

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

INSTITUTO DE NUTRICIÓN Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS "JOSÉ MATAIX"



## TESIS DOCTORAL INTERNACIONAL

*"Estado oxidativo/antioxidante y biodisponibilidad de cobre y zinc en la recuperación de la anemia ferropénica nutricional con dietas basadas en leche (cabra o vaca) fortificadas en hierro y ácido fólico"*

Programa Oficial de Doctorado en Nutrición y Ciencias de los Alimentos

**EMILIO RIVAS GARCÍA**



Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Emilio Rivas García  
ISBN: 978-84-9125-154-5  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/40322>



**D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> INMACULADA LÓPEZ ALIAGA, Catedrática de Fisiología de la Universidad de Granada;**

**INFORMA:**

Que la Tesis Doctoral Internacional titulada: *“Estado oxidativo/antioxidante y biodisponibilidad de cobre y zinc en la recuperación de la anemia ferropénica nutricional con dietas basadas en leche (cabra o vaca) fortificadas en hierro y ácido fólico”*, que presenta D. EMILIO RIVAS GARCÍA al superior juicio del Tribunal que designe la Universidad de Granada, ha sido realizada bajo mi dirección durante los años 2012-2015, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autor en condiciones tan aventajadas que le hacen merecedor al Título de Doctor, siempre y cuando así lo considere el citado Tribunal.

Fdo.: M<sup>a</sup> Inmaculada López Aliaga

En Granada a 30 de Abril de 2015.

**D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> JOSÉ MUÑOZ ALFÉREZ, Profesora Titular de Fisiología de la Universidad de Granada;**

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral Internacional titulada: “Estado oxidativo/antioxidante y biodisponibilidad de cobre y zinc en la recuperación de la anemia ferropénica nutricional con dietas basadas en leche (cabra o vaca) fortificadas en hierro y ácido fólico”, que presenta D. EMILIO RIVAS GARCÍA al superior juicio del Tribunal que designe la Universidad de Granada, ha sido realizada bajo mi dirección durante los años 2012-2015, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autor en condiciones tan aventajadas que le hacen merecedor al Título de Doctor, siempre y cuando así lo considere el citado Tribunal.

Fdo.: M<sup>a</sup> José Muñoz Alférez

En Granada a 30 de Abril de 2015.

**D JAVIER DÍAZ CASTRO, Profesor Titular de Fisiología de la Universidad de Granada;**

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral Internacional titulada: “Estado oxidativo/antioxidante y biodisponibilidad de cobre y zinc en la recuperación de la anemia ferropénica nutricional con dietas basadas en leche (cabra o vaca) fortificadas en hierro y ácido fólico”, que presenta D. EMILIO RIVAS GARCÍA al superior juicio del Tribunal que designe la Universidad de Granada, ha sido realizada bajo mi dirección durante los años 2012-2015, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autor en condiciones tan aventajadas que le hacen merecedor al Título de Doctor, siempre y cuando así lo considere el citado Tribunal.

Fdo.: Javier Díaz Castro

En Granada a 30 de Abril de 2015.

El doctorando D. **EMILIO RIVAS GARCÍA** y los directores de la tesis Dra. **M<sup>a</sup> INMACULADA LÓPEZ ALIAGA**, Dra. **M<sup>a</sup> JOSÉ MUÑOZ ALFÉREZ** y Dr. **JAVIER DÍAZ CASTRO** garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Directores de la Tesis

Doctorando

Fdo.: **M<sup>a</sup> Inmaculada López Aliaga**

Fdo.: **Emilio Rivas García**

Fdo.: **M<sup>a</sup> José Muñoz Alférez**

Fdo.: **Javier Díaz Castro**

En Granada, a 30 de abril de 2015



## *AGRADECIMIENTOS*

A mi directora *M<sup>a</sup> Inmaculada López Aliaga*, por estar dispuesta a dirigir esta tesis pero también por sacar tiempo en todo momento para dedicarle tiempo a pesar de estar ocupada. Su cercanía y amabilidad son unas de las muchas cualidades que la han hecho una de los mejores directores que se puede tener. Gracias.

A mi codirectora *M<sup>a</sup> José Muñoz Alférez*, por animarme desde el principio a realizar la tesis y estar siempre disponible a mis preguntas con su familiaridad característica. Sus ánimos también me empujaron a emprender la aventura de realizar las estancias en el extranjero. Gracias.

A mi codirector *Javier Díaz Castro*, por su inestimable ayuda en absolutamente todo. Simplemente sin él, no hubiera sido posible realizar esta tesis. Una persona que antepone los problemas de los demás a los suyos propios. Más que un jefe, un amigo. Una de las cosas por las que me siento más orgulloso es de haber tenido tan buenas personas que me dirijan la Tesis, poca gente puede tener tanta suerte.

A *Silvia M<sup>a</sup> Hijano Fernández*, una amiga más, por su ayuda y apoyo en el día a día del laboratorio, algo esencial en la consecución de este proyecto. Por ser siempre tan trabajadora y estar en todo momento a disposición de los demás. Gracias por todos los momentos que hemos pasado.

Al Grupo de Investigación “*Alimentación, Nutrición y Absorción*” (PAIDI AGR- 206), por aceptar que realice todo este trabajo dentro de sus líneas de investigación.

Al Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos “José Mataix” (*INYTEA*) y al Departamento de Fisiología de la Universidad de Granada, por poner a mi disposición sus instalaciones para la realización de este trabajo de investigación.

A la Directora del Departamento de Fisiología, *María López-Jurado Romero de la Cruz*, por su importante labor en el desarrollo de esta Tesis.

Al *INRA* de Clermont-Ferrand/Theix/Lyon, por acogerme durante tres meses maravillosos en el grupo AGL-UMRH. Fue una experiencia inolvidable de la que guardaré por siempre buenos recuerdos.

Al Consejo Andaluz de Colegios Oficiales de Farmacéuticos (*CACOF*), por financiar en parte este trabajo.

A todas las personas que han contribuido de una forma u otra a que este tiempo haya constituido para mí uno de los proyectos más importantes de mi vida.

A mi familia y amigos. También quisiera dar las gracias a otros compañeros de laboratorio como Mario, Jorge, Adrián, Julio, Naroa, Alicia, Alfonso, Patri, Nuri y todos los demás; por lo aprendido de cada uno de ellos.

*Gracias a la vida,  
por las experiencias vividas.*



# **ÍNDICE**

|  |               |
|--|---------------|
| <b>I. OBJETO .....</b>   | <b>- 7 -</b>  |
| <b>II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS .....</b>                                 | <b>- 11 -</b> |
| <b>1. <u>EL HIERRO</u> .....</b>   | <b>- 12 -</b> |
| <b>1.1 FUNCIONES .....</b>   | <b>- 12 -</b> |
| <b>1.2 REQUERIMIENTOS .....</b>  | <b>- 13 -</b> |
| <b>1.3 BIODISPONIBILIDAD .....</b>   | <b>- 16 -</b> |
| <b>1.4 HOMEOSTASIS DEL HIERRO EN EL SER HUMANO, PROCESO ADME .....</b>       | <b>- 19 -</b> |
| <b>1.5 DÉFICIT DE HIERRO: ANEMIA FERROPÉNICA NUTRICIONAL .....</b>           | <b>- 22 -</b> |
| <b>1.5.1 CAUSAS .....</b>  | <b>- 23 -</b> |
| <b>1.5.2 CONSECUENCIAS.....</b>  | <b>- 24 -</b> |
| <b>1.5.3 TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO .....</b>                                   | <b>- 25 -</b> |
| <b>1.5.4 SUPLEMENTACIÓN Y FORTIFICACIÓN .....</b>                            | <b>- 26 -</b> |
| <b>1.6 OTROS TIPOS DE ANEMIAS .....</b>                                      | <b>- 27 -</b> |
| <b>2. <u>ÁCIDO FÓLICO</u> .....</b>  | <b>- 29 -</b> |
| <b>2.1 ABSORCIÓN Y DISTRIBUCIÓN .....</b>                                    | <b>- 31 -</b> |
| <b>2.2 METABOLISMO Y EXCRECIÓN .....</b>                                     | <b>- 32 -</b> |
| <b>2.3 INTERACCIÓN ENTRE EL ÁCIDO FÓLICO Y LA CIANOCOBALAMINA .....</b>      | <b>- 33 -</b> |
| <b>3. <u>RADICALES LIBRES Y MECANISMOS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE</u> .....</b> | <b>- 34 -</b> |

|  |               |
|--|---------------|
| <b>3.1 RADICALES LIBRES .....</b>  | <b>- 35 -</b> |
| <b>3.1.1 OXÍGENO MOLECULAR .....</b>   | <b>- 38 -</b> |
| <b>3.1.2 ANIÓN SUPERÓXIDO .....</b>  | <b>- 40 -</b> |
| <b>3.1.3 PERÓXIDO DE HIDRÓGENO .....</b>   | <b>- 42 -</b> |
| <b>3.1.4 HIDROXILO.....</b>  | <b>- 44 -</b> |
| <b>3.1.5 EFECTOS BENEFICIOSOS Y TOXICIDAD DE LOS RADICALES LIBRES<br/>SOBRE LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS.....</b> | <b>- 46 -</b> |
| <b>3.2 MECANISMOS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE .....</b>  | <b>- 52 -</b> |
| <b>3.2.1 SUPERÓXIDO DISMUTASA .....</b>  | <b>- 54 -</b> |
| <b>3.2.1.1 HOMEOSTASIS DEL COBRE EN EL SER HUMANO .....</b>  | <b>- 55 -</b> |
| <b>3.2.1.2 REQUERIMIENTOS .....</b>  | <b>- 56 -</b> |
| <b>3.2.1.3 METABOLISMO O BIODISPONIBILIDAD .....</b>   | <b>- 56 -</b> |
| <b>3.2.1.4 DÉFICIT .....</b>   | <b>- 58 -</b> |
| <b>3.2.1.5 SOBRECARGA .....</b>  | <b>- 59 -</b> |
| <b>3.2.1.6 HOMEOSTASIS DEL CINC EN EL SER HUMANO .....</b>   | <b>- 59 -</b> |
| <b>3.2.1.7 REQUERIMIENTOS .....</b>  | <b>- 60 -</b> |
| <b>3.2.1.8 METABOLISMO O BIODISPONIBILIDAD .....</b>   | <b>- 61 -</b> |
| <b>3.2.1.9 DÉFICIT .....</b>   | <b>- 62 -</b> |
| <b>3.2.1.10 SOBRECARGA .....</b>   | <b>- 63 -</b> |
| <b>3.2.2 CATALASA .....</b>  | <b>- 63 -</b> |
| <b>3.2.3 GLUTATION PEROXIDASA Y GLUTATION REDUCTASA .....</b>  | <b>- 64 -</b> |

|   |               |
|---|---------------|
| 3.2.4 OTRAS ENZIMAS .....                                       | - 65 -        |
| 3.2.5 GLUTATION .....   | - 65 -        |
| 3.2.6 VITAMINA E .....  | - 66 -        |
| 3.2.7 VITAMINA C .....  | - 67 -        |
| 3.2.8 CAROTENOIDES .....  | - 68 -        |
| 3.2.9 OLIGOELEMENTOS.....                                       | - 69 -        |
| 3.2.10 COENZIMA Q.....  | - 69 -        |
| 3.2.11 ÁCIDO A-LIPOICO .....                                    | - 70 -        |
| 3.2.12 OTRAS SUSTANCIAS .....                                   | - 70 -        |
| <b>4. <u>LECHE DE CABRA: BENEFICIOS PARA LA SALUD</u> .....</b> | <b>- 72 -</b> |
| 4.1 CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS .....                        | - 73 -        |
| 4.2 COMPOSICIÓN.....  | - 74 -        |
| 4.2.1 PORCIÓN PROTEÍNIC A .....                                 | - 75 -        |
| 4.2.2 PORCIÓN LIPÍDICA .....                                    | - 76 -        |
| 4.2.3 PORCIÓN GLUCÍDICA .....                                   | - 78 -        |
| 4.2.4 COMPOSICIÓN MINERAL .....                                 | - 78 -        |
| 4.2.5 COMPOSICIÓN VITAMÍNICA .....                              | - 80 -        |
| 4.2.6 FACTORES BIOACTIVOS .....                                 | - 81 -        |
| <b>5. <u>MARE MILK COMPOSITION: VARIATION FACTORS</u> .....</b> | <b>- 72 -</b> |
| 5.1 MARE MILK .....   | - 86 -        |
| 5.2 VARIATION FACTORS.....                                      | - 86 -        |

|  |               |
|--|---------------|
| <b>III. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>   | <b>- 93 -</b> |
| <b>1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN .....</b>  | <b>- 94 -</b> |
| <b>2. DISEÑO EXPERIMENTAL.....</b>   | <b>- 94 -</b> |
| <b>3. DIETAS ENSAYADAS .....</b>   | <b>- 96 -</b> |
| <b>4. MÉTODOS ANALÍTICOS .....</b>   | <b>- 99 -</b> |
| <b>4.1 MATERIA SECA .....</b>  | <b>- 99 -</b> |
| <b>4.2 MATERIA GRASA.....</b>  | <b>- 99 -</b> |
| <b>4.3 CONTENIDO PROTEICO .....</b>  | <b>- 99 -</b> |
| <b>4.4 MINERALIZACIÓN POR VÍA HÚMEDA .....</b>   | <b>- 99 -</b> |
| <b>4.5 DETERMINACIÓN DE HIERRO, COBRE Y ZINC .....</b>   | <b>- 99 -</b> |
| <b>4.6 DETERMINACIÓN DE ÁCIDO FÓLICO.....</b>  | <b>- 99 -</b> |
| <b>4.7 RECuento DE HEMATÍES, HEMOGLOBINA, HEMATOCRITO, VOLUMEN<br/>CORPUSCULAR MEDIO Y PLAQUETAS .....</b>         | <b>- 99 -</b> |
| <b>4.8 HIERRO SÉRICO, CAPACIDAD TOTAL DE UNIÓN AL HIERRO Y<br/>SATURACIÓN DE TRANSFERRINA .....</b>                | <b>- 99 -</b> |
| <b>4.9 FERRITINA SÉRICA .....</b>  | <b>- 99 -</b> |
| <b>4.10 TRANSAMINASAS .....</b>  | <b>- 99 -</b> |
| <b>4.11 CREATININA.....</b>  | <b>- 99 -</b> |
| <b>4.12 CREATINA KINASA .....</b>  | <b>- 99 -</b> |
| <b>4.13 OBTENCIÓN DE CITOSOL ERITROCITARIO, HEPÁTICO, CEREBRAL Y<br/>DETERMINACIÓN DE CONTENIDO PROTEICO .....</b> | <b>- 99 -</b> |

|  |                |
|--|----------------|
| <b>4.14 DAÑO OXIDATIVO DE LÍPIDOS .....</b>            | <b>- 99 -</b>  |
| <b>4.15 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ANTIOXIDANTE .....</b>    | <b>- 99 -</b>  |
| <b>5. ÍNDICES BIOLÓGICOS.....</b>                      | <b>- 107 -</b> |
| <b>6. CONTROL DE CALIDAD .....</b>                     | <b>- 107 -</b> |
| <b>7. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO.....</b>                 | <b>- 107 -</b> |
| <br>   |                |
| <b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>                | <b>- 110 -</b> |
| <br>   |                |
| <b>1. PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS .....</b>               | <b>- 111 -</b> |
| <b>2. DAÑO OXIDATIVO .....</b>                         | <b>- 115 -</b> |
| <b>3. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ANTIOXIDANTE .....</b>      | <b>- 115 -</b> |
| <b>4. UTILIZACIÓN NUTRITIVA DE COBRE Y ZINC .....</b>  | <b>- 115 -</b> |
| <b>5. DISCUSIÓN .....</b>                              | <b>- 124 -</b> |
| <b>5.1 PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS.....</b>               | <b>- 124 -</b> |
| <b>5.2 DAÑO OXIDATIVO.....</b>                         | <b>- 124 -</b> |
| <b>5.3 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ANTIOXIDANTE .....</b>     | <b>- 127 -</b> |
| <b>5.4 UTILIZACIÓN NUTRITIVA DE COBRE Y ZINC .....</b> | <b>- 127 -</b> |
| <br>   |                |
| <b>V. CONCLUSIONES .....</b>                           | <b>- 133 -</b> |
| <br>   |                |
| <b>VI. BIBLIOGRAFÍA .....</b>                          | <b>- 140 -</b> |



# **I. OBJETO**

## Objeto

Se estima que en nuestro medio, el consumo de leche entera constituye alrededor del 17% de la grasa total que consume una persona al día, por lo que la leche y sus derivados son una importante fuente de grasa en la dieta. Sin embargo, su consumo ha descendido considerablemente en la última década debido a la preocupación por una dieta con bajo contenido graso y un perfil lipídico apropiado. Además, ha sido en los últimos años cuando se ha producido una demanda masiva de alimentos enriquecidos (vitaminas, minerales, fibra, ácidos grasos, etc), los cuales han empezado a formar parte de la dieta habitual. Esta tendencia es la expresión de la inquietud que se va generando en torno a la alimentación como fuente de salud.

Por otra parte, el hierro es un nutriente esencial para la vida, aunque en cantidades elevadas resulta tóxico para la célula. Cuando la ingesta de hierro es insuficiente para satisfacer las demandas del organismo se produce anemia ferropénica, que constituye un importante problema de Salud Pública; mientras que, cuando la ingesta es muy elevada, como puede ocurrir con el tratamiento de la repleción crónica con Fe, se produce sobrecarga. El hierro tiene la capacidad de ceder o donar electrones fácilmente y puede catalizar reacciones que dan lugar a la producción de especies radicalarias altamente perjudiciales para el metabolismo celular.

En este sentido, el daño proteico, al material genético y la peroxidación lipídica son consecuencias directas de la acción de los radicales libres en el organismo. La dieta puede contener diferentes antioxidantes naturales que contribuyen al refuerzo de las defensas naturales del organismo.

## Objeto

La principal defensa contra estos radicales libres es llevada a cabo por un sistema enzimático. Estas enzimas poseen minerales que actúan como cofactores y por tanto son fundamentales para su actividad catalítica. En ausencia de estrés oxidativo, las especies reactivas del oxígeno que se generan se mantienen a niveles muy bajos gracias a la acción coordinada de estas enzimas que neutralizan y eliminan estos radicales perjudiciales.

Estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación en animales de experimentación han puesto de manifiesto el efecto beneficioso de la leche de cabra, respecto a la de vaca, sobre la utilización nutritiva de proteína, grasa y minerales en situación normal y patologías tales como síndrome de malabsorción o anemia ferropénica y más recientemente en estrés oxidativo y sobrecarga de hierro. Sin embargo, la leche de cabra es deficitaria en ácido fólico, una vitamina hidrosoluble esencial en la diferenciación y crecimiento celular, regulación del proceso apoptótico, síntesis y reparación del ADN, además de poseer actividad antioxidante *per se* dado su papel como *scavenger* de radicales libres.

Por tanto, teniendo en cuenta estos antecedentes, el objeto de esta memoria de Tesis es estudiar en ratas controles y con anemia ferropénica nutricional inducida experimentalmente, el efecto del consumo de dietas basadas en leche de cabra (en comparación con la de vaca) con contenido normal o sobrecarga de hierro y suplementadas o no en ácido fólico, sobre los parámetros hematológicos, parámetros bioquímicos relacionados con el metabolismo hepático (como tejido clave en la detoxificación de xenobióticos), procesos de peroxidación lipídica y mecanismos de defensa enzimática antioxidante en plasma, citosol hepático, eritrocitario y cerebral.



## **II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS**

## **1. EL HIERRO**

El hierro (Fe) es un metal de transición, abundante en la naturaleza y con múltiples acciones celulares. Por una parte, el Fe opera en estado reducido, ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ); mientras que por otra parte se transporta y almacena en estado oxidado, férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ).

El Fe participa en un conjunto de reacciones bioquímicas de gran importancia para la vida, como las que intervienen y controlan el flujo de electrones, rutas bioenergéticas, síntesis de ADN y aporte de oxígeno a los tejidos. También es indispensable en la proliferación y el crecimiento celular, y además es un elemento de vital importancia en la respuesta inmunológica frente a patógenos y microorganismos perjudiciales.

Fisiológicamente, el Fe se halla unido a proteínas, ya que en estado libre tiene la habilidad de generar radicales libres que pueden causar daño a los lípidos de membrana y proteínas celulares, así como al propio ADN. Su absorción, concentración y estado redox están cuidadosamente regulados (Cappa y Marti, 2009).

### **1.1 Funciones**

El Fe es un elemento clave en la regulación homeostática del organismo debido fundamentalmente a su capacidad de participar en procesos de reducción/oxidación (Beard, 2001). Se trata de un elemento esencial para la vida, pero puede presentar una gran toxicidad además de que es una bomba osmótica, basta con una dosis de 1-2 gramos de Fe para provocar la muerte.

Aun así, el Fe participa en numerosos procesos relevantes (Hijano Fernández, 2010):

## Antecedentes bibliográficos

- Transporte y almacenamiento de oxígeno en los tejidos: el Fe forma parte de los centros activos de la hemoglobina (grupo hemo) y la mioglobina. La hemoglobina capta el oxígeno rápidamente al pasar la sangre por los pulmones para después distribuirlo por los diferentes tejidos, mientras que la mioglobina es la encargada de regular el aporte del oxígeno necesario para el músculo (Beard, 2001).
- Sensibilización al oxígeno: cuando se presenta un déficit del aporte de oxígeno tiene lugar una respuesta fisiológica compensatoria (aumento de células rojas o angiogénesis), que requiere de la participación de varios factores como puede ser la prolil-hidroxilasa, enzima ferro-dependiente (Ivan y col., 2001; Jaakkola y col., 2001).
- Metabolismo energético y detoxificación del organismo: el Fe forma parte de numerosas enzimas del ciclo de Krebs además de funcionar como transportador de electrones en los citocromos de la cadena respiratoria mitocondrial, interviniendo en la respiración celular. Más concretamente, el Fe forma parte del citocromo P-450 hepático, máximo responsable de la eliminación de numerosos compuestos xenobióticos (Beard, 2001).
- Enzimas antioxidantes y del sistema nervioso: como trataremos más adelante, este elemento es esencial para el buen funcionamiento de numerosas enzimas antioxidantes (como la catalasa, las peroxidasas, la mieloperoxidasa o las oxigenasas). Además, participa en la producción de algunos neurotransmisores (al estar relacionado con la enzima monoaminoxidasa, MAO) y en otras funciones encefálicas. De hecho, se ha comprobado la importancia a nivel neuronal de un buen aporte de Fe, sobre todo en la etapa de crecimiento (Hallterman y col., 2001).
- Síntesis de ADN: la ‘ribonucleótido reductasa’ es una enzima dependiente de Fe requerida para la síntesis de ADN y para la división celular (Beard, 2001).

## 1.2 Requerimientos

El Fe se encuentra en numerosos alimentos: carnes rojas, hígado, bazo, sardinas, yema de huevo, leguminosas secas, espinacas, avena, cebada o frutos secos.

## Antecedentes bibliográficos

Los requerimientos van a depender de las necesidades fisiológicas en cada etapa de la vida por lo que encontraremos grandes diferencias entre los diversos grupos poblacionales (Food and Nutrition Board, 2004).

| <b>ETAPA</b>             | <b>EDAD</b>      | <b>HOMBRE (mg/d)</b> | <b>MUJER (mg/d)</b> |
|--------------------------|------------------|----------------------|---------------------|
| <b>Lactantes</b>         | 0-6 meses        | 0,27                 | 0,27                |
| <b>Lactantes</b>         | 7-12 meses       | 11                   | 11                  |
| <b>Niños</b>             | 1-3 años         | 7                    | 7                   |
| <b>Niños</b>             | 4-8 años         | 10                   | 10                  |
| <b>Niños</b>             | 9-13 años        | 8                    | 8                   |
| <b>Adolescentes</b>      | 14-18 años       | 11                   | 15                  |
| <b>Adultos</b>           | 19-50 años       | 8                    | 18                  |
| <b>Adultos</b>           | Más de 51 años   | 8                    | 8                   |
| <b>Embarazo</b>          | Todas las edades | -                    | 27                  |
| <b>Lactancia materna</b> | 18 años o menos  | -                    | 10                  |
| <b>Lactancia materna</b> | Más de 19        | -                    | 9                   |

**Tabla 1.** Ingestas Diarias Recomendadas de Fe (modificado de Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, 2004).

Es a partir del 4º mes de vida cuando empiezan a aumentar realmente las necesidades de Fe ya que las reservas se agotan rápidamente debido al periodo de crecimiento (Moreiras y col., 2013). Durante la infancia, sin embargo, los requerimientos disminuyen si bien es importante prestar mucha atención puesto que es durante esta etapa cuando se fijan los hábitos nutricionales (Lonnerdal y Dewey, 1995).

Más tarde, durante la adolescencia, las demandas vuelven a aumentar debido al rápido crecimiento propio de esta edad. Estas demandas están a su vez aumentadas en

## Antecedentes bibliográficos

las chicas por las pérdidas menstruales que se empiezan a dar (Lonnerdal y Dewey, 1995).

En las mujeres fértiles adultas, tales demandas continúan aumentadas por la misma razón aunque, como es de esperar, con la menopausia los requerimientos disminuyen hasta equipararse a los del hombre adulto (Moreiras y col., 2013).

No obstante, es en embarazadas donde los requerimientos de Fe están aumentados al máximo en razón del aumento de las demandas por las exigencias propias de los nuevos compartimentos fetal y placentario (WHO/FAO, 2004). De hecho, según la OMS/WHO, la definición de 'estado anémico' en el embarazo es cuando existe una concentración sanguínea de hemoglobina inferior a 110, y no a 120 g/L que es el valor propio de la mujer no embarazada. Esta diferencia es debida a la desproporción entre los aumentos de la volemia y la masa eritrocitaria de la embarazada en razón de una hemodilución de la hemoglobina en el primer y segundo trimestres de gestación. A partir del tercer trimestre la demanda de hierro por parte del feto conlleva un flujo a través de la barrera placentaria que tiene lugar a expensas de las reservas férricas de la madre. En consecuencia, esto conlleva a la madre llegar en numerosas ocasiones a una situación límite de ferropenia o déficit de hierro en sus reservas en beneficio del feto (Pérez Surribas, 2005).

Es por ello que sería importante en esta etapa considerar la posibilidad de suplementación de este elemento. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el Fe puede llegar a tener un rol pro-oxidante, por lo que la elección del tipo de suplemento resulta esencial. Se ha observado por ejemplo que el  $\text{FeSO}_4$  y, sobre todo el NaFeEDTA, además de mejorar considerablemente el estado anémico de la madre disminuye también el estrés oxidativo que se da en el embarazo (Xiu X Han y col., 2011).

Asimismo, la suplementación cobra especial importancia en el neonato. Algunos estudios han puesto de relieve que el aporte adecuado de Fe puede incluso mejorar el peso del recién nacido en comparación con el de la embarazada en situación de anemia que no toma suplementos. Tan importante es igualmente en la prevención de la anemia la suplementación con ácido fólico (Paesano y col., 2012; Peña-Rosas y col., 2012). En

## Antecedentes bibliográficos

estos dos últimos estudios se evaluó también el efecto de la malaria en la situación anémica de las mujeres embarazadas que padecen esta enfermedad.

### 1.3 Biodisponibilidad

El Fe es el único micronutriente cuya biodisponibilidad se puede determinar directamente. Además, se pueden utilizar indistintamente los términos ‘biodisponibilidad’ y ‘absorción’, ya que no existe una vía de excreción específica del Fe (Fairweather-Tait, 2001a). La absorción del Fe va a estar condicionada por multitud de factores entre los que cabe destacar esencialmente y a grosso modo el estado fisiológico (si las demandas de Fe están aumentadas o no) y las características nutricionales en las que se encuentra ese Fe que va a ser asimilado.

Por ejemplo, su absorción va a estar aumentada en caso de deficiencia del metal, anemia o de hipoxia, mientras que durante procesos infecciosos o inflamatorios estaría reducida. Por otra parte, si los depósitos corporales de Fe están bajos su absorción será mayor pudiendo variar entre el 20-30% que absorbería un sujeto con anemia ferropénica, y el 5-10% del total ingerido que absorbería un individuo sin anemia (Zlotkin, 2001; Conrad y Umbreit, 2002).

Como hemos mencionado anteriormente, también es importante el ‘estado nutricional’ en que se encuentra este Fe, de modo que, en la dieta, se puede encontrar en forma de Fe hemo (carnes rojas y magras) y de Fe no hemo o inorgánico (minerales, vegetales y ciertos alimentos de procedencia animal como leche y huevos), (Fairweather-Tait, 2001b; Swain y col., 2007). El Fe hemo se encuentra formando parte de la hemoglobina, mioglobina y de diversas enzimas, mientras que el Fe no hemo forma parte de numerosas enzimas relacionadas con el metabolismo oxidativo (metaloproteínas, aconitasas, fosfoenolpiruvato carboxikinasa, etc.). De forma general, el Fe hemínico se absorbe mejor que el no hemo.

La absorción del Fe hemo no está afectada por los componentes de la dieta, salvo por el excesivo cocinado del alimento y por el Ca, aunque con éste último no siempre ocurre (Grinder-Pedersen y col., 2004; Roughead y col., 2005), que

## Antecedentes bibliográficos

disminuyen su absorción; y por las proteínas de origen animal que aumentan su absorción al evitar la degradación del anillo de protoporfirina en el lumen gástrico y participar en el mecanismo de captación del grupo hemo por el enterocito (Alfárez y col., 2012).

Sin embargo, la biodisponibilidad del Fe no hemo puede variar entre un 1-20%, dependiendo de muchos factores estimuladores o potenciadores de su absorción (Lynch, 1997; Sandstrom, 2001; Miret y col., 2003; Alfárez y col., 2012):

### Potenciadores de la absorción del Fe no hemo

- Vitamina C (ácido ascórbico) y otros ácidos orgánicos; tales como cítrico, málico, láctico o acético (vinagre): su funcionalidad radica en la capacidad de éstos de reducir el  $Fe^{3+}$  (estado férrico, insoluble a  $pH > 3$  como ocurre en el pH alcalino del intestino) a  $Fe^{2+}$  (estado ferroso), lo que hace más fácil su absorción en el lumen duodenal (Teucher y col., 2004).

- Vitamina A: el mecanismo que influye en el aumento de la biodisponibilidad del Fe no está claro pero se ha comprobado que esta vitamina es necesaria para la movilización de las reservas de Fe, su reutilización en la hematopoyesis, o el mantenimiento de una adecuada solubilidad para su absorción (Gaitán y col., 2006).

- ‘Factor carne’: fue a finales de los 60 cuando se comprueba que el consumo de carne, aparte de contener Fe hemínico, favorece la absorción de Fe no hemo (Layrisse y col., 1967). Este hecho se relaciona con el contenido de aminoácidos ricos en histidinas y en enlaces sulfhidrilos (como la cisteína) de la proteína animal, los cuales promueven la reducción a  $Fe^{2+}$  (Mulvihill y col., 1998; Baech y col., 2003). Sin embargo, todo esto no ocurre con la proteína animal contenida en la clara de huevo (por efecto de la coalbúmina, proteína quelante del Fe) o en la leche (por efecto de la caseína, que oxida el  $Fe^{2+}$ ), (Hurrell y col., 1988; Emery, 1992; Gaitán y col., 2006).

Según varios estudios, la dieta que tiene una proporción 80/20 Fe inorgánico-Fe hemo reporta una serie de beneficios sustanciales comparándola con la que sólo contiene una proporción 50/50: ganancia de peso, mejor utilización digestiva del Fe, eficacia en la

## Antecedentes bibliográficos

regeneración de Hb, recuperación de la desmineralización ósea, o recuperación del metabolismo fosfocálcico y del magnesio (Lisbona y col., 1999).

### Inhibidores de la absorción del Fe no hemo

- Fitatos (ácido fítico): presentes en granos enteros, legumbres, arroz o soja. El efecto inhibitorio se da al unirse este compuesto con varios metales en el intestino, disminuyendo su absorción (Agte y col., 2005).

- Oxalatos (ácido oxálico): en espinacas, acelgas, fresas, chocolate o té. Al igual que los compuestos anteriores, son capaces de formar complejos quelantes que inhiben la absorción del Fe.

- Taninos (polifenoles): se encuentran en el café, té, ciertas especias (orégano) y en varias frutas y verduras. Una vez más, estos compuestos se unen al Fe formando un complejo insoluble.

- Minerales (Cu, Zn y Ca, Mn): intervienen en la absorción del Fe al competir por los mismos transportadores de membrana, al modificar su estado de oxidación o al interferir en su metabolismo (Sandstrom, 2001).

El más curioso de estos casos es el del Cu puesto que, si bien es reconocido como factor antianémico en las anemias ferropénicas, la deficiencia de Cu afecta la biodisponibilidad del Fe al ser la 'ceruloplasmina' una ferroxidasa Cu-dependiente implicada en la absorción y movilización de Fe (Sharp, 2004), además de que ambos metales utilizan el mismo transportador de membrana para su absorción (Arredondo y col., 2006).

Lo mismo ocurre con el Zn, ya que ambos metales compiten por el mismo transportador, aunque este efecto disminuye al ingerir una mezcla de alimentos (Arredondo, 2005). Este efecto se puede mejorar también con la ingesta de leche de cabra (Alfárez y col., 2006; Díaz-Castro y col., 2009).

