.
- McCarron DA (2006). Hypertension and cardiovascular disease. En: Weaver CM y Heaney RP (eds). *Calcium in Human Health.* New Jersey: Humana Press. pp: 421-429.
- McCutcheon JE y Marinelli M (2009). Age matters. *Eur J Neurosci.* 29: 997-1014.
- Mcguire MA y Mcguire MK (2000). Conjugated linoleic acid (CLA): A ruminant fatty acid with beneficial effects on human health. *Proc Am Soc Anim Sci Annu.* 1: 1-8.

- Mckie AT, Barrow D, Latunde-Dada GO, Rolfs A, Sager G, Mudaly E, Mudaly M, Richardson C, Barlow D, Bomford A, Peters TJ, Raja KB, Sgirali S, Hediger MA, Farzaneh F y Simpson RJ (2001). An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science*. 291: 1755-1759.
- Mckie AT, Marciani P, Rolfs A, Brennan K, Wher K, Barrow D, Miret S, Bomford A, Peters TJ, Farnazeh F, Hediger MA, Hentze MW y Simpson RJ (2000). A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Molecular Cell*. 5: 299-309.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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*. 34: 3061-3067.
- Mehta BC (2003). Ineffectiveness of iron polymaltose in treatment of iron deficiency anemia. *J Assoc Phys India*. 51: 419-421.
- Melkko J, Kauppila S, Niemi S, Risteli L, Haukipuro K, Jukkola A y Risteli J (1996). Immunoassay for intact aminoterminal propeptide of human type I procollagen. *Clin Chem*. 42: 947-954.

- Melton LJ, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Wahner HW y Riggs BL (1993). Long-term fracture prediction by bone mineral assessed at different skeletal sites. *J Bone Miner Res.* 8: 1227-1233.
- Meyer RA, Jr, Morgan PL y Meyer MH (1994). Measurement of parathyroid hormone in the mouse: secondary hyperparathyroidism in the X-linked hypophosphatemic (Gyro, Gy) mouse. *Endocrine.* 2: 1127-1132.
- Miller GD, Jarvis JK y McBean LD (2001). The importance of meeting calcium needs with foods. *J Am Coll Nutr.* 20: 168-185.
- Min JH, Yang H, Ivan M, Gertler F, Kaelin WG Jr y Pavletich NP (2002). Structure of an HIF-1alpha-pVHL complex: Hydroxyproline recognition in signaling. *Science.* 296: 1886-1889.
- Mineo H, Hara H y Tomita F (2001). Short-chain fatty acids enhance diffusional ca transport in the epithelium of the rat cecum and colon. *Life Sci.* 69: 517-526.
- Minotti P, Buchonski S y Miller D (1993). Effects of calcium supplementation, calcium source and lactose on iron absorption in the rat. *Nutr Res.* 13: 1173-1181.
- Minuto F, Palermo C, Arvigo M y Barreca AM (2005). The IGF system and bone. *J Endocrinol Invest.* 28: 8-10.
- Miret S, Simpson RJ y McKie AT (2003). Physiology and molecular biology of dietary iron absorption. *Annu Rev Nutr.* 23: 283-301.
- Mladenka P, Hrdina R, Hübl M y Simuek T (2005). The fate of iron in the organism and its regulatory pathways. *Acta Médica (Hradec Králové).* 48: 127-35.
- Moe SM (2008). Disorders involving calcium, phosphorus, and magnesium. *Prim Care.* 35: 215-37.

- Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V, Bindels RJ, Bruford EA, Caterina MJ, Clapham DE, Harteneck C, Heller S, Julius D, Kojima I, Mori Y, Penner R, Prawitt D, Scharenberg AM, Schultz G, Shimizu N y Zhu MX (2002). A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Mol Cell*. 9: 229-231.
- Montero M, Alonso MT, Carnicero E, Cuchillo-Ibáñez I, Albillos A, García AG, García-Sancho J y Álvarez J (2000). Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca²⁺ transients that modulate secretion. *Nat Cell Biol*. 2: 57-61.
- Mora Alvarado D, Alfaro Herrera N y Portuquez CF (2000). Aporte del agua de bebida a los requerimientos de calcio de la población costarricense. *Rev costarric salud pública*. 9: 16-31.
- Mouillon JM y Persson BL (2006). New aspects on phosphate sensing and signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*. 6: 171-176.
- Mulvihill B, Kirwan FM, Morrissey PA y Flynn A (1998). Effect of myofibrillar muscle proteins on the in vitro bioavailability of non-haem iron. *Int J Food Sci Nutr*. 49: 187-192.
- Mundy GR (1993). Cytokines and growth factors in the regulation of bone remodeling. *J Bone Miner Res*. 8: 505-510.
- Mundy GR, Chen D y Oyajobi BO (2003). Bone remodeling. En: Favus MJ (ed). *Primer on the metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. 5ª ed. American Society for Bone and Mineral Research. pp: 46-58.
- Muñoz Gómez M, Campos Garriguez A, García Erce JA y Ramírez Ramírez G (2005). Physiopathology of iron metabolism: diagnostic and therapeutic implications. *Nefrología*. 25: 9-19.
- Muñoz Gómez M, Molero León SE y García-Erce JA (2008). Fisiopatología del metabolismo del hierro y sus implicaciones en la anemia perioperatoria. *Anemia Rev*. 1: 47-60.

Muñoz M, Villar I, García-Erce JA (2009). An update on iron physiology. *World J Gastroenterol.* 15: 4617-4626.

Murer H, Forster I y Biber J (2004). The sodium Phosphate cotransporter family SLC34. *Pflugers Arch.* 447: 763-767.

Murer H, Hernando N, Forster I y Biber J (2000). Proximal tubular phosphate reabsorption: molecular mechanisms. *Physiol Rev.* 80: 1373-1409.

Murer H, Hernando N, Forster I y Biber J (2001a). Molecular aspects in the regulation of renal inorganic phosphate reabsorption: the type IIa sodium/inorganic phosphate co-transporter as the key player. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 10: 555-561.

Murer H, Hernando N, Forster L y Biber J (2001b). Molecular mechanisms in proximal tubular and small intestinal phosphate reabsorption. *Mol Membr Biol.* 18: 3-11.



Nagpal S, Na S y Rathnachalam R (2005) Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocr Rev.* 26: 662-687.

Nash TJ, Howlett CR, Martin C, Steele J, Johnson KA y Hicklin DJ (1994). Effects of platelet-derived growth factor on tibial osteotomies in rabbits. *Bone.* 15: 203-208.

Negri AL (2004). New physiological aspects in the regulation of phosphate metabolism. *Rev argent endocrinol metab.* 41: 20-26.

Negri AL (2007). Bone-Kidney axis in the control of serum phosphorus and bone mineralization. *Rev argent endocrinol metab.* 44: 86-93.