## Antecedentes bibliográficos

En el caso del Ca, aunque no compite con el Fe por el transportador, ejerce una inhibición dosis-dependiente de su absorción (Gaitán y col., 2006). No obstante, en comidas completas este efecto se ve reducido (Grinder-Pedersen y col., 2004).

Por otro lado, una vez más, la leche de cabra ha demostrado reducir esta inhibición (López-Aliaga y col., 2000; Campos y col., 2007).

## 1.4 Homeostasis del hierro en el ser humano, proceso ADME

En un adulto, alrededor del 50% del contenido de Fe está unido a la hemoglobina de los hematíes, el 25% se encuentra en el hígado, mientras que el resto constituye la mioglobina y otras proteínas que contienen Fe.

### Absorción

Se absorbe aproximadamente sólo el 10-30% de la ingesta total de Fe, y esta absorción se da mayoritariamente en el duodeno y primeras porciones del yeyuno. Al pasar por el estómago, por acción del ácido clorhídrico el Fe pasa a su forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ), que es la que es capaz de atravesar la membrana de la mucosa intestinal. Sin embargo, el pH alcalino intestinal vuelve a transformar el Fe en su forma férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ ) no soluble, de ahí que generalmente haya una mayor absorción en las primeras porciones del intestino.

El Fe hemo es absorbido en su mayoría por los enterocitos gracias a un transportador de membrana específico (HPC1) cuyo mecanismo se desconoce, aunque también podría pasar por otros tipos de mecanismos, como por ejemplo atravesando las células intactas (Krishnamurthy y col., 2007). Una vez dentro del enterocito, el Fe es extraído del hemo gracias a la acción de la ‘hemooxigenasa-1’ (HO-1), pasando a formar parte de las reservas de ‘ferritina’ (Steinbicker y Muckenthaler, 2013); la cual, aparte de como reserva de Fe, tiene un papel citoprotector en otros tejidos (Pérez Surribas, 2005).

Por el contrario, el proceso de absorción del Fe no hemo es más complicado. En el lumen intestinal, el Fe en estado férrico es reducido al estado ferroso por una

## Antecedentes bibliográficos

‘reductasa férrica’ de membrana, CYBRD (o DCYTB). El incremento de la expresión de DCYTB en situación de ferodeficiencia resalta su importancia en la bomba apical de Fe (McKie y col., 2001). Es en este estado ferroso cuando el enterocito es capaz de absorber el Fe gracias al ‘transportador de metales divalentes’ (DMT1, DCT1 o NRAMP2).

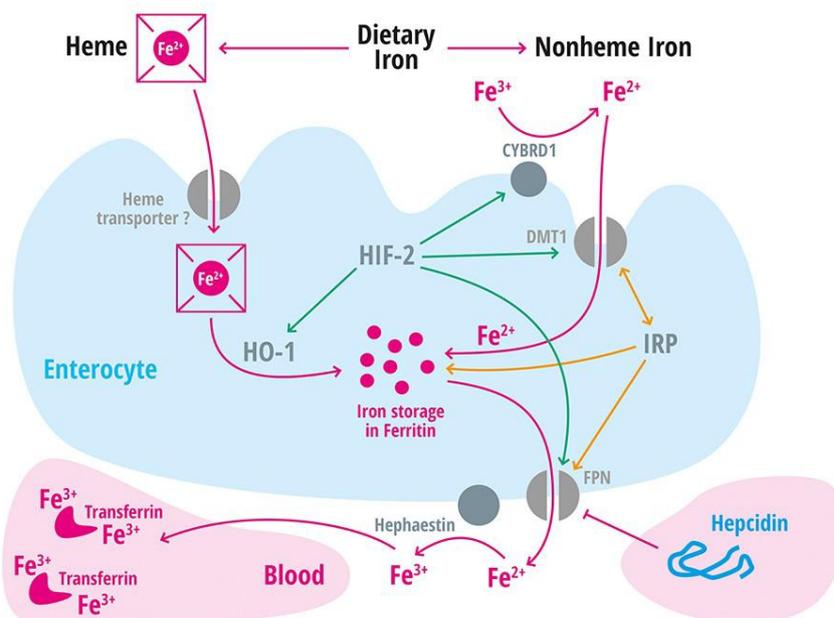
Aunque en poca cantidad, los iones férricos también pueden ser absorbidos a través de un tipo de integrina de membrana (Cappa y Marti, 2009).

## Distribución y Metabolismo

Una vez absorbido, el Fe puede ser almacenado en el citosol en forma de ferritina o exportado al plasma gracias a una proteína transportadora de la membrana basolateral, la ‘ferroportina’ (FPN o IREG1). La FPN se puede encontrar además en varios tejidos (Pérez Surribas, 2005). Para que este transporte sea efectivo es necesaria la actuación de la ‘hefastina’, una proteína Cu-dependiente, de ahí que la deficiencia de Cu acarree anemia ferropénica (Pérez Surribas, 2005); que interactúa con la FPN y que transforma el  $\text{Fe}^{2+}$  en  $\text{Fe}^{3+}$  para que pueda ser transportado en plasma. Además, la hefastina incorpora este  $\text{Fe}^{3+}$  en la ‘transferrina’, la cual está encargada de transportar el Fe a toda célula nucleada uniéndose al ‘receptor de transferrina’ (TfR). La transferrina protege a los sistemas orgánicos de los efectos tóxicos del Fe al limitar su capacidad de generación de radicales libres. Cuando no está unida a Fe se denomina ‘apotransferrina’.

La expresión de la FPN está controlada por la ‘hepcidina’, un péptido que es producido en el hígado cuando se da una sobrecarga de Fe en el organismo, inhibiendo su absorción intestinal (Anderson y col., 2009; Steinbicker y Muckenthaler, 2013).

## Antecedentes bibliográficos



**Figura 1.** Absorción y distribución del Fe (Steinbicker y Muckenthaler, 2013).

Según la información de captación de Fe por parte de la transferrina se modula la síntesis de todas las proteínas implicadas en su absorción y depósito.

Existen dos receptores de transferrina diferentes, el TfR1 que introduce el Fe en la mayoría de las células y tiene mayor afinidad por éste, y el TfR2, expresado en hígado. Una vez acoplada la transferrina a su receptor, con la ayuda de una bomba de hidrogeniones acoplada al DMT1 se provoca la acidificación necesaria para que se de el cambio de conformación del receptor que permite la liberación del Fe en el interior celular (Pérez Surribas, 2005).

Cuando en el hígado hay un exceso de almacenamiento de Fe, éste pasa a acumularse en una proteína parecida a la ferritina, la ‘hemossiderina’ (Vaghefi y col., 2005), la cual origina la aparición de radicales libres, aunque libera el Fe mucho más lentamente que la ferritina (Pérez Surribas, 2005).

Una fracción menos significativa de Fe se encuentra ligada a la albúmina, citrato u otra molécula de bajo peso molecular, constituyendo el llamado ‘Fe no ligado a transferrina’. Por otra parte, la intensidad de la eritropoyesis parece estar relacionada

## Antecedentes bibliográficos

con el ‘índice de saturación de la transferrina’ (IST), que cuando es menor al 16%, disminuye drásticamente (Cappa y Marti, 2009).

El Fe transportado alcanza la médula ósea (síntesis de hemoglobina, formación de hematíes y células del sistema retículo-endotelial, como macrófagos), el hígado o bazo (almacenamiento), y todas las células para la síntesis de enzimas que requieren Fe. La distribución del Fe queda así: 65-70% en hematíes y eritroblastos maduros (Hb), 25-30% en el SRE y precursores medulares, 5% en los músculos (mioglobina), 0’3-1% en el interior celular, y 0’1-0’2% en el plasma (Sánchez Peralta, 2012).

Al cabo de 120 días, los eritrocitos experimentan una alteración superficial que sirve como señal para ser fagocitados y digeridos por los macrófagos en bazo e hígado. Por ello, los niveles de Fe y la generación de daño oxidativo estarán también influenciados por este proceso. La eritropoyetina por su parte, reduce la captación de Fe de los macrófagos (Kong y col., 2008).

## Excreción

No tiene mucha importancia a nivel cuantitativo, pero cuando hay un exceso de Fe, el metal se elimina por descamación epitelial o de la mucosa intestinal, orina, bilis y sudor. No obstante, el Fe ni se agota ni se destruye en un cuerpo que funcione normalmente aunque en la mujer se da una eliminación superior, ya sea por la menstruación, o por la lactancia (Food and Nutrition Board, 2004).

## **1.5 Déficit de hierro: anemia ferropénica nutricional**

Según la OMS/WHO, la anemia se define como un nivel de hemoglobina inferior a 130 g/L en hombres y menos de 120 g/L en mujeres mayores de 15 años (Ania y col., 1997; Steinbicker y Muckenthaler, 2013). Se trata de la más común de las deficiencias de nutrientes en el mundo (incluyendo los países industrializados) y es un indicador de una nutrición inadecuada y un estado de salud deficiente. Tiene una alta prevalencia especialmente en niños y mujeres en edad de gestación (Stephenson y col., 2000; Grantham-McGregor y Ani, 2001; Haas y Brownlie, 2001; Pérez Surribas, 2005).

## Antecedentes bibliográficos

La anemia por deficiencia de Fe o anemia ferropénica nutricional (AFN) constituye la segunda carencia nutricional más extendida por el mundo después de la desnutrición proteico-calórica, y se caracteriza por la reducción o ausencia de depósitos de Fe, bajos niveles de Fe sérico y Hb, reducción del hematocrito y niveles de plaquetas incrementados (Campos y col., 1998), bajo porcentaje de saturación de transferrina, disminución de ferritina sérica y un drástico incremento en la capacidad total de fijación al Fe (total iron binding capacity, TIBC).

### 1.5.1 Causas

En muchas ocasiones, la AFN se debe a desórdenes en la síntesis de FPN, hefastina, hepcidina, ceruloplasmina, transferrina o TfRs; aunque también puede deberse a factores externos como la baja biodisponibilidad del Fe de los cereales en dietas vegetarianas o en países pobres (Paesano y col., 2012). Más aún, pueden darse mutaciones en el DMT1 que originen anemia (Theil, 2011).

No obstante, en general se distinguen dos causas principales de ferropenia (Pérez Surribas, 2005): por una absorción inadecuada de Fe (dieta con Fe de biodisponibilidad baja, tratamiento prolongado con antiácidos o pH gástrico elevado, exceso de fibra o almidón, competencia con otros metales, pérdida o disfunción de enterocitos, resección del intestino, enfermedad celíaca o enfermedad intestinal inflamatoria); o por una pérdida aumentada de Fe (enfermedades gastrointestinales, pérdidas genitourinarias y pulmonares de sangre, traumas o grandes malformaciones vasculares).

Inicialmente, los depósitos corporales de Fe, la ferritina y la hemosiderina decrecen mientras que el hematocrito y la hemoglobina permanecen normales. Después de esto, cuando las reservas ya no pueden hacer frente a las necesidades, disminuyen los niveles de Fe sérico y enzimas Fe-dependientes, para luego aumentar la capacidad de fijación de Fe y reducirse el porcentaje de saturación de la transferrina. Consecuentemente, hay una rápida reducción de las células rojas en la circulación (este estado se conoce como ‘deficiencia de Fe sin anemia’ o ‘deficiencia eritropoyética’).

## Antecedentes bibliográficos

Posteriormente se da un estado más avanzado de hiposiderosis, caracterizado por baja concentración de hemoglobina y descenso de hematocrito, con cambios en la citología y morfología del eritrocito que dan lugar a hematíes microcíticos e hipocrómicos, además de una disfunción del transporte de oxígeno (Hercberg y Galan, 1992; Pérez Surribas, 2005).

### 1.5.2 Consecuencias

La hemoglobina en los eritrocitos es necesaria para movilizar el oxígeno por lo que muchos de los signos y síntomas de la anemia resultan de una reducción en la capacidad de la sangre para el transporte de oxígeno. La enfermedad puede manifestarse de varias formas: con una importante depleción de Fe, incluso con anemia moderada en una persona asintomática; con signos iniciales atribuibles a un proceso oculto; o con molestias inespecíficas atribuibles a la anemia tales como fatiga, disminución de la capacidad para efectuar ejercicio, debilidad, hiperventilación, disnea, palpitaciones, irritabilidad y cefalalgia (Branda, 2000). La esplenomegalia es debida al incremento en el proceso de destrucción de los glóbulos rojos por disminución de la supervivencia eritrocitaria y aumento de la captación de Cr por el bazo (Lee, 1993).

Los niños de hasta 6 meses tienen reservas de Fe. Los menores de 4 años con anemia ferropénica de larga duración experimentan cambios en el esqueleto muy semejantes a los observados en la anemia hemolítica debido a la expansión de la medula ósea, pudiendo observarse disminución del espesor de los huesos planos y aumento de tejido esponjoso; se pueden presentar asimismo dolores neurálgicos, trastornos vasomotores y sensación de frío; por otra parte se puede afectar también el funcionamiento en aquellos tejidos de bajo recambio celular, por lo que estos niños pueden presentar estados apáticos o de irritabilidad, así como trastornos para el aprendizaje (Oski, 1993).

En adultos, la deficiencia de Fe disminuye la capacidad muscular para el trabajo ya que la disfunción de las enzimas oxidativas (especialmente la  $\alpha$ -glicerolfosfatasa) impide la producción de energía celular, aumenta la cantidad de ácido láctico y acelera la fatiga muscular. Cabe remarcar que esto ocurre cuando hay hipoxia. Además, los

## Antecedentes bibliográficos

pacientes con deficiencia de Fe presentan una mayor susceptibilidad a la aparición de infecciones. Es característica igualmente la eliminación de catecolaminas por la orina, algo que está relacionado con alteraciones en la termorregulación: se cree que durante este proceso el sujeto pierde calor y como consecuencia de ello se aumenta el consumo de oxígeno y los niveles de norepinefrina en plasma (Hillman y Ault, 1995). También se produce palidez cutánea y de las mucosas debido a la vasoconstricción que tiene lugar y a que la sangre sólo va a los órganos principales, además de alteraciones en las uñas y el cabello.

En el 75% de los casos de anemia ferropénica se presentan diversos grados de gastritis, acompañadas de disminución de la secreción gástrica. Además se ha observado en los niños, no en adultos, la aparición del síndrome de malabsorción intestinal (Oski, 1993).

Nacimientos prematuros, bajo peso al nacer, mayor susceptibilidad a infecciones, mayor riesgo de muerte, o desajuste en el desarrollo físico y psicológico (Stoltzfus, 2001); pueden ser consecuencia de la AFN en recién nacidos y niños (Paesano y col., 2012).

### 1.5.3 Técnicas de diagnóstico

No existe un método de referencia claro y absoluto para detectar la ferropenia. No obstante, existen diversos métodos en laboratorio de identificación de la ferrodeficiencia; screening de niveles de Fe en eritropoyesis y evaluación del estatus de Fe en los tejidos. Los tests incluyen porcentaje de eritrocitos hipocrómicos, contenido de Hb en reticulocitos y síntesis de receptores de transferrina (TfRs) (Beutler y col., 2003).

También tiene especial importancia el diagnóstico de la evaluación de las reservas férricas: el examen microscópico del aspirado medular, la susceptibilidad magnética (reservas hepáticas), la respuesta al tratamiento con Fe, el contenido hemoglobínico de los reticulocitos o la proporción de eritrocitos hipocrómicos (Pérez Surribas, 2005).

#### 1.5.4 Suplementación y fortificación

Principalmente, tres son las estrategias para corregir la ferropdeficiencia en la población:

- Educación en buenas prácticas dietarias, combinando la modificación y diversificación de la dieta mejorando su asimilación y biodisponibilidad.

-Suplementación con Fe; más concretamente en pacientes de alto riesgo (Baltussen y col., 2004; Siega-Riz y col., 2006; Xiu X Han y col., 2011; Peña-Rosas y col., 2012). Se da usualmente en grandes dosis farmacológicas, independientemente de la ingesta alimentaria, aunque por estudios en población se ha comprobado que es mejor la suplementación intermitente y no diaria con Fe (Cavalli-Sforza y col., 2005).

-Fortificación con Fe en los alimentos; aunque es más difícil que con otros minerales, cobra especial relevancia en los países subdesarrollados (WHO/FAO, 2006; Paesano y col., 2012); especialmente para los niños (Eichler y col., 2012).

El suplemento de Fe oral, sobre todo en forma de sal ferrosa, es el tratamiento de elección en la ferropdeficiencia. La mayor dificultad que presenta este método, es que puede causar náuseas y molestias epigástricas a corto plazo. Estos síntomas varían según la concentración de Fe ionizable en la parte alta del tracto gastrointestinal y puede ser reducida si se acompaña de la ingesta de alimentos o se fracciona (Cook, 2005; Cavalli-Sforza y col., 2005). Aunque los valores de Hb empiezan a recuperarse en 4 días, la duración del tratamiento es de varios meses con objeto de reponer las reservas corporales. Otro de los métodos utilizados en la industria alimentaria para prevenir la ferropdeficiencia en la actualidad es la adición de ‘fitasas’ (capaces de degradar los fitatos), o la manipulación genética de algunas plantas con el fin de reducir los niveles de éstos (Gibson y col., 2003).

El polen y el propoleo también tienen efectos beneficiosos en la recuperación de la anemia: ganancia de peso, mejor utilización digestiva del Fe, eficacia en la

## Antecedentes bibliográficos

regeneración de Hb, o recuperación del metabolismo fosfocálcico y del magnesio (Haro y col., 2000).

Como alternativa queda la administración intravenosa de Fe, debido a su mayor biodisponibilidad, aunque sería crucial controlar sus niveles para evitar episodios tóxicos. Especial cuidado hay que tener también en pacientes con infecciones (Steinbicker y Muckenthaler, 2013).

## 1.6 Otros tipos de anemias

Aparte de la AFN, existen otros tipos de anemias originadas por distintos factores (Sánchez Peralta, 2012), entre las que destacamos:

- Anemia por enfermedades crónicas: todas ellas tienen un componente inflamatorio, por lo que si se trata la enfermedad que provoca dicha inflamación, mejoran los síntomas. Son de escasa severidad y requieren de terapia raramente. Cursan con enfermedades como la artritis reumatoide o el linfoma de Hodgkin.
- Anemia por hemólisis: debida a la destrucción y rotura de glóbulos rojos, con un aumento del catabolismo de la hemoglobina y de la bilirrubinemia indirecta. Existen multitud de causas que dan origen a este tipo de anemia (hereditarias, enzimáticas, fármacos o virus, entre otras).
- Anemia por hemorragia aguda: se suelen dar lugar por algún tipo de accidente aunque existen otras causas como lesiones digestivas o rotura de una variz.
- Anemia mediterránea o beta-talasemia: se da por una mutación en la cadena beta de la hemoglobina. Ocurre en sociedades endogámicas de las costas mediterráneas y sólo basta con que uno de los progenitores sea portador para que ocurra. Los afectados requieren continuas transfusiones y no suelen alcanzar muchos años de vida.
- Anemia sideroblástica: existen varios tipos que tienen en común la deficiencia en la producción del grupo hemo en los precursores eritroides de la médula ósea, lo que cursa

## Antecedentes bibliográficos

con un depósito de Fe en forma de anillo en los sideroblastos de la médula ósea. Tiene distintas causas, ya sean genéticas o externas (como el abuso de alcohol, déficit de Cu o determinados fármacos), en estos últimos casos, de carácter reversible, por lo que si se retira el agente inductor mejoran los síntomas. No obstante, hay daño orgánico por sobrecarga de Fe. El tratamiento de elección es la piridoxina (vitamina B<sub>6</sub>). En el caso de déficit de Cu, el Fe no se libera de la ceruloplasmina, con lo que disminuye los niveles de éste en suero y hemoglobina a pesar de que las reservas de Fe sean normales.

- Anemia megaloblástica: se da por falta de ácido fólico (vitamina B<sub>9</sub>, que se suele encontrar en alimentos vegetales) y de cianocobalamina (vitamina B<sub>12</sub>, que sólo se encuentra en alimentos de origen animal); coenzimas esenciales para la replicación del ADN, lo que provoca que las células se queden grandes e inmaduras (Lucock, 2000).

Anemia por carencia de vitamina B<sub>12</sub> (anemia perniciosa): esta carencia es secundaria a la falta de '*factor intrínseco*', proteína del jugo gástrico necesaria para su absorción. Es muy típica de vegetarianos estrictos cuya dieta no contiene dicha vitamina. Para su tratamiento conviene una dieta rica en proteínas e ingerir carne (de ternera y cerdo sobre todo), huevos o productos lácteos. El uso de antiácidos a largo plazo podría aumentar su déficit (Lam y col., 2013).

Anemia por carencia de ácido fólico: existen diversas causas como pueden ser el alcoholismo crónico, el uso de anticonceptivos orales y de anticonvulsivos, el embarazo, la pérdida significativa de peso o el aumento de los requerimientos por el crecimiento. A la hora de tratarla existen numerosos preparados farmacéuticos aunque se puede evitar con la ingesta de al menos una pieza/zumo de frutas de forma diaria.

## Antecedentes bibliográficos

| Tipo de anemia                         | Tamaño celular (VCM)                        | Pigmentación (HCM) (CHCM)        | Reticulocitos | Fe  | Bilirrubina | Ferritina | Índice sat transferrina | TIBC | Transferrina | Receptor sol. transferrina |
|--|---|----------------------------------|---------------|-----|-------------|-----------|-------------------------|------|--------------|----------------------------|
| Ferropénica                            | ↓<br>microcítica (heterogénea)              | ↓<br>hipocrómica                 | ↓             | ↓   | =           | ↓         | ↓                       | ↑    | ↑            | ↑                          |
| Enf. crónica                           | =↓<br>normocítica o microcítica (homogénea) | =↓<br>normocromica o hipocrómica | =↓            | =↓  | =           | =↑        | =↓                      | =↓   | =↓           | =↓                         |
| ↓ Ác Fólico<br>↓ Vit. B12 (perniciosa) | ↑=<br>macrocítica (heterogénea)             | =<br>normocromica                | ↓             | =↓↑ | =↑          | ↑         | ↑                       | ↓    | =            | =↑                         |
| Hemolítica                             | =<br>normocítica (heterogénea)              | =<br>normocromica                | ↑             | =↓  | ↑           | ↑         | ↑                       | ↓    | ↑            | =↑                         |
| Hemorrágica aguda                      | =<br>normocítica (homogénea)                | =<br>normocromica                | =             | ↓   | =           | ↓         | ↓                       | ↑    | ↑            | -                          |
| Hemorrágica crónica                    | ↓<br>microcítica                            | ↓<br>hipocrómica                 | =↓            | ↓   | =           | ↓         | ↓                       | ↑    | ↑            | -                          |
| Talasemia (mediterránea)               | ↓↓<br>microcítica (homogénea)               | ↓<br>hipocrómica                 | ↑             | =↑  | ↑           | =↑        | =                       | =    | =            | =↑                         |
| Sideroblástica                         | ↓<br>microcítica (homogénea)                | ↓<br>hipocrómica                 | =↑            | =↑  | =           | =↑        | =↑                      | =    | =            | =↓                         |

**Tabla 2.** Tipos de anemia y características (Sánchez Peralta, 2012).

## 2. ÁCIDO FÓLICO

El ácido fólico es la forma más activa y estable de los folatos (vitamina B<sub>9</sub>), de hecho su biodisponibilidad es prácticamente el doble. Se trata de una molécula esencial que no puede ser sintetizada por las células de los mamíferos. Su principal función es la de aceptor y donante de unidades monocarbonadas, fundamentalmente de grupos metilo; algo esencial en la síntesis de algunos aminoácidos (como la metionina), nucleótidos, bases púricas y pirimidínicas, ADN y ARN. También tiene un papel muy importante en procesos de oxidación ya que influye en la actividad de la ‘óxido-nítrico sintetasa endotelial’ (eNOS) al aumentar la producción de óxido nítrico en situaciones de estrés oxidativo, lo que previene la aterogénesis. No obstante, el más conocido de sus beneficios es el papel que juega en la prevención de defectos del tubo neural en recién nacidos, como la espina bífida debida al desarrollo incompleto del SNC.

Además, cuando la ingesta de folatos es insuficiente, se incrementa el riesgo de padecer ciertos tipos de cáncer como el cervical, el de pulmón o el de colon (Kim, 1999;

## Antecedentes bibliográficos

Choi y Mason., 2000); así como depresión (Fava y col., 1997; Green y Miller, 1999); se afecta el sistema inmune (Green y Miller., 1999); y se pueden provocar daños neurológicos o alteraciones cognitivas, ya que el ácido fólico disminuye los niveles de homocisteína (Green y Miller., 1999; Houston y col., 1999; Snowdon y col., 2000; Iyer y Tomar, 2009). Esto se relaciona además con una menor incidencia de enfermedades cardiovasculares (Iyer y Tomar, 2009).

En la anemia megaloblástica, las células plasmáticas crecen de forma anómala al coexistir la síntesis defectuosa del ADN y la normal del ARN, lo que produce un aumento del tamaño de los eritrocitos, que adoptan formas ovaladas. La formación patológica de estas células origina su destrucción intramedular, por lo que se genera una hiperbilirrubinemia y una hiperuricemia. Al estar afectadas todas las líneas celulares, además de la anemia, el déficit de ácido fólico/folatos puede desarrollar leucopenia y trombocitopenia, aunque suelen tardar más tiempo en aparecer. El tratamiento para este tipo de anemia causada por una deficiencia de folatos se basa en administrar una cantidad de 200 a 500  $\mu\text{g}/\text{día}$  de ácido fólico. La respuesta a tal tratamiento verifica el diagnóstico, ya que una anemia producida por falta de cobalamina no respondería a dosis tan bajas de ácido fólico (Li y col., 2009).

En los niños, el déficit de folatos se observa con más frecuencia en los prematuros. Esto ocurre tras la administración de dietas exclusivas en leche de cabra, cuyo contenido en folatos es muy bajo, o tras la utilización de sustitutos lácteos sin suplementos vitamínicos (De Paz y Hernández-Navarro, 2006). La falta de fólico puede producir también bajo peso al nacer o aumentar el riesgo de aborto (Iyer y Tomar, 2009). Es importante saber que se debe tomar antes de la concepción, ya sea en la madre para tener depósitos suficientes y para prevenir la aparición de síndrome de Down en el neonato (Iyer y Tomar, 2009); o incluso en el padre a fin de evitar abortos espontáneos y defectos congénitos en el bebé (Kimmins y col., 2013).

Existe una serie de modificaciones bioquímicas y morfológicas características de la deficiencia de folato: disminución de la concentración de folato y elevación de los valores de homocisteína en plasma, aumento de la tasa de segmentación de los neutrófilos, aumento en la excreción urinaria de ácido forminoglutámico, disminución

## Antecedentes bibliográficos

de la concentración de fólculo eritrocitario, anemia megaloblástica, macroovalocitosis en sangre periférica y megaloblastia en la médula espinal (González-Gross y col., 2002).

Los folatos se encuentran mayoritariamente en legumbres como los garbanzos (aportan alrededor de 180  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  de producto), o en verduras como las espinacas y las acelgas (140  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ). También se puede encontrar de forma abundante en los frutos secos, cuyo contenido es destacable en cacahuets (110  $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) o almendras (96  $\mu\text{g}/100\text{g}$ ); (González-Gross y col., 2002). No obstante, se almacena poco en el organismo por lo que se puede dar una deficiencia muy fácilmente.

Cabe destacar que la biodisponibilidad de los folatos sintéticos es aproximadamente el doble que la de los naturales, además cuando se toman con el estómago vacío, su biodisponibilidad también es mayor (Iyer y Tomar, 2009).

En los alimentos, los folatos se encuentran en su gran mayoría en forma de ‘poliglutamatos’ y asociados a proteínas, forma en la que también se encuentran a nivel intracelular. En el medio extracelular, por el contrario, se encuentran como ‘monoglutamatos’, que son las formas en las que se transforman los poliglutamatos por acción de las enzimas digestivas.

## 2.1 Absorción y distribución

Los folatos llegan al intestino en forma de poliglutamatos. La ‘pteroilpoliglutamato hidrolasa’ ( $\gamma$ -glutamihidrolasa’ o ‘folato conjugasa’) presente en la membrana del “borde en cepillo” de las células intestinales (sobre todo en yeyuno) es la peptidasa responsable de la hidrolización de dichos poliglutamatos (Wright y col., 2007). Sin embargo, ciertos factores en los alimentos, tales como la fibra dietética o algunos ácidos orgánicos (como zumo de naranja o tomates), pueden inhibir la desconjugación de los poliglutamatos (Keagy y col., 1988; Wei y col., 1996; Wei y Gregory, 1998).

Por contra, los folatos en la leche están unidos a una proteína, siendo este complejo absorbido intacto en el ileon (Verwei y col., 2003). Además, la leche inhibe la

## Antecedentes bibliográficos

captación de folatos por parte de las bacterias intestinales (Iyer y Tomar, 2009). Por todo ello, la biodisponibilidad del folato en la leche es considerablemente mayor que la del folato libre.

El transporte activo de los monoglutamatos a través de las células de la mucosa intestinal en el yeyuno proximal es saturable y dependiente del pH, aumentando en presencia de glucosa y Na<sup>+</sup>, con las que se absorbe mediante un mecanismo de cotransporte. Sin embargo, alrededor de un 20-30% del folato se absorbe mediante difusión pasiva (mecanismo no saturable), siendo ésta la vía que actúa principalmente cuando se administran dosis farmacológicas de la vitamina. En sangre, el folato se encuentra preferentemente en forma de 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF), que se une de forma inespecífica a la albúmina, aunque también pueden aparecer ligados a la transferrina o a la  $\alpha$ -macroglobulina (González-Gross y col., 2002). Existen además proteínas ligantes de alta afinidad que aumentan en casos de deficiencia de fólico (embarazo, leucemia, uremia o enfermedades hepáticas), proteínas que son similares a las ligantes de folato asociadas a membranas celulares (Lucock, 2000). De esta manera, el 5-MTHF es la forma predominante en plasma, siendo el único que puede atravesar la barrera cerebro-encefálica. Es la forma activa que alcanza los distintos tejidos, en especial aquellos que muestran una gran división celular (médula ósea, mucosa gastrointestinal, sistema inmune, eritrocitos o tejido conjuntivo). El transporte de folatos a través de los tejidos ocurre gracias a la ‘proteína ligadora de folatos’ asociada a membranas (Brito y col., 2012).

## 2.2 Metabolismo y excreción

Antes de ser depositado en los tejidos, los monoglutamatos se conjugan a poliglutamatos gracias a la ‘folilpoliglutamato sintetasa’ presente tanto en hígado como en los tejidos extrahepáticos.

Estos poliglutamatos o bien se almacenan intracelularmente (en mayor proporción en hígado), o se transforman, gracias a la ‘dihidrofolato reductasa’, en ácido 5,6,7,8 – tetrahidrofólico (THF), que es la forma activa como coenzima.

## Antecedentes bibliográficos

El hígado y las células rojas de la sangre son los principales tejidos de almacenamiento de folatos. El hígado puede almacenar el folato en forma reducida y conjugada o convertirlo en 5-MTHF que es secretado en la bilis y reabsorbido en la mucosa intestinal, estando disponible para los tejidos extrahepáticos. Es por ello que se dice que la homeostasis del folato viene regulada por un ciclo enterohepático.

Los poliglutamatos son hidrolizados en el interior celular y acetilados para poder excretarse vía renal. Sin embargo, el ácido fólico excretado como tal por esta vía es recaptado en su totalidad en el túbulo proximal. También puede excretarse, aunque en menor medida, vía biliar o por las heces, siendo muy difícil de cuantificar ya que los folatos también son biosintetizados por la microflora intestinal (Mataix y Ochoa, 2002).

### 2.3 Interacción entre el ácido fólico y la cianocobalamina

La vitamina B<sub>12</sub> (cianocobalamina) se encuentra en la dieta unida a proteínas, siendo liberada por la acidez y la proteólisis gástrica. Es entonces cuando se une a la 'haptocorrina' o 'proteína R' para pasar al intestino. En el duodeno, el medio alcalino permite su liberación de la proteína R para después unirse al 'factor intrínseco' (FI) previamente secretado por las células parietales. De esta manera, la cianocobalamina se absorbe finalmente en el íleon distal. A diferencia del ácido fólico, la vitamina B<sub>12</sub> se almacena más eficientemente en el organismo, preferentemente en el hígado (Brito y col., 2012).

El 5-Me-THF sólo puede perder su grupo metilo cediéndolo a la homocisteína en la síntesis de metionina, reacción catalizada por la 'metionina sintasa', que requiere de la vitamina B<sub>12</sub> como cofactor. Posteriormente, esta metionina recién creada es convertida en adenosilmetionina, compuesto utilizado como fuente de grupos metilo para sintetizar creatina, proteínas, lípidos, fosfolípidos, neurotransmisores; y metilar ADN y ARN. Gracias a esta reacción se ha generado también la forma metabólicamente activa de los folatos, el THF.

En caso de deficiencia de B<sub>12</sub>, la actividad de la metionina sintasa está reducida por lo que la formación de THF se bloquea. De esta manera, el folato está disponible

## Antecedentes bibliográficos

pero no en una forma activa que pueda ser útil para la célula por lo que, consecuentemente, la producción de purinas y pirimidinas necesarias para la síntesis de ADN está afectada (Hughes y col., 2013).

| Causas de la deficiencia de folatos                                  | Causas de la deficiencia de vitamina B12            |
|--|---|
| <b>Bajo consumo dietario</b>   | <b>Bajo consumo dietario</b>                        |
| <b>Malabsorción</b>  | Veganismo   |
| Defectos congénitos  | Lacto-ovo vegetarianismo                            |
| Enfermedad celíaca   | Bajo consumo de fuentes de origen animal            |
| Esprue tropical  | Bajos depósitos y bajo consumo para lactantes       |
| Resecciones intestinales   | <b>Malabsorción</b>                                 |
| Enfermedad inflamatoria o infiltrativa crónica del intestino delgado | Atrofia gástrica y malabsorción desde los alimentos |
| <b>Incremento de requerimientos</b>                                  | Anemia perniciosa                                   |
| Rápido crecimiento (lactantes, especialmente los de bajo peso)       | Enfermedad ileal                                    |
| Hematopoyesis hiperactiva (anemias hemolíticas)                      | Pancreatitis crónica                                |
| Condiciones hipermetabólicas (hipertiroidismo, infección)            | Enfermedad celíaca                                  |
| Enfermedades neoplásicas   | Esprue tropical                                     |
| Exfoliación cutánea extensa  | Diarrea crónica                                     |
| <b>Incremento de pérdidas</b>  | <b>Incremento de requerimientos</b>                 |
| Diarrea crónica  | Enfermedades neoplásicas                            |
| Episodios repetidos de diarrea                                       | Hipertiroidismo                                     |
| Diálisis crónica   | <b>Infecciones</b>                                  |
| <b>Alcoholismo</b>   | <b>Parasitosis</b>                                  |
| <b>Medicaciones</b>  | <b>Cirugía bariátrica</b>                           |
| <b>Polimorfismos</b>   | <b>Medicaciones</b>                                 |
|  | Polimorfismos                                       |

**Tabla 3.** Causas de la deficiencia de folatos y vitamina B<sub>12</sub> (Brito y col., 2012).

### 3. RADICALES LIBRES Y MECANISMOS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE

Actualmente, existe cada vez una mayor preocupación por un estado de salud óptimo y los métodos necesarios para preservarlo. Así, uno de los términos más discutidos y más estudiados en los últimos años en la búsqueda de este estado es el denominado “estrés oxidativo”. Esto es debido a que el estrés oxidativo está relacionado directamente con la vejez por lo que un control del mismo podría llevarnos a envejecer de forma más “sana” o incluso a envejecer “más lentamente”. Aún así, el concepto de estrés oxidativo en el ser humano es sumamente complejo y su comprensión viene dada por un conjunto de procesos que ocurren simultáneamente. De esta manera, el estrés oxidativo es principalmente el resultado de un desequilibrio entre la producción de radicales libres y los mecanismos del organismo para contrarrestar los efectos perjudiciales producidos por tales sustancias. Esto es debido a la incapacidad del

## Antecedentes bibliográficos

sistema biológico de detoxificar dichos intermedios producidos como consecuencia de la alteración del estado normal redox de las células que tiene, en última instancia, un efecto tóxico sobre todos los componentes celulares incluyendo proteínas, lípidos y ADN. Comúnmente se habla de que la célula presenta un “estado redox” consecuencia del equilibrio entre las moléculas intracelulares oxidadas y reducidas.

Es en el caso de que haya tanto una variación de este estado redox como de los sistemas de regulación del mismo cuando aparece el ya denominado estrés oxidativo. Hay varios factores exógenos que contribuyen a generar sustancias desencadenantes de estrés oxidativo, como son: los malos hábitos alimentarios, el estrés, el tabaco, el alcohol, el sedentarismo, la ansiedad/depresión, ciertos medicamentos, la contaminación o ciertas radiaciones. Por otro lado, existen cada vez más evidencias de que la protección básica del organismo puede resultar insuficiente tanto en determinadas situaciones fisiológicas (envejecimiento o ejercicio extremo, por ejemplo) como en enfermedades tales como cáncer (Pulido Morán, 2012), Alzheimer, Parkinson o arterosclerosis. Es por ello que el estudio del estrés oxidativo así como de las moléculas implicadas en el mismo resulta crucial para entender aún mejor estas situaciones patológicas y tener la posibilidad en última instancia de desarrollar nuevos tratamientos efectivos contra tales situaciones patológicas. A continuación nos disponemos a tratar los factores más relevantes implicados en este mecanismo.

### 3.1 Radicales libres

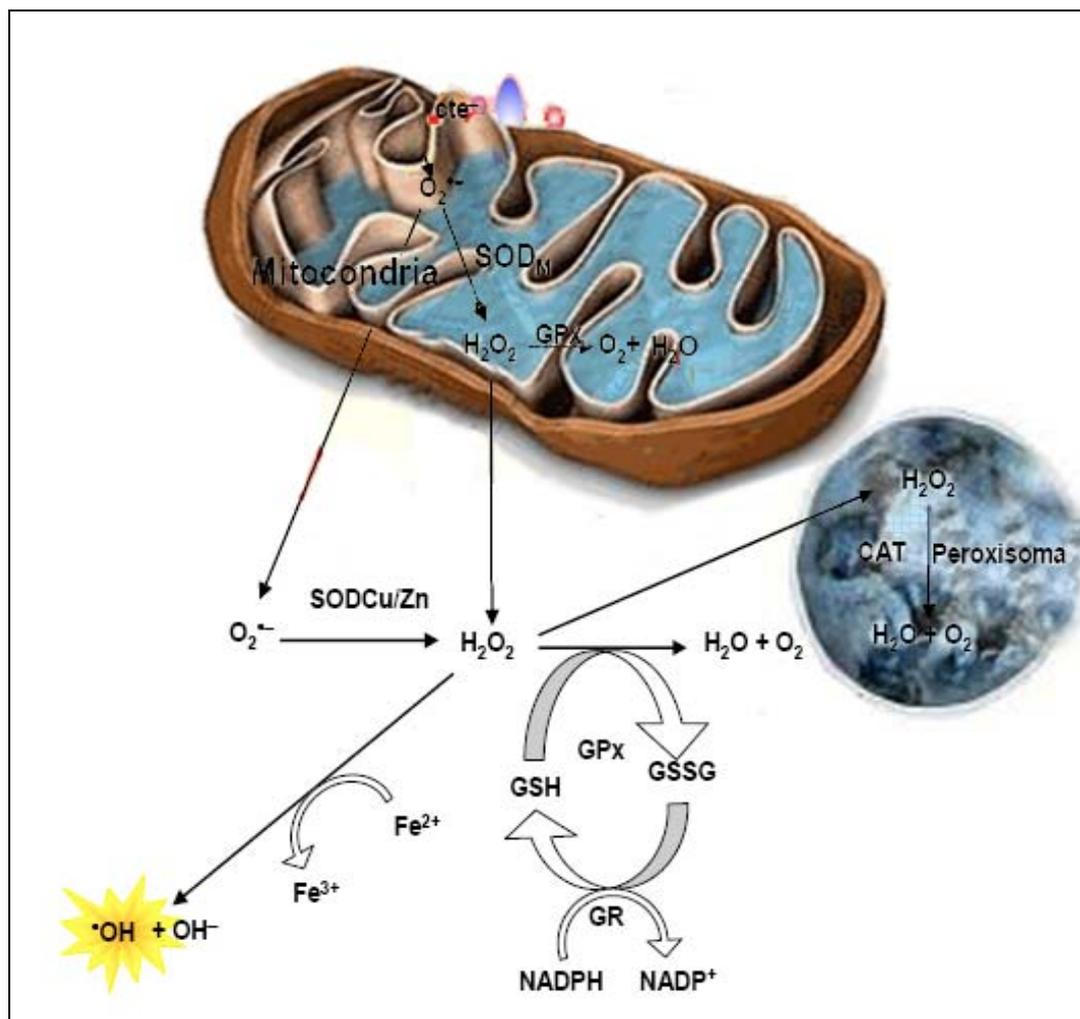
Los radicales libres son moléculas o porciones de las mismas que presentan al menos un electrón desapareado en su orbital más externo y que por tanto son extremadamente reactivos (Halliwell y Gutteridge, 1989; Elejalde Guerra y col., 2001) lo que les conducirán a interactuar rápidamente con cualquier molécula biológica con la que entren en contacto. Los radicales libres pueden modificar la estructura y/o función de éstas, pudiendo actuar así sobre la membrana plasmática o sobre procesos críticos intracelulares, entre los que se incluyen la maquinaria genética y diversos procesos enzimáticos (Cheeseman y Slater, 1993; Halliwell y Chirico, 1993; Liu y col., 2002; Murphy, 2009). De esta manera, el producto final de una reacción en la que haya intervenido un radical libre suele ser el comienzo de otra nueva reacción, por lo que el

## Antecedentes bibliográficos

daño oxidativo se mantiene. Además, estas sustancias tienen una vida media muy corta y se encuentran en concentraciones muy pequeñas por lo que su determinación suele ser muy dificultosa.

Por otra parte, los radicales libres son generados endógenamente por la fosforilación oxidativa que se da en la mitocondria generalmente y por interacciones con componentes exógenos denominados “compuestos xenobióticos” (Ray y col., 2012). Sin embargo, la generación de especies reactivas tiene en muchos casos un efecto beneficioso como ocurre en la formación de radicales superóxido y óxido de nitrógeno a concentraciones moderadas cuando se produce una infección por un patógeno (Valko y col., 2007).

Aún así, el organismo se vale de diferentes mecanismos de protección frente al daño producido por estas sustancias: los antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa –que constituyen la primera línea de defensa– y otros) y los antioxidantes no enzimáticos (glutathione, vitaminas C y E, carotenoides, ubiquinona, ácido lipoico, metales de transición o polifenoles, entre otros). Por lo tanto, existe un equilibrio entre los sistemas de defensa antioxidante y el de producción de radicales libres, conocido como balance oxidativo, que al inclinarse hacia la producción de radicales (o al descompensarse los sistemas antioxidantes) da lugar al denominado estrés oxidativo.



**Figura 2.** Formación de radicales libres y eliminación por sistemas enzimáticos (Rivas García E., 2012).

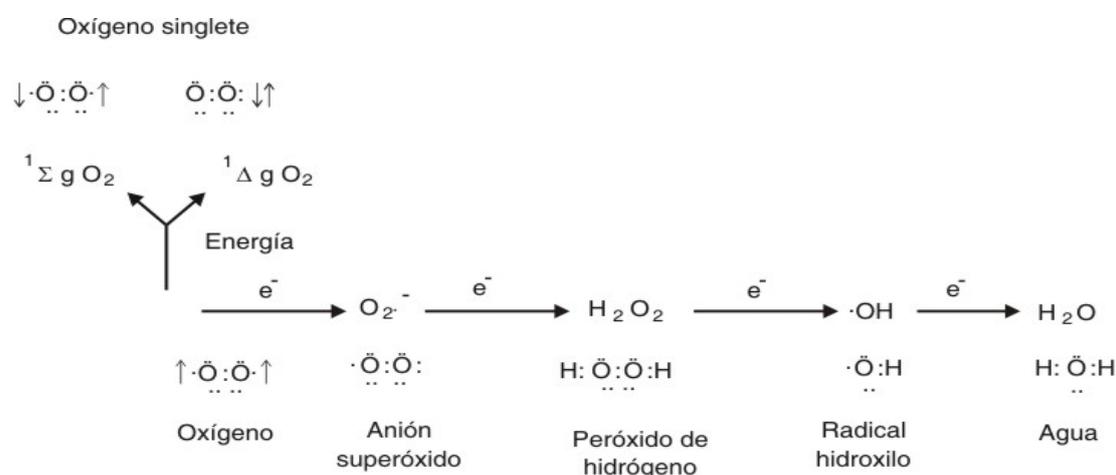
Más adelante procederemos al estudio de tales líneas de defensa del organismo.

Por otro lado, es imprescindible conocer la naturaleza y el origen de dichas especies reactivas para su total comprensión. En algunos casos, estos radicales pueden provenir de reacciones en las que interviene el nitrógeno, los cuales juegan un papel muy importante no sólo como radicales nocivos sino como radicales necesarios para la vida (tanto es así que son imprescindibles en procesos tan relevantes como la relajación de la musculatura lisa). Sin embargo, los más estudiados son los provenientes de procesos en los que interviene el oxígeno, generándose así las denominadas “especies reactivas de oxígeno” o EROs, originados en organismos que necesitan metabolizar compuestos orgánicos para producir energía y cuyo aceptor de electrones es el oxígeno.

## Antecedentes bibliográficos

Además de las fuentes exógenas mencionadas anteriormente –compuestos xenobióticos- (malos hábitos alimentarios, estrés, tabaco, alcohol, sedentarismo, ansiedad/depresión, medicamentos, contaminación o radiaciones), hay una variedad de procesos endógenos que son también responsables de la generación de EROs: la oxidación de la hemoglobina y la mioglobina, la actividad de los peroxisomas, la autooxidación de pequeñas moléculas citoplasmáticas como pueden ser los iones divalentes/ catecolaminas/ flavinas/ quininas o tioles (Freeman y Grapo, 1982; Proctor y Reynolds, 1984), a partir del óxido nítrico, por la actividad de ciertas enzimas como la MAO / ciclo oxigenasa/ lipoxigenasa o la óxido nítrico sintasa, por la actividad leucocitaria (los leucocitos utilizan EROs durante el proceso inflamatorio para destruir bacterias invasivas), o durante los procesos de transporte electrónico microsomal y mitocondrial (Morillas-Ruiz, 2010).

Los EROs más importantes son el oxígeno molecular ( $O_2$ ), el radical anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxilo ( $HO^{\cdot}$ ) y su precursor el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).



**Figura 3.** Formación de las diferentes EROs (www.scielo.isciii.es).

### 3.1.1 Oxígeno molecular

El átomo de oxígeno posee 8 electrones por lo que el oxígeno atmosférico ( $O_2$ ) consta de 16, 2 de los cuales desapareados. Considerando esto, la molécula de  $O_2$ , aunque estable, es un birradical. Esta estabilidad puede verse alterada por diversos agentes dando lugar a las moléculas expuestas en la **Figura 3**, de ahí su toxicidad.

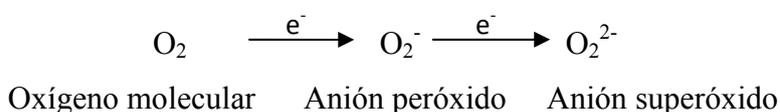
## Antecedentes bibliográficos

Las principales especies producidas son el oxígeno atómico, el oxígeno singlete, el ozono y las especies de oxígeno parcialmente reducidas tales como el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. La luz ultravioleta y las descargas eléctricas rompen los enlaces covalentes de la molécula de O<sub>2</sub> produciendo oxígeno atómico (O) que al combinarse con el O<sub>2</sub> produce ozono (O<sub>3</sub>). El O<sub>3</sub> es el responsable de la absorción de parte de la luz ultravioleta que llega a nuestro planeta procedente del sol, sin embargo, se trata de un gas irritante mucho más oxidante que el O<sub>2</sub>.

Aún así, generalmente la reactividad del oxígeno molecular no es tan elevada debido a que los espines de sus 2 electrones desapareados son paralelos; sin embargo su afinidad tan elevada por los electrones lo va a convertir en un aceptor (de electrones) excelente. Un buen ejemplo de esto último ocurre en la mitocondria cuando el complejo IV de la cadena de transporte electrónico mitocondrial o “citocromo c oxidasa” reduce el oxígeno molecular a H<sub>2</sub>O gracias a la transferencia de electrones y a la donación de protones desde la matriz mitocondrial:



Esta reacción de reducción del oxígeno no es ni mucho menos tan simple puesto que aunque de forma general se transfieran 4 electrones al oxígeno para formar 2 moléculas de H<sub>2</sub>O, puede ocurrir que la reducción se dé tan sólo parcialmente lo que podría derivar en la generación de intermediarios del oxígeno perjudiciales potenciales del organismo:



De este modo, para que la reducción total del oxígeno a H<sub>2</sub>O se produzca, es indispensable que el catalizador retenga de manera adecuada las moléculas de oxígeno, hecho para el cual va a utilizar iones Fe y Cu que van a mantener este oxígeno unido.

## Antecedentes bibliográficos

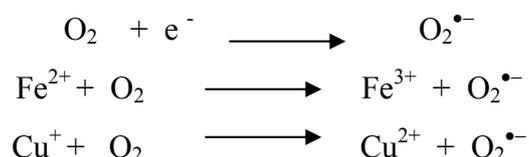
Es por ello indispensable que durante el proceso no se formen intermediarios reactivos del oxígeno tales como el anión superóxido o el peróxido de hidrógeno, punto clave en la evaluación de la eficacia de este tipo de enzimas (Berg y col., 2007).

Por otra parte, el estado fundamental del oxígeno es un triplete  $^3\Sigma_g^-$ . Existe una forma derivada, el oxígeno singlete atómico ( $^1O_2$ ), que se caracteriza por ser un átomo de oxígeno en el estado singlete excitado. En estado fundamental es un triplete  $^3P$ , mientras que en el estado excitado pasa a  $^1S$  o  $^1D$  (Costa, 2005). Los dos estados singletes metaestables derivados de la configuración fundamental son:  $^1\Delta_g$  y  $^1\Sigma_g^-$ . El oxígeno singlete delta ( $^1\Delta_g$ ) es de mayor importancia biológica debido a su larga vida media, mientras que el oxígeno singlete sigma ( $^1\Sigma_g^-$ ) es más reactivo pero tiene una semivida más corta porque se transforma rápidamente al estado delta (Proctor y Reynolds, 1984).

De esta manera estas formas inusuales del oxígeno van a poder reaccionar en ocasiones con los lípidos, proteínas y ADN celulares por lo que son muy peligrosas en presencia de materia orgánica (Lledías y Hansberg, 2000). Sin embargo, no es un radical libre propiamente dicho puesto que no presenta electrones desapareados.

### 3.1.2 Anión superóxido

El anión superóxido ( $O_2^-$ ) se produce por la reducción del oxígeno debida a la transferencia de un electrón, por la denominada “activación del oxígeno a través de radiaciones”, a través de procesos catalizados por enzimas, o por autooxidación de metales de transición (Fridovich, 1983; Cheeseman y Slater, 1993; Lindsay y col., 2002; Valko y col., 2005):



El  $Fe^{2+}$  tiene cuatro electrones desapareados mientras que el  $Cu^+$  no tiene electrones desapareados pero acepta fácilmente uno para formar  $Cu^{2+}$ . Estos hechos convierten a ambos metales de transición en radicales libres por su capacidad de donar/aceptar electrones.

## Antecedentes bibliográficos

Aunque no es particularmente dañino, la importancia del  $O_2^-$  deriva de su acción como reductor de metales de transición y comoradical primario (fuente de peróxido de hidrógeno y otros tipos de radicales secundarios) produciendo daño lipídico, proteico o del ADN (Valko y col., 2007).

Como hemos comentado anteriormente, esta especie reactiva se produce fundamentalmente en la mitocondria de forma accidental a nivel de los complejos I (NADH-Q oxidorreductasa) y III (Q-citocromo c oxidorreductasa) de la cadena de transporte electrónico, reduciéndose el 1-3% del oxígeno hasta este radical.

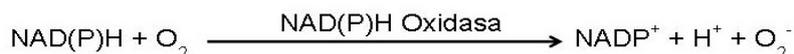
En lo que respecta al complejo I, se cree que la fuga de electrones se da hacia la matriz de la mitocondria, sin aparición de los mismos en mitocondrias intactas, lo que sugiere que dichas fugas se pueden dar en los brazos hidrofílicos de la proteína donde se localizan los complejos Fe-S (ya que el superóxido no atraviesa membranas por estar mayoritariamente cargado negativamente a pH fisiológico), (Muller y col., 2004).

En referencia al complejo III, se ha de tener en cuenta la existencia de complejos Fe-S ligeramente diferentes a los del complejo I (por tener residuos de histidina y no de cisteína) que facilitan la captación de electrones por parte del coenzima Q reducido (momento en el que se cree que se generan las fugas que pueden dar lugar a la formación del superóxido) aunque este proceso no está aún muy claro (Gutteridge, 1994; Muller y col., 2004; Valko y col., 2007).

Aún así, en todos estos casos la formación del radical  $O_2^-$  depende del flujo de la cadena de transporte de electrones, por lo que cualquier situación que aumente el consumo de  $O_2$  aumentará proporcionalmente la generación de este anión (Finkel y Holbrook, 2000; Camougrand y Rigoulet, 2001; Barbi de Moura y col., 2010).

A pesar de lo anterior, cabe destacar que la producción de este compuesto no está ligada únicamente a la mitocondria (si bien este orgánulo es el que más radicales produce fisiológicamente), sino que puede generarse por la actuación de diversos enzimas; como por ejemplo la NAD(P)H oxidasa, que cataliza la reacción de reducción del oxígeno, generando:

## Antecedentes bibliográficos



La NAD(P)H oxidasa usa como donante de electrones tanto NADH como NADPH. Está presente a su vez en las membranas celulares de múltiples tipos de células, siendo de especial relevancia en las leucocitarias, donde actúa como bactericida (Babior, 2002). Además, la activación de esta enzima viene determinada en muchos casos por la generación de segundos mensajeros producidos a consecuencia del metabolismo del ácido araquidónico (Martín Garrido, 2007).

Por otro lado, el anión superóxido se puede formar además por la captura de un electrón cedido por otros sustratos como son la oxihemoglobina (Hb-Fe<sup>2+</sup>)-O<sub>2</sub> (que libera radical superóxido), en la oxidación de la xantina e hipoxantina a ácido úrico, en la migración de los leucocitos hacia las lesiones tisulares o en la autooxidación de catecolaminas y tetrahidrofolato (Ballester, 1996).

### 3.1.3 Peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) proviene de la reducción espontánea del oxígeno con dos electrones, pudiendo ser también generado en los sistemas biológicos por la reacción de dos moléculas de anión superóxido, catalizada por la superóxido dismutasa:



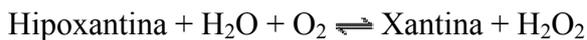
Debido a su estabilidad al no presentar electrones desapareados, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se considera una especie no radical dentro de los EROs. Sin embargo, hay que tener en cuenta que tiene la capacidad de difundir fácilmente a través de las membranas, pudiendo generar otros radicales muy oxidantes (como es el hidroxilo, que trataremos posteriormente).

## Antecedentes bibliográficos

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tiene un papel fundamental en la regulación de genes, especialmente los controlados por el factor de transcripción nuclear (NF-κB), así como segundo mensajero celular (en la inducción de Ca<sup>2+</sup> intracelular o al unirse al diacilglicerol –DAG- o al AMP<sub>c</sub>, pudiendo interferir en cascadas de fosforilación enzimática que pueden llevar a la modulación de la expresión de determinados genes). También posee la capacidad de alterar la conformación proteica por su capacidad de oxidación de residuos de metionina y cisteína.

Por otro lado, el peróxido de hidrógeno se puede encontrar de forma relevante en:

-Xantina oxidasa: conjuntamente con la xantina deshidrogenasa constituyen un sistema conocido como “xantina oxidoreductasa”, imprescindible para el metabolismo de las purinas, catalizando la reacción:



Existe un paso intermedio en el que se produce la formación de superóxido, el cual es metabolizado rápidamente a peróxido de hidrógeno por la acción de la SOD.

-Óxido nítrico sintasa: se trata de un complejo homodimérico que transporta electrones desde el dominio reductasa hacia el dominio oxidasa que contiene el grupo hemo. En ausencia de algunos cofactores necesarios para la síntesis de óxido nítrico (TBH o tetrahidrobloptenina), se va a generar peróxido de hidrógeno, radical superóxido y óxido nítrico, debido a que este cofactor facilitaría el correcto acoplamiento entre los electrones y el grupo hemo, evitando la reducción del oxígeno molecular (Vazquez-Vivar y Kalyanaraman, 2000; Martín Garrido, 2007).

-NAD(P)H oxidoreductasas: en neutrófilos activados, la oxidasa NADPH-dependiente reduce el oxígeno molecular hasta radical superóxido y, consecuentemente, peróxido de hidrógeno.

-COX: las ciclooxigenasas son unas enzimas que metabolizan el ácido araquidónico, generando los llamados ‘prostanoides’. Es durante esta síntesis cuando se producen los

## Antecedentes bibliográficos

EROs debido al componente peroxidasa de las COX que llevan a cabo la oxidación de la NAD(P)H (generando el superóxido que puede desembocar en la formación de peróxido de hidrógeno).

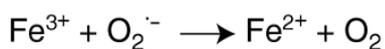
-Otros enzimas: hay algunos enzimas que tienen la capacidad de originar directamente peróxido de hidrógeno como por ejemplo las oxidasas peroxisomales. Sin embargo, en condiciones normales, estos peroxisomas contienen ‘catalasa’, un enzima que degrada el peróxido de hidrógeno hasta oxígeno y agua. Además, existen otras enzimas como por ejemplo la lisil oxidasa, implicada en la formación de aldeídos precursores de los entrecruzamientos de elastina y colágeno, que generan per se peróxido de hidrógeno siendo en sí mismas una fuente de estrés oxidativo.

El hecho de que sea en la mitocondria donde se producen la mayoría de las reacciones anteriores supone que un buen balance en el consumo de oxígeno va a promover que salgan a la luz o no diversas patologías asociadas a la producción de peróxido de hidrógeno (Rojkind y col., 2002).

### 3.1.4 Hidroxilo

El radical hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ) es extremadamente oxidante ya que reacciona con cualquier tipo de biomolécula (Halliwell y Gutteridge, 1989; Barbi de Moura y col., 2010) y aunque no tiene un gran poder de difusión además de que su vida media es corta -del orden de  $10^{-9}$  segundos, por lo que su acción va a ser prácticamente en el lugar de formación, (Pastor y col., 2000)-; produce un gran daño a las moléculas que se encuentran en el lugar de su producción. De hecho, el radical hidroxilo es uno de los más reactivos que se conocen en química, teniendo capacidad para reaccionar con las bases púricas y pirimidínicas del ADN, las proteínas, los lípidos y los carbohidratos. Su precursor químico inmediato es el peróxido de hidrógeno. Dicho radical hidroxilo se produce a través de las reacciones de Fenton y de Haber-Weiss:

### Fenton chemistry



### Haber-Weiss reaction



La reacción de Fenton se caracteriza por ser lenta pero se promueve una generación más rápida de radicales en presencia de metales de transición como los iones ferroso o cuproso libres (que actúan como catalizadores), al alterarse la homeostasis por ejemplo en condiciones de isquemia-reperfusión (Catillo y col., 2003). Sin embargo, en condiciones fisiológicas normales, los niveles de Fe y Cu están controlados puesto que el Fe absorbido en el intestino es transportado por la ‘transferrina’ y almacenado bajo la forma de ‘ferritina’ y de ‘hemosiderina’, mientras que el Cu se halla unido a la ‘ceruloplasmina’ (Aruoma y Halliwell, 1991). La reacción de Fenton es además un paso que ocurre durante la peroxidación lipídica, pudiendo así perdurar dicha peroxidación si las condiciones se mantienen.

Bajo condiciones de estrés, el superóxido puede actuar como oxidante de los complejos Fe-S, pudiendo incrementar los niveles de  $\text{Fe}^{2+}$  haciéndolos de esta manera disponibles para que, junto con el peróxido de hidrógeno, se dé un aumento en los niveles de hidroxilo (Valko y col., 2005).

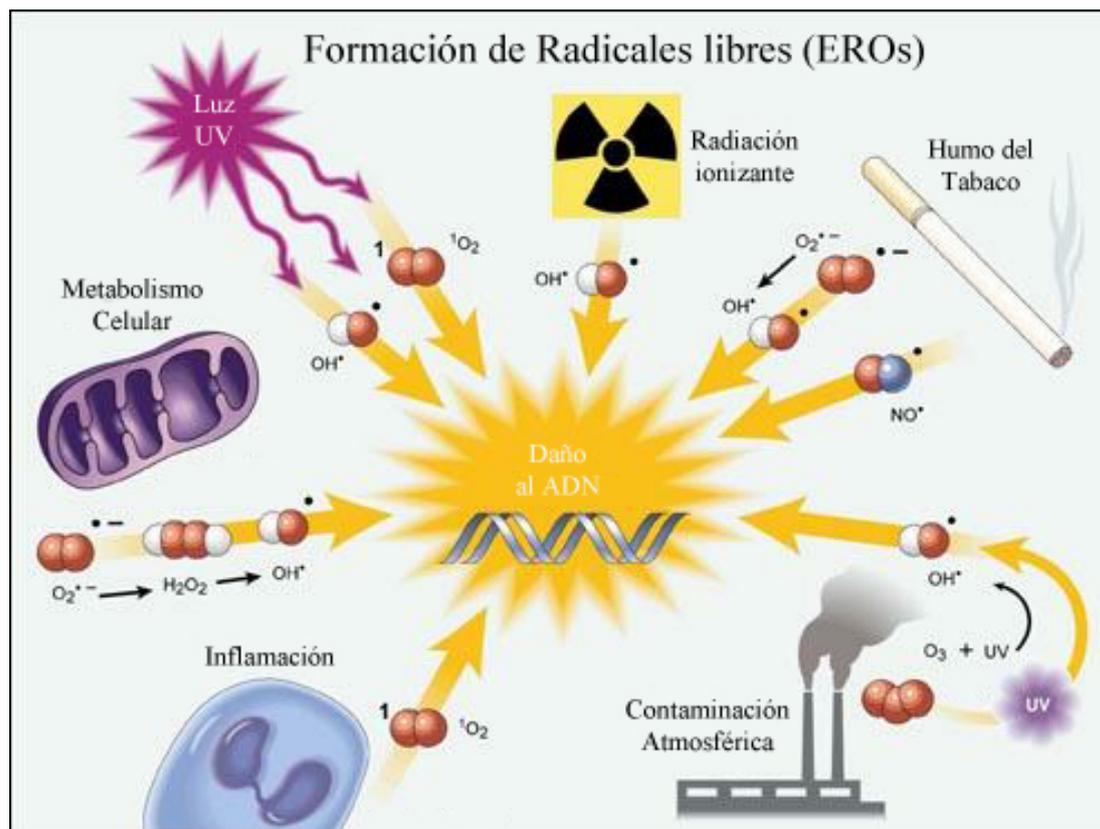


Figura 4. Principales fuentes generadoras de radicales libres (Rivas García E., 2012).

### 3.1.5 Efectos beneficiosos y toxicidad de los radicales libres sobre los sistemas biológicos

Aunque resulte paradójico, los EROs también tienen un papel beneficioso importante para el organismo ya que intervienen en multitud de reacciones biológicas cruciales (Morillas Ruiz, 2010), como son:

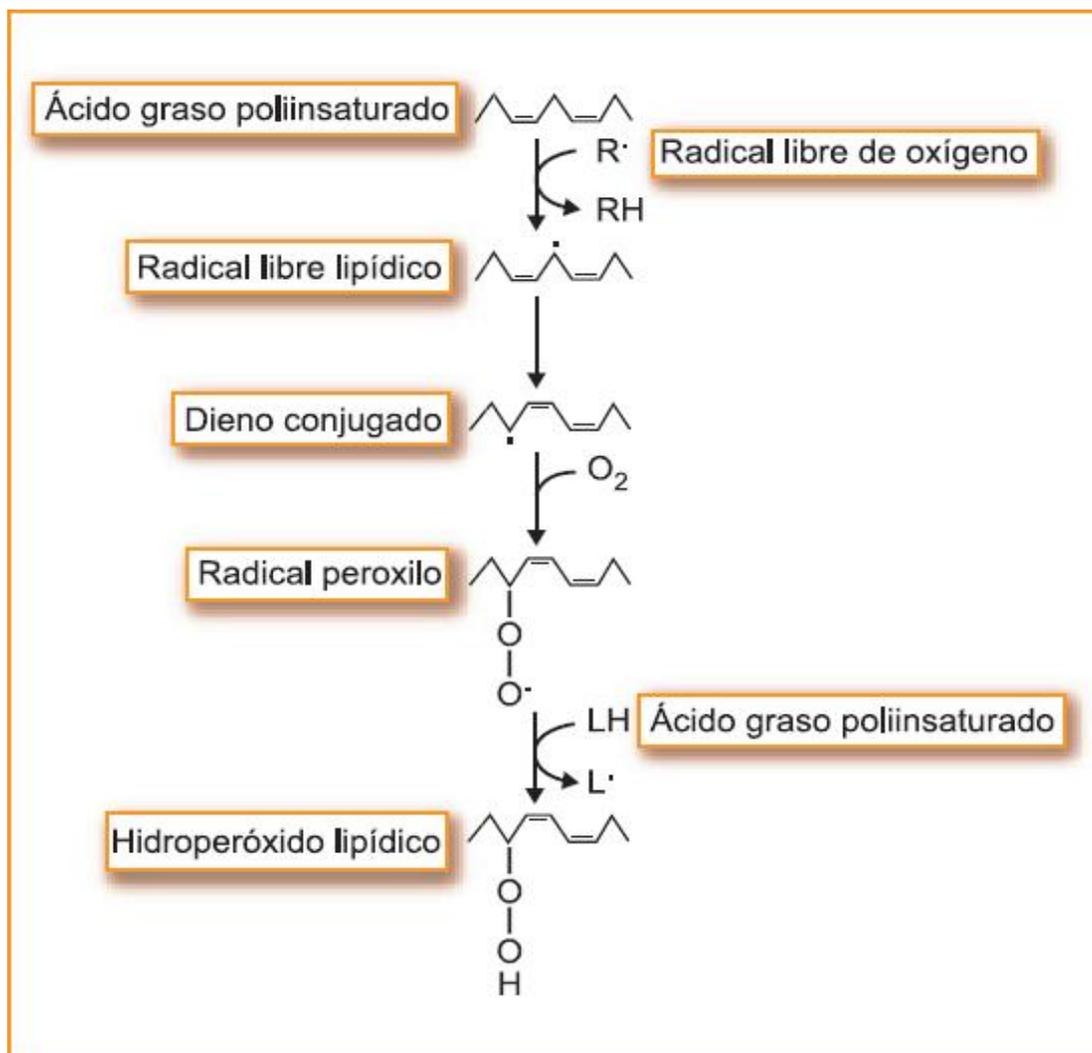
- Reacciones inflamatorias: son sustancias imprescindibles para la fagocitosis de microorganismos invasores por parte de los leucocitos polimorfonucleares.
- Mediadores esenciales en la 'apoptosis' o muerte programada.
- Son esenciales en la metabolización de productos tóxicos, proliferación de fibroblastos y en la vasorregulación.
- Otro radical libre inorgánico tal que el óxido nítrico ( $NO^\bullet$ ) actúa como factor de relajación muscular o como neurotransmisor del sistema nervioso central (SNC), además de participar en la respuesta fagocítica de algunos macrófagos.