Nemeth E y Ganz T (2006). Heparin and iron-loading anemias. *Haematologica.* 91: 727-732.

- Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, Ganz T y Kaplan J (2004). Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*. 306: 2090-2093.
- Nemeth E, Valore EV, Terreto M, Sciller G, Lichtenstein A y Ganz T (2003). Heparin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood*. 101: 2461-2463.
- Nenonen A, Cheng S, Ivaska KK, Alatalo SL, Lehtimäki T, Schmidt-Gayk H, Uusi-Rasi K, Heinonen A, Kannus P, Sievänen H, Vuori I, Väänänen HK y Halleen JM (2005). Serum TRACP 5b is a useful marker for monitoring alendronate treatment: comparison with other markers of bone turnover. *J Bone Miner Res*. 20: 1804-1812.
- Nestares T, Díaz-Castro J, Alférez MJM, López-Aliaga I, Barrionuevo M y Campos MS (2008). Calcium-enriched goat milk, in comparison with similarly enriched cow milk, favours magnesium bioavailability in rats with nutritional ferropenic anaemia. *J Sci Food Agric*. 88: 319-327.
- Nicklas TA (2003). Calcium intake trends and health consequences from childhood through adulthood. *J Am Coll Nutr*. 22: 340-356.
- Nishiura JL, Martini LA, Mendonca CO, Schor N y Heilberg IP (2002). Effect of calcium intake on urinary oxalate excretion in calcium stone-forming patients. *Braz J Med Biol Res*. 35: 669-675.
- Noble BS, Peet N, Stevens HY, Brabbs A, Mosley JR, Reilly GC, Reeve J, Skerry TM y Lanyon LE (2003). Biphasic osteocyte survival and the targeting of osteoclasts for bone destruction in rat cortical bone. *Am J Physiol Cell*. C934-C943.



O'Connor DL (1994). Folate in goat milk products with reference to other vitamins and minerals: a review. *Small Rumin Res.* 14: 143-149.

Odle J (1997). New insights into the utilization of medium-chain triglycerides by the neonate: observations from a piglet model. *J Nutr.* 127: 1061-1067.

Okano T, Tsugawa N, Morishita A y Kato S (2004). Regulation of gene expression of epithelial calcium channels in intestine and kidney of mice by $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 . *J Steroid Biochem Mol Biol.* 89-90: 335-338.

Olakanmi O, Stokes JB, Pathan S y Britigan BE (1997). Polyvalent cationic metals induce the rate of transferrin-independent iron acquisition by HL-60 cells. *J Biol Chem.* 272: 2599-2606.

Olivares GM y Walter KT (2003). Consequences of iron deficiency. *Rev chil nutr.* 30: 226-233.

Olivares M (1997). Anemia ferropriva. En: Meneghello J, Fanta E, Paris E y Puga T (eds). *Pediatría.* 5ª ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana. pp: 1745-1749.

Olynyk JK, Cullen DJ, Aquila S, Summerville L y Powell LW (1999). A population based study of the clinical expression of the hemochromatosis gene. *N Engl J Med.* 341: 718-724.

OMS (2007). Iron supplementation of young children in regions where malaria transmission is intense and infectious disease highly prevalent.

OMS (1994). Assessment of fracture risk and its application for screening for postmenopausal osteoporosis. pp: 843.

- OMS/FAO (2006). Guidelines on Food Fortification with Micronutrients. Genova.
- OMS/UNICEF/UNU (2001). Iron deficiency anaemia: assessment, prevention, and control. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, (WHO/NHD/01.3).
- Op den Kamp JA (1979). Lipid asymmetry in membranes. *Annu Rev Biochem.* 48: 47-71.
- Oppenheimer SJ (2001). Iron and its relation to immunity and infectious disease. *J Nutr.* 131: 616S-633S.
- Oski FA y Honig AS (1978). The effects of therapy on the developmental scores of iron-deficient infants. *J Pediatr.* 92: 21-25.
- Otsuka E, Hirano K, Matsushita S, Inoue A, Hirose S, Yamaguchi A y Hagiwara H (1998). Effects of nitric oxide from exogenous nitric oxide donors on osteoblastic metabolism. *Eur J Pharmacol.* 349: 345-350.



- Palacios C (2003). El calcio y las enfermedades crónicas: un resumen de las evidencias. *An Venez Nutr.* 16: 78-84.
- 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.
- Palmer G, Zao J, Bonjour J, Hofstetter W y Caverzasio J (1999). In vivo expression of transcripts encoding the Glvr-1 phosphate transporter/retrovirus receptor during bone development. *Bone.* 24: 1-7.

- Pannabecker TL, Chandler JS y Wasserman RH (1995). Vitamin-D-dependent transcriptional regulation of the intestinal plasma membrane calcium pump. *Biochem Biophys Res Commun.* 213: 499-505.
- Papayannopoulou T, D'Andrea A, Abkowitz J y Migliaccio AR (2005). Biology of erythropoiesis, erythroid differentiation, and maturation. En: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE y Mc Glave P (eds). *Hematology: Basic Principles and Practice.* 4ª ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone. pp: 126-138, 202-217.
- Papierska L y Rabijewski M (2007). Glucocorticoid-induced osteoporosis. *Pol Arch Med Wewn.* 117: 363-369.
- 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.
- Parfitt AM (2001). Skeletal heterogeneity and the purposes of bone remodelling: implications for the understanding of osteoporosis. En: Marcus R, Feldman D y Kelsey J (eds). *Osteoporosis.* 2ª ed. San Diego (USA): Academic.
- Parfitt AM (2002). Targeted and nontargeted bone remodeling: Relationship to basic multicellular unit origination and progression. *Bone.* 30: 5-7.
- Parikka V, Peng Z, Hentunen T, Risteli J, Elo T, Väänänen HK y Härkönen P (2005). Estrogen responsiveness of bone formation in vitro and altered bone phenotype in aged estrogen receptor deficient male and female mice. *Eur J Endocrinol.* 152: 301-314.
- Parisi MS y Oliveri B (2008). Osteomalacia tumoral. *Actualiz Osteol.* 4: 14-21.
- Pariza MW, Park Y y Cook ME (2001). The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Progr Lipid Res.* 40: 283-298.