## Antecedentes bibliográficos

Aun así, la mayoría de los componentes celulares pueden ser dañados por los radicales libres, siendo los ácidos grasos insaturados, las proteínas, los ácidos nucleicos y los hidratos de carbono los más propensos a tal ataque. De esta forma, estas estructuras se alteran, haciéndolo a su vez el correcto funcionamiento de la célula que las contiene. No obstante, los organismos tienen una buena capacidad de adaptación ante una tensión oxidativa.

### a) Toxicidad en lípidos (peroxidación lipídica, PL)

La peroxidación lipídica es la destrucción por oxigenación de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) en una reacción autocatalítica e incontrolada donde se forman hidroperóxidos y productos secundarios. Este proceso ocurre cuando el radical libre arrebató un átomo de hidrógeno de uno de los grupos metilenos de la cadena hidrocarbonada. El radical libre lipídico sufre un reajuste molecular para estabilizarse dando lugar a un dieno conjugado. El dieno conjugado reacciona con el oxígeno molecular dando lugar a un radical peróxido que puede derivar en ‘endoperóxido’ o en ‘hidroperóxido’ si capta un hidrógeno de algún carbono metileno de otro ácido graso poliinsaturado adyacente (**Figura 5**). Es así como es posible que se induzcan reacciones en cadena de propagación del daño peroxidativo que pueden dar lugar a daños celulares lejos del lugar donde inicialmente se originó el radical (Martínez Cayuela, 2010). La peroxidación de los ácidos grasos modifica la estructura molecular de los lípidos que los contienen, provocando a su vez un cambio conformacional que es más importante cuando tales lípidos integran las membranas celulares (Rice-Evans y Miller, 1994), y más aún las mitocondriales, ya que el mal funcionamiento de la fosforilación oxidativa se asocia a destrucción de la membrana por alteraciones en la fluidez y pérdida de ácidos grasos (Halliwell, 2006).



**Figura 5.** Reacciones en cadena de la peroxidación lipídica. (Martínez Cayuela, 2010).

Los hidroperóxidos lipídicos son estables pero poseen una vida media muy corta pues o bien son rápidamente reducidos por acción de las enzimas u otros elementos del sistema de defensa antioxidante a alcoholes no reactivos, o bien reaccionan con metales para dar lugar a una variedad de productos altamente reactivos como pueden ser los epóxidos o los aldehídos. Entre los productos aldehídicos producidos destacan el malondialdehído (MDA) o el 4-hidroxinonenal (4-HNE). El MDA es mutagénico para las células de bacterias y mamíferos además de que puede causar entrecruzamientos y polimerización entre componentes de las membranas así como reaccionar con las bases nitrogenadas del ADN; mientras que el 4-HNE tiene un importante efecto sobre el fenotipo celular ya que interfiere en las rutas de transducción de señales intracelulares (Marnett, 2000).

## Antecedentes bibliográficos

Las membranas biológicas y las lipoproteínas plasmáticas son susceptibles de peroxidación porque contienen los sustratos necesarios para ello, como el ácido linoleico, araquidónico y docosahexanoico. Los isoprostanos se forman a partir de la unión de compuestos derivados de la peroxidación del ácido araquidónico y otros PUFA con una serie de prostaglandinas. Pueden encontrarse en forma libre o esterificados con fosfolípidos y se pueden cuantificar en orina. Incluso, la excreción urinaria de isoprostanos se incrementa en situaciones de estrés oxidativo como en el caso de fumadores o pacientes con arterioesclerosis (Salonen y col., 2003).

Existe un mecanismo reparador del daño oxidativo de los lípidos en el que intervienen fosfolipasas como la 'fosfolipasa A2', ya que su actividad en la membrana interna mitocondrial parece verse incrementada en situaciones de estrés oxidativo. Así, en ausencia de este tipo de mecanismos reparadores, los lípidos peroxidados se acumularían pudiendo aumentar la permeabilidad de la membrana y alterarse la respiración mitocondrial (Kinsey y col., 2007).

### b) Toxicidad en proteínas

Entre las alteraciones más frecuentes que se pueden dar en las proteínas por acción de especies radicalarias se encuentran la fragmentación, agregación y susceptibilidad a la degradación proteolítica (Dröge, 2002). Debido a la reactividad de los radicales libres con moléculas que poseen dobles enlaces o que contienen grupos azufre, las proteínas cuya proporción en los aminoácidos triptófano, tirosina, fenilalanina, histidina, metionina o cisteína sea alta, pueden ser fácilmente atacadas por radicales libres. En cualquier caso, la magnitud del daño oxidativo va a depender de si estos aminoácidos forman parte de grupos funcionales responsables de la actividad y/o conformación de tales proteínas, algo que puede resultar crucial en la viabilidad celular. No obstante, la mayoría de los daños en las proteínas son ocasionados por el radical hidroxilo, el cual reacciona de forma irreversible con cualquier aminoácido en el mismo lugar donde se forma. En este sentido, los EROs pueden reaccionar a su vez directamente con los ligandos metálicos de muchas metaloproteínas, modificando su estado redox. Un ejemplo muy claro es el Fe de la hemoglobina o de la catalasa, que puede reaccionar con el radical superóxido y pasar a su forma inactiva  $Fe^{3+}$ ; o el Cu de la superóxido dismutasa Cu/Zn, que puede reaccionar con el peróxido de hidrógeno generando radical

## Antecedentes bibliográficos

hidroxilo, capaz de atacar el residuo de histidina del centro activo de la enzima (Martínez Cayuela, 2010).

La forma más común de medir el grado de oxidación de las proteínas de una célula es mediante la detección de 'carbonilos' en la proteína. Éstos se suelen formar por la oxidación de residuos de prolina o arginina (que normalmente son más resistentes a las modificaciones) mediada por radicales hidroxilo o superóxido, seguida posteriormente de la hidrólisis de enlaces peptídicos, lo que desemboca en la escisión oxidativa y en la desaminación de las proteínas.

Estos grupos carbonilos originados (que actúan como biomarcadores de daño en proteínas) tras una situación de estrés oxidativo, pueden ser determinados por varios métodos, entre los que cabe destacar el de determinación espectrofotométrica (Reznick y Packer, 1994); o por colorimetría, en tejidos humanos y fluidos corporales (Evans y col., 1999).

### c) Toxicidad en hidratos de carbono

Los hidratos de carbono son dañados en menor proporción que otras moléculas por los radicales libres. No obstante, algunos azúcares como la glucosa, el manitol o ciertos desoxiazúcares se pueden auto-oxidar o reaccionar con el radical hidroxilo produciendo cantidades de  $H_2O_2$  que contribuyen a los niveles intracelulares de este compuesto. La auto-oxidación de la glucosa permite que esta pueda interactuar con otras moléculas provocando, por ejemplo, la glicosilación no enzimática de las proteínas (Roy y col., 2004). Asimismo, polisacáridos como el ácido hialurónico pueden sufrir el ataque de ciertos radicales libres dando lugar a unidades más sencillas (Greenwald y Moy, 1980).

Por otra parte, el daño que los radicales libres producen en los desoxiazúcares que constituyen el ADN, aunque conocido desde hace mucho tiempo, ha recibido una creciente atención. Los fragmentos de desoxirribosa derivados del ataque de los radicales libres al ADN son potenciales mutágenos, ya que bloquean la actividad de enzimas como la ADN polimerasa o la ADN ligasa (Hwang y Bowen, 2007).

## Antecedentes bibliográficos

### d) Toxicidad en ácidos nucleicos

Con el estrés oxidativo se produce lenta pero continuamente una pérdida y una transformación de bases del ADN así como una ruptura de las hebras del mismo, dando como resultado en última instancia la aparición de mutaciones o de muerte celular (Marnett y Plastaras, 2001).

El ADN mitocondrial (ADNmit) de los animales es más vulnerable al daño oxidativo que el ADN nuclear ya que se localiza en una región de la membrana mitocondrial interna donde las EROs se generan, es de pequeño tamaño y además carece de histonas. Por si fuera poco, la mitocondria posee un mecanismo de reparación del ADN incompleto en comparación con el sistema nuclear. El ADNmit codifica proteínas involucradas en el proceso de fosforilación oxidativa por lo que, su fragmentación a causa de la presencia de radicales libres, da lugar a una disfunción de la cadena respiratoria mitocondrial que aumenta aún más la generación de EROs, pudiendo derivar en la inducción de la apoptosis de la célula (Hwang y Bowen, 2007).

Por otro lado, el daño persistente del ADN nuclear puede dar lugar a la alteración de la transcripción, a la inducción de rutas de señalización intracelular, o a errores en la replicación e inestabilidad genómica (Klaunig y Kamendulis, 2004; Valko y col., 2006). Se estima que una célula humana, en condiciones fisiológicas normales, está expuesta a  $1,5 \times 10^5$  lesiones oxidativas al día que provocan modificaciones en el ADN. Una de las especies que pueden producir estas modificaciones es el  $H_2O_2$ , el cual es capaz de alterar las bases en la mayoría de los casos pero también causar roturas de simple y doble cadena. Sin embargo, el radical que más modificaciones puede desencadenar es el radical  $OH^-$  (el cual podría producirse incluso por una radiación ionizante exógena), capaz de intercalarse entre los dobles enlaces de las bases nitrogenadas dando lugar a un radical muy inestable que reacciona con otros componentes del ADN y se oxida generando una base hidroxilada. Esta reacción en cadena da lugar a una amplia variedad de bases nitrogenadas y azúcares modificados, lugares libres de bases nitrogenadas, roturas del ADN e interacciones entre ADN y proteínas. Los cambios en las bases nitrogenadas pueden generar mutaciones cuando se duplica el ADN.

## Antecedentes bibliográficos

Como resultado, se obtienen varias especies derivadas de este daño como pueden ser los residuos de timina glicol (Tg), timidinaglicol (dTg), 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina (8-oxodG), 8-oxoguanina (8-oxoGua) o 5-hidroximetiluracilo (5-OHmU); todos ellos hidrosolubles y por tanto identificables en orina siendo así unos buenos biomarcadores del daño oxidativo en el ADN (de hecho varios kits de determinación de daño oxidativo en el ADN analizan la cantidad excretada de estas sustancias). Los daños producidos por el Tg y el 8-oxodG son los más estudiados por la cantidad de efectos que pueden ocasionar (Morillas Ruiz, 2010).

Cuando existen rupturas en el ADN se activan polimerasas como la 'poli (ADP-ribosa) polimerasa' o PARP, que une residuos de ADP-ribosa formando cadenas ramificadas con proteínas asociadas con el ADN. Este hecho parece facilitar la acción de los mecanismos específicos de reparación de las rupturas en el ADN. Incluso, en el hombre se conocen varias enfermedades, como puede ser el xeroderma pigmentoso, en las cuales están afectados alguno de estos mecanismos de reparación, lo que puede acarrear fatales consecuencias (Morillas Ruiz, 2010).

### 3.2 Mecanismos de defensa antioxidante

Una sustancia es antioxidante cuando tiene la capacidad de disminuir o inhibir el daño oxidativo sobre una molécula. Para la desintoxicación de radicales libres los organismos han desarrollado numerosos tipos de sistemas defensivos formados por atrapadores y sustancias neutralizantes no enzimáticas, así como por sistemas enzimáticos entre los que están la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GPx) y la catalasa (CAT), entre otros. Generalmente se trata de moléculas capaces de transformar los EROs en sustancias menos reactivas y también de prevenir la transformación de los EROs menos reactivos en sustancias más perjudiciales, como por ejemplo el paso de  $H_2O_2$  a  $OH^-$  (Ghiselli y col., 2000). Estos sistemas de defensa antioxidante funcionan coordinadamente de forma muy eficiente y su misión es proteger la homeostasis celular frente a la disrupción oxidativa causada por los radicales libres.

De forma simplificada, los antioxidantes se pueden clasificar en:

## Antecedentes bibliográficos

A) Enzimáticos: constituidos por enzimas o sistemas enzimáticos.

3.2.1- Superóxido dismutasa (SOD).

3.2.2- Catalasa (CAT).

3.2.3- Glutation peroxidasa (GPx) y glutacion reductasa (GR).

3.2.4- Otras enzimas.

B) No enzimáticos:

3.2.5- Glutation.

3.2.6- Vitamina E.

3.2.7- Vitamina C.

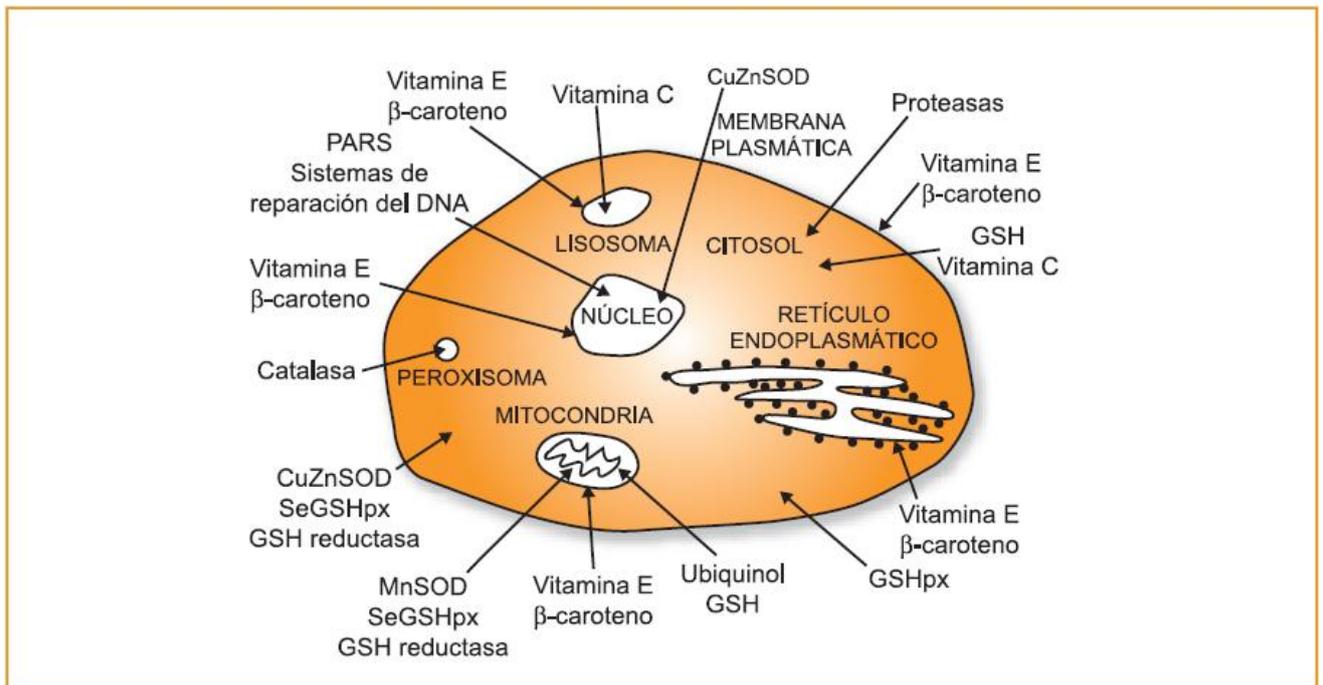
3.2.8- Carotenoides.

3.2.9- Oligoelementos.

3.2.10- Coenzima Q.

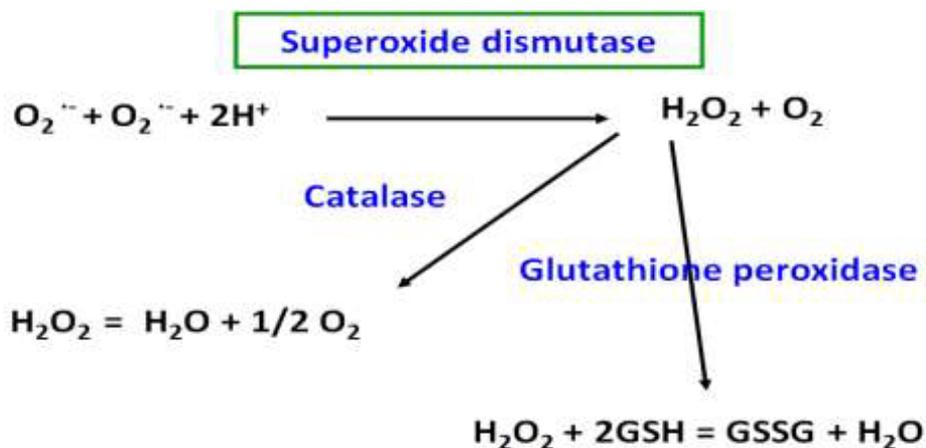
3.2.11- Ácido  $\alpha$ -lipoico.

3.2.12- Otras sustancias.



**Figura 6.** Sistemas de defensa antioxidante intracelulares. CuZnSOD: CuZn superóxido dismutasa; GSH: glutatión; GSH reductasa: glutatión reductasa; GSHpx: glutatión peroxidasa; MnSOD: Mn superóxido dismutasa; PARS: poli(ADP-ribosa) sintetasa; SeGSHpx: glutatión peroxidasa dependiente de selenio (Martínez Cayuela, 2010).

### 3.2.1 Superóxido dismutasa

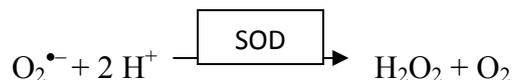


La enzima superóxido dismutasa fue descrita por McCord y Fridovich en 1968. Está presente en la mayoría de los organismos aerobios y contiene en su estructura metales esenciales para su función catalítica, según los cuales hay varios tipos que catalizan la misma reacción (Gutteridge y Halliwell, 1994; Barbi de Moura y col., 2010).

| METAL PRESENTE                  | ORGANISMOS                              | LOCALIZACIÓN SUBCELULAR       |
|---------------------------------|---|-------------------------------|
| <b>Cobre y Zinc (Cu/Zn SOD)</b> | Células eucariotas nucleadas            | Citosol, núcleos, peroxisomas |
| <b>Manganeso (Mn SOD)</b>       | Bacterias y células aerobias eucariotas | Mitocondrias y citosol        |
| <b>Hierro (Fe SOD)</b>          | Bacterias y plantas                     | (No en humanos)               |

**Tabla 4.** Tipos de SOD (modificado de Gutteridge y Halliwell, 1994).

Los metales de la SOD reaccionan con  $\text{O}_2^{\bullet -}$  y con  $\text{H}^+$ , para formar  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}_2$ . La escisión no enzimática del  $\text{O}_2^{\bullet -}$  tiene lugar a pH 7.4, pero la enzima la acelera 10.000 veces (Fridovich, 1974):



La SOD debe actuar en conjunto con otras enzimas que descompongan el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , porque puede éste formar  $\text{HO}^{\bullet}$  cuando contacta con iones metálicos produciendo daño

## Antecedentes bibliográficos

tisular. A su vez altos niveles de  $H_2O_2$  pueden inhibir a la enzima (Cheeseman y Slater, 1993; Melov, 2002). Hay varios subtipos de SOD: En humanos, la Mn SOD mitocondrial o  $SOD_2$  elimina el  $O_2^{\bullet -}$  producido por la cadena de transporte de electrones y por las oxidasas de dicho orgánulo celular. Aunque su actividad no es superior al 15%, constituye un orgánulo indispensable para la viabilidad celular. Sin embargo, existen estímulos que reprimen la expresión de la  $SOD_2$ , como puede ser la acetilación de los intrones del gen responsable de su producción (Maehara y col., 2002); y otros, como el entrenamiento, que la aumentan (Morillas-Ruiz, 2010).

Por otra parte, la SOD Cu/Zn o  $SOD_1$  elimina el  $O_2^{\bullet -}$  de oxidasas citosólicas y de las enzimas del citocromo  $P_{450}$  presentes en el retículo endoplásmico de la célula. Aún así, aparte de encontrarse mayoritariamente en el citosol y el núcleo de las células eucarióticas, algunas SOD Cu/Zn pueden estar presentes en los peroxisomas o incluso en fluidos extracelulares (pasándose a denominar en este caso  $SOD_3$  o Ec-SOD), como por ejemplo los vasos alveolares del pulmón, donde parece tener un efecto protector (Rojkind y col., 2002). El gen humano que codifica la SOD Cu/Zn se encuentra en el cromosoma 21; por lo que los individuos con síndrome de Down (trisomía en este cromosoma), presentan una sobreproducción de  $H_2O_2$  a partir del cual se puede formar el radical hidroxilo que resulta extremadamente nocivo. El átomo de Cu es esencial para la actividad catalítica de la enzima, mientras que el de Zn le proporciona estabilidad.

### 3.2.1.1 Homeostasis del cobre en el ser humano

Varios estudios bioquímicos sobre la esencialidad del Cu han mostrado que varias proteínas muestran una actividad óxido-reductasa dependiente de la presencia de cobre. El papel del Cu en estas enzimas reside en su capacidad para actuar como intermediario en la transferencia de electrones. El Cu es un cofactor esencial para la actividad catalítica de la lisil oxidasa, tirosinasa, ceruloplasmina (Cp), citocromo Coxidasa (COX) y la ya citada SOD Cu/Zn.

La COX es un complejo proteico de la membrana interna de la mitocondria que cataliza la reducción del oxígeno molecular a agua, utilizándose la energía libre de esta reacción para generar un gradiente de protones de transmembrana durante la respira-

## Antecedentes bibliográficos

ción. La Cp es una multicobre oxidasa que contiene más del 90-95% del Cu presente en el plasma de las especies vertebradas.

### 3.2.1.2 Requerimientos

Diversos organismos internacionales han establecido ingestas recomendadas de Cu. La ingesta adecuada de Cu según el Instituto de Medicina de EE.UU. es de 200  $\mu\text{g}$  diarios para los lactantes de 0-6 meses de edad y 220  $\mu\text{g}$  entre los 7 y los 12 meses. La ingesta recomendada diaria es de 340  $\mu\text{g}$  entre 1 y 3 años, 440  $\mu\text{g}$  a los 4-8 años, 700  $\mu\text{g}$  a los 9-13 años, 890  $\mu\text{g}$  entre 14 y 18 años, y 900  $\mu\text{g}$  para los mayores de 18 años. La ingesta diaria recomendada para la embarazada es de 1.000  $\mu\text{g}$ . La ingesta diaria superior tolerable de Cu propuesta es de 1.000  $\mu\text{g}$  entre 1 y 3 años, 3.000  $\mu\text{g}$  a los 4-8 años, 5.000  $\mu\text{g}$  a los 9-13 años, 8.000  $\mu\text{g}$  entre los 14 y los 18 años, y 10.000  $\mu\text{g}$  después de los 18 años (Ralph y McArdle, 2001). Otras fuentes reportan una ingesta recomendada de 1'5-3 mg para adultos (Ruiz-López y col., 2000).

Los niños desnutridos poseen un riesgo elevado de desarrollar una deficiencia de Cu ya que suelen reunir varios de los factores condicionantes tales como prematuridad, corta lactancia materna, alimentación en base a leche de vaca (ésta presenta un menor contenido de Cu y más baja absorción en comparación con la leche humana) sin modificaciones y diarreas repetidas. La embarazada presenta requerimientos de Cu aumentados debido al aumento de ciertos tejidos maternos, el contenido de la placenta y las necesidades del feto. Si bien la deficiencia de Cu es infrecuente en esta situación, puede afectar al normal desarrollo embrionario o fetal, por lo que es fundamental asegurar una ingesta adecuada de Cu durante este periodo.

### 3.2.1.3 Metabolismo o biodisponibilidad

La absorción del Cu tiene lugar en duodeno y yeyuno, aunque una pequeña fracción es absorbida en el estómago. La fracción de Cu absorbido varía normalmente entre un 40 y un 60%. Cuanto mayor es su solubilidad, más eficiente es su absorción. El pH gástrico tiene un papel importante al facilitar la solubilidad del Cu y al modular la interacción con otros componentes del bolo dietético. Favorecen su absorción: la proteína animal, la leche humana y la histidina. Por el contrario, retrasan su absorción:

## Antecedentes bibliográficos

la leche de vaca, fitatos/ácido ascórbico (demostrado en animales), fructosa, Zn, Fe, Ni y Mo (Lonnerdal y Uauy, 1998; Veum y col., 2009).

En la célula intestinal, el Cu es captado por el transportador DMT1 (50-55%) y el transportador hCTR1. En la membrana apical existen oxido-reductasas que reducen el  $\text{Cu}^{+2}$  a  $\text{Cu}^{+1}$ , siendo de esta manera captado por otros transportadores no saturables. Bajo condiciones de deficiencia, la principal función de la célula es captar el metal y entregarlo por la membrana basolateral hacia la circulación para ser utilizado por los distintos órganos. En cambio, cuando el contenido de Cu interno es alto, la célula capta una menor concentración del metal. A ingestas bajas, la absorción ocurre probablemente por un transporte activo saturable, mientras que a ingestas altas juega un papel importante la difusión pasiva.

El Cu plasmático (unido a histidina o, sobre todo, a albúmina) entra a la célula a través de los transportadores Ctr1 o DMT1. Una vez en el citosol, dependiendo de las necesidades de la célula, el Cu puede ser almacenado en la metalotioneína o ser distribuido por las distintas chaperonas (HAH1, Ccs, Cox17) hacia los distintos orgánulos o enzimas para su utilización. Esta es la forma como puede ser entregado al aparato de Golgi, la mitocondria o a la SOD Cu/Zn. La ATPasa de Wilson se localiza en la membrana del aparato de Golgi y permite la entrada del metal al mismo a fin de ser enviado a los lisosomas para su posterior liberación al plasma o eliminación por los canalículos biliares. El tejido hepático remueve el Cu desde la circulación, atrapándolo con proteínas quelantes que lo transfieren a cuproenzimas y a ceruloplasmina. El Cu es devuelto a la circulación extrahepática unido principalmente a ceruloplasmina. Una proporción del mismo es almacenada en hígado unida a la metalotioneína, superóxido dismutasa y otras proteínas ligantes, mientras que el exceso es excretado hacia la bilis. La eliminación del Cu ocurre principalmente por excreción biliar o como Cu no absorbido por las heces. Las pérdidas por el sudor, menstruación u orina son mínimas. Además, una proporción importante del Cu ingerido no es absorbida y sólo un 10-15% del Cu eliminado por la vía biliar es reabsorbido (Peña y col., 1999).

Los niveles de Cu y ceruloplasmina experimentan cambios. Durante los 4-6 primeros meses de vida sus concentraciones son bajas. Por otra parte, se sabe que las mujeres adultas presentan valores más elevados que los hombres. Durante el embarazo

## Antecedentes bibliográficos

hay un aumento progresivo de las concentraciones séricas/plasmáticas de Cu y ceruloplasmina. El efecto mediado por los estrógenos puede explicar en parte este aumento. Se da también un aumento de las concentraciones de Cu y ceruloplasmina en los procesos inflamatorios/infecciosos, neoplasias y terapia con anticonvulsivantes o estrógenos. Sin embargo, los corticosteroides y la hormona adrenocorticotropa (ACTH) reducen los niveles de Cu. Por otro lado, las concentraciones de Cu y ceruloplasmina se encuentran disminuidas en otras patologías tales como la enfermedad de Wilson y el síndrome nefrótico.

### 3.2.1.4 Déficit

La deficiencia adquirida de Cu es el principal problema de salud relacionado con este mineral. Ocurre sobre todo en lactantes (por el menor tamaño relativo del hígado y a sus elevados requerimientos), aunque también ha sido descrita en otras edades y es la consecuencia de depósitos de Cu disminuidos al nacer, consumo de dietas con bajo contenido de Cu y/o baja biodisponibilidad, aumento de las necesidades (crecimiento, embarazo) y aumento de las pérdidas. Además, esta deficiencia se ha descrito en sujetos con síndromes de malabsorción como la enfermedad celiaca, esprue tropical y no tropical, fibrosis quística o intestino corto. Las manifestaciones clínicas más frecuentes de la deficiencia de Cu son anemia, neutropenia y alteraciones óseas. La anemia es de tipo normocítico o macrocítico, normo o hipocroma, que se acompaña de un recuento de reticulocitos disminuido e hipoferremia. En la médula ósea se aprecian cambios megaloblásticos, vacuolización de los precursores mieloides y eritroides, detención de la maduración de precursores mieloides y presencia de sideroblastos anillados.

Las alteraciones óseas pueden semejar a las observadas en el escorbuto e incluyen osteoporosis, fracturas de huesos largos y costillas, separación de las epífisis, desflecamiento y deformación en copa de las metáfisis.

La *enfermedad de Menkes* es una deficiencia de Cu debida a un defecto genético recesivo ligado al cromosoma X, en el que existe un defecto del gen que codifica la proteína transportadora ATP7A, que desencadena una alteración de la absorción y transporte de Cu, quedando este mineral atrapado dentro del enterocito. Los síntomas

## Antecedentes bibliográficos

aparecen antes del tercer mes de edad y llevan a la muerte antes de los 5 años de vida (Lonnerdal y Uauy, 1998).

Se caracteriza por retardo del crecimiento, hipotermia, despigmentación del pelo y cutánea, pelo ensortijado en espiral (pili torti), laxitud de piel y articulaciones, dilatación y tortuosidad de grandes arterias, varices venosas, osteoporosis, desflecamiento de las metáfisis, fracturas óseas, formación aumentada de huesos wormianos, distrofia retiniana y daño profundo del sistema nervioso central que incluye retardo mental severo, convulsiones y ataxia.

### 3.2.1.5 Sobrecarga

El exceso de Cu puede ser consecuencia de un defecto genético autosómico recesivo del metabolismo del Cu (enfermedad de Wilson) o de origen ambiental. En la *enfermedad de Wilson*, principal causa de sobrecarga de Cu, existe una ausencia o una disfunción de la ATPasa tipo P denominada ATP7B, que produce una incapacidad del hígado para exportar el Cu a la circulación y para excretarlo por la vía biliar. Se trata de una patología que excepcionalmente aparece antes de los 5 años de edad. Las manifestaciones clínicas dependen del depósito de Cu en órganos específicos, principalmente en hígado, cerebro y córnea (anillo de Kayser-Fleischer). Las formas más frecuentes de presentación de la enfermedad son la de una enfermedad hepática crónica (inflamación, fibrosis, cirrosis) y/o alteraciones neurológicas o psiquiátricas, frecuentemente asociadas a una disfunción renal. La toxicidad crónica de origen ambiental es aún más infrecuente. Ésta suele ocurrir en áreas geográficas muy específicas.

En la India, por ejemplo, casos de cirrosis infantil se han asociado a una ingesta excesiva de Cu derivada del consumo de leche almacenada y/o calentada en recipientes de bronce o Cu. En el Tirol se describieron casos de cirrosis infantil antes de 1974. En dicho lugar existía la costumbre de preparar los alimentos en utensilios de Cu. En ambas regiones, el reemplazo de los recipientes o utensilios de Cu dio lugar a una reducción o eliminación de los casos de cirrosis (Lonnerdal y Uauy, 1998).

### 3.2.1.6 Homeostasis del cinc en el ser humano

## Antecedentes bibliográficos

Las funciones de este bioelemento son: el crecimiento, la inmunidad y la cicatrización. A ello se puede añadir su participación en algunos aspectos del desarrollo psicomotor, en la regulación del apetito y de la composición corporal. De hecho, es indispensable en sistemas enzimáticos que participan en la división celular y multiplicación celular como: deoxitimidín kinasa, ribonucleótido reductasa y adenosín tetrafosfato adenosina sintasa. Además participa en la actividad de la hormona de crecimiento, IGF-1, así como de la prolactina. Y por supuesto, como ya se ha mencionado anteriormente, es indispensable en el mantenimiento de la estabilidad de la SOD Cu/Zn.

### 3.2.1.7 Requerimientos

La ingesta recomendada de Zn para un adulto se sitúa entre 12-15 mg/día para las mujeres y es de 15 mg/día para los hombres. Durante la gestación y la lactancia las necesidades se elevan a 20 mg/día y 25 mg/día, respectivamente (Ruiz-López y col., 2000; Moreiras y col., 2013). Asimismo, los lactantes alimentados con biberón presentan un requerimiento más alto debido a la menor biodisponibilidad de Zn en las fórmulas infantiles (Carruth y col., 1991; National Research Council, 1991).