- Park YW (1994). Hypo-allergenic and therapeutic significance of goat milk. *Small Rumin Res.* 14: 151-155.
- Park YW (2006). Goat milk. Chemistry and nutrition. En: Park YW y Haenlein GFW. *Handbook of milk of non-bovine mammals*. Oxford: Blackwell Publishing. pp: 34-58.
- Park YW, Storkson JM, Albright KJ, Liu W y Pariza MW (1999). Evidence that the trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. *Lipids.* 34: 235-241.
- Parkkila S, Waheed A, Britton RS, Bacon BR, Zhou XY, Tomatsu S, Fleming RE y Sly WS (1997). Association of the transferrin receptor in human placenta with HFE, the protein defective in patients with hereditary hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94: 13198-13202.
- Pattanaungkul S, Riggs BL, Yergey AL, Viera NE, O'Fallon WM y Khosla S (2000). Relationship of intestinal calcium absorption to 1,25-dihydroxyvitamin D in young versus elderly women: evidence for age related intestinal resistance to 1,25(OH)₂D action. *J Clin Endocrinol Metab.* 85: 4023-4027.
- Pawlotsky Y, Le Dantec P, Moirand R, Guggenbuhl P, Jouanolle AM, Catheline M, Meadeb J, Brissot P, Deugnier Y y Chalès G (1999). Elevated parathyroid hormone 44-68 and osteoarticular changes in patients with genetic hemochromatosis. *Arthritis Rheum.* 42: 799-806.
- Peng J-B, Brown EM y Hediger MA (2003). Epithelial Ca²⁺ entry channels: transcellular Ca²⁺ transport and beyond. *J Physiol.* 551.3: 729-740.
- Perales S, Barberá R, Lagarda MJ y Farré R (2006). Fortification of milk with calcium: effect on calcium bioavailability and interactions with iron and zinc. *J Agric Food Chem.* 54: 4901-4906.

- Pérez Cano R, Montoya MJ (2004). Calcitonina: acciones biológicas. En: Riancho Moral JA y González Macías J (eds). *Manual práctico de osteoporosis y enfermedades del metabolismo mineral*. Madrid: Jarpyo S.A. pp: 35-40.
- Pérez G, Vittori D, Pregi N, Garbossa G y Nesse A (2005). Homeostasis del hierro. Mecanismos de absorción, captación celular y regulación. *Acta Bioquím Clín Latinoam*. 39: 301-314.
- Pérez-Aguilar F (2002). Hemocromatosis hereditaria: consideraciones fisiopatológicas, clínicas y terapéuticas. *Med Clin (Barc)*. 118: 103-110.
- Pérez-Granados AM, Vaquero MP y Navarro MP (2003). The frying process. Influence on the bioavailability of dietary minerals. En: Vaquero MP, García-Arias MT, Carvajal A y Sánchez-Muniz FJ (eds). *Bioavailability of Micronutrients and Minor Dietary Compounds. Metabolic and Technological Aspects. Research Signpost*. Trivandrum. pp: 31-41.
- Pi M y Quarles LD (2005). Osteoblast calcium-sensing receptor has characteristics of ANF/7TM receptors. *J Cell Biochem*. 95: 1081-1092.
- Pi M, Faber P, Ekema G, Jackson PD, Ting A, Wang N, Fontilla-Poole M, Mays RW, Brunden KR, Harrington JJ y Quarles LD (2005). Identification of a novel extracellular cation-sensing G-protein-coupled receptor. *J Biol Chem*. 280: 40201-40209.
- Pi M, Garner SC, Flannery P, Spurney RF y Quarles LD (2000). Sensing of extracellular cations in CasR-deficient osteoblasts. Evidence for a novel cation-sensing mechanism. *J Biol Chem*. 275: 3256-3263.
- Pietrangelo A (2004). Hereditary hemochromatosis-a new look at an old disease. *N Engl J Med*. 350: 2383-2397.
- Pietrangelo A (2006). Hereditary hemochromatosis. *Biochim Biophys Acta*. 1763: 700-710.

- Pinto JP, Ribeiro S, Pontes H, Thowfeequ S, Tosh D, Carvalho F y Porto G (2008). Erythropoietin mediates hepcidin expression in hepatocytes through EPOR signaling and regulation of C/EBP α . *Blood*. 111: 5727-5733.
- Pleilschifter J, Koditz R, Pfohl M y Schatz H (2002). Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. *Endocr Rev*. 23: 90-119.
- Ploszaj T, Ryniewicz Z y Motyl T (1997). Polyamines in goat's colostrum and milk. *Comp Biochem Physiol*. 118B: 45-52.
- Plotnikoff, GA (2007). Osteoporosis. En: Rakel D. *Integrative Medicine*. 2ª ed. Philadelphia, Pa: WB Saunders; Ed: Elsevier.
- Pocock NA, Eisman JA, Hopper JL, Yeates MG, Sambrook PN y Ebery S (1987). Genetic determinants of bone mass in adults. *J Clin Invest*. 80:706-710.
- Porrata MC, Hernández TM y Argüelles VJ (1996). *Recomendaciones nutricionales y guías de alimentación para la población cubana*. La Habana: Editorial Pueblo y Educación. pp: 12-13.
- Porthouse J, Cockayne S, King C, Saxon L, Steele E, Aspray T, Baverstock M, Birks Y, Dumville J, Francis R, Iglesias C, Puffer S, Sutcliffe A, Watt I y Torgerson DJ (2005). Randomised controlled trial of supplementation with calcium and cholecalciferol (vitamin D₃) for prevention of fractures in primary care. *Br Med J*. 330: 1003-1005.
- Pozzo MJ (2005). Vitamina D: acciones no clásicas. *Actualizaciones en Osteología*. 1: 28-33.



Quarles LD (2008). Endocrine functions of bone in mineral metabolism regulation. *J Clin Invest.* 118: 3820-3828.



Rafferty K, Walters G y Heaney RP (2007). Calcium fortificants: overview and strategies for improving calcium nutriture of the U.S. population. *J Food Sci.* 72: R152-R158.

Raisz LG (2005). Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest.* 115: 3318-3325.

Raja KB, Simpson RJ y Peters TJ (1994). Intestinal iron absorption studies in mouse models of iron-overload. *Br J Haematol.* 86: 156-162.

Raja KB, Simpson RJ, Pippard MJ y Peters TJ (1988). In vivo studies on the relationship between intestinal iron (Fe^{3+}) absorption, hypoxia and erythropoiesis in the mouse. *Br J Haematol.* 68: 373-378.

Rama Devi M, Amita P, Balraj M y Kailash Nath A (2002). Effect of latent iron deficiency on GABA and glutamate neuroreceptors in rat brain. *Indian J Clin Biochemistry.* 17: 1-6.

Ramesh C e Ilka N (2008). Regulation of intestinal calcium transport. *Nutr Rev.* 28: 179-196.

- Rapuri PB, Gallagher JC, Kinyamu HK y Ryschon KL (2001). Caffeine intake increases the rate of bone loss in elderly women and interacts with vitamin D receptor genotypes. *Am J Clin Nutr.* 74: 694-700.
- Recker RR, Lappe JM, Davies KM y Heaney RP (2004). Bone remodeling increases substantially in the years after menopause and remains increased in older osteoporosis patients. *J Bone Miner Res.* 19: 1628-1633.
- Reddy M y Cook J (1997). Effect of calcium intake on nonheme-iron absorption from a complete diet. *Am J Clin Nutr.* 65: 1820-1825.
- Reddy M, Hurrell R, Juillerat M y Cook J (1996). The influence of different protein sources on phytate inhibition of nonheme-iron absorption in humans. *Am J Clin Nutr.* 63: 203-207.
- Reddy MB y Cook JD (1997). Effect of calcium intake on nonheme-iron absorption from a complete diet. *Am J Clin Nutr.* 65: 1820-1825.
- Reddy PS, Adsul BB, Gandewar K y Desai A (2000). Mumfer (iron polymaltose complex) in the management of anemia in pregnancy-an Indian study. *J Indian Med Assoc.* 98: 343-346.
- Reddy PS, Adsul BB, Gandewar K, Korde KM y Desai A (2001). Evaluation of efficacy and safety of iron polymaltose complex and folic acid (Mumfer) vs. iron formulation (ferrous fumarate) in female patients with anaemia. *J Indian Med Assoc.* 99: 154-155.
- 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.
- Resnick LM (1999). The role of dietary calcium in hypertension: a hierarchical overview. *Am J Hypertens.* 12: 99-112.

- Rico H (2002). *El calcio en la prevención de las osteopenias*. Rico H (ed). Madrid: Ergon.
- Riggs BL, Koshla S y Melton LJ (2002). Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev.* 23: 279-302.
- Rissanen JP, Suominen MI, Oksala R, Ravanti L, Kallio P y Halleen JM (2006). The ratio of osteoclast activity/osteoclast number (CTX/TRACP 5b) is a useful parameter in experimental rat models of osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 21: Abstract SU105.
- Risteli J y Risteli L (2006). Products of bone collagen metabolism. En: Seibel MJ, Robins SP y Bilezikian JP (eds). *Dynamics of bone and cartilage metabolism. Principles and clinical applications*. 2ª ed. London: Academic Press. pp: 391-405.
- Rizzoli R, Fleisch H y Bonjour JP (1977). Role of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on intestinal phosphate absorption in rats with a normal vitamin D supply. *J Clin Invest.* 60: 639-647.
- Rodríguez Martínez A, Niemela O y Parkkila S (2004). Hepatic and extrahepatic expression of the new iron regulatory protein hemojuvelin. *Haematologica.* 89: 1441-1445.
- Ronco AL, De Stefani E y Dattoli R (2002). Dairy foods and risk of breast cancer: a case-control study in Montevideo, Uruguay. *Eur J Cancer Prev.* 11: 457-463.
- Roodman GD (1999). Cell biology of the osteoclast. *Exp Hematol* 27: 1229-1241.
- Rosales FJ, Jang JT, Pinero DJ, Erikson KM, Beard JL y Ross AC (1999). Iron deficiency in young rats alters the distribution of vitamin A between plasma and liver and between hepatic retinol and retinyl esters. *J Nutr.* 129: 1223-1228.
- Rosen HN, Dresner-Pollak R, Moses AC, Rossenblatt M y Zeind AJ (1994). Telopeptides of type I collagen as a marker of bone turnover. *Calcif Tissue Int.* 54: 26-29.

- Rossander-Hulten L, Brune M, Sandstrom B, Lonnerdal B y Hallberg L (1991). Competitive inhibition of iron absorption by manganese and zinc in humans. *Am J Clin Nutr.* 54: 152-156.
- Rothfield L y Finkelstein A (1968). Membrane biochemistry. *Annu Rev Biochem.* 37: 463-496.
- Roughead ZK, Zito CA y Hunt JR (2005). Inhibitory effects of dietary calcium on the initial uptake and subsequent retention of heme and nonheme iron in humans: comparisons using an intestinal lavage method. *Am J Clin Nutr.* 82: 589-597.
- Rowe PS, Kumagai Y, Gutierrez G, Garrett IR, Blacher R, Rosen D, Cundy J, Navvab S, Chen D, Drezner MK, Quarles LD y Mundy GR (2004). MEPE has the properties of an osteoblastic phosphatonin and minhibin. *Bone.* 34: 303-319.
- Roy C y Enns C (2000). Iron homeostasis: new tales from the crypt. *Blood.* 96: 4020-4027.
- Roy CN y Andrews NC (2001). Recent advances in disorders of iron metabolism: mutations, mechanisms and modifiers. *Hum Mol Genet.* 10: 2181-2186.
- Roy CN, Penny DM, Feder JN y Enns CA (1999). The hereditary hemochromatosis protein, HFE, specifically regulates transferrin-mediated iron uptake in HeLa cells. *J Biol Chem.* 274: 9022-9028.
- Rucker D, Ezzat S, Diamandi A, Khosravi J y Hanley DA (2004). IGF-I and testosterone levels as predictors of bone mineral density in healthy, community-dwelling men. *Clin Endocrinol.* 60: 491-499.
- Ruiz-Arguelles GJ, Díaz-Hernández A, Manzano C y Ruiz-Delgado GJ (2007). Ineffectiveness of oral iron hydroxide polymaltose in iron-deficiency anemia. *Hematology.* 12: 255-256.
- Russo de Boland A (2005). Acción de la Vitamina D en intestino. *Actualizaciones en Osteología.* 1: 34-39.

Ryder JW, Portocarrero CP, Song XM, Cui L, Yu M, Combatsiaris T, Galuska D, Bauman DE, Barbano DM, Charron MJ, Zierath JR y Houseknecht KL (2001). Isomer-specific antidiabetic properties of conjugated linoleic acid. *Diabetes*. 50: 1149-1157.



Saarinen UM, Siimes MA y Dallman PR (1977). Iron absorption in infants: high bioavailability of breast milk as indicated by the extrinsic tag method of iron absorption and by the concentration of serum ferritin. *J Pediatr*. 91: 36-39.

Saini AL y Gill RS (1991). Goat milk: An attractive alternate. *Indian Dairyman*. 42: 562-564.

Sakhaee K, Baker S, Zerwekh J, Poindexter J, Garcia-Hernandez PA y Pak CY (1994). Limited risk of kidney stone formation during long-term calcium citrate supplementation in nonstone forming subjects. *J Urol*. 152: 324-327.

Samarzija D, Havranek JL Pavic V y Mioc B (2001). Effects of stage of lactation on the chemical composition of goat milk. *Czech Journal of Animal Science*. 46: 548-553.

Sánchez M (2004). Especies menores para pequeños productores: cabras lecheras. En: *Memoria de la XIX Reunión Nacional sobre Caprinocultura*. Acapulco Gro. pp: 219-223.

Sandberg A, Brune M, Carlson N, Hallberg L, Skoglund E y Rosander-Hulthen L (1999). Inositol phosphates with different numbers of phosphate groups influence iron absorption in humans. *Am J Clin Nutr*. 70: 240-246.