En aguas de abastecimiento público, la cantidad de Zn, como ocurre con la de otros minerales como Fe y Cu, pueden provenir en parte de la disolución de los terrenos y de la cesión a partir de los materiales de las conducciones. En la Reglamentación Técnico-Sanitaria para el abastecimiento y control de aguas potables de consumo público, se establece un valor guía de 100 µg/L de Zn, informando que a valores superiores de 5 µg/L es probable que aparezcan sabores astringentes, opalescencias y depósitos granulosos.

El procesado de alimentos es una de las principales causas de la pérdida de Zn. El ejemplo más representativo lo constituyen los cereales, donde el contenido del elemento puede reducirse desde un 20 a un 80% cuando son refinados (Conor Reilly, 1980; Linder, 1988; National Research Council, 2001). Por ello, se debe prestar especial atención a las personas vegetarianas, ya que su principal fuente de Zn son los cereales. Si a esto le sumamos la disminuida biodisponibilidad cuando el contenido en fitato es

## Antecedentes bibliográficos

alto, podemos concluir que la absorción y por tanto el estatus de Zn en estas personas es menor que en aquellas no vegetarianas (National Research Council, 2001).

### 3.2.1.8 Metabolismo o biodisponibilidad

La mayoría del Zn se absorbe en el intestino delgado por un proceso transcelular, teniendo el yeyuno la mayor velocidad de transporte. Se trata de un proceso activo saturable que requiere ATP, existiendo un aumento de la velocidad de transporte en la depleción de Zn. Sin embargo, con ingestas elevadas de Zn a veces se realiza un transporte no saturable, probablemente de tipo paracelular. Desde el intestino es transferido vía portal unido mayoritariamente a la albúmina (70%) y a la  $\alpha$ 2-macroglobulina (20-40%). Existen otras proteínas que son capaces de ligar Zn, como la transferrina y una glicoproteína rica en histidina. El lumen intestinal es el principal sitio al cual se excreta el Zn a través de las secreciones pancreática, intestinal y biliar. Algunos componentes de la dieta como fitatos y fibra forman compuestos de baja solubilidad con Zn, reduciendo la proporción de Zn absorbida. Otros ligandos, como histidina, metionina y cisteína, favorecen su captación.

La acumulación de Zn en la célula es la suma de procesos de entrada y salida vía proteínas transportadoras, tales como los transportadores ZnT1, ZIP o DMT1; y de proteínas de almacenamiento, principalmente la metalotioneína (MT) que es el más abundante grupo de proteínas intracelulares que unen Zn en las células de eucariotas. Entre el 5 y el 10% del Zn en el hepatocito se encuentra unido a MT.

El Zn liberado en los capilares mesentéricos es transportado hasta el hígado. La proteína transportadora más relevante es la albúmina, (el 70% del Zn se encuentra unido a ella), mientras que el resto del metal se adhiere a la alfa-2-macroglobulina, transferrina y algunos aminoácidos como cisteína e histidina. La cantidad de Zn que pasa a sangre no solo depende de la concentración intracelular de éste, sino también de la albúmina disponible. El Zn que llega a las células se une a MT, que es rápidamente activada en hígado, riñón, páncreas e intestino por exposición a altas dosis de metales pesados, especialmente Zn y Cd.

## Antecedentes bibliográficos

Los diferentes tejidos captan de la sangre cantidades variables del ión, siendo el hígado el órgano que presenta una mayor captación, seguido de hueso, piel, riñón y timo (Mataix, 2009). El Zn localizado en eritrocitos, músculo, pelo y testículos se intercambia a mayor velocidad que el que se encuentra en esqueleto y dientes (Rubio y col., 2007).

Los glucocorticoides disminuyen los niveles plasmáticos de Zn e incrementan la captación hepática. A nivel sanguíneo, además de localizarse en los hematíes, este metal también se haya en leucocitos y plasma. El contenido en los glóbulos rojos se atribuye principalmente al contenido en anhidrasa carbónica de estas células, que responde al mayor porcentaje del metal en sangre que en plasma, aproximadamente diez veces más (Rubio y col., 2007). El Zn aparece aumentado en estas células cuando la persona padece anemia megaloblástica, leucemia crónica, linfoblástica, monocítica aguda y en metaplasia mieloidea. En varias enfermedades se ha observado una relación recíproca entre los niveles de Zn en eritrocitos y en leucocitos; de tal manera que en pacientes con afecciones los leucocitos poseen valores bajos del mineral, mientras que los valores eritrocitarios son altos (Wintrobe, 1979). El contenido de Zn en los leucocitos se atribuye a la enzima fosfatasa alcalina, también rica en este ión (Mataix, 2005).

Al contrario que otros iones, el Zn no se almacena en el organismo, sino que el exceso es eliminado. Las mayores pérdidas de Zn son a través de heces, orina, descamación de las células epiteliales y sudoración. Las pérdidas endógenas intestinales pueden variar de 0,5mg/día a 3mg/día (a mayor ingesta, mayores pérdidas). Las pérdidas renales se ven incrementadas en pacientes con nefrosis (proteinuria), alcoholismo y cirrosis hepática, sin olvidar los estados de estrés metabólico (Rubio y col., 2007), además del catabolismo muscular. El ejercicio intenso y las elevadas temperaturas aumentan las pérdidas por transpiración.

### **3.2.1.9 Déficit**

Las consecuencias clínicas de una deficiencia severa de Zn en humanos son: anorexia, retardo del crecimiento, maduración sexual y ósea tardía, lesiones cutáneas, diarrea, alopecia, deterioro del apetito (pérdida de gusto y olfato), aumento de la frecuencia de infecciones por defecto del sistema inmunitario, ceguera nocturna,

## Antecedentes bibliográficos

trastornos en la cicatrización y cambios en el comportamiento. Los efectos de una deficiencia leve de Zn todavía no están claros puesto que sólo se ha experimentado en animales. Algunos estudios han demostrado que la deficiencia de Zn está asociada con complicaciones del embarazo y el parto, como la preclampsia y la ruptura prematura de membranas (Caulfield, 1989; Naem y col., 2014). Además, la deficiencia de este catión incrementa el contenido celular de hierro ferroso, que cataliza la producción de radicales libres.

La ceguera nocturna típica de deficiencia de Zn parece deberse a la depleción de las retinal y retinol deshidrogenasas, pero además se ha demostrado que el Zn participa en el mantenimiento de la integridad de la retina (Mataix, 2009). El déficit de Zn eleva los niveles plasmáticos de glucocorticoides. Este fenómeno causa depleción de las células B de la médula ósea y atrofia del timo. Como consecuencia de esto, se altera el sistema inmunitario ya que se produce una disminución de la capacidad de respuesta mediada por células y anticuerpos (Mataix, 2009). Las quemaduras, alteraciones renales, nutrición parenteral o hemodiálisis son situaciones que provocan déficit de Zn.

### 3.2.1.10 Sobrecarga

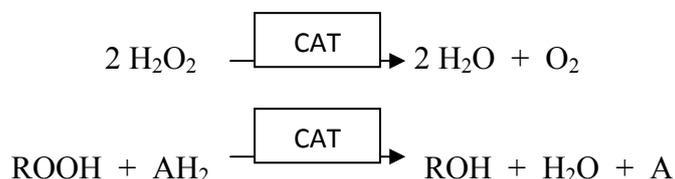
El Zn es el oligoelemento menos tóxico y su margen de seguridad es muy amplio. Aún así, el efecto tóxico más relevante por una suplementación de altas dosis de Zn es la interferencia y disminución del estatus corporal de Cu (Bodgen, 2004; Willis y col., 2005), lo que puede dar lugar a una anemia por deficiencia de este otro metal. Un elevado consumo de Zn aumenta el riesgo de padecer cáncer de próstata, inhibe los efectos beneficiosos de los bifosfonatos, incrementa los niveles de testosterona y colesterol, reduce los niveles de HDL plasmático y puede fomentar una disfunción inmune (Moyad, 2004). Erosión gástrica, alteraciones gustativas (sabores metálicos), dolor de cabeza, náuseas y vómitos también pueden ser resultado de un exceso de Zn (Mataix, 2009).

### 3.2.2 Catalasa

Esta enzima se encuentra principalmente localizada en los peroxisomas (80%) y en el citosol (20%), aunque también se halla en la mitocondria del tejido cardíaco a baja

## Antecedentes bibliográficos

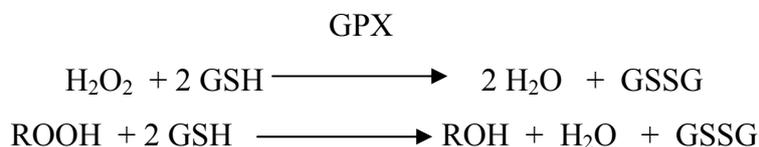
concentración (Roberfroid y Buc-Calderon, 1995) donde ejerce un importante papel antioxidante (Radi y col., 1993). La catalasa elimina el  $\text{H}_2\text{O}_2$  rompiéndolo directamente hasta  $\text{O}_2$ . También posee actividad peroxidante (Aebi, 1984) produciendo la oxidación de donadores de hidrógeno como el etanol, metanol, ácido fórmico y fenoles:



La catalasa requiere que el ión  $\text{Fe}^{3+}$  se una a su sitio activo para poder ser eficaz. En cualquier caso, su afinidad por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  es baja por lo que requiere elevadas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  para actuar, lo que la convierte en la enzima más relevante en la respuesta adaptativa celular frente a condiciones de estrés oxidativo (Cheeseman y Slater, 1993; Roberfroid y Buc-Calderon, 1995). Además, al encontrarse ésta mayoritariamente en los peroxisomas, la glutatión peroxidada es más efectiva que la CAT frente al  $\text{H}_2\text{O}_2$  producido en compartimentos como el citosol o la mitocondria (Ji, 1995).

### 3.2.3 Glutatión peroxidasa y glutatión reductasa

La glutatión peroxidada comporta una familia de enzimas localizadas fundamentalmente en citosol (y mitocondria) que utilizan glutatión (GSH) como donador de hidrógeno y que pueden aceptar otros peróxidos orgánicos además del  $\text{H}_2\text{O}_2$  como sustratos (Flohé y Gunzler, 1984; Wendel, 1993; McCord, 2000).



Por lo tanto, la glutatión peroxidada en humanos es la mayor enzima eliminadora de peróxidos (Rojkind y col., 2002). La regeneración del glutatión oxidado es efectuada por la enzima glutatión reductasa (GR) que utiliza NADPH como agente reductor y flavina adenina dinucleótido (FAD) como cofactor; siendo de esta manera esencial para la correcta función antioxidante de la GPx:



En la mayoría de los tejidos el NADPH es producido a través de la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa en la ruta de las pentosas fosfato. La GPx tiene mayor afinidad por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que la catalasa (Roberfroid y Buc-Calderon, 1995) y presenta una mayor actividad que ésta a bajas concentraciones. Esto podría significar que la GPx está más adaptada a eliminar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido en la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Se trata de una enzima selenio dependiente que puede reducir peróxidos lipídicos, por tanto es muy importante en el mantenimiento de la estructura y función de las membranas biológicas (McCord, 2000; Barbi de Moura y col., 2010).

### 3.2.4 Otras enzimas

- Tiorredoxina reductasa: es un tipo de peroxirredoxina que juega un papel fundamental en la regulación del estado redox intracelular por la reducción de proteínas oxidadas y por su actividad peroxidasa (Hoffmann y col., 2002).
- Citocromo-C-oxidasa: impide el escape de radicales fuera de la cadena respiratoria.
- Fosfolipasa A<sub>2</sub>: tiene un papel importante en la eliminación de lípidos oxidados.

### 3.2.5 Glutation

Se trata del antioxidante no enzimático de bajo peso molecular más abundante en las células de mamíferos y constituye la mayor fuente no proteica de grupos tiol en las células. Se sintetiza mayoritariamente en el hígado y su contenido en los tejidos va a estar en el rango del milimolar (mM). Su forma reducida (GSH) se encuentra a una concentración 10-100 veces superior que su forma oxidada (GSSG). De hecho, la proporción GSH/GSSG se encuentra estrictamente regulada en la célula (la oxidación del GSH se da en el eritrocito mayoritariamente) y su alteración conduce a la activación de algunas rutas de señalización intracelulares que inciden sobre el ciclo celular (Klaunig y Kamendulis, 2004).

## Antecedentes bibliográficos

El glutatión o  $\gamma$ -glutamil-cisteinil-glicina es una molécula tripéptica esencial en la defensa antioxidante de la célula, debido principalmente a que actúa como cofactor de varias enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa (ya explicada con anterioridad) o la glutatión transferasa, que elimina xenobióticos y productos de la peroxidación lipídica como el 4-HNE.

Por otro lado, el glutatión es capaz de capturar y neutralizar directamente radicales  $\text{OH}^\bullet$  y  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , regenerar importantes especies antioxidantes como las vitaminas E y C (por su potencial reductor), mantiene en el núcleo el estado redox de proteínas con grupos sulfhidrilo críticas en los procesos de expresión y reparación del ADN, y participa en el transporte de aminoácidos a través de la membrana celular (Valko y col., 2006).

### 3.2.6 Vitamina E

Cuando hablamos de la vitamina E nos estamos refiriendo en realidad a un conjunto de 8 nutrientes liposolubles diferentes (tocoferoles), siendo el  $\alpha$ -tocoferol el de mayor actividad biológica y el predominante en muchas especies. Se encuentra principalmente en la membrana celular asociada a las zonas más fluidas de la bicapa fosfolipídica, cerca de los AGPI, y su centro activo se relaciona con el grupo 6-OH mientras que su cola fitilo es la responsable del transporte y anclaje dentro de las membranas.

Al principio se sugirió que los tocoferoles podrían encargarse de la eliminación de radicales en zonas más externas de la membrana mientras que el coenzima Q actuaría en la zona interior hidrofóbica, algo que se constató posteriormente (Yasukazu y col., 2007; Constantinou y col., 2008).

La vitamina E actúa como antioxidante biológico, constituyendo gran parte de la capacidad antioxidante liposoluble del plasma humano y de los eritrocitos. En consecuencia, la protección frente a la peroxidación lipídica es considerada su principal función en la célula. Sin embargo, interviene también en otros procesos como por ejemplo la agregación plaquetaria, la hemólisis o la actividad de ciertas enzimas (creatinina kinasa o xantina oxidasa). Es además termorresistente y fotosensible.

## Antecedentes bibliográficos

El tocoferol reacciona con varios tipos de EROs como puede ser el radical peroxilo. De esta manera, actúa rompiendo las reacciones en cadena de lipoperoxidación mediante la transferencia de un átomo de hidrógeno al radical o a un lípido. La clave está en que los radicales peroxilo reaccionan con otros lípidos a una velocidad aproximada de 50 mol/s, mientras que con el tocoferol reaccionan unas 100 veces más rápido. Así pues, este radical generado es lo suficientemente estable como para que no continúe la cadena de eventos peroxidativos, siendo retirado del ciclo y reciclado mediante la acción de dos posibles moléculas, el ácido ascórbico y el coenzima Q (Ramírez Tortosa y Quiles Morales, 2010). En relación con la reversibilidad de la formación de radicales libres de tocoferol, es probable que el dador de hidrógeno sea hidrosoluble y que el radical en cuestión se elimine de la membrana hacia el compartimento acuoso de la célula. Por ello se cree que el  $\alpha$ -tocoferol y el ácido ascórbico cooperan en una reacción antioxidante cíclica que protege a la célula principalmente frente a la peroxidación lipídica (Valko y col., 2006; Constantinou y col., 2008). Esta forma de actuación podría explicar su efecto protector sobre las membranas de eritrocitos y células nerviosas (ricas en AGPI), que son curiosamente las más afectadas en situaciones de déficit de vitamina E.

De estas propiedades deriva la implicación de la vitamina E en distintos procesos patológicos como enfermedades cardiovasculares, cáncer, hemólisis, diabetes, cataratas, Alzheimer o alteraciones de la respuesta inmunológica y anomalías neuromusculares (Halliwell y Gutteridge, 1999).

### 3.2.7 Vitamina C

La vitamina C o ácido ascórbico (ascorbato) es un importante antioxidante hidrosoluble que protege del daño oxidativo a los lípidos de membrana, al ADN y a los grupos amino de las proteínas gracias a su poder reductor. La mayor parte de la vitamina C se encuentra libre en el citoplasma celular y es capaz entre otras cosas de inhibir la adhesión de células mononucleares al endotelio, evento de especial relevancia en la aterosclerosis y en patologías inflamatorias. También tiene un efecto antioxidante al ser transportada en los leucocitos, sobre todo durante procesos inflamatorios e infecciosos; al capturar directamente determinados radicales o al regenerar la vitamina E como ya se ha visto anteriormente.

## Antecedentes bibliográficos

Sin embargo, algunos estudios *in vitro* sugieren que el ácido ascórbico puede tener también un efecto pro-oxidante en presencia de iones metálicos como el Fe o el Cu, ya que los mantiene en estado reducido permitiendo así la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u otros radicales por la reacción de Fenton o la aparición de roturas de la hebra de ADN así como modificaciones de las bases nitrogenadas (Ramírez Tortosa y Quiles Morales, 2010). No obstante, este comportamiento se limita a aquellas situaciones no fisiológicas en las que se observa una contaminación del medio por iones metálicos ya que en situaciones fisiológicas no patológicas no hay ni Fe ni Cu libres en los fluidos extracelulares (Valko y col., 2006; Eun-Sun y Bowen, 2007). Aún así, la capacidad de reducir iones metálicos cobra especial relevancia en diversas situaciones como la anemia, ya que la vitamina C aumenta la absorción del Fe al transformarlo en su forma reducida que es más fácilmente absorbible.

Por otra parte, el ascorbato parece influir en la modulación de algunos componentes hormonales del sistema nervioso así como en la síntesis de sustancias del tejido conectivo. En este sentido, una disminución en el organismo de la capacidad de síntesis de colágeno es derivada de una deficiencia de vitamina C, lo que origina fragilidad capilar, problemas en la cicatrización, edema, dolores articulares y caída de las piezas dentales; enfermedad conocida como ‘escorbuto’. Además, la vitamina C, esencial en el ser humano al no poder ser sintetizada, es importante en el desarrollo de ciertos tipos de cáncer pero su relación con diversas enfermedades cardiovasculares, cataratas o resfriado común está en cuestión (Halliwell y Gutteridge, 1999; Shaik-Dasthagirisaheb y col., 2013).

### 3.2.8 Carotenoides

Son un conjunto de antioxidantes biológicos, precursores algunos de ellos de la vitamina A o retinol, que poseen 9 o más dobles enlaces conjugados (responsables de sus propiedades antioxidantes) capaces de neutralizar O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, OH<sup>-</sup> y otros radicales. De esta manera, al igual que hace la vitamina E, el β-caroteno es capaz de inhibir la lipoperoxidación de las membranas. Al ser sustancias liposolubles, se suelen encontrar en la membrana celular y en la parte externa de las lipoproteínas. Cabe destacar que, como ocurre con la vitamina C, el β-caroteno puede actuar como antioxidante y como

## Antecedentes bibliográficos

prooxidante: el radical carotenoide formado tras la transferencia electrónica a los diversos radicales libres durante el proceso de detoxificación puede reaccionar con el oxígeno molecular dando lugar a un radical peroxilo que induce la oxidación de ácidos grasos insaturados. Así pues, parece ser que a altas presiones de oxígeno los carotenoides pierden su actividad antioxidante adquiriendo incluso propiedades prooxidantes (Valko y col., 2006; Eun-Sun y Bowen, 2007).

### 3.2.9 Oligoelementos

Además del Cu y el Zn, hay otros elementos considerados antioxidantes:

- Selenio (Se): su papel como antioxidante es fundamental al formar parte de las ‘selenoproteínas’, las cuales participan en el mecanismo de defensa antioxidante (como por ejemplo la GPx). Además, el Se participa directamente en el reciclaje del tocoferol o vitamina E, completando así su ciclo antioxidante.
- Manganeseo (Mn): el Mn tiene especial relevancia en el pleno antioxidante al formar parte de la SOD<sub>2</sub> mitocondrial que elimina los RLs producidos en la mitocondria.

### 3.2.10 Coenzima Q

La ubiquinona, ubiquinol o CoQ es el único antioxidante biosintetizado en el organismo. Parece estar localizada en el plano medio de la bicapa lipídica, con la cabeza polar oscilando transversalmente de un lado a otro de la membrana. Este movimiento transversal de la ubiquinona parece ser el responsable de las interacciones con los radicales de los lípidos, deteniendo así la cadena de propagación del daño peroxidativo. La coenzima Q<sub>10</sub> aportada exógenamente protege a las células del estrés oxidativo tras ser reducido por acción de reductasas presentes en distintas fracciones celulares y se acumula en la mitocondria en forma de cationes, previniendo la peroxidación lipídica y protegiendo frente el estrés oxidativo. Tales propiedades antioxidantes derivan del anillo fenólico que presenta su estructura. Además, el ubiquinol participa, junto al ácido ascórbico, en el proceso de regeneración de la vitamina E por vía dependiente del sistema NADPH (Genova y col., 2003).

## Antecedentes bibliográficos

Su estructura isoprenoide nos recuerda que se forma endógenamente por la misma vía que lo hace el colesterol gracias a la hidroximetilglutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa). De este modo, cuando se están utilizando fármacos inhibidores de la HMG-CoA reductasa en el tratamiento de la hipercolesterolemia, se puede originar situaciones carenciales de coenzima Q.

### 3.2.11 Ácido $\alpha$ -lipoico

Debido a su capacidad de ceder electrones, es un buen antioxidante. Se encuentra en la membrana mitocondrial interna. El ácido  $\alpha$ -lipoico exógeno libre puede participar en la regeneración de las vitaminas C y E al reducirse, tras la ingesta, a ácido dihidrolipoico (DHHLA) que es en sí mismo un potente antioxidante (Packer, 1994; Powers y Hamilton, 1999). Por otro lado, no presenta efectos tóxicos conocidos.

### 3.2.12 Otras sustancias

- Flavonoides: Son compuestos polifenólicos ampliamente presentes en numerosos vegetales que actúan como quelantes finales de iones metálicos e interfieren en el proceso de peroxidación lipídica donando rápidamente un hidrógeno a los radicales, lo que lleva a la formación de un fenoxi-radical muy estable y no reactivo (Halliwell, 2008). A pesar de ello, los flavonoides, bajo ciertas circunstancias, como altas concentraciones de antioxidantes fenólicos, presencia de iones metálicos o un pH elevado; pueden comportarse como sustancias pro-oxidantes. Flavonas, flavanonas, flavonoles, catequinas, antocianos o antocianidinas constituyen este amplio grupo. Su uso para prevenir enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer ha aumentado el interés por su estudio (Rivas Gonzalo y García Alonso, 2002).

- Proteínas no enzimáticas: *transferrina* y *ferritina*, responsables del transporte y almacenamiento de los depósitos de Fe (si fallan podría quedar libre actuando como prooxidante); *ceruloplasmina*, encargada de incorporar el Cu a la célula además de tener la capacidad de oxidar el Fe, lo que impediría su acción prooxidante; *albúmina*, que también transporta Cu al igual que la ceruloplasmina y hace frente a la peroxidación lipídica; y las *chaperonasoproteínas de choque térmico*, que tienen una actividad

## Antecedentes bibliográficos

protectora sobre las proteínas en situaciones de estrés oxidativo (Cea Bonilla y col., 2002).

- Taurina: es un  $\beta$ -aminoácido que se acumula en el interior de las células eucarióticas. Su relevancia reside en su capacidad de captación de RLs transformándolos en sustancias menos nocivas, así como su participación en reacciones de conjugación de xenobióticos. Este aminoácido es especialmente abundante en los neutrófilos.

- Ácido úrico: aunque se produce en las células animales por el catabolismo de las bases púricas, este compuesto es capaz de interaccionar directamente con los EROs o de acomplejar metales de transición, disminuyendo en ambos casos sus efectos oxidantes.

- Bilirrubina: este producto derivado del metabolismo de las hemoproteínas, al igual que el anterior, es un buen captador de radicales de oxígeno, siendo un eficaz antioxidante al romper las cadenas de lipoperoxidación.

- Los aminoácidos metionina y cisteína: su importancia antioxidante deriva de su implicación en la regeneración de novo de glutatión, hecho de suma importancia para la GPx. Además, la N-acetilcisteína puede actuar como antioxidante en otras situaciones (Miján de la Torre y de Mateo Silleras, 1998).

- Melanina y melatonina: la primera actúa como antioxidante al absorber la luz UV y la visible en todas las longitudes de onda, mientras que la segunda protege del daño oxidativo a numerosos tejidos y órganos (Miján de la Torre y de Mateo Silleras, 1998).

#### **4. Leche de cabra: beneficios para la salud**

La leche es uno de los alimentos más completos desde el punto de vista nutricional, ya que además de ser una buena fuente de macro y micronutrientes, contiene compuestos activos que juegan un papel significativo tanto en 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.

Estamos ante un tipo de leche con unas características nutricionales altamente beneficiosas que le confieren un alto interés como alimento y objeto de investigación. De este modo, la leche de cabra se ha convertido en una alternativa real a la de vaca, sobre todo 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. En esta línea cabe remarcar que la sustitución de la leche de vaca por la de cabra produjo efectos positivos hasta en un 93% de niños con alergia a la leche de vaca, lo cual pone de manifiesto que la leche de cabra es más tolerable y menos alergénica (Bevilacqua y col., 2001; Lara-Villoslada y col., 2004; Sanz Ceballos, 2007).

Además, su consumo habitual ayuda a prevenir y tratar algunas enfermedades y dolencias habituales de nuestra sociedad, tales como anemia (Alfárez y col., 2006), arteriosclerosis y osteoporosis. Recientemente, diversos estudios en niños han demostrado que los resultados obtenidos en cuanto a ganancia de peso, aumento de 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). Aún así, no se puede utilizar como sustituto 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 B<sub>6</sub> y B<sub>12</sub> (Darnton y col., 1987; Zhou y col., 2014).

Se ha demostrado incluso que el consumo de leche de cabra, además de reducir los niveles de LDL y colesterol total, mantiene en el rango fisiológico los niveles de HDL, triglicéridos y transaminasas (Alfárez y col., 2001; López-Aliaga y col, 2005), lo

## Antecedentes bibliográficos

que tiene una alta importancia sobre todo para pacientes con enfermedades cardiovasculares.

Los valores tanto de proteínas como de grasas o de lactosa varían en función de la dieta y la carga genética del animal. La fracción proteica de la leche caprina está más ligada a la genética que a la alimentación del animal, ya que este macronutriente se modifica mucho de una raza a otra (Martin, 1996). Así, la leche de cabra produce un índice de crecimiento superior, con una mejor utilización digestiva y metabólica de la proteína. Además, las caseínas de la leche de cabra son más solubles y por tanto su absorción es mucho más fácil (Boza y Sanz-Sampelayo, 1997; Lamothe y col., 2007).

Por otra parte, la grasa de la leche de cabra también es más digestible (Alferez y col., 2001; Haenlein, 2001), pudiendo ser considerada una fuente excelente de energía en varios procesos metabólicos (Boza y Sanz-Sampelayo, 1997; Sanz Ceballos, 2007), incluso para combatir problemas metabólicos (Babayan, 1981; García Unciti, 1996; Velázquez y col., 1996).

De este modo, muchas de las reacciones adversas que se suelen presentar por el consumo de leche de vaca, concretamente frente a ciertas fracciones proteicas así como intolerancia a la lactosa; se pueden evitar en muchas ocasiones con el cambio a la leche de cabra (Park, 1991). Existen desde hace bastantes años varias pruebas en la literatura científica sobre el beneficio de la leche caprina en problemas de acidez, úlcera de estómago, colitis, problemas hepáticos y biliares, asma, migraña, eccemas y estados de convalecencia.

### 4.1 Características organolépticas

Antiguamente, el fuerte olor que caracterizaba a la leche caprina se producía como consecuencia de la absorción de compuestos aromáticos durante su manejo, algo que ya no sucede gracias a un adecuado tratamiento. Su sabor propio se debe también a los ácidos grasos libres que contiene, especialmente a los de cadena ramificada 4-metiloctanoico y 4-etiloctanoico (Kim Ha y Lindsay, 1991). También contribuyen al mismo las mayores concentraciones de ácidos grasos caproico, caprílico y cáprico.

## Antecedentes bibliográficos

Además, su mayor contenido en cloruro y minerales, le confieren un sabor ligeramente salobre.

El olor de la leche de cabra es atribuido a los ácidos grasos de cadena media. Bajo condiciones normales, estos ácidos se encuentran encapsulados dentro del glóbulo graso, por lo que la leche de cabra adecuadamente manipulada no se distingue de la leche de vaca por el olfato. El problema se daría si la membrana del glóbulo graso se rompiera y liberara estos ácidos. Sin embargo, aunque se rompiera el glóbulo, los ácidos grasos están en forma de triglicéridos por lo que se necesitaría de una lipasa para liberar a los mismos (esto no podría suceder ya que en el proceso de pasteurización se destruyen dichas enzimas). En este punto habría que añadir que una vez rota la integridad de los glóbulos, la leche es más propensa a enranciarse (Chacón, 2005).

Otra de las particularidades organolépticas de la leche de cabra es la ausencia de caroteno, lo que le da un color completamente blanco (a diferencia de la de vaca que posee dicho compuesto que le confiere color a su grasa).

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), razón por la cual la leche de cabra puede incluso utilizarse en personas con problemas de acidez (Jandal, 1996).

## 4.2 Composición

|                        | <b>LECHE CABRA (%)</b> | <b>LECHE VACA (%)</b> | <b>DIFERENCIAS PARA LECHE DE CABRA (%)</b> |
|------------------------|------------------------|-----------------------|--|
| <b>Sólidos totales</b> | 13.57                  | 11.36                 | +16.3                                      |
| <b>Proteínas</b>       | 3.48                   | 2.82                  | +19.0                                      |
| <b>Grasa</b>           | 5.23                   | 3.42                  | +34.6                                      |
| <b>Cenizas</b>         | 0.75                   | 0.65                  | +13.3                                      |
| <b>Lactosa</b>         | 4.11                   | 4.47                  | - 8.8                                      |

**Tabla 5.** Composición de las leches de cabra y vaca (Sanz Ceballos y col., 2009).

## Antecedentes bibliográficos

En la leche de cabra se halla un contenido más alto de componentes sólidos totales, proteína, grasa y minerales (Sanz Ceballos y col., 2009). Incluso cuando estas cantidades son expresadas como materia seca, siguen sobrepasando a los de la leche de vaca, sobre todo en el contenido mineral y lipídico.

No obstante, dependiendo de la raza de las cabras, condicionamientos genéticos, factores medioambientales, momento de la lactación, y sobre todo alimentación; existen variaciones en la composición de la leche.

La modificación de la composición láctea de los rumiantes es difícil debido al proceso de hidrogenación que sufre la grasa de piensos y forrajes en el rumen, hecho que incrementa el contenido de ácidos grasos saturados y reduce el de 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 al aumentar el contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), algo con repercusiones beneficiosas en el metabolismo lipídico humano (Sanz Sampelayo y col., 2004).

### 4.2.1 Porción proteínica

La proteína de leche de cabra es más digestible (Park, 1994; Boza y Sanz-Sampelayo, 1997; Haenlein, 2001; López-Aliaga y col., 2003; Haenlein, 2004; López-Aliaga y col., 2010), y al mismo tiempo más tolerable y menos alergénica que la de la leche de vaca (Bevilacqua y col., 2001; Lara-Villoslada y col., 2004; Sanz Ceballos, 2007). De esta manera, la calidad de la proteína de la leche de cabra es mayor que la de vaca ya que las caseínas de la leche de cabra son más solubles y, por tanto, su absorción es mucho más fácil (Boza y Sanz-Sampelayo, 1997; Lamothe y col., 2007).

Al igual que en la leche de vaca, la fracción proteica mayoritaria de la leche caprina son dichas caseínas, existiendo seis fracciones genéricas de carácter mayoritario:  $\alpha$ s1-caseína,  $\alpha$ s2-caseína,  $\beta$ -caseína,  $\chi$ -caseína,  $\beta$ -lactoglobulinas y  $\alpha$ -lactoalbúminas. Estas caseínas de la leche de cabra están caracterizadas por contener más glicina, así como menos arginina y aminoácidos sulfurados, especialmente metionina (Chacón, 2005).

## Antecedentes bibliográficos

La cantidad de  $\alpha$ 1-caseína es inferior en la leche de cabra (Martin, 1996), siendo superiores las cantidades de  $\beta$ -caseína y  $\chi$ -caseína (Park 2006). Esto tiene especial importancia ya que la  $\alpha$ 1-caseína es una de las principales responsables de la alergia a la proteína de leche de vaca (Bevilacqua y col., 2001).

Además, existen otras proteínas que se encuentran en el lactosuero de la leche de cabra:  $\alpha$ -lactoalbúmina,  $\beta$ -lactoglobulina, albúmina, inmunoglobulinas, péptidos y otras proteínas menores, algunas con carácter enzimático. En este sentido, las  $\alpha$ -lactoalbúminas y las  $\beta$ -lactoglobulinas son menos alergénicas ya que son proteínas termosensibles, por lo que su poder alergénico se inactiva en los procesos de pasteurización y uperización (Chacón, 2005).

Por otra parte, la leche caprina no contiene aglutinina, proteína encargada de agrupar los glóbulos grasos, por lo que sus glóbulos están más dispersos, pudiendo ser atacados más fácilmente por las enzimas digestivas (lipasas) favoreciendo una velocidad de digestión mayor (Chacón, 2005). Esto, sumado al pequeño volumen de dichos glóbulos de la leche de cabra, da como consecuencia la escasa capacidad de dicha leche para formar nata (Chandan y col., 1992).