Sanderson P (1986). A New method of analysis of feeding stuffs for the determination of crude oils and fat. En: Haresing W y Cole DJA (eds). *Recent advances in animal nutrition*. London: Butter Worths. pp: 77-86.

- Sandstrom B (2001). Micronutrient interactions: effects on absorption and bioavailability. *Br J Nutr.* 85: S181- S185.
- Santana MA, Pihakaski-Maunsbach K, Sandal N, Marcker KA y Smith AG (1998). Evidence that the plant host synthesizes the heme moiety of leghemoglobin in root nodules. *Plant Physiol.* 116: 1259-1269.
- Sanz Ceballos L (2007). Caracterización de la leche de cabra frente a la de vaca. Estudio de su valor nutritivo e inmunológico. *Tesis Doctoral.* Facultad de Farmacia, Universidad de Granada.
- Sanz Ceballos L, Ramos Morales E, de la Torre Adarve G, Díaz Castro J, Pérez Martínez L y Sanz Sampelayo MR (2009). Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology. *Journal of Food Composition and Analysis.* 22: 322-329.
- Sanz Sampelayo MR, Martín AJ, Pérez L, Gil Extremera F y Boza J (2004). Dietary supplements for lactating goats by polyunsaturated fatty acid-rich protected fat. Effects after supplement withdrawal. *J Dairy Sci.* 87: 1796-1802.
- Sarkar BC y Chauhan UP (1967). A new method for determining micro quantities of calcium in biological materials. *Anal Biochem.* 20: 155-166.
- Sato K, Nohtomi K, Demura H Takeuchi A, Kobayashi T, Kazama J y Ozawa H (1997). Saccarated ferric oxide (SFO) induced osteomalacia: in vitro inhibition by SFO of bone formation and 1,25 dihydroxy-vitamin D production in renal tubules. *Bone.* 21: 57-64.
- Sáyago-Ayerdi SG, Vaquero MP, Schultz-Moreira A, Bastida S y F. J. Sánchez-Muniz FJ (2008). Utilidad y controversias del consumo de ácidos grasos de cadena media sobre el metabolismo lipoproteico y obesidad. *Nutr Hosp.* 23: 191-202.

- Schaer Ch, Vallelian F, Imhof A, Schoedon G y Schaer D (2008). Heme Carrier Protein (HCP-1) spatially interacts with the CD 163 hemoglobin uptake pathway and is a target of inflammatory macrophage activation. *J Leukoc Biol.* 83: 1-9.
- Schiavi SC y Kumar R (2004). The phosphatonin pathway: new insights in phosphate homeostasis. *Kidney Int.* 65: 1-14.
- Scholz-Ahrens KE, Schaafsma G, van den Heuvel EG y Schrezenmeir J (2001). Effects of prebiotics on mineral metabolism. *Am J Clin Nutr.* 73: 459S-464S.
- Schonau E y Rauch F (1997). Markers of bone and collagen metabolism. Problems and perspectives in Pediatrics. *Horm Res.* 48: 50-59.
- Schümann K, Ertle T, Szegner B, Elsenhans B y Solomons NW (2007). On risks and benefits of iron supplementation recommendations for iron intake revisited. *J Trace Elem Med Biol.* 21: 147-168.
- Segawa H, Kaneko I, Yamanaka S, Ito M, Kuwahata M, Inoue Y, Kato S y Miyamoto K (2004). Intestinal Na-P(i) cotransporter adaptation to dietary P(i) content in vitamin D receptor null mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 287: F39-F47.
- Seibel MJ (2005). Biochemical markers of bone turnover: part I: biochemistry and variability. *Clin Biochem Rev.* 26: 97-122.
- Seidlová-Wuttke D, Jarry H, Becker T, Christoffel V y Wuttke W (2003). Pharmacology of Cimicifuga racemosa extract BNO 1055 in rats: bone, fat and uterus. *Maturitas.* 44: S39-S50.
- Semenza GL (2000). HIF-1 and human disease: One highly involved factor. *Genes Dev.* 14: 1983-1991.
- Semenza GL (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 3: 721-732.

- Shah M, Chandalia M, Adams-Huet B, Brinkley LJ, Sakhaee K, Grundy SM y Garg A (2009). Effect of a high-fiber diet compared with a moderate-fiber diet on calcium and other mineral balances in subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 32: 990-995.
- Shaik A, Berndt T y Kumar R (2008). Regulation of phosphate homeostasis by the phosphatonins and other novel mediators. *Pediatr Nephrol*. 23: 1203-1210.
- Shaikh A, Berndt T y Kumar R (2007). FGF-7 is a potent in vivo phosphaturic agent in rats. *J Bone Miner Res*. 22: S106.
- Shalhoub V, Grisanti M, Padagas J, Scully S, Rattan A, Qi M, Varnum B, Vezina C, Lacey D y Martin D (2003). In vitro studies with the calcimimetic, cinacalcet HCl, on normal human adult osteoblastic and osteoclastic cells. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 13: 89-106.
- Sharp P (2004). The molecular basis of copper and iron interactions. *Proc Nutr Soc*. 63: 563-569.
- Sharp PA, Tandy SR y Srai SKS (2003). Mechanisms involved in the regulation of intestinal iron absorption. *Nutr Abst Rev*. 73: 1-9.
- Shayeghi M, Latunde-Dada GO, Oakhill JS, Laftah AH, Takeuchi K, Halliday N, Khan Y, Warley A, McCann FE, Hider RC, Frazer DM, Anderson GJ, Vulpe CD, Simpson RJ y McKie AT (2005). Identification of an intestinal heme transporter. *Cell*. 122: 789-801.
- Sheehan GM, Kallakury BV, Sheehan CE, Fisher HA, Kaufman RP Jr y Ross JS (2007). Loss of claudins-1 and -7 and expression of claudins-3 and -4 correlate with prognostic variables in prostatic adenocarcinomas. *Hum Pathol*. 38: 564-569.
- Shen X, Weaver CM, Martin BR y Heany RP (1998). Lignin effect on calcium absorption in rats. *J Food Sci*. 63: 165-167.

- Shin MH, Holmes MD, Hankinson SE, Wu K, Colditz GA y Willett WC (2002). Intake of dairy products, calcium, and vitamin d and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 94: 1301-1311.
- Shoback D (2007). Update in osteoporosis and metabolic bone disorders. *J Clin Endocrinol Metab.* 7: 289-300.
- Siah CW, Ombiga J, Adams LA, Trinder D y Olynyk JK (2006). Normal iron metabolism and the pathophysiology of iron overload disorders. *Clin Biochem Rev.* 27: 5-16.
- Silver J, Kilav R y Naveh-Manly T (2002). Mechanisms of secondary hyperparathyroidism. *Am J Physiol Renal Physiol.* 283: F367-F376.
- Simon DB, Lu Y, Choate KA, Velazquez H, Al-Sabban E, Praga M, Casari G, Bettinelli A, Colussi G, Rodríguez-Soriano J, McCredie D, Milford D, Sanjad S y Lifton RP (1999). Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg²⁺ resorption. *Science.* 285: 103-106.
- Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R y Boyle WJ (1997). Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell.* 89: 309-319.
- Singer F y Eyre D (2008). Using biochemical markers of bone turnover in clinical practice. *Cleveland Clinic J of Medicine.* 75: 739-750.
- Sisk CL y Zehr JL (2005). Pubertal hormones organize the adolescent brain and behavior. *Front Neuroendocrinol.* 26: 163-174.
- Sorace P y Patzan J (2007). Anemia and its effects on performance. *Strength and Conditioning Journal.* 29: 25-28.

- Spencer H, Kramer L y Osis D (1988). Do protein and phosphorus cause calcium loss? *J Nutr.* 118: 657-660.
- Spencer H, Norris C, Derler J y Osis D (1991). Effect of oat bran muffins on calcium absorption and calcium, phosphorus, magnesium and zinc balance in men. *J Nutr.* 121: 1976-1983.
- Stangl GI y Kirchgessner M (1998). Different degrees of moderate iron deficiency modulate lipid metabolism of rats. *Lipids.* 33: 889-895.
- Staubli Asobayire F, Adou P, Davidsson L, Cook JD y Hurrell RF (2001). Prevalence of iron deficiency with and without concurrent anemia in population groups with high prevalence of malaria and other infections: a study in Côte d'Ivoire. *Am J Clin Nutr.* 74: 776-782.
- Stekel A, Olivares M, Pizarro F, Chadud P, López I y Amar M (1986). Absorption of fortification iron from milk formulas in infants. *Am J Clin Nutr.* 43: 917-922.
- Stepan JJ (2006). Clinical value of the biochemical markers of bone remodeling in the assessment of bone metabolic diseases. *Jugoslav Med Biobem.* 25: 241-248.
- Stephenson LS, Lathan MC y Ottesen EA (2000). Global malnutrition. *Parasitology.* 121: S5-S22.
- Stock AM, Robinson VL y Goudreau PN (2000). Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 69: 183-215.
- Stoltzfus RJ (2001). Iron-deficiency anemia: reexamining the nature and magnitude of the public health problem. Summary: implications for research and programs. *J of Nutr.* 131: 697S-701S.
- St-Onge MP y Jones P (2002). Physiological effects of medium chain triglycerides: potential agents in the prevention of obesity. *J Nutr.* 132: 329-332.

Stuart KA, Anderson GJ, Frazer DM, Powell LW, McCullen M, Fletcher LM y Crawford DH (2003). Duodenal expression of iron transport molecules in untreated haemochromatosis subjects. *Gut*. 52: 953-959.

Sullivan LW, Luhby LA y Streiff LW (1966). Studies on the daily requirement for folic acid in infants and the etiology of folate deficiency in goat's milk megaloblastic anemia. *Am J Clin Nutr*. 18: 311-317.

Summerbell CD, Watts C, Higgins JP y Garrow JS (1998). Randomised controlled trial of novel, simple, and well supervised weight reducing diets in outpatients. *BMJ*. 317: 1487-1489.

Suzuki S, Ferjani A, Suzuki I y Murata N (2004). The SphSSphR two component system is the exclusive sensor for the induction of gene expression in response to phosphate limitation in synechocystis. *J Biol Chem*. 279: 13234-13240.

Swain JH, Tabatabai LB y Reddy MB (2002). Histidine content of low molecular weight beef proteins influences nonheme iron bioavailability in Caco-2 cells. *J Nutr*. 135: 245-251.



Talmage RV, Doppelt SH y Fondren FB (1976). An interpretation of acute changes in plasma ^{45}Ca following parathyroid hormone administration to thyroparathyroidectomized rats. *Calcif Tissue Res*. 22: 117-128.

Tang VW y Goodenough DA (2003). Paracellular ion channel at the tight junction. *Biophys J*. 84: 1660-1673.

- Tappenden KA, Thomson AB, Wild GE y Mc Burney MI (1997). Short-chain fatty acid-supplemented total parenteral nutrition enhances functional adaptation to intestinal resection in rats. *Gastroenterology*. 112: 792-802.
- Teegarden D, Proulx WR, Martin BR, Zhao J, McCabe GP, Lyle RM, Peacock M, Slemenda C, Johnston CC y Weaver CM (1995). Peak bone mass in young women. *J Bone Miner Res*. 10: 711-715.
- Tejeda-López MF, Ramírez-Ley K, Bacardí-Gascón M y Jiménez-Cruz A (2009). Efecto del calcio sobre la pérdida de peso. *Nutr Hosp*. 24: 364-367.
- Tenenhouse HS (2005). Regulation of phosphorus homeostasis by the Type IIa Na/phosphate cotransporter. *Ann Rev Nutr*. 25: 197-214.
- Tenenhouse HS y Murer H (2003). Disorders of renal tubular phosphate transport. *J Am Soc Nephrol*. 14: 240-247.
- Tenenhouse HS, Roy S, Martel J y Gauthier C (1998). Differential expression, abundance and regulation of Na⁺-Phosphate cotransporter genes in murine kidney. *Am J Physiol*. 275: F527-F534.
- Teucher B, Olivares M y Cori H (2004). Enhancers of iron absorption: ascorbic acid and other organic acids. *Int J Vitam Nutr Res*. 74: 403-419.
- The Hyp Consortium (1995). A gene (PEX) with homologies to endopeptidases is mutated in patients with X-linked hypophosphatemic rickets. *Nat Genet*. 11: 130-136.
- Theofan G y Price PA (1989). Bone Gla protein messenger ribonucleic acid is regulated by both 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and 3',5'-cyclic adenosine monophosphate in rat osteosarcoma cells. *Mol Endocrinol*. 3: 36-43.
- Toblli JE y Brignoli R (2007). Iron (III)-hydroxide polymaltose complex in iron deficiency anemia. Review and meta-analysis. *Arzneimittel-Forschung (Drug Research)*. 57: 431-438.

Tuderman L, Myllyla R y Kivirikko KI (1977). Mechanism of the prolyl hydroxylase reaction. 1. Role of co-substrates. *Eur J Biochem.* 80: 341-348.



U.S.D.A. (2004). Department of Agriculture, Agricultural Research Service; Nutrient Data Laboratory. *USDA National Nutrient Database for Standard Reference.* 17^a ed. pp: 106.

Uehara M, Chiba H, Mogi H, Suzuki K y Goto S (1997). Induction of increased phosphatidylcholine hydroperoxide by an iron-deficient diet in rats. *J Nutr Biochem.* 8: 385-391.