En cuanto al contenido en aminoácidos, se descubrió que seis de los diez aminoácidos esenciales se encuentran en cantidades superiores en la leche de cabra (Haenlein, 2004).

### 4.2.2 Porción lipídica

El contenido graso de la leche de cabra es superior al de vaca (4,14% vs. 3,34%), más parecido al de la leche humana (4,38%) e inferior al de la leche de oveja (7,00%) (Boza y Sanz Sampelayo, 1997). Tal contenido graso representa una fuente concentrada de energía debido a que una unidad de esta grasa tiene 2,5 veces más energía que los carbohidratos comunes (Chacón, 2006).

## Antecedentes bibliográficos

El menor tamaño de los glóbulos grasos de la leche de cabra hace que sean más accesibles a las lipasas que participan en la digestión lipídica, algo que favorece su mayor digestibilidad (Chilliard, 1996).

Esta acción se ve igualmente potenciada por el mayor contenido en lipoproteína-lipasa (LPL) de esta leche, la cual está a su vez ligada a los glóbulos de grasa facilitando su hidrólisis (en la de vaca la LPL está unida a la caseína) y produciendo un mayor porcentaje de ácidos grasos libres, lo que también contribuye a su mayor digestibilidad (Chilliard, 1996).

Los contenidos en ácidos grasos esenciales y de cadena corta hacen de la leche de cabra un alimento saludable desde un punto de vista cardiaco (Chacón, 2005). Los ácidos grasos de cadena media (C6:0 caproico, C8:0 caprílico, C10:0 cáprico) tienden a proporcionar energía en lugar de formar tejido adiposo, además de disolver los depósitos de colesterol sérico; lo que se relaciona con una menor incidencia de patologías coronarias, fibrosis quística y cálculos biliares (Haenlein, 2004). En esta misma línea, la leche de cabra es por lo tanto más rica en triglicéridos de cadena media (Alfárez y col., 2001; Haenlein, 2001; 2004; Sanz Ceballos, 2007; López-Aliaga y col., 2010), una fuente de energía rápida; ya que se absorben directamente en el intestino delgado proximal al ser fácilmente hidrolizados, no necesitan la participación de las sales biliares para su absorción, no requieren reesterificarse para entrar en la mitocondria y su oxidación mitocondrial es en parte independiente de los niveles de carnitina (Odle, 1997). Por todo ello, estos triglicéridos podrían tener efectos beneficiosos en situaciones metabólicas desfavorables (enfermedades hepáticas o pacientes inmunodeprimidos), en el recién nacido (cuyo metabolismo es aún inmaduro), en nutrición deportiva (por ser una fuente de energía rápida); o incluso en la prevención de la obesidad, ya que al ser rápidamente oxidados en el hígado, estimulan la saciedad y disminuyen los depósitos de grasa (St-Onge y Jones, 2002).

Se ha demostrado también 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; 2010).

## Antecedentes bibliográficos

Por otra parte, el contenido en ácido linoleico conjugado es mayor en la leche de cabra (Sanz Ceballos y col., 2009). Este ácido tiene efecto anticancerígeno (Ip y col., 1999), antiaterogénico (McGuire y McGuire, 2000), y antidiabético (Ryder y col., 2001).

No obstante, modificando el régimen alimentario del animal se puede variar el perfil lipídico de la leche que produce (Chilliard y col., 2007).

### 4.2.3 Porción glucídica

El contenido en oligosacáridos en la leche de cabra es 10 veces superior al de la leche de vaca, los cuales tienen una gran variabilidad estructural que hacen que esta leche sea la más semejante a la humana. Se ha demostrado incluso que los oligosacáridos de la leche de cabra inducen la maduración del epitelio intestinal, disminuyendo pues los problemas asociados a la intolerancia a la lactosa (Martínez-Férez, 2004).

No obstante, el contenido de lactosa en la leche de cabra es más bajo que el de otras leches (aproximadamente entre 1-13% 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). La mayor digestibilidad de dicha lactosa repercute de igual manera en tal efecto.

Otra característica importante de la porción glucídica 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).

### 4.2.4 Composición mineral

Es destacable la mayor cantidad de Ca, P, Mg, Fe, Cu, Zn, K, Cl y Mn en la leche de cabra, siendo a su vez la biodisponibilidad de los mismos mucho mayor.

## Antecedentes bibliográficos

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

**Tabla 6.** Composición mineral de la leche de cabra (Sanz Ceballos y col., 2009).

Por el contrario, la leche de cabra posee un contenido menor de Na y S (Sanz Ceballos y col., 2009).

La leche de cabra favorece la utilización de Fe y Ca, minimizando las interacciones entre ambos minerales y favoreciendo su metabolismo (López-Aliaga y col., 2000). Además, el Fe de la leche de cabra propicia la vuelta a la normalidad de los parámetros hematológicos alterados como consecuencia de la anemia ferropénica nutricional y la recuperación de los depósitos de Fe en órganos diana (Alfárez y col., 2006).

En el más reciente de los estudios llevado a cabo en nuestro grupo de investigación se comprobó que en situación de anemia ferropénica, con la leche de cabra la repleción de los depósitos de Fe fue más eficiente que con la de vaca, ya que se dio una mayor expresión de DMT1 y se encontró una mayor cantidad de hepcidina sérica que propició una recuperación más rápida de los parámetros hematológicos (Díaz-Castro y col., 2014).

En lo que refiere al Cu, además de que su absorción está aumentada con la leche de cabra (López-Aliaga y col., 2010), este mineral mejora a su vez la absorción del Fe al promover la actividad de la hefastina en el enterocito, hecho sumamente beneficioso en caso de anemia ferropénica (Díaz-Castro y col., 2011).

## Antecedentes bibliográficos

Comparativamente, la leche de cabra aporta un 28% más de Ca que la leche de vaca (Sanz Ceballos y col., 2009). La absorción de este mineral está además aumentada debido al mayor contenido en vitamina D de esta leche así como el de lisina, aminoácido relacionado con el transporte pasivo de Ca.

La cantidad de Mg en la leche de cabra también es superior a la de vaca. Incluso, la absorción de este mineral está aumentada con la leche de cabra (López-Aliaga y col., 2003; 2010). Esto puede tener especial relevancia incluso en la integridad del ADN, ya que la leche de cabra tiene un efecto protector sobre éste en comparación con la de vaca durante la recuperación de la anemia ferropénica, entre otras cosas, al ser este mineral un cofactor de numerosas enzimas que protegen el ADN (Díaz-Castro y col., 2010).

Es especialmente relevante que la leche de cabra contenga Se (López-Aliaga y col., 2010), mineral antioxidante que además de ser esencial para el sistema inmunitario, combate en cierto modo las infecciones víricas.

### 4.2.5 Composición vitamínica

La leche de cabra contiene niveles más altos de vitaminas del grupo B que la leche de vaca, a excepción de las vitaminas B<sub>6</sub> y B<sub>12</sub> que están en menor cantidad (Jauber y Kalantzopoulos, 1996). El principal inconveniente de esta leche es su bajo contenido en ácido fólico (vitamina B<sub>9</sub>) en comparación con el de la leche de vaca y la humana. No obstante, el contenido en vitamina C, vitamina D, vitamina A, ácido nicotínico y riboflavina también es superior en la leche de cabra. Este mayor contenido de ácido ascórbico (vitamina C) contribuye a aumentar la absorción del Fe.

Una de las particularidades de esta leche es la ausencia de caroteno, hecho que le confiere su color completamente blanco (a diferencia de la de vaca que posee dicho compuesto que le confiere color a su grasa). Dicho caroteno, precursor de la vitamina A, debe ser convertido por el organismo en la glándula tiroideas. Al encontrar en la leche de cabra directamente la vitamina A completamente disponible para su asimilación sin intervención de dicha glándula, hace que esta leche sea ideal en el caso de niños pequeños cuya actividad tiroidea no está totalmente desarrollada. A esto se le suma el

## Antecedentes bibliográficos

hecho de que la leche de cabra es muy rica en riboflavina, un importante factor de crecimiento (Chacón, 2005).

Por todo ello la leche de cabra es beneficiosa, sobre todo en poblaciones sensibles, como los niños en edad de crecimiento (American Dairy Goat Association, 2004).

| 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           | -             |
| B <sub>1</sub> , mg/L   | 0.5            | 0.1           |
| B <sub>2</sub> , 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           |
| B <sub>6</sub> , mg/L   | 0.5            | 0.7           |
| B <sub>12</sub> , 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         |

**Tabla 7.** Composición vitamínica de la leche de cabra (Chandan y col., 1992; O'Connor, 1994).

### 4.2.6 Factores bioactivos

La concentración de poliaminas (espermidina, espermina y putrescina) en la leche de cabra permanece estable durante todo el periodo de lactación (a excepción de la putrescina, que disminuye durante las primeras semanas), siendo siempre sus niveles superiores a los de la leche de vaca (Ploszaj y col., 1997). Además, el patrón de secreción de estas sustancias (importantes en el desarrollo intestinal de los neonatos) con la leche de cabra es similar al que ocurre con la leche humana. Esta mayor concentración de poliaminas se ha relacionado asimismo con la reducción del riesgo de

## Antecedentes bibliográficos

padecer alergias alimentarias, debido justamente a la maduración del epitelio intestinal favorecida por estas sustancias.

La leche de cabra contiene poca cantidad de ácido orótico, sustancia que se suele asociar con el ‘síndrome del hígado graso’ (American Dairy Goat Association, 2004). Las cantidades de fosfatasas alcalinas y ácido N-acetilneuramínico son igualmente bajas en esta leche (Haenlein, 2007).

Respecto a la defensa antioxidante, se observa que en dietas con leche de vaca hay un aumento de la actividad SOD consecuencia de la mayor generación de radicales  $O_2^{\bullet-}$ , con respecto a la de cabra. Esto, unido a la mayor biodisponibilidad de zinc (mineral antioxidante) y la mejor calidad lipídica (produce menos TBARS) características de la leche de cabra, hace de este tipo de leche un alimento con más capacidad antioxidante (Bysokogorskiĭy Veselov, 2010; Díaz-Castro y col., 2012; 2013). Incluso los niveles de transaminasas fueron más bajos cuando se administró leche de cabra enriquecida en Ca en comparación con la misma suplementación en la de vaca (Díaz-Castro y col., 2013).

Para concluir, a la leche de cabra se le atribuyen propiedades anticancerígenas dado su contenido en coenzima Q y ácido linolénico conjugado (ya mencionado anteriormente). Además se le considera útil para combatir problemas sexuales y la dispepsia en la mujer embarazada (Chacón, 2005).

## **5. Mare milk composition: variation factors**

Nowadays, people are more concerned about the health problems entailed by milk, namely cow milk. In this sense, several alternatives to this milk are rising recently such as goat or mare milk. The case of mare milk is less known by society but similarities to human milk concerning nutritional composition are greater. In fact, its composition falls between human and cow milk. Concerning allergies, mare milk proteins are less allergenic (Doreau & Martuzzi, 2006a; Doreau & Martuzzi, 2006b; Pietrzak-Fiecko et al., 2009) so it is more tolerable milk. In addition, characteristic low fat content may make mare milk a good option face to obesity or overweight problems. What is more, mare milk is usually used to treat several diseases such as scurvy, dysentery, gastrointestinal ulcers, chronic hepatitis, skin diseases or inflammatory processes among others (Doreau & Martuzzi, 2006b; Pietrzak-Fiecko et al., 2009).

However, mare milk is quite expensive. Its organoleptic characteristics must be developed and culture acceptance is not adequate in some occidental countries. Furthermore, it is not consumed as fresh milk due to its high content in free fatty acids and lipase that make it too sensitive to lipolysis thus becomes rancid rapidly (Doreau & Martuzzi, 2006a). Anyway, its nitrogen compounds resemblance to human milk could make mare's milk a good raw material for the production of formulae substituting natural food for infants (Pietrzak-Fiecko et al., 2009).

The main aim of this project is to set up a prediction tool for determining the nutritional value of mare milk by infra-red method and to validate this method. It will be applied to mare milk samples used in previous projects. Secondly, we intend to link mare milk nutritional value data with foal growth so that we can prove the relationship between maternal milk and osteochondrose in foals.

## 5.1 Mare milk

Mare milk has, in general, a low content of fat but the composition of fatty acids and concentration of lactose are similar to that of human milk (Pietrzak-Fiecko et al., 2009). Besides, mare milk possesses a lower proportion of triglycerides and higher proportion of free fatty acids and of phospholipids compared to cow or human milk (Doreau & Martuzzi, 2006a). On the one hand, the average content of unsaturated fatty acids (44%) is higher than that of cow milk (32%) and closer to that of human milk (45%). On the other hand, saturated fatty acid content is similar in mare and human milk, mare milk having a higher content of medium-chain saturated fatty acids (C8:0 – C14:0) and a lower content of long-chain saturated fatty acid (C15:0 – C20:0) (Pietrzak-Fiecko et al., 2009; 2013).

Total PUFAs content is, in fact, much higher in mare milk (on average 19% of total FA content) than in cow (3%) or goat milk (2%) (Devle et al., 2012). These FA are associated to a reduced risk of cardiovascular diseases but could increase putative oxidation, however, mare milk contains natural antioxidants (Doreau & Martuzzi, 2006a). The reasons of this high content in PUFAs are, on the one hand, the absence of bio-hydrogenation of FA in the digestive tract before absorption (as occurring in ruminants) and, on the other hand, the ability of horses to consume forages which are rich in linolenic acid (Doreau & Boulot, 1989; Doreau, 1994). Furthermore, mare milk is richer in short- and medium-chain FA, partially hydrogenated 20-C FA (C20:1, 20:2, 20:3) and in  $\alpha$ -linolenic acid (ALA), but poorer in oleic acid when compared to human milk (Doreau & Martuzzi, 2006a). In addition, mare milk has a higher content of C18:2 (n-6) –linoleic acid-, C18:3 (n-3) –linolenic acid- (PUFAs) and C16:1 compared to cow, ewe or goat milk (Marconi & Panfili, 1998; Pietrzak-Fiecko et al., 2009; Devle et al., 2012).

Concerning saturated fatty acids (which are associated with increased risk of coronary heart disease if they are consumed in excess), they represent in average 69% of FA content in cow milk and 59% of that of goat milk. Nevertheless, it only represents

## Antecedentes bibliográficos

48% of FA content in mare milk (Devle et al., 2012). The greatest contribution is due to palmitic acid (C16:0) (Pietrzak-Fiecko et al., 2013). High content of fatty acids (FA) with less than 16 carbons, such as caprylic (C8:0), capric (C10:0), lauric (C12:0) or myristic (C14:0) acids; is also reported (Doreau & Boulot, 1989; Pietrzak-Fiecko et al., 2009; 2013).

The levels of C8:0 and C10:0 are even similar to those found in goat's milk fat, whereas the very low concentration of C6:0 –caproic acid- (trace amounts) is typical of milk fat from non-ruminant animals (Pietrzak-Fiecko et al., 2009).

Mare milk has fewer calories and less cholesterol (Marconi & Panfili, 1998) as well as a lower C18:0 –stearic acid- level in comparison with ruminants (1% of total FA versus 13 or 17% in cow and goat milk) (Doreau & Boulot, 1989; Doreau & Martuzzi, 2006a; Devle et al., 2012). In this sense, when energy intake is lower than requirements, body reserves provide necessary energy for milk production (Doreau & Martuzzi, 2006c).

Finally, trans fatty acids (which have been shown to increase blood lipids) are reported to be in higher amounts in ruminants such as cow, ewe or goat, than in mares, although those in ruminants milk have been found to have anti-atherogenic effects in animal models (Devle et al., 2012). The n-6/n-3 ratio is an interesting index from a nutritional point of view. Indeed, a low ratio is known to be beneficial in a health perspective according to World Health Organisation (WHO) recommendations. In this sense, mare milk has a 1.0:1 ratio whereas cow milk has a 2.4:1 ratio and goat milk a 4.0:1 ratio (Devle et al., 2012).

In general, mare milk has lower fat and protein contents (Pietrzak-Fiecko et al., 2009) as well as higher lactose content compared to cow milk. The protein fraction is particularly rich in whey protein while total nitrogen and casein nitrogen are lower in

## Antecedentes bibliográficos

mare milk (Marconi & Panfili, 1998). Carbohydrates are mainly made of lactose (Doreau & Boulot, 1989).

Concerning vitamins and minerals, vitamin C is found in high amount in mare milk (Marconi & Panfili, 1998), while Fe content is low (Doreau & Martuzzi, 2006b). Furthermore, the concentrations of mineral element in mares' milk are similar to those in ewes and cows although the milk is not able to cover Ca, P, Cu and Fe requirements of foal (Grace et al., 1999; Pietrzak-Fiecko et al., 2009).

The highest immunoglobulin content (almost 20%) is recorded in mare's milk (Doreau & Martuzzi, 2006b; Markiewicz-Keszycka et al., 2013). Lysozyme content, which is the main responsible for antimicrobial defence in mares due to being highly thermo-stable, is by far higher in mare milk since it takes 8% of total whey proteins (Doreau & Martuzzi, 2006b). Besides,  $\beta$ -lactoglobulin, one of the major allergens in children (casein is in adults) since it is absent in human milk, represents 32% of whey protein of mare milk (53% in cow milk), whereas  $\alpha$ -lactoalbumin represents 28% of whey protein (instead of the 20% in cow milk and closer to the 42% found in human milk) (Doreau & Martuzzi, 2006b).

## 5.2 Variation factors

The two main factors responsible for the modifications in mare milk macronutrient composition are mainly either *dietary regime* or *lactation stage*. *Age* and *breed* are involved secondly.

### - *Lactation stage* :

In various mammal species, colostrum contains higher amounts of biologically active compounds compared to milk so that offsprings are able to grow properly (Pecka

## Antecedentes bibliográficos

et al., 2012). However, results on the whole lactation are sometimes difficult to interpret owing to feeding changes during this period which interfere with the effect of lactation stage (Doreau & Martuzzi, 2006a). Also, the colostrum period is shorter in mare than in cow since it takes 24-96 hours after foaling but most variations occur during the first 12 hours (Doreau & Boulot, 1989).

Generally, fat and lactose contents are low at the very beginning of lactation after foaling (Doreau & Boulot, 1989) although protein content is higher. An increase in lactose content during the lactation period is noted (Doreau & Boulot, 1989; Pecka et al., 2012). Colostrum is higher in fat and has a higher content of long-chain fatty acids than milk (Doreau & Martuzzi, 2006a) while highest total solid and fat contents are reported between 141-160 days of lactation (Markiewicz-Keszycka et al., 2013). Firstly, fat content decreases until 3 months of lactation and thus remains stable or slightly decreases (Doreau & Martuzzi, 2006a).

Content of C16:1 in mare milk increases with the period of lactation. However, contents of medium-chain saturated fatty acids (C8:0 – C14:0) and palmitic acid are generally higher in the early lactation period since total content of saturated fatty acids decrease along with the period of lactation (Pietrzak-Fiecko et al., 2013).

Despite its low fat content, mare milk is a good source of fat soluble vitamins such as A, D, E or K even if their contents are higher in colostrum (Csapo et al., 1994; Marconi & Panfili, 1998).

The protein content decreases roughly during the first 2 months of lactation (Doreau & Martuzzi, 2006b; Pecka et al., 2012). Nitrogen content also decreases rapidly until 2 months of lactation (Doreau & Boulot, 1989). Moreover, casein nitrogen decreases by 54% and true whey protein nitrogen by 40% (Doreau & Martuzzi, 2006b). Additionally, some authors report that casein decreases of about 50% from the beginning to the 5th month of lactation (Doreau & Martuzzi, 2006b); whereas others indicate that casein content has similar levels but it represents 20% of all milk proteins in early colostrum and 60% later due to the decrease in total protein content (Pecka et al., 2012).

## Antecedentes bibliográficos

In addition, colostrum possesses lower  $\beta$ -casein,  $\alpha$ -lactoalbumin and serum albumin levels (Pecka et al., 2012). Urea content increases in subsequent weeks of lactation (Pecka et al., 2012). The mare milk during late lactation is characterized, on the one hand, by higher contents of lactoferrin, lysozyme and immunoglobulins (Markiewicz-Keszycka et al., 2013); and on the other hand, by very low contents of somatic cells as well as total bacteria count (Pecka et al., 2012; Markiewicz-Keszycka et al., 2013).

The highest minerals concentrations are observed in colostrum with the exception of Ca and P for which highest concentrations are observed on day 7 of lactation, afterwards these amounts decrease (Grace et al., 1999; Doreau & Martuzzi, 2006b). A significant decrease in IgG level in milk is observed in comparison to that in colostrum (Bondo & Jensen, 2011; Pecka et al., 2012). In fact, foals are born with practically no immunity level due to the structure of the placenta (Bondo & Jensen, 2011).

### - *Dietary factors:*

Several dietary factors affect mare milk composition:

- 1) Water limitation and diets without cereals induce a limitation in lactose synthesis (Doreau, 1994).
- 2) Forage-based diets lead to a higher milk yield compared to a 50:50 hay:concentrate diet (Doreau & Martuzzi, 2006c).
- 3) Generally, diets richer in hay produce slight lactose content in comparison to a concentrate supply in the diet (Doreau, 1994). Also, it could provoke higher proportions in ALA (as occurring with herbage diet that has ALA proportions within 15 and 25% of total FA) (Doreau & Martuzzi, 2006a). A hay-concentrate diet (50:50) might lead to a reduction of fat content and short/medium chain fatty acid levels (Doreau & Martuzzi,

## Antecedentes bibliográficos

- 2006a). Indeed, high percentage of concentrate strongly reduces fat (Doreau & Boulot, 1989) and protein contents of mare milk (Doreau, 1994).
- 4) Intake of grass and grains generally leads to a higher milk fat content of linoleic (C18:2 n-6) and  $\alpha$ -linolenic (C18:3 n-3) acids (Devle et al., 2012).
  - 5) Maize oil addition in the diet could be responsible for an increase in linoleic acid from 10 to 15% of total FA and for a little decrease in ALA (Doreau & Martuzzi, 2006a).
  - 6) Soybean oil addition increases linoleic acid (Doreau & Martuzzi, 2006a) and if soybean protein represents 50% of total protein intake, it enhances growth rate in foals by increasing mare milk protein (Doreau & Martuzzi, 2006b).
  - 7) By supplying safflower oil (1.2%), a decrease in saturated fatty acids from 63 to 56% of total FA as well as an increase in linoleic acid from 20 to 24% are reported (Doreau & Martuzzi, 2006a).
  - 8) If we provide cod-liver oil, we observe an increase in different n-3 FA and a decrease in some n-6 FA (Doreau & Martuzzi, 2006a).
  - 9) Incorporating fish oil in mare diet increases the levels of C22:0 –docosanoic acid- and C22:1 in milk fat (Doreau & Martuzzi, 2006a).
  - 10) Summer pasture decreases C16:0 level and increases that of C18:1 (n-9) –oleic acid- (Devle et al., 2012).

## Antecedentes bibliográficos

- 11) When mare's energy intake during lactation is restricted a negative effect on foal growth is reported (Doreau & Boulot, 1989).
  
- 12) Fat mares produce a milk richer in fat (due to fat mobilisation) (Doreau & Boulot, 1989; Doreau, 1994) and long-chain fatty acids contents, but poorer in short/medium-chain fatty acids (as occurring in fat cows) (Doreau & Martuzzi, 2006a). This situation even increases the amount of C18:0 –stearic acid- in milk (Doreau, 1994).
  
- 13) Protein content in milk decreases when energy supply of diet increases above requirements and/or proportion of concentrate in the diet decrease (Doreau & Boulot, 1989; Doreau & Martuzzi, 2006b).
  
- 14) Also, growth in foals might be increased by an intaker of 10% digestible nitrogen substance. Furthermore, higher protein nitrogen supply increases urea content in milk (Doreau, 1994).

### - *Age:*

A progressive increase in milk production occurs until a very late age maximum between 11 and 15 years. Mares in first or second lactation give a milk richer in protein compared to older mares while fat content is reported lower for primiparous mares than second lactation mares (Doreau & Boulot, 1989). However, the effect of age on milk composition is low.

### - *Breed:*

Differences between breeds in milk composition are not clearly established. In any case, individual variations in milk composition are higher for fat than for any other component (Doreau & Boulot, 1989). Indeed, milk fat from mares of different breeds showed differences in the concentrations of some fatty acids (Pietrzak-Fiecko et al.,

## Antecedentes bibliográficos

2009). Concerning protein content, differences were reported among various breeds such as Murgese and Italian Heavy Draft breed; or Haflinger, Thoroughbred and Anglo-arab mares (Doreau & Martuzzi, 2006b). Similar data were observed when talking about casein content, with differences between Haflinger and Italian saddle mares; and about whey proteins with an experiment carried out in Arab-persano and Thoroughbred Australian horses (Doreau & Martuzzi, 2006b).



# **III. MATERIAL Y MÉTODOS**

## 1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

En este estudio se utilizaron 160 ratas macho de la raza Wistar albina, con 21 días de edad y un peso inicial aproximado de  $41 \pm 5$  g, adquiridas en el Servicio de Animales de Laboratorio de la Universidad de Granada. Todos los cuidados y los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de Granada de acuerdo a las directrices de la Comunidad Europea.

## 2. DISEÑO EXPERIMENTAL

Al comienzo del estudio, las ratas se sometieron a un periodo pre-experimental (PPE) de 40 días en el que se dividieron al azar en dos grupos: 80 ratas *controles* que recibieron la dieta AIN 93G con unos niveles normales de Fe (45 mg/kg de dieta) (Reeves y col., 1993), y 80 ratas *anémicas* que recibieron la dieta AIN 93G pero con unos niveles bajos de Fe (5 mg/kg de dieta) para inducir una deficiencia severa del mismo (Reeves y col., 1993); según la técnica desarrollada previamente por nosotros mismos (Pallarés y col., 1993). Durante este período, la dieta y el agua bidestilada estaba disponible “ad libitum” para todas las ratas.

Desde el comienzo del estudio, las ratas fueron alojadas en células individuales de metabolismo. Estas células se encuentran situadas en una habitación aireada y termorregulada ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) con fotoperiodo controlado de 12 horas (de 9:00 a 21:00) y un  $55 \pm 5\%$  de humedad.

En el día 40 del PPE, previa anestesia por inyección intraperitoneal con pentobarbital sódico (Sigma Diagnostics, St Louis, MO, USA), en 10 ratas de cada grupo se procede a la extracción de sangre periférica de la vena caudal en tubos que contienen EDTA como anticoagulante para el control hematológico de la anemia. Se verificó que las ratas padecían anemia por el bajo nivel de hierro en suero, hemoglobina, recuento de glóbulos rojos, volumen corpuscular medio (VCM), hematocrito, además de altos niveles de plaquetas; parámetros consistentes con el modelo de anemia ferropénica inducida experimentalmente en la rata.

## Material y métodos

Tras la inducción de la anemia ferropénica nutricional, los animales (n=160) se sometieron a un periodo experimental (PE) en el cual, los grupos controles y anémicos eran divididos a su vez en cuatro subgrupos, alimentados durante 30 días con 8 tipos diferentes de dieta: basadas en leche de cabra o vaca, y con contenido normal (45 mg/kg dieta) o sobrecarga de Fe (450 mg/kg dieta), y contenido normal (2mg/kg dieta) o suplemento de ácido fólico (40 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) y la dosis de 40 mg/kg dieta de ácido fólico es la que se emplea más comúnmente en estudios de suplementación (Achón y col., 2000). Durante este PE, el agua bidestilada estaba disponible “*ad libitum*” mientras que la dieta se controla “*pair feed*”, de manera que los animales ingieren el 80% de la ingesta media de cada período al día, para evitar las diferencias debidas a la cantidad de dieta ingerida.

Los últimos 7 días del PE se realiza la técnica biológica adaptada de Thomas y Mitchell (1923), en los que se controla diariamente la ingesta de alimento y se recogen por separado heces y orina que son almacenadas en frigorífico a 4°C para el posterior análisis del contenido de Cu y Zn.

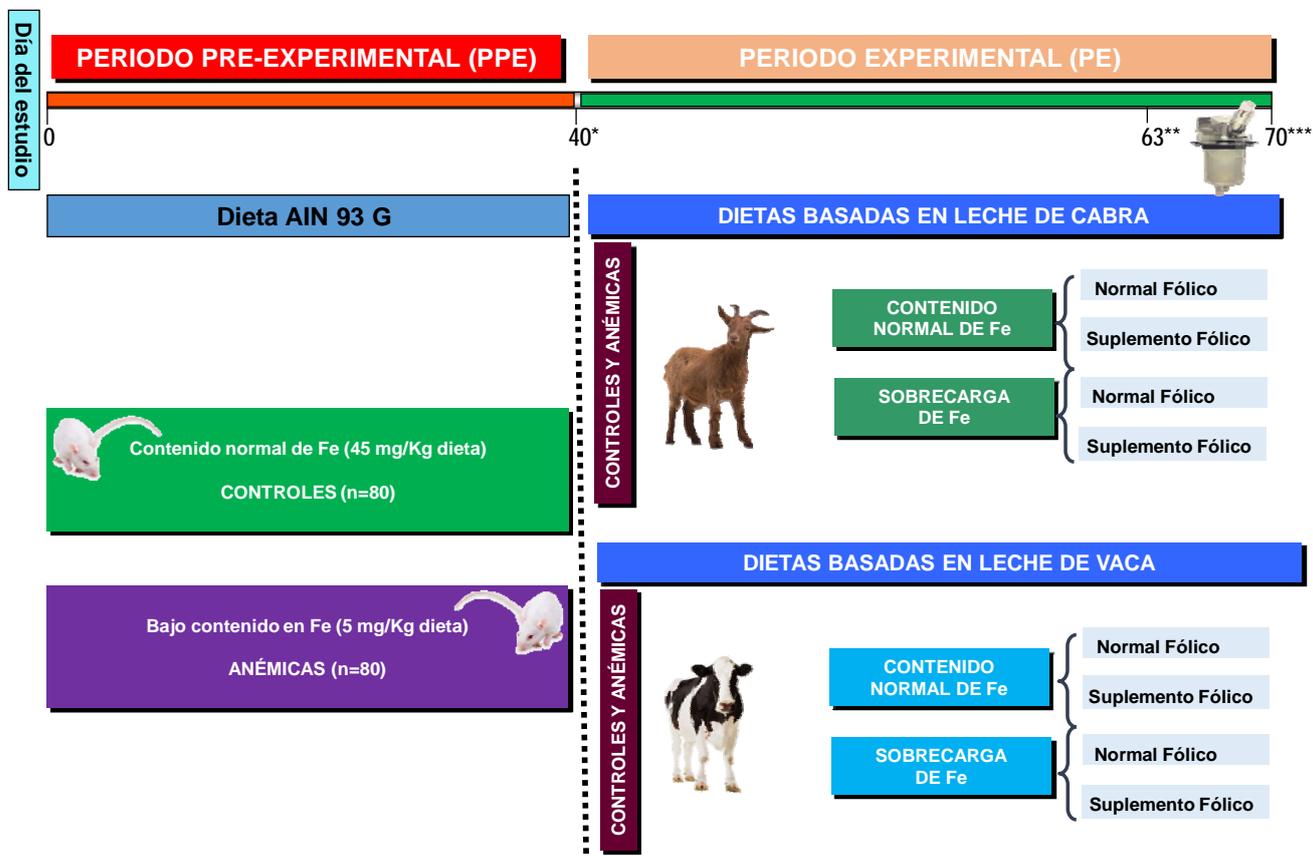
Al final del PE (día 70 del estudio), los animales son sacrificados siguiendo el Protocolo del Comité de Ética de la Universidad de Granada. Para ello primero se anestesian con pentobarbital sódico (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) a una dosis de 5 mg/kg de peso, y tras laparotomía media las ratas son desangradas mediante canulación de la aorta abdominal, recogiendo las muestras de sangre en un tubo que contiene EDTA como anticoagulante para analizar los parámetros hematológicos.

La sangre es entonces centrifugada (1,500 x g, 4°C, 10 min) a fin de separar las células rojas sanguíneas del suero para el análisis de Fe, ferritina y ‘capacidad total de unión al hierro’ (TIBC).

Posteriormente se procede a la extracción de hígado y cerebro para su posterior lavado con una solución salina de hielo (0.9%, w/v, NaCl). Las fracciones citosólicas de hígado, de cerebro y de eritrocito se obtienen por centrifugación diferencial con hemolisis hipotónica el mismo día del sacrificio y se conservan congeladas a -80°C

## Material y métodos

hasta posterior análisis de los parámetros de daño oxidativo. La **Figura 7** muestra el diseño experimental del estudio.



**Figura 7.** Diseño experimental del estudio.

\* Toma de sangre de la vena caudal para el control hematológico de la anemia.

\*\* Técnica de Thomas y Mitchell: recogida de heces y orina por separado en células individuales de metabolismo para posterior análisis.

\*\*\* Sacrificio de los animales para la obtención de sangre y la extirpación de hígado y cerebro.

## 3. DIETAS ENSAYADAS

La Tabla 8 muestra la composición de las dietas ensayadas durante el PPE y PE:

| COMPONENTE  | CANTIDAD (g/kg) |
|---|-----------------|
| <b>PPE</b>  |                 |
| <b>Dieta AIN 93 G (contenido normal o bajo contenido en Fe) <sup>a</sup></b>        |                 |
| Caseína   | 200             |
| Lactosa   | 0               |
| Aceite de oliva virgen  | 100             |
| Almidón de trigo  | 500             |
| Ingredientes constantes <sup>b</sup>  | 200             |
| <b>PE</b>   |                 |
| <b>Dietas con leche de vaca (contenido normal o sobrecarga de Fe) <sup>c</sup></b>  |                 |
| Proteína de leche de vaca   | 205             |
| Lactosa de leche de vaca  | 290             |
| Grasa de leche de vaca  | 100             |
| Almidón de trigo  | 205             |
| Ingredientes constantes <sup>b</sup>  | 200             |
| <b>Dietas con leche de cabra (contenido normal o sobrecarga de Fe) <sup>c</sup></b> |                 |
| Proteína de leche de cabra  | 205             |
| Lactosa de leche de cabra   | 295             |
| Grasa de leche de cabra   | 100             |
| Almidón de trigo  | 205             |
| Ingredientes constantes <sup>b</sup>  | 200             |

**Tabla 8.** Dietas ensayadas durante el PPE y PE.

<sup>a</sup> Contenido de Fe en la dieta durante el PPE: Las dietas fueron preparadas de acuerdo con 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) (Pallarés y col., 1993).

<sup>b</sup> Los ingredientes constantes (g/kg dieta) fueron: fibra (celulosa micronizada) 50, sacarosa 100, cloruro de colina 2.5, L-cistina 3, corrector mineral 35, corrector vitamínico 10.

<sup>c</sup> Para las dietas basadas en leche de cabra o vaca empleadas en el PE se formularon correctores minerales específicos teniendo en cuenta el contenido mineral que aportaban las leches para alcanzar las citadas recomendaciones. Las dietas se prepararon de acuerdo a las recomendaciones 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 (Raja y col., 1994). El corrector vitamínico se preparó de acuerdo a las directrices del Instituto Americano de Nutrición (Reeves y col., 1993) para las dietas normales en ácido fólico (2 mg/kg dieta) y con alto contenido en ácido fólico (40 mg/kg dieta) para las suplementadas (Achón y col., 2000).

## Material y métodos

La dieta estándar AIN 93-G del PPE y 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: la grasa proviene de aceite de oliva en lugar de soja (debido a sus conocidos efectos beneficiosos sobre la salud y por ser la más comúnmente consumida en nuestro país) y la proporción de grasa es 10% en lugar del 7%. La fuente de Fe empleada fue citrato férrico. El contenido en Fe por análisis en las dietas ensayadas utilizadas durante el PPE fue: 44.71 mg/kg en la dieta para los animales controles y 6.31 mg/kg en la dieta que recibieron las ratas anémicas. Las dietas basadas en leche se elaboraron con leche en polvo desnatada de cabra (raza Murciano-Granadina) o vaca (raza Holstein). Se tomaron las cantidades necesarias de leche en polvo de cabra o vaca para obtener una dieta con un 20% de proteína. Puesto que el contenido de grasa en la dieta era indetectable (< 0.01%, debido a que se trata de leches desnatadas), ésta se añadió para conseguir una dieta con un 10% de grasa. La grasa se obtuvo por purificación de mantequilla o nata (de cabra o vaca, respectivamente). Ambos tipos de grasa se fundían al baño maría y posteriormente se centrifugaban a 300 g (Hetticj, Universal 30 RF, Germany) durante 15 min a 4°C, para separar el sobrenadante que constituía la grasa pura (Rivas García E., 2012).

El contenido en Fe (mg/kg dieta) en las dietas usadas durante el PE, fue el siguiente por análisis:

- Dietas con contenido normal en Fe: 44.2 (dieta basada en leche de cabra) y 43.9 (dieta basada en leche de vaca).
- Dietas con sobrecarga de Fe: 471.34 (dieta basada en leche de cabra) y 469.20 (dieta basada en leche de vaca).

El contenido en ácido fólico (mg/kg dieta) en las dietas usadas durante el PE, fue el siguiente por análisis:

- Dietas con contenido normal en ácido fólico: 2.07 (dieta basada en leche de cabra) y 2.02 (dieta basada en leche de vaca).
- Dietas con suplemento en ácido fólico: 41.26 (dieta basada en leche de cabra) y 41.05 (dieta basada en leche de vaca).

## 4. MÉTODOS ANALÍTICOS

### 4.1 Materia seca

Está definida como la parte de sustancia que no desaparece al someter la muestra a una temperatura de  $105 \pm 2^\circ\text{C}$  hasta alcanzar un peso constante. La materia seca se determinó en las distintas dietas ensayadas y en heces.

### 4.2 Materia grasa

El contenido graso de las leches de cabra/vaca y las dietas fue determinado tras hidrólisis hidrocórica por extracción con éter de petróleo (Sanderson, 1986).

### 4.3 Contenido proteico

El contenido en nitrógeno de las leches en polvo desnatadas 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).

### 4.4 Mineralización por vía húmeda

Para la mineralización se coloca un gramo de dieta o de heces (sustancia seca) 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 sea necesario hasta la aparición de vapores blanquecinos. En este momento se comienza a añadir 10 mL de mezcla nítrico/perclórico (4:1, v/v) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) en alícuotas de 2 mL cada vez, hasta completar la mineralización. Una vez 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

## Material y métodos

mL en un matraz aforado. Como resultado final obtenemos una solución transparente que se emplea en la posterior determinación de minerales (Rivas García E., 2012).

### 4.5 Determinación de hierro, cobre y cinc

Las concentraciones de Fe en dieta y Cu y Zn en dieta, heces y orina, se determinan por espectrofotometría de absorción atómica (AAS) (espectrometro PerkinElmer Analyst 1100B con WinLab32 para AA software, Ueberlingen, Germany) 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.

La espectroscopia de absorción atómica, por tanto, consiste en la absorción de elementos. Si se aplica energía a un átomo, esta puede ser absorbida y un electrón externo puede ser promovido a una configuración conocida como estado excitado; dado que ese estado es inestable, el átomo retornará inmediatamente al estado fundamental, emitiendo energía.

La característica de interés en las medidas de absorción atómica, es la cantidad de luz absorbida por un mineral, a la longitud de onda resonante, cuando pasa a través de una nube atómica. A medida que el número de átomos se incrementa en el paso de la luz, la cantidad de luz absorbida también aumenta.

La ley de Beer, muestra la relación entre absorbancia y concentración del mineral, mediante la ecuación:

$$A = a \times b \times c$$

Donde:

$A =$  absorbancia

$a =$  coeficiente de absorción (constante)

$b =$  longitud del camino óptico

$c =$  concentración

## 4.6 Determinación de ácido fólico

El ácido fólico en las dietas se determina mediante cromatografía líquida de alta resolución HPLC (Hewlett-Packard, Waldbronn, Alemania) ligada a un detector de masas Quattro Ultima tandem (Waters-Micromass, Manchester, Reino Unido). El sistema HPLC se equipa con una columna 150 x 3 mm, 5 mm XBridge C18 (Waters, Milford, PA) que se mantiene a 40°C. Se usó un gradiente binario en fase móvil con un flujo de 0.4 mL/min, disolvente A (0.1% de ácido acético en agua) y disolvente B (0.1% ácido acético en metanol). El gradiente isocritico comienza al 10% de B durante medio minuto, seguido de un aumento lineal hasta el 100% de B en el minuto 4.5. Después se mantiene al 100% B hasta el minuto 5.9, momento en el que el gradiente vuelve al 10% de B durante 0.1 minutos para la equilibración de la columna a los 3 min. El espectrofotómetro de masas se utiliza en modo 'electrospray' negativo, y se obtuvieron los datos monitorizando múltiples reacciones. Se usa Argon como gas propelente a  $3.2 \times 10^{-3}$  mbar y el multiplicador se pone en marcha a 750V. Al principio de cada serie, se inyectan diferentes standards de trabajo que contienen ácido fólico a diversas concentraciones para calibrar el funcionamiento del aparato.

## 4.7 Recuento de hematíes, hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio y plaquetas

Efectuado en el día 40 y 70 a partir de la sangre periférica obtenida de la vena caudal y recogida en un tubo con EDTA para el control hematológico de la anemia. Las determinaciones se llevaron a cabo con un autoanalizador hematológico SYSMEX KX-21 (Sysmex, Tokyo, Japan).

## 4.8 Hierro sérico, capacidad total de unión al hierro y saturación de transferrina

Para calcular la concentración de Fe sérico, la capacidad total de unión al hierro (TIBC) y el índice de saturación de transferrina, se usan Sigma Diagnostics Iron and

## Material y métodos

TIBC reagents (Sigma Diagnostics). La absorbancia de las muestras es leída a 550 nm en un lector de microplacas (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA). El porcentaje de saturación de transferrina fue calculado a partir de la siguiente ecuación:

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

### 4.9 Ferritina sérica

La concentración plasmática de ferritina sérica fue determinada mediante un Kit Elisa (Biovendor GmbH, Heidelberg, Germany). La absorbancia fue medida por un lector de microplacas a 450 nm (Bio-rad Laboratories Inc., California, USA). La intensidad del color obtenido era inversamente proporcional a la concentración de ferritina sérica.

### 4.10 Transaminasas

Las actividades plasmáticas de la alanina aminotransferasa, *ALT* (también conocida como glutamato-piruvato transaminasa, *GPT*), y de la aspartato transaminasa, *AST* (también conocida como transaminasa glutámico-oxalacética, *GOT*); fueron determinadas usando un Kit de transaminasas (Sigma Diagnostics Inc., St. Louis, MO) como ya se había descrito previamente (Bergmeyer y col., 1978). El piruvato es reducido a lactato por la lactato deshidrogenasa, mientras que el oxalacetato es reducido a malato, con la consecuente oxidación del NADH a NAD; reacciones que son medidas gracias a la disminución espectrofotométrica de la absorbancia (Thermo Spectronic, Rochester, USA) a 340 nm.

### 4.11 Creatinina

La creatinina en plasma fue medida con un kit colorimétrico comercial (Spinreact, Barcelona, Spain). Su fundamento radica en la reacción de la creatinina con el picrato sódico, lo que forma un complejo rojo cuya intensidad de color es monitorizada espectrofotométricamente a 550 nm (Thermo Spectronic, Rochester,

USA), intensidad que es directamente proporcional a la concentración de creatinina en la muestra.

#### **4.12 Creatina kinasa**

La creatina kinasa (CK) en plasma fue medida con un Kit colorimétrico comercial (Spinreact, Barcelona, Spain). Esta enzima se encarga de la transferencia reversible de un grupo fosfato de la fosfocreatina al ADP. Dicha reacción está acoplada a las de las enzimas hexokinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. La formación de NADPH es medida espectrofotométricamente (Thermo Spectronic, Rochester, USA) a 340 nm, siendo proporcional a la cantidad de CK presente en plasma.

#### **4.13 Obtención de citosol eritrocitario, hepático, cerebral y determinación de contenido proteico**

Se llevaron a cabo distintas centrifugaciones diferenciales para separar las fracciones citosólicas de eritrocito, hígado y cerebro de acuerdo al procedimiento descrito previamente (DeSandro y col., 1991). Las muestras de hígado y cerebro fueron homogenizadas tras la adición de 4 mL de tampón de sacarosa para los cerebros y de tampón sacarosa-albumina para los hígados. Ambos órganos fueron fraccionados con una cuchilla automática (Polytron-Vertrieb GmbH, Langwiesenweg, Deutschland) y posteriormente homogenizados en un Potter con pistón de teflón (Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Germany). Para la obtención de sobrenadantes y pellets se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos en una centrífuga J2-21 (Beckman, Brea, CA, USA) a una temperatura de 4°C, siendo los sobrenadantes obtenidos de ambos órganos filtrados con gasa y centrifugados a 8000 rpm durante 20 minutos. Los pellets obtenidos fueron guardados en hielo y oscuridad, mientras que los sobrenadantes fueron centrifugados a 10000 rpm durante 10 minutos obteniéndose los citosoles de cerebro e hígado. Los pellets a su vez obtenidos se unieron a los guardados y se resuspendieron en 25 mL de tampón de sacarosa y fueron centrifugados a 12000 rpm durante 10 minutos. Los sobrenadantes obtenidos se desecharon dejando solamente los pellets para la obtención de membranas mitocondriales de ambos órganos, que fueron resuspendidos

## Material y métodos

en 2 mL de tampón de sacarosa para luego ser homogeneizados y congelados en sus respectivos viales a -80°C.

La fracción citosólica de los eritrocitos se obtiene por centrifugación diferencial con hemólisis hipotónica de acuerdo al método de Hanahan y Ekholm (1974), eliminando los leucocitos mediante un lavado con tampón isotónico Tris a pH 7.6 con posterior centrifugación a 100 g a 4°C durante 15 minutos. El sobrenadante y la capa superficial de células obtenidas se separan mediante una pipeta Pasteur. Este procedimiento de lavado y eliminación se repitió dos veces más en cada muestra. Para resuspender los eritrocitos lavados obtenidos, se empleó un tampón Tris isotónico hasta un hematocrito aproximado del 50%. A la suspensión se le adiciona después tampón Tris hipotónico de pH 7.6 en proporción 1/5. La operación de lavado con tampón hipotónico se repitió tres veces hasta quedar finalmente las membranas con un ligero tono rosáceo y el sobrenadante obtenido de la hemólisis de eritrocitos incoloro, el cual corresponde a la fracción citosólica.

La concentración de proteína en las diferentes muestras citosólicas se determina mediante el método de Lowry y col. (1951), que se basa en la asociación entre las reacciones de Biuret y de Folin, la primera característica del enlace peptídico y de los grupos fenólicos y la segunda de la tirosina. Para ello se tomaron 15 µL de muestra a los que se le añadieron 5 mL de reactivo de Biuret; se agita y, tras 15 minutos, se adicionan 0.5 mL de reactivo de Folin. Pasados 20 minutos se vuelve a agitar y, manteniendo los tubos en ambiente oscuro, se procede a su lectura en espectrofotómetro (Thermo Spectronic, Rochester, NY, USA) a una longitud de onda de 640 nm. Para el cálculo de la concentración existente se emplea una curva patrón con albúmina sérica.

### **4.14 Daño oxidativo de lípidos**

La peroxidación lipídica se evalúa en plasma y fracciones citosólicas de hígado, cerebro y eritrocito, determinando la concentración de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) siguiendo el método descrito por Yagi (1976) y Ohkawa y col. (1979). 0.5 mL de plasma se mezclan con 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 15% (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland) y se centrifuga a 80 g durante 10 min. 1 mL de

## Material y métodos

sobrenadante se mezcla con 1 mL de reactivo TBA (0.67%) y la mezcla fue mantenida en un baño de agua a 100°C durante 20 min. El producto de la reacción se extrae y se mide mediante análisis espectrofotométrico (Thermo Spectronic, Rochester, NY, USA) a 532 nm. El ensayo se calibra usando una curva de tetraetoxipropano (TEP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) como fuente de malondialdehído (MDA).

### 4.15 Actividad enzimática antioxidante

Las actividades de la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa fueron medidas en las fracciones citosólicas de eritrocito, hígado y cerebro.

La actividad de la superóxido dismutasa (SOD) fue determinada usando una versión ligeramente modificada del método de Crapo y col. (1978). Este método está basado en la inhibición de la reducción del citocromo C por la SOD, determinada espectrofotométricamente (Thermo Spectronic, Rochester, NY, USA) a 550 nm. Una unidad de actividad SOD se define como la cantidad de enzima necesaria para producir una inhibición del 50% en la tasa de reducción del citocromo C.

La actividad de la catalasa (CAT) fue determinada siguiendo el método establecido por Aebi (1984), en el cual se monitoriza con el espectrofotómetro (Thermo Spectronic, Rochester, USA) a 240 nm la descomposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por acción de la catalasa.

Por su parte, la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) fue medida por el método de Flohé y Gunzler(1984), el cual está basado en la formación instantánea de glutatión oxidado durante la reacción catalizada por la GPx. Dicho glutatión oxidado es continuamente reducido por el exceso de glutatión reductasa y NADPH presente en la cubeta. La posterior oxidación de NADPH a NADP<sup>+</sup> es monitorizada espectrofotométricamente (Thermo Spectronic, Rochester, USA) a 340 nm. Para dicha reacción se utiliza hidroperóxido de cumen como sustrato.

## 5. ÍNDICES BIOLÓGICOS

La metódica utilizada en el cálculo de los diferentes índices empleados es la siguiente:

\* **Coefficiente de Digestibilidad Aparente (C.D.A.):**

$$C.D.A. = \frac{A}{I} \times 100$$

$$A = I - F$$

\* **Balance o retención (R):**

$$R = I - ( F + U )$$

\* **Ratio retención frente a absorbido (R/A) ingesta (R/I):**

$$\% R/A = \frac{A - (F + U)}{A} \times 100$$

$$\% R/I = \frac{I - (F + U)}{I} \times 100$$

Las siglas empleadas en estas fórmulas, son las indicadas por la FAO/OMS (1966):

A = Absorbido

I = Ingerido

F = Excreción fecal

U = Excreción urinaria

R = Retención

## 6. CONTROL DE CALIDAD

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:  $2.23 \pm 0.29$   $\mu\text{g/g}$  (valor certificado:  $2.32 \pm 0.23$   $\mu\text{g/g}$ ).
- Cu:  $187 \pm 3$   $\mu\text{g/g}$  (valor certificado:  $180 \pm 4$   $\mu\text{g/g}$ ).
- Zn:  $143 \pm 4$   $\mu\text{g/g}$  (valor certificado:  $139 \pm 2$   $\mu\text{g/g}$ ).

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.

En el caso de las determinaciones hematológicas y bioquímicas se utilizaron los patrones internos y controles de calidad presentes en los reactivos comerciales suministrados por los respectivos proveedores. En todos los casos, las determinaciones se mantuvieron dentro del rango de linealidad establecido en los protocolos.

## 7. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Los datos se presentan como valor medio  $\pm$  EEM (error estándar de la media) durante el PPE y como valor medio  $\pm$  DER (desviación estándar residual) en el PE. Los datos fueron analizados mediante un diseño aleatorizado en bloques con adaptación factorial ( $2 \times 2 \times 2 \times 2$ ), 2 (tipo de dieta: leche de vaca frente a leche de cabra)  $\times$  2 (grupo de animal: controles frente a anémicas)  $\times$  2 (contenido de Fe en la dieta: normal frente a

## Material y métodos

sobrecarga) x 2 (contenido de ácido fólico en la dieta: normal frente a suplementada) y por el método de los mínimos cuadrados (Steel y col. 1997). El modelo tiene en cuenta las variaciones causadas por el tipo de dieta, la anemia, el contenido de Fe y el contenido de ácido fólico en las dietas. Cuando los términos de la interacción no eran estadísticamente significativos ( $P > 0.05$ ), los mínimos cuadrados fueron calculados del modelo tras omitir tales términos (Steel y col. 1997). Las diferencias entre grupos (control frente anémico, contenido normal de Fe frente a sobrecarga y contenido normal de ácido fólico frente a suplementado), fueron analizadas mediante el test de la *t de Student*. El análisis de la varianza (One-Way ANOVA) se ha usado para comparar las diferentes dietas suministradas a los dos grupos de animales (controles y anémicos). Las medias individuales se compararon usando el test “post hoc” de Tukey, cuando los efectos principales resultaban significativos. 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 22.0, 2014).



# **IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## 1. Parámetros hematológicos

En los animales controles, todos los parámetros hematológicos estudiados (Hb, recuento de hematíes, hematocrito, plaquetas, VCM, Fe sérico, ferritina sérica, porcentaje de saturación de la transferrina y TIBC) están dentro de los límites normales para esta especie (Campos y col., 1998). Sin embargo, cuando los animales consumen una dieta con bajo contenido en Fe durante 40 días (PPE) se induce una anemia ferropénica nutricional, con una baja concentración de Hb ( $P < 0.001$ ). Además, el hematocrito, el Fe sérico, ferritina sérica y la saturación de la transferrina eran bajos ( $P < 0.001$ ); en tanto que los niveles de plaquetas y TIBC estaban marcadamente elevados ( $P < 0.001$ ) (Tabla I), consecuencia de la depleción progresiva de Fe desde los depósitos corporales (Brownlie y col. 2002).

| Parámetros hematológicos             | Grupo experimental                    |                                    |
|--------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|
|                                      | Controles<br>(contenido normal de Fe) | Anémicas<br>(bajo contenido de Fe) |
| Concentración de Hb (g/L)            | 128.9 ± 2.8                           | 73.5 ± 2.7*                        |
| Hematíes ( $10^{12}/L$ )             | 7.1 ± 0.1                             | 6.1 ± 0.2*                         |
| Hematocrito (%)                      | 39.8 ± 0.7                            | 27.5 ± 0.5*                        |
| Recuento de plaquetas ( $10^9/L$ )   | 723 ± 25.1                            | 1388 ± 67.8*                       |
| VCM (fL)                             | 55.6 ± 0.2                            | 38.9 ± 0.6*                        |
| Fe sérico ( $\mu\text{g}/L$ )        | 1375 ± 119                            | 703 ± 55*                          |
| Ferritina sérica ( $\mu\text{g}/L$ ) | 83 ± 2.5                              | 49.9 ± 1.3*                        |
| Saturación transferrina (%)          | 47 ± 3.1                              | 3.9 ± 0.3*                         |
| TIBC ( $\mu\text{g}/L$ )             | 2852 ± 198                            | 17642 ± 725*                       |

**Tabla I.** Parámetros hematológicos de ratas controles y anémicas en el día 40 del PPE (datos expresados como la media ± error estándar de la media).

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

## Resultados y Discusión

Posteriormente, tras los 30 días de alimentación con las dietas basadas en leche de cabra o vaca (día 70 de estudio), los parámetros hematológicos se recuperaron completamente con ambos tipos de dietas, con contenido normal o con sobrecarga de Fe.

La sobrecarga de Fe aumentó el contenido de Fe sérico (como era de esperar) ( $P < 0.01$ ), la hemoglobina ( $P < 0.001$ ), la ferritina sérica ( $P < 0.01$ ), el porcentaje de saturación de transferrina ( $P < 0.01$ ) y el TIBC ( $P < 0.01$ ). La suplementación en ácido fólico incrementó el recuento de hematíes en los grupos con contenido normal de Fe ( $P < 0.01$ ) y redujo el VCM ( $P < 0.001$ ) (Tabla II).

El consumo de dieta basada en leche de vaca con sobrecarga de Fe incrementó los niveles plasmáticos de ALT y AST, en comparación con la leche de cabra, en ambos grupos de animales ( $P < 0.001$ ). Además, la sobrecarga de Fe en las dietas basadas en leche de vaca, en las distintas condiciones experimentales, dio lugar a un incremento de los niveles de transaminasas en plasma ( $P < 0.01$ ). Sin embargo, no se observó ningún efecto de la sobrecarga de Fe en los animales alimentados con dietas elaboradas con leche de cabra. Por otra parte, la suplementación con ácido fólico disminuyó de manera acusada los niveles de transaminasas en los animales alimentados con dieta de leche de cabra ( $P < 0.001$ ), no existiendo diferencias en los grupos alimentados con dieta basada en leche de vaca. La suplementación con ácido fólico aumentó significativamente los niveles plasmáticos de creatinina y CK con ambos tipos de leche y en todas las condiciones experimentales ensayadas ( $P < 0.001$ ) (Tabla III).

## Resultados y Discusión

**Tabla II.** Parámetros hematológicos de ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche de cabra o vaca, con contenido normal o sobrecarga de Fe y contenido normal o suplemento de ácido fólico.

| Parámetros                     | Contenido de Fe | Dieta basada en leche de cabra |                            |                      |                            | Dieta basada en leche de vaca |                            |                      |                            | Nivel de significación           |                 |        |                 |                     |
|--------------------------------|-----------------|--------------------------------|----------------------------|----------------------|----------------------------|-------------------------------|----------------------------|----------------------|----------------------------|----------------------------------|-----------------|--------|-----------------|---------------------|
|                                |                 | Grupos control                 |                            | Grupos anémicos      |                            | Grupos control                |                            | Grupos anémicos      |                            | Efectos principales <sup>1</sup> |                 |        |                 |                     |
|                                |                 | Fólico normal (n=20)           | Fólico suplementado (n=20) | Fólico normal (n=20) | Fólico suplementado (n=20) | Fólico normal (n=20)          | Fólico suplementado (n=20) | Fólico normal (n=20) | Fólico suplementado (n=20) | DER <sup>2</sup>                 | Dieta           | Anemia | Contenido de Fe | Contenido de fólico |
| Hb (g/l)                       | Normal          | 130.80                         | 134.00 <sup>D</sup>        | 129.80               | 129.30                     | 132.60                        | 133.25                     | 128.50               | 133.43 <sup>D</sup>        | 2.345                            | NS <sup>3</sup> | NS     | < 0.001         | < 0.05              |
|                                | Sobrecarga      | 143.80 <sup>C</sup>            | 141.30 <sup>C</sup>        | 148.00 <sup>AC</sup> | 146.00 <sup>C</sup>        | 142.80 <sup>C</sup>           | 142.13 <sup>C</sup>        | 142.10 <sup>BC</sup> | 145.00 <sup>C</sup>        | 2.984                            | <0.05           | NS     | < 0.001         | NS                  |
| Hematíes (10 <sup>12</sup> /l) | Normal          | 7.40 <sup>a</sup>              | 8.01 <sup>aD</sup>         | 7.20 <sup>A</sup>    | 8.04 <sup>AD</sup>         | 7.05 <sup>a</sup>             | 7.74 <sup>bD</sup>         | 7.07 <sup>A</sup>    | 7.68 <sup>BD</sup>         | 0.183                            | <0.05           | NS     | < 0.05          | < 0.001             |
|                                | Sobrecarga      | 8.03 <sup>aC</sup>             | 7.87 <sup>a</sup>          | 7.10                 | 7.98 <sup>AC</sup>         | 6.92 <sup>b</sup>             | 7.17 <sup>b</sup>          | 7.20                 | 7.49 <sup>B</sup>          | 0.127                            | <0.01           | NS     | < 0.05          | < 0.05              |
| Hematocrito %                  | Normal          | 42.38 <sup>a</sup>             | 44.08 <sup>aD</sup>        | 39.54 <sup>A</sup>   | 42.48 <sup>D</sup>         | 40.82 <sup>b</sup>            | 38.52 <sup>bD</sup>        | 38.94 <sup>B</sup>   | 43.04 <sup>D</sup>         | 0.568                            | <0.01           | NS     | < 0.01          | < 0.01              |
|                                | Sobrecarga      | 45.28 <sup>aC</sup>            | 48.54 <sup>aCD</sup>       | 45.36 <sup>C</sup>   | 42.32                      | 39.21 <sup>b</sup>            | 40.23 <sup>b</sup>         | 45.28 <sup>C</sup>   | 42.59 <sup>D</sup>         | 0.593                            | <0.05           | NS     | < 0.01          | < 0.05              |
| Plaquetas(10 <sup>9</sup> /l)  | Normal          | 926.00                         | 928.00                     | 939.33               | 963.67                     | 934.00                        | 903.00                     | 964.00               | 944.89                     | 29.53                            | NS              | NS     | NS              | NS                  |
|                                | Sobrecarga      | 909.67                         | 936.56                     | 968.00               | 984.12                     | 940.25                        | 916.75                     | 968.50               | 913.25                     | 32.21                            | NS              | NS     | NS              | NS                  |
| VCM (fL)                       | Normal          | 57.25                          | 52.62 <sup>D</sup>         | 55.04                | 53.44 <sup>D</sup>         | 57.68                         | 53.77 <sup>D</sup>         | 55.34                | 52.48 <sup>D</sup>         | 0.386                            | NS              | NS     | NS              | < 0.001             |
|                                | Sobrecarga      | 56.44                          | 52.39 <sup>D</sup>         | 56.15 <sup>A</sup>   | 52.00 <sup>D</sup>         | 56.79                         | 53.33 <sup>D</sup>         | 53.18 <sup>B</sup>   | 50.56 <sup>D</sup>         | 0.402                            | <0.05           | NS     | NS              | < 0.001             |
| Fe sérico (µg/l)               | Normal          | 1352                           | 1347                       | 1326                 | 1345                       | 1346                          | 1364                       | 1355                 | 1353                       | 58.65                            | NS              | NS     | < 0.01          | NS                  |
|                                | Sobrecarga      | 1456 <sup>C</sup>              | 1445 <sup>C</sup>          | 1476 <sup>C</sup>    | 1489 <sup>C</sup>          | 1491 <sup>C</sup>             | 1478 <sup>C</sup>          | 1487 <sup>C</sup>    | 1454 <sup>D</sup>          | 61.87                            | NS              | NS     | < 0.01          | NS                  |
| Ferritina sérica (µg/l)        | Normal          | 84.33                          | 83.60                      | 82.34                | 80.26                      | 83.25                         | 83.87                      | 82.97                | 82.60                      | 1.925                            | NS              | NS     | < 0.01          | NS                  |
|                                | Sobrecarga      | 87.91 <sup>C</sup>             | 88.40 <sup>C</sup>         | 86.65 <sup>C</sup>   | 87.53 <sup>C</sup>         | 87.73 <sup>C</sup>            | 88.06 <sup>C</sup>         | 86.87 <sup>C</sup>   | 88.71 <sup>D</sup>         | 2.322                            | NS              | NS     | < 0.01          | NS                  |
| Saturación transferrina(%)     | Normal          | 46.65                          | 47.34                      | 46.37                | 46.25                      | 45.98                         | 46.21                      | 45.32                | 45.18                      | 1.543                            | NS              | NS     | < 0.01          | NS                  |
|                                | Sobrecarga      | 49.59 <sup>C</sup>             | 48.95 <sup>C</sup>         | 48.96 <sup>C</sup>   | 48.85 <sup>C</sup>         | 47.76 <sup>C</sup>            | 48.59 <sup>C</sup>         | 47.88 <sup>C</sup>   | 47.76 <sup>C</sup>         | 1.885                            | NS              | NS     | < 0.01          | NS                  |
| TIBC (µg/l)                    | Normal          | 2785                           | 2821                       | 2789                 | 2776                       | 2787                          | 2765                       | 2798                 | 2776                       | 156.43                           | NS              | NS     | < 0.01          | NS                  |
|                                | Sobrecarga      | 3251 <sup>C</sup>              | 3285 <sup>C</sup>          | 3195 <sup>C</sup>    | 3156 <sup>C</sup>          | 3145 <sup>C</sup>             | 3321 <sup>C</sup>          | 3254 <sup>C</sup>    | 3128 <sup>C</sup>          | 189.54                           | NS              | NS     | < 0.01          | NS                  |

<sup>1</sup> Efectos principales: Dieta, efecto principal del tipo de dieta; Anemia, efecto principal de la ferropdeficiencia; Sobrecarga de Fe, efecto principal de la sobrecarga; Contenido de ácido fólico, efecto principal del contenido de ácido fólico en las dietas. <sup>2</sup>DER, Desviación estándar residual. <sup>3</sup>NS, no significativo.

<sup>a,b</sup> Valores entre grupos de animales controles con distinto superíndice minúscula en la misma fila indican diferencia significativa mediante one-way ANOVA (test de Tukey).

<sup>A,B</sup> Valores entre grupos de animales anémicos con distinto superíndice mayúscula en la misma fila indican diferencia significativa mediante one-way ANOVA (test de Tukey).

<sup>C</sup> Valores estadísticamente diferentes del correspondiente grupo de animales alimentados con dietas con contenido normal de Fe (comparación entre dietas con contenido normal y con sobrecarga de Fe) ( $P < 0.05$ ) mediante test de la *t de Student*.

<sup>D</sup> Valores estadísticamente diferentes del correspondiente grupo de animales alimentados con dietas con contenido normal de ácido fólico (comparación entre dietas con contenido normal y con sobrecarga de ácido fólico) ( $P < 0.05$ ) mediante test de la *t de Student*.