Ueland T (2005). GH/IGF-I and bone resorption in vivo and in vitro. *Eur J Endocrinol.* 152: 327-332.

Umbreit JN, Conrad ME, Moore EG, Desai MP y Turrens J (1996). Paraferitin: a protein complex with ferrireductase activity is associated with iron absorption in rats. *Biochemistry.* 35: 6460-6469.

Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, Iijima K, Hasegawa H, Okawa K, Fujita T, Fukumoto S y Yamashita T (2006). Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF-23. *Nature.* 444: 770-774.

Utermohlen V (2000). Diet, nutrition and drug interactions. En: Shils ME, Olson JA, Shike M y Ross AC (eds). *Modern nutrition in health and disease.* 9^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. pp: 1619-1641.

Uzel C y Conrad ME (1998). Absorption of heme iron. *Semin Dermatol.* 35: 27-34.



- Valenti L, Varena M, Fracanzani AL, Rossi V, Fargion S y Sinigaglia L (2009). Association between iron overload and osteoporosis in patients with hereditary hemochromatosis. *Osteoporos Int.* 20: 549-555.
- Van Campen DR (1973). Enhancement of iron absorption from ligated segments of rat intestine by histidine, cysteine and lysine. Effects of removing ionizing groups and of stereoisomerism. *J Nutr.* 103: 139-142.
- Van den Heuvel E, Muys T, van Dokkum W y Schaafsma G (1999). Oligo/fructose stimulates calcium absorption in adolescents. *Am J Clin Nutr.* 69: 544-548.
- Van den Heuvel E, Schaafsma G, Muys T y van Dokkum W (1998). Nondigestible oligosaccharides do not interfere with calcium and non-heme iron absorption in young, healthy men. *Am J Clin Nutr.* 67: 445-451.
- Van den Heuvel EG, Muijs T, Brouns F, Hendriks HF (2009). Short-chain fructo-oligosaccharides improve magnesium absorption in adolescent girls with a low calcium intake. *Nutr Res.* 29: 229-237.
- Van der MR, Lapre JA, Govers MJ y Kleibeuker JH (1997). Mechanisms of the intestinal effects of dietary fats and milk products on colon carcinogenesis. *Cancer Lett.* 114: 75-83.
- Van Eijk HG y De Jong G (1992). The physiology of iron, transferrin, and ferritin. *Biol Trace Element Res.* 35: 13-24.
- Van't HRJ y Ralston SH (2001). Nitric oxide and bone. *Immunology.* 103: 255-261.

- Vanderschueren D, Vandput L, Boonen S, Lindberg MK, Bouillon R y Ohlsson C (2004). Androgens and bone. *Endocr Rev.* 2: 389-425.
- VanHouten J, Dann P, McGeoch G, Brown EM, Krapcho K, Neville M y Wysolmerski JJ (2004). The calcium-sensing receptor regulates mammary gland parathyroid hormone-related protein production and calcium transport. *J Clin Invest.* 113: 598-608.
- Verga Falzacappa MV y Muckenthaler M (2004). Heparin: Iron – hormone and anti-microbial peptide. *Gene.* 304: 37-44.
- Vernejoul MC de, Pointillart A, Cywiner Golinzer C, Morieux C, Bielakoff J, Modrowski D y Miravet L (1984). Effects of iron overload on bone remodeling in pigs. *Am J Pathol.* 116: 377-384.
- Villa I, Dal Fiume C, Maestroni A, Rubinacci A, Ravasi F y Guidobono F (2003). Human osteoblast-like cell proliferation induced by calcitonin-related peptides involves PCK activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 284: E627-E633.
- Villalobos C, Núñez L, Montero M, García AG, Alonso MT, Chamero P, Álvarez J y García-Sancho J (2002). Redistribution of Ca²⁺ among cytosol and organelle during stimulation of bovine chromaffin cells. *FASEB J.* 16: 343-353.
- Vives Corrons JL, Miguel-García A, Pujades MA, Miguel-Sosa A, Cambiasso S, Linares M, Dibarrart M y Calvo MA (1995). Increased susceptibility of microcytic red blood cells to in vitro oxidative stress. *Eur J Haematol.* 55: 327-331.
- Vives JL (2001). Anemia ferropénica y otros trastornos del metabolismo del hierro. En: *Hematología Clínica.* 4ª ed. Barcelona: Harcourt. pp: 105-130.



- Wagner C (2007). Novel insights into the regulation of systemic phosphate homeostasis and renal phosphate excretion. *J Nephrol.* 20: 130-134.
- Waheed A, Grubb JH, Zhou XY, Tomatsu S, Fleming RE, Costaldi ME, Britton RS, Bacon BR y Sly WS (2002). Regulation of transferrin-mediated iron uptake by HFE, the protein defective in hereditary hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99: 3117-3122.
- Waheed A, Parkkila S, Saarnio J, Fleming RE, Zhou XY, Tomatsu S, Britton RS, Bacon BR y Sly WS (2002). Association of HFE protein with transferrin receptor in crypt enterocytes of human duodenum. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99: 3117-3122.
- Waheed A, Parkkila S, Saarnio J, Fleming RE, Zhou XY, Tomatsu S, Britton RS, Bacon BR y Sly WS (1999). Association of HFE protein with transferrin receptor in crypt enterocytes of human duodenum. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96: 1579-1584.
- Waheed A, Parkkila S, Tomatsu S, Tsuchihashi Z, Feder JN, Schatzman RC, Britton RS, Bacon BR y Sly WS (1997). Hereditary hemochromatosis: effects on C282Y and H63D mutations on association with β_2 -microglobulin intracellular processing, and cell surface expression of the HFE protein in COS-7 cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94: 12384-12389.
- Wali RK, Baum CL, Sitrin MD y Brasitus TA (1990). 1,25(OH)₂vitamin D₃ stimulates membrane phosphoinositide turnover, activates protein kinase C, and increases cytosolic calcium in rat colonic epithelium. *J Clin Invest.* 85: 1296-1303.
- Wallach S, Farley JR, Baylink DJ y Brenne-Gatti L (1993). Effects of calcitonin on bone quality and osteoblastic function. *Calcif Tissue Int.* 52: 335-339.

- Walter T, Zacarías I y Yáñez CG (2005). Tolerance and acceptability in infants of iron polymaltose complex. *Ars Med.* 9: 428-431.
- Wang Y, Zhang J, Yi XJ y Yu FS (2004). Activation of ERK1/2 MAP kinase pathway induces tight junction disruption in human corneal epithelial cells. *Exp Eye Res.* 78: 125-136.
- Wauben IP y Atkinson SA (1999). Calcium does not inhibit iron absorption in infant piglets fed a high calcium diet. *J Nutr.* 129: 707-711.
- Weaver CM y Haney RP (1999). Calcium. En: Shils M, Olson JA, Shike M y Ross AC (eds). *Nutrition in Health and Disease.* 9ª ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins. pp: 141-155.
- Weaver CM y Haney RP (2001). Dairy consumption and bone health. *Am J Clin Nutr.* 73: 660-661.
- Weaver CM, Prolux WR y Heaney R (1999). Choices for achieving adequate dietary calcium with a vegetarian diet. *Am J Clin Nutr.* 70: 543S-548S.
- Weinberg ED (2006). Iron loading: a risk factor for osteoporosis. *Biometals.* 19: 633-635.
- Weinberg ED (2008). Role of iron in osteoporosis. *Pediatr Endocrinol Rev.* 1: 81-85.
- Welten DC, Kemper HC, Post GB y Van Staveren WA (1995). A meta-analysis of the effect of calcium intake on bone mass in young and middle aged females and males. *J Nutr.* 125: 2802-2813.
- Whittaker P (1998). Iron and zinc interactions in humans. *Am J Clin Nutr.* 68: 442S-446S.
- Whittaker P, Tufaro PR y Rader JI (2001). Iron and folate in fortified cereals. *J Am Coll Nutr.* 20: 247-254.

- Wienk KJ, Marx JJ y Beynen AC (1999). The concept of iron bioavailability and its assessment. *Eur J Nutr.* 38: 51-75.
- Wienk KJ, Marx JJ y Beynen AC (1999). The concept of iron bioavailability and its assessment. *Eur J Nutr.* 38: 51-75.
- Wilcox ER, Burton QL, Naz S, Riazuddin S, Smith TN, Ploplis B, Belyantseva I, Ben-Yosef T, Liburd NA, Morell RJ, Kachar B, Wu DK, Griffith AJ, Riazuddin S y Friedman TB (2001). Mutations in the gene encoding tight junction claudin-14 cause autosomal recessive deafness DFNB29. *Cell.* 104: 165-172.
- Williams KB y De Luca HF (2007). Characterization of intestinal phosphate absorption using a novel in vivo method. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 292: E1917-E1921.
- Wilson FH, Disse-Nicodeme S, Choate KA, Ishikawa K, Nelson-Williams C, Desitter I, Gunel M, Milford DV, Lipkin GW, Achard JM, Feely MP, Dussol B, Berland Y, Unwin RJ, Mayan H, Simon DB, Farfel Z, Jeunemaitre X y Lifton RP (2001). Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. *Science.* 293: 1107-1112.
- Wisker E, Nagel R, Tanudjaja TK y Feldheim W (1991). Calcium, magnesium, zinc, and iron balances in young women: effects of a low-phytate barley-fiber concentrate. *Am J Clin Nutr.* 54: 553-559.
- Wolf RL, Cauley JA, Baker CE, Ferrell RE, Charron M, Caggiula AW, Salamone LM, Heaney RP y Kuller LH (2000). Factors associated with calcium absorption efficiency in pre and perimenopausal women. *Am J Clin Nutr.* 72: 466-471.
- Wu K, Willett WC, Fuchs CS, Colditz GA y Giovannucci EL (2002). Calcium intake and risk of colon cancer in women and men. *J Natl Cancer Inst.* 94: 437-446.



- Yamaguchi A, Komori T y Suda T (2000). Regulation of osteoblast differentiation mediated by Bone Morphogenetic Proteins, Hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev.* 21: 393-411.
- Yamaguchi T, Chattopadhyay N, Kifor O, Ye C, Vassilev PM, Sanders JL y Brown EM (2001). Expression of extracellular calcium-sensing receptor in human osteoblastic MG-63 cell line. *Am J Physiol Cell Physiol.* 280: C382- C393.
- Yamaji S, Sharp P, Ramesh B y Srani SK (2004). Inhibition of iron transport across human intestinal epithelial cell by hepcidin. *Blood.* 104: 2178-2180.
- Yamasaki K y Hagiwara H (2009). Excess iron inhibits osteoblast metabolism. *Toxicology Letters.* 191: 211-215.
- Yaziji H, Janckila AJ, Lear SC, Martin AW y Yam LT (1995). Immunohistochemical detection of tartrate-resistant acid phosphatase in non-hematopoietic human tissues. *Am J Clin Pathol.* 104: 397-402.
- Yen AW, Fancher TL y Bowlus CL (2006). Revisiting hereditary hemochromatosis: current concepts and progress. *Am J Med.* 119: 391-399.
- Yoon KG, Rutledge SJ, Buenaga RF y Rodan GA (1988). Characterization of the rat osteocalcin gene: stimulation of promoter activity by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Biochemistry.* 27: 8521-8526.
- Yoshiko Y, Wang H, Minamizaki T, Ijuin C, Yamamoto R, Suemune S, Kozai K, Tanne K, Aubin JE y Maeda N (2007). Mineralized tissue cells are a principal source of FGF-23. *Bone.* 40: 1565-1573.

- Young MF (2003). Bone matrix proteins: more than markers. *Calcif Tissue Int.* 72: 2-4.
- Young SP y Bomford A (1994). Iterative endocytosis of transferrin by K562 cells. *Biochem J.* 298: 165-170.
- Yu ASL (2007). Disorders of magnesium and phosphorus. En: Goldman L y Ausiello D (eds). *Cecil Medicine.* 23ª ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier. pp:156-213.
- Yu F, White SB, Zhao Q y Lee FS (2001). HIF-1alpha binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98: 9630-9635.
- Yung-Suk K y Akera T (1987). O₂ free radical: cause of ischemia-reperfusion injury to cardiac Na⁺-K⁺-ATPase. *Am J Physiol.* 252: H252-H257.



- Zaidi M, Inzerillo AM, Moonga BS, Bevis PJ y Huang CL (2002). Forty years of calcitonin. Where are we now? A tribute to the work of Iain Macintyre. *Bone.* 30: 655-663.
- Zemel MB, Shi H, Greer B, Dirienzo D y Zemel PC (2000). Regulation of adiposity by dietary calcium. *Faseb J.* 14: 1132-1138.
- Zhang AS, Davies PS, Carlson HL y Enns CA (2003). Mechanisms of HFE-induced regulation of iron homeostasis: Insights from the W81AHFE mutation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100: 9500-9505.
- Zhu A, Kaneshiro M y Kaunitz JD (2010). Evaluation and treatment of iron deficiency anemia: a gastroenterological perspective. *Dig Dis Sci.* 55(3): 548-559.
- Zimmermann MB y Hurrell RF (2007). Nutritional iron deficiency. *Lancet.* 370: 511-520.

Zlotkin S (2001). Treatment of anemia with microencapsulated ferrous fumarate plus ascorbic acid supplied as sprinkles to complementary (weaning) foods. *Am J Clin Nutr.* 74: 791-795.