## Resultados y Discusión

**Tabla III.** Transaminasas, creatinina y creatin kinasa (CK) de ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche de cabra o vaca, con contenido normal o sobrecarga de Fe y contenido normal o suplemento de ácido fólico.

| Parámetro bioquímico | Contenido de Fe | Dieta basada en leche de cabra |                            |                      |                            | Dieta basada en leche de vaca |                            |                      |                            | Nivel de significación           |        |                 |                 |                     |
|----------------------|-----------------|--------------------------------|----------------------------|----------------------|----------------------------|-------------------------------|----------------------------|----------------------|----------------------------|----------------------------------|--------|-----------------|-----------------|---------------------|
|                      |                 | Grupos control                 |                            | Grupos anémicos      |                            | Grupos control                |                            | Grupos anémicos      |                            | Efectos principales <sup>1</sup> |        |                 |                 |                     |
|                      |                 | Fólico normal (n=20)           | Fólico suplementado (n=20) | Fólico normal (n=20) | Fólico suplementado (n=20) | Fólico normal (n=20)          | Fólico suplementado (n=20) | Fólico normal (n=20) | Fólico suplementado (n=20) | DER <sup>2</sup>                 | Dieta  | Anemia          | Contenido de Fe | Contenido de fólico |
| ALT (U/l)            | Normal          | 37.59                          | 24.57 <sup>ad</sup>        | 33.55                | 26.82 <sup>AD</sup>        | 40.38                         | 37.22 <sup>b</sup>         | 35.24                | 32.20 <sup>B</sup>         | 1.537                            | <0.05  | NS <sup>3</sup> | <0.01           | <0.01               |
|                      | Sobrecarga      | 39.81 <sup>a</sup>             | 27.39 <sup>ad</sup>        | 36.43 <sup>A</sup>   | 29.42 <sup>AD</sup>        | 50.99 <sup>bc</sup>           | 53.15 <sup>bc</sup>        | 44.52 <sup>BC</sup>  | 43.12 <sup>BC</sup>        | 1.675                            | <0.001 | NS              | <0.01           | <0.01               |
| AST (U/l)            | Normal          | 108.15                         | 98.87 <sup>ad</sup>        | 109.23               | 94.66 <sup>AD</sup>        | 110.25                        | 109.92 <sup>b</sup>        | 108.73               | 107.65 <sup>B</sup>        | 3.922                            | <0.05  | NS              | <0.01           | <0.01               |
|                      | Sobrecarga      | 112.20 <sup>a</sup>            | 101.17 <sup>ad</sup>       | 111.52 <sup>A</sup>  | 95.19 <sup>AD</sup>        | 124.32 <sup>bc</sup>          | 122.57 <sup>bc</sup>       | 123.41 <sup>BC</sup> | 124.08 <sup>BC</sup>       | 4.129                            | <0.001 | NS              | <0.01           | <0.01               |
| Creatinina (μmol/l)  | Normal          | 20.51                          | 27.32 <sup>D</sup>         | 21.32                | 28.32 <sup>D</sup>         | 21.35                         | 29.30 <sup>D</sup>         | 23.45                | 29.22 <sup>AD</sup>        | 1.107                            | NS     | NS              | NS              | <0.001              |
|                      | Sobrecarga      | 20.32                          | 29.53 <sup>D</sup>         | 20.59                | 29.54 <sup>D</sup>         | 21.98                         | 29.32 <sup>D</sup>         | 22.34                | 30.18 <sup>AD</sup>        | 1.113                            | NS     | NS              | NS              | <0.001              |
| CK (U/l)             | Normal          | 71.81                          | 95.93 <sup>D</sup>         | 74.81                | 99.56 <sup>D</sup>         | 73.95                         | 101.23 <sup>D</sup>        | 72.76                | 98.87 <sup>AD</sup>        | 3.243                            | NS     | NS              | NS              | <0.001              |
|                      | Sobrecarga      | 72.12                          | 101.91 <sup>D</sup>        | 73.07                | 103.42 <sup>D</sup>        | 76.86                         | 100.57 <sup>D</sup>        | 73.97                | 103.11 <sup>AD</sup>       | 3.389                            | NS     | NS              | NS              | <0.001              |

<sup>1</sup> Efectos principales: Dieta, efecto principal del tipo de dieta; Anemia, efecto principal de la ferodeficiencia; Sobrecarga de Fe, efecto principal de la sobrecarga; Contenido de ácido fólico, efecto principal del contenido de ácido fólico en las dietas.

<sup>2</sup> DER, Desviación estándar residual.

<sup>3</sup> NS, no significativo.

<sup>a,b</sup> Valores entre grupos de animales controles con distinto superíndice minúscula en la misma fila indican diferencia significativa mediante one-way ANOVA (test de Tukey).

<sup>A,B</sup> Valores entre grupos de animales anémicos con distinto superíndice mayúscula en la misma fila indican diferencia significativa mediante one-way ANOVA (test de Tukey).

<sup>C</sup> Valores estadísticamente diferentes del correspondiente grupo de animales alimentados con dietas con contenido normal de Fe (comparación entre dietas con contenido normal y con sobrecarga de Fe) ( $P < 0.05$ ) mediante test de la *t de Student*.

<sup>D</sup> Valores estadísticamente diferentes del correspondiente grupo de animales alimentados con dietas con contenido normal de ácido fólico (comparación entre dietas con contenido normal y con sobrecarga de ácido fólico) ( $P < 0.05$ ) mediante test de la *t de Student*.

## 2. Daño oxidativo

Respecto al daño oxidativo a los lípidos (Tabla IV), en general, los niveles de TBARS son mayores en eritrocito ( $P < 0.05$ ), cerebro ( $P < 0.01$ ) y plasma ( $P < 0.05$ ) en ambos grupos de animales (controles y anémicos) alimentados con dietas basadas en leche de vaca con sobrecarga de Fe en comparación con los alimentados con leche de cabra. La anemia no tuvo efecto en los niveles de TBARS en ninguno de los tejidos estudiados y bajo cualquier condición experimental. Sin embargo, la sobrecarga de Fe afectó negativamente a los animales alimentados con dieta de leche de vaca con contenido normal de ácido fólico, incrementando la peroxidación lipídica en eritrocito ( $P < 0.05$ ), cerebro ( $P < 0.01$ ) y plasma ( $P < 0.05$ ). Por otra parte, el suplemento de ácido fólico en las dietas elaboradas a base de leche tuvo un efecto beneficioso al reducir el grado de peroxidación lipídica en todos los tejidos estudiados ( $P < 0.01$ ) (Tabla IV).

## Resultados y Discusión

**Tabla IV.** Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (nmol/mg proteína) en fracciones citosólicas de hígado, eritrocito, cerebro y plasma de ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche de cabra o vaca, con contenido normal o sobrecarga de Fe y contenido normal o suplemento de ácido fólico.

| TEJIDO     | Contenido de Fe | Dieta basada en leche de cabra |                            |                      |                            | Dieta basada en leche de vaca |                            |                      |                            | Nivel de significación           |                 |        |                 |                     |
|------------|-----------------|--------------------------------|----------------------------|----------------------|----------------------------|-------------------------------|----------------------------|----------------------|----------------------------|----------------------------------|-----------------|--------|-----------------|---------------------|
|            |                 | Grupos control                 |                            | Grupos anémicos      |                            | Grupos control                |                            | Grupos anémicos      |                            | Efectos principales <sup>1</sup> |                 |        |                 |                     |
|            |                 | Fólico normal (n=20)           | Fólico suplementado (n=20) | Fólico normal (n=20) | Fólico suplementado (n=20) | Fólico normal (n=20)          | Fólico suplementado (n=20) | Fólico normal (n=20) | Fólico suplementado (n=20) | DER <sup>2</sup>                 | Dieta           | Anemia | Contenido de Fe | Contenido de fólico |
| Hígado     | Normal          | 5.79                           | 2.58 <sup>D</sup>          | 5.88                 | 2.63 <sup>D</sup>          | 5.63                          | 2.77 <sup>D</sup>          | 6.04                 | 2.88 <sup>D</sup>          | 0.221                            | NS <sup>3</sup> | NS     | < 0.01          | < 0.001             |
|            | Sobrecarga      | 6.35 <sup>a</sup>              | 2.68 <sup>D</sup>          | 7.58 <sup>AC</sup>   | 2.79 <sup>D</sup>          | 8.54 <sup>bc</sup>            | 2.89 <sup>D</sup>          | 8.66 <sup>BC</sup>   | 3.09 <sup>D</sup>          | 0.225                            | <0.05           | NS     | < 0.01          | < 0.001             |
| Eritrocito | Normal          | 8.16 <sup>a</sup>              | 3.88 <sup>ad</sup>         | 8.98                 | 3.96 <sup>D</sup>          | 9.65 <sup>b</sup>             | 4.87 <sup>bd</sup>         | 8.96                 | 4.55 <sup>D</sup>          | 0.331                            | <0.05           | NS     | < 0.05          | < 0.001             |
|            | Sobrecarga      | 9.59 <sup>a</sup>              | 3.55 <sup>ad</sup>         | 9.97 <sup>A</sup>    | 3.99 <sup>D</sup>          | 14.35 <sup>bc</sup>           | 5.10 <sup>bd</sup>         | 12.05 <sup>BC</sup>  | 4.16 <sup>D</sup>          | 0.376                            | <0.05           | NS     | < 0.05          | < 0.001             |
| Cerebro    | Normal          | 11.55                          | 5.10 <sup>D</sup>          | 11.05                | 4.88 <sup>AD</sup>         | 11.07                         | 5.11 <sup>D</sup>          | 11.49                | 5.66 <sup>BD</sup>         | 0.331                            | NS              | NS     | < 0.01          | < 0.001             |
|            | Sobrecarga      | 11.94 <sup>a</sup>             | 5.03 <sup>ad</sup>         | 11.88 <sup>A</sup>   | 5.03 <sup>AD</sup>         | 19.95 <sup>bc</sup>           | 6.55 <sup>bd</sup>         | 17.81 <sup>BC</sup>  | 6.24 <sup>BD</sup>         | 0.355                            | <0.01           | NS     | < 0.01          | < 0.001             |
| Plasma     | Normal          | 3.11                           | 1.41 <sup>D</sup>          | 3.12                 | 1.43 <sup>AD</sup>         | 3.66                          | 1.73 <sup>D</sup>          | 3.01                 | 2.23 <sup>BD</sup>         | 0.329                            | NS              | NS     | < 0.05          | < 0.001             |
|            | Sobrecarga      | 3.95 <sup>a</sup>              | 1.52 <sup>D</sup>          | 4.10 <sup>A</sup>    | 1.40 <sup>AD</sup>         | 5.91 <sup>bc</sup>            | 1.75 <sup>D</sup>          | 5.56 <sup>BC</sup>   | 2.28 <sup>BD</sup>         | 0.337                            | <0.05           | NS     | < 0.05          | < 0.001             |

<sup>1</sup> Efectos principales: Dieta, efecto principal del tipo de dieta; Anemia, efecto principal de la ferodeficiencia; Sobrecarga de Fe, efecto principal de la sobrecarga; Contenido de ácido fólico, efecto principal del contenido de ácido fólico en las dietas.

<sup>2</sup> DER, Desviación estándar residual.

<sup>3</sup> NS, no significativo.

<sup>a,b</sup> Valores entre grupos de animales controles con distinto superíndice minúscula en la misma fila indican diferencia significativa mediante one-way ANOVA (test de Tukey).

<sup>A,B</sup> Valores entre grupos de animales anémicos con distinto superíndice mayúscula en la misma fila indican diferencia significativa mediante one-way ANOVA (test de Tukey).

<sup>C</sup> Valores estadísticamente diferentes del correspondiente grupo de animales alimentados con dietas con contenido normal de Fe (comparación entre dietas con contenido normal y con sobrecarga de Fe) ( $P < 0.05$ ) mediante test de la *t de Student*.

<sup>D</sup> Valores estadísticamente diferentes del correspondiente grupo de animales alimentados con dietas con contenido normal de ácido fólico (comparación entre dietas con contenido normal y con sobrecarga de ácido fólico) ( $P < 0.05$ ) mediante test de la *t de Student*.

### 3. Actividad enzimática antioxidante

Se observó un incremento en la actividad de la SOD en todos los tejidos estudiados de los animales alimentados con dieta elaborada a base de leche de vaca (con contenido normal en ácido fólico, con o sin sobrecarga de Fe) en comparación con la leche de cabra ( $P < 0.001$ ). La sobrecarga de Fe también aumentó la actividad de la SOD en el eritrocito y el cerebro de los animales controles y de los anémicos alimentados con leche de vaca, en comparación con los alimentados con las dietas con contenido normal de Fe ( $P < 0.05$ ). Por otra parte, la suplementación con ácido fólico derivó en un incremento de la actividad de esta enzima en todos los tejidos estudiados; en todas las condiciones experimentales ensayadas, excepto para el plasma ( $P < 0.001$ ), (Tabla V).

La actividad de la CAT aumentó en todos los tejidos de los animales controles y anémicos alimentados con leche de vaca en comparación con los alimentados con leche de cabra y contenido normal de Fe ( $P < 0.001$  para hígado y eritrocito, y  $P < 0.01$  para cerebro). El déficit de Fe desencadenó una disminución de la actividad de la CAT en cerebro de los animales alimentados con leche de vaca, ya sea con o sin sobrecarga de Fe y con contenido normal de ácido fólico ( $P < 0.001$ ). La actividad de la CAT, sin embargo, no se ve afectada por la suplementación de ácido fólico en el cerebro de animales alimentados con dieta basada en leche de cabra con sobrecarga de Fe. La sobrecarga de Fe aumentó la actividad de la CAT en hígado y eritrocito en todas las condiciones experimentales ( $P < 0.01$ ), mientras que en cerebro no se observaron diferencias significativas. La suplementación con ácido fólico aumentó la actividad de la CAT en hígado y la disminuyó en eritrocito y cerebro (Tabla VI).

La actividad de la GPx es menor en hígado ( $P < 0.001$ ) y eritrocito ( $P < 0.05$ ) de los animales alimentados con leche de vaca con sobrecarga de Fe en comparación con la leche de cabra. En general, la anemia no afecta a la actividad de la GPx en los tres tejidos estudiados. La sobrecarga de Fe disminuyó la actividad GPx en hígado y cerebro de los animales alimentados a base de leche de vaca con contenido normal de ácido fólico ( $P < 0.001$ ). La suplementación de ácido fólico disminuyó la actividad de la GPx

en hígado ( $P < 0.001$ ), aumentó en eritrocito ( $P < 0.001$ ), mientras que en cerebro no se observaron diferencias significativas (Tabla VII).

### 4. Utilización nutritiva de cobre y cinc

El suministro durante 30 días de las dietas basadas en leche de cabra, en relación a las de vaca, conduce a un efecto positivo sobre la utilización digestiva (CDA) y metabólica (R/I) de Cu y Zn, tanto para animales controles como con anemia, con contenido normal o sobrecarga de Fe y con contenido normal o suplemento de ácido fólico ( $P < 0.01$ ) (Tablas VIII y IX).

La anemia afecta negativamente a la utilización nutritiva de Cu y Zn en animales que consumen la dieta con leche de vaca especialmente con suplemento de ácido fólico y con contenido normal o sobrecarga de Fe ( $P < 0.05$ ). En cambio, los animales ferodeficientes alimentados con la dieta de leche de cabra suplementada con ácido fólico, en general, presentan mayor utilización nutritiva de Cu ( $P < 0.05$ ) y mantienen unos niveles similares a sus respectivos controles para el caso del Zn.

La sobrecarga de Fe no altera la utilización digestiva (CDA) ni metabólica (retención) de Cu y Zn en ambos grupos de animales y en todas las condiciones experimentales ensayadas.

El suplemento de ácido fólico duplica la utilización nutritiva de Cu en ratas controles y anémicas, alimentadas con ambos tipos de leche, con contenido normal o sobrecarga de Fe ( $P < 0.001$ ) (Tabla VIII); sin embargo, el suplemento de ácido fólico no afecta la utilización de Zn (Tabla IX).

## Resultados y Discusión

**Tabla V.** Superóxido dismutasa (SOD, U/mg proteína) en fracciones citosólicas de hígado, eritrocito, cerebro y plasma de ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche de cabra o vaca, con contenido normal o sobrecarga de Fe y contenido normal o suplemento de ácido fólico.

| TEJIDO     | Contenido de Fe | Dieta basada en leche de cabra |                            |                      |                            | Dieta basada en leche de vaca |                            |                      |                            | Nivel de significación           |         |                 |                 |                     |
|------------|-----------------|--------------------------------|----------------------------|----------------------|----------------------------|-------------------------------|----------------------------|----------------------|----------------------------|----------------------------------|---------|-----------------|-----------------|---------------------|
|            |                 | Grupos control                 |                            | Grupos anémicos      |                            | Grupos control                |                            | Grupos anémicos      |                            | Efectos principales <sup>1</sup> |         |                 |                 |                     |
|            |                 | Fólico normal (n=20)           | Fólico suplementado (n=20) | Fólico normal (n=20) | Fólico suplementado (n=20) | Fólico normal (n=20)          | Fólico suplementado (n=20) | Fólico normal (n=20) | Fólico suplementado (n=20) | DER <sup>2</sup>                 | Dieta   | Anemia          | Contenido de Fe | Contenido de fólico |
| Hígado     | Normal          | 2.832 <sup>a</sup>             | 1.253 <sup>D</sup>         | 2.925 <sup>A</sup>   | 1.281 <sup>E</sup>         | 11.111 <sup>b</sup>           | 1.296 <sup>D</sup>         | 10.045 <sup>B</sup>  | 1.398 <sup>D</sup>         | 0.276                            | < 0.01  | NS <sup>3</sup> | < 0.05          | < 0.001             |
|            | Sobrecarga      | 3.075 <sup>a</sup>             | 1.402 <sup>D</sup>         | 3.234 <sup>A</sup>   | 1.361 <sup>D</sup>         | 12.325 <sup>b</sup>           | 1.406 <sup>D</sup>         | 12.121 <sup>BC</sup> | 1.380 <sup>D</sup>         | 0.374                            | < 0.01  | NS              | < 0.05          | < 0.001             |
| Eritrocito | Normal          | 2.931 <sup>a</sup>             | 1.108 <sup>AD</sup>        | 2.929 <sup>A</sup>   | 1.116 <sup>AD</sup>        | 9.187 <sup>b</sup>            | 1.580 <sup>BD</sup>        | 9.554 <sup>B</sup>   | 1.402 <sup>BD</sup>        | 0.282                            | < 0.001 | NS              | < 0.05          | < 0.001             |
|            | Sobrecarga      | 3.189 <sup>a</sup>             | 1.169 <sup>AD</sup>        | 3.032 <sup>A</sup>   | 1.042 <sup>AD</sup>        | 10.386 <sup>BC</sup>          | 1.499 <sup>BD</sup>        | 9.987 <sup>B</sup>   | 1.221 <sup>BD</sup>        | 0.217                            | < 0.01  | NS              | < 0.05          | < 0.001             |
| Cerebro    | Normal          | 2.922 <sup>a</sup>             | 2.174 <sup>D</sup>         | 2.953 <sup>A</sup>   | 2.017 <sup>AD</sup>        | 6.322 <sup>b</sup>            | 2.182 <sup>D</sup>         | 6.434 <sup>B</sup>   | 2.391 <sup>BD</sup>        | 0.269                            | < 0.01  | NS              | < 0.05          | < 0.001             |
|            | Sobrecarga      | 3.165 <sup>a</sup>             | 2.049 <sup>AD</sup>        | 3.206 <sup>A</sup>   | 2.007 <sup>AD</sup>        | 7.434 <sup>BC</sup>           | 2.433 <sup>BD</sup>        | 7.567 <sup>BC</sup>  | 2.604 <sup>BD</sup>        | 0.388                            | < 0.01  | NS              | < 0.05          | < 0.001             |
| Plasma     | Normal          | 0.316 <sup>a</sup>             | 0.835 <sup>D</sup>         | 0.325 <sup>A</sup>   | 0.764 <sup>AD</sup>        | 0.525 <sup>b</sup>            | 0.842 <sup>D</sup>         | 0.531 <sup>B</sup>   | 0.892 <sup>BD</sup>        | 0.083                            | < 0.01  | NS              | NS              | < 0.001             |
|            | Sobrecarga      | 0.325 <sup>a</sup>             | 0.809 <sup>D</sup>         | 0.313 <sup>A</sup>   | 0.747 <sup>D</sup>         | 0.530 <sup>b</sup>            | 0.824 <sup>D</sup>         | 0.512 <sup>B</sup>   | 0.757 <sup>D</sup>         | 0.088                            | < 0.01  | NS              | NS              | < 0.001             |

<sup>1</sup> Efectos principales: Dieta, efecto principal del tipo de dieta; Anemia, efecto principal de la ferodeficiencia; Sobrecarga de Fe, efecto principal de la sobrecarga; Contenido de ácido fólico, efecto principal del contenido de ácido fólico en las dietas.

<sup>2</sup> DER, Desviación estándar residual.

<sup>3</sup> NS, no significativo.

<sup>a,b</sup> Valores entre grupos de animales controles con distinto superíndice minúscula en la misma fila indican diferencia significativa mediante one-way ANOVA (test de Tukey).

<sup>A,B</sup> Valores entre grupos de animales anémicos con distinto superíndice mayúscula en la misma fila indican diferencia significativa mediante one-way ANOVA (test de Tukey).

<sup>C</sup> Valores estadísticamente diferentes del correspondiente grupo de animales alimentados con dietas con contenido normal de Fe (comparación entre dietas con contenido normal y con sobrecarga de Fe) ( $P < 0.05$ ) mediante test de la *t de Student*.

<sup>D</sup> Valores estadísticamente diferentes del correspondiente grupo de animales alimentados con dietas con contenido normal de ácido fólico (comparación entre dietas con contenido normal y con sobrecarga de ácido fólico) ( $P < 0.05$ ) mediante test de la *t de Student*.

## Resultados y Discusión

**Tabla VI.** Catalasa (CAT, U/ml citosol) en fracciones citosólicas de hígado, eritrocito y cerebro de ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche de cabra o vaca, con contenido normal o sobrecarga de Fe y contenido normal o suplemento de ácido fólico.

|            |                 | Dieta basada en leche de cabra |                            |                      |                            | Dieta basada en leche de vaca |                            |                      |                            | Nivel de significación           |        |                 |                 |                     |
|------------|-----------------|--------------------------------|----------------------------|----------------------|----------------------------|-------------------------------|----------------------------|----------------------|----------------------------|----------------------------------|--------|-----------------|-----------------|---------------------|
|            |                 | Grupos control                 |                            | Grupos anémicos      |                            | Grupos control                |                            | Grupos anémicos      |                            | Efectos principales <sup>1</sup> |        |                 |                 |                     |
| TEJIDO     | Contenido de Fe | Fólico normal (n=20)           | Fólico suplementado (n=20) | Fólico normal (n=20) | Fólico suplementado (n=20) | Fólico normal (n=20)          | Fólico suplementado (n=20) | Fólico normal (n=20) | Fólico suplementado (n=20) | DER <sup>2</sup>                 | Dieta  | Anemia          | Contenido de Fe | Contenido de fólico |
| Hígado     | Normal          | 0.178 <sup>a</sup>             | 0.293 <sup>aE</sup>        | 0.183 <sup>A</sup>   | 0.182 <sup>AC</sup>        | 0.226 <sup>b</sup>            | 0.547 <sup>bE</sup>        | 0.320 <sup>BC</sup>  | 0.557 <sup>BE</sup>        | 0.032                            | <0.001 | <0.05           | <0.01           | <0.001              |
|            | Sobrecarga      | 0.206 <sup>a</sup>             | 0.397 <sup>aDE</sup>       | 0.385 <sup>CD</sup>  | 0.216 <sup>ACE</sup>       | 0.324 <sup>bd</sup>           | 0.646 <sup>bDE</sup>       | 0.394 <sup>E</sup>   | 0.680 <sup>BDE</sup>       | 0.042                            | <0.001 | <0.05           | <0.01           | <0.001              |
| Eritrocito | Normal          | 0.681 <sup>a</sup>             | 0.388 <sup>aE</sup>        | 0.620 <sup>A</sup>   | 0.304 <sup>ACE</sup>       | 0.850 <sup>b</sup>            | 0.479 <sup>bE</sup>        | 0.868 <sup>B</sup>   | 0.576 <sup>BCE</sup>       | 0.051                            | <0.001 | <0.05           | <0.01           | <0.001              |
|            | Sobrecarga      | 1.075 <sup>D</sup>             | 0.432 <sup>aE</sup>        | 0.986 <sup>D</sup>   | 0.331 <sup>ACE</sup>       | 1.083 <sup>D</sup>            | 0.526 <sup>bE</sup>        | 0.962 <sup>D</sup>   | 0.654 <sup>BCDE</sup>      | 0.045                            | <0.001 | <0.05           | <0.01           | <0.001              |
| Cerebro    | Normal          | 0.151 <sup>a</sup>             | 0.091 <sup>aE</sup>        | 0.089 <sup>C</sup>   | 0.139 <sup>E</sup>         | 0.199 <sup>b</sup>            | 0.166 <sup>bE</sup>        | 0.092 <sup>C</sup>   | 0.138 <sup>E</sup>         | 0.019                            | <0.01  | <0.05           | <0.05           | <0.001              |
|            | Sobrecarga      | 0.158 <sup>a</sup>             | 0.109 <sup>aE</sup>        | 0.113                | 0.129 <sup>AE</sup>        | 0.221 <sup>b</sup>            | 0.170 <sup>bE</sup>        | 0.110 <sup>C</sup>   | 0.142 <sup>BE</sup>        | 0.017                            | <0.01  | NS <sup>3</sup> | <0.05           | <0.001              |

<sup>1</sup> Efectos principales: Dieta, efecto principal del tipo de dieta; Anemia, efecto principal de la ferodeficiencia; Sobrecarga de Fe, efecto principal de la sobrecarga; Contenido de ácido fólico, efecto principal del contenido de ácido fólico en las dietas.

<sup>2</sup> DER, Desviación estándar residual.

<sup>3</sup> NS, no significativo.

<sup>a,b</sup> Valores entre grupos de animales controles con distinto superíndice minúscula en la misma fila indican diferencia significativa mediante one-way ANOVA (test de Tukey).

<sup>A,B</sup> Valores entre grupos de animales anémicos con distinto superíndice mayúscula en la misma fila indican diferencia significativa mediante one-way ANOVA (test de Tukey).

<sup>C</sup> Valores estadísticamente diferentes del correspondiente grupo de animales controles (comparación entre ratas controles y anémicas) ( $P < 0.05$ ) mediante test de la *t de Student*.

<sup>D</sup> Valores estadísticamente diferentes del correspondiente grupo de animales alimentados con dietas con contenido normal de Fe (comparación entre dietas con contenido normal y con sobrecarga de Fe) ( $P < 0.05$ ) mediante test de la *t de Student*.

<sup>E</sup> Valores estadísticamente diferentes del correspondiente grupo de animales alimentados con dietas con contenido normal de ácido fólico (comparación entre dietas con contenido normal y con sobrecarga de ácido fólico) ( $P < 0.05$ ) mediante test de la *t de Student*.

## Resultados y Discusión

**Tabla VII.** Glutacion peroxidasa (GPx, mmol/mg proteína/ml) en fracciones citosólicas de hígado, eritrocito y cerebro de ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche de cabra o vaca, con contenido normal o sobrecarga de Fe y contenido normal o suplemento de ácido fólico.

| TEJIDO     | Contenido de Fe | Dieta basada en leche de cabra |                            |                      |                            | Dieta basada en leche de vaca |                            |                      |                            | Nivel de significación           |                 |                 |                 |                     |
|------------|-----------------|--------------------------------|----------------------------|----------------------|----------------------------|-------------------------------|----------------------------|----------------------|----------------------------|----------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------|
|            |                 | Grupos control                 |                            | Grupos anémicos      |                            | Grupos control                |                            | Grupos anémicos      |                            | Efectos principales <sup>1</sup> |                 |                 |                 |                     |
|            |                 | Fólico normal (n=20)           | Fólico suplementado (n=20) | Fólico normal (n=20) | Fólico suplementado (n=20) | Fólico normal (n=20)          | Fólico suplementado (n=20) | Fólico normal (n=20) | Fólico suplementado (n=20) | DER <sup>2</sup>                 | Dieta           | Anemia          | Contenido de Fe | Contenido de fólico |
| Hígado     | Normal          | 0.851                          | 0.303 <sup>E</sup>         | 0.876                | 0.375 <sup>E</sup>         | 0.880                         | 0.364 <sup>E</sup>         | 0.822                | 0.339 <sup>E</sup>         | 0.035                            | NS <sup>3</sup> | NS <sup>3</sup> | < 0.01          | < 0.001             |
|            | Sobrecarga      | 0.585 <sup>aD</sup>            | 0.312 <sup>E</sup>         | 0.553 <sup>AD</sup>  | 0.342 <sup>AE</sup>        | 0.351 <sup>BD</sup>           | 0.312 <sup>DE</sup>        | 0.283 <sup>BD</sup>  | 0.272 <sup>BDE</sup>       | 0.041                            | <0.001          | NS              | < 0.01          | < 0.001             |
| Eritrocito | Normal          | 1.135                          | 1.389 <sup>a</sup>         | 1.189                | 1.665 <sup>ACE</sup>       | 1.088                         | 0.902 <sup>b</sup>         | 1.175                | 1.077 <sup>B</sup>         | 0.059                            | < 0.05          | NS              | < 0.05          | < 0.001             |
|            | Sobrecarga      | 1.070 <sup>a</sup>             | 1.104                      | 1.085 <sup>A</sup>   | 1.237 <sup>DE</sup>        | 0.845 <sup>BD</sup>           | 1.201 <sup>DE</sup>        | 0.860 <sup>BD</sup>  | 1.137 <sup>E</sup>         | 0.050                            | < 0.05          | NS              | < 0.05          | < 0.001             |
| Cerebro    | Normal          | 0.316 <sup>a</sup>             | 0.308                      | 0.315                | 0.295                      | 0.283 <sup>b</sup>            | 0.283                      | 0.292                | 0.303                      | 0.022                            | NS              | NS              | NS              | NS                  |
|            | Sobrecarga      | 0.315 <sup>a</sup>             | 0.323 <sup>a</sup>         | 0.323 <sup>A</sup>   | 0.301                      | 0.281 <sup>b</sup>            | 0.286 <sup>b</sup>         | 0.289 <sup>B</sup>   | 0.299                      | 0.031                            | < 0.05          | NS              | NS              | NS                  |

<sup>1</sup> Efectos principales: Dieta, efecto principal del tipo de dieta; Anemia, efecto principal de la ferredéficiencia; Sobrecarga de Fe, efecto principal de la sobrecarga; Contenido de ácido fólico, efecto principal del contenido de ácido fólico en las dietas.

<sup>2</sup> DER, Desviación estándar residual.

<sup>3</sup> NS, no significativo.

<sup>a,b</sup> Valores entre grupos de animales controles con distinto superíndice minúscula en la misma fila indican diferencia significativa mediante one-way ANOVA (test de Tukey).

<sup>A,B</sup> Valores entre grupos de animales anémicos con distinto superíndice mayúscula en la misma fila indican diferencia significativa mediante one-way ANOVA (test de Tukey).

<sup>C</sup> Valores estadísticamente diferentes del correspondiente grupo de animales controles (comparación entre ratas controles y anémicas) ( $P < 0.05$ ) mediante test de la *t de Student*.

<sup>D</sup> Valores estadísticamente diferentes del correspondiente grupo de animales alimentados con dietas con contenido normal de Fe (comparación entre dietas con contenido normal y con sobrecarga de Fe) ( $P < 0.05$ ) mediante test de la *t de Student*.

<sup>E</sup> Valores estadísticamente diferentes del correspondiente grupo de animales alimentados con dietas con contenido normal de ácido fólico (comparación entre dietas con contenido normal y con sobrecarga de ácido fólico) ( $P < 0.05$ ) mediante test de la *t de Student*.

## Resultados y Discusión

**Tabla VIII.** Utilización nutritiva de cobre en ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche de cabra o vaca, con contenido normal o sobrecarga de Fe y contenido normal o suplemento de ácido fólico.

| Parámetros               | Contenido de Fe | Dieta basada en leche de cabra |                                 |                           |                                 | Dieta basada en leche de vaca |                                 |                           |                                 | Nivel de significación |                 |        |                 |                     |
|--------------------------|-----------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------|---------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|---------------------------|---------------------------------|------------------------|-----------------|--------|-----------------|---------------------|
|                          |                 | Fólico normal<br>(n = 20)      | Fólico suplementado<br>(n = 20) | Fólico normal<br>(n = 20) | Fólico suplementado<br>(n = 20) | Fólico normal<br>(n = 20)     | Fólico suplementado<br>(n = 20) | Fólico normal<br>(n = 20) | Fólico suplementado<br>(n = 20) | DER <sup>2</sup>       | Dieta           | Anemia | Contenido de Fe | Contenido de fólico |
| S.S. ingerida<br>(g/día) | Normal          | 15.04                          | 15.56                           | 15.04                     | 15.56                           | 15.04                         | 15.45                           | 15.04                     | 15.45                           | 0.00                   | NS <sup>3</sup> | NS     | NS              | NS                  |
|                          | Sobrecarga      | 15.12                          | 15.61                           | 15.12                     | 15.61                           | 15.12                         | 15.53                           | 15.12                     | 15.53                           | 0.00                   | NS              | NS     | NS              | NS                  |
| Cu ingerido<br>(µg/día)  | Normal          | 97.76                          | 96.24                           | 97.76                     | 96.24                           | 95.25                         | 98.10                           | 95.25                     | 98.10                           | 0.00                   | NS              | NS     | NS              | NS                  |
|                          | Sobrecarga      | 107.35                         | 89.33                           | 107.35                    | 89.33                           | 105.28                        | 96.27                           | 105.28                    | 96.27                           | 0.00                   | NS              | NS     | NS              | NS                  |
| Cu fecal<br>(µg/día)     | Normal          | 72.38 <sup>a</sup>             | 46.91 <sup>aE</sup>             | 63.64 <sup>AC</sup>       | 44.76 <sup>AE</sup>             | 77.33 <sup>b</sup>            | 54.10 <sup>bE</sup>             | 71.38 <sup>B</sup>        | 66.45 <sup>BC</sup>             | 1.68                   | <0.05           | <0.05  | <0.05           | <0.001              |
|                          | Sobrecarga      | 78.57                          | 48.02 <sup>aE</sup>             | 75.65 <sup>AD</sup>       | 40.43 <sup>ACE</sup>            | 83.38                         | 57.65 <sup>bE</sup>             | 84.80 <sup>BD</sup>       | 68.87 <sup>BCE</sup>            | 2.45                   | <0.05           | <0.05  | <0.05           | <0.001              |
| Cu absorbido<br>(µg/día) | Normal          | 25.38 <sup>a</sup>             | 49.33 <sup>aE</sup>             | 34.12 <sup>AC</sup>       | 51.48 <sup>AE</sup>             | 18.92 <sup>b</sup>            | 43.99 <sup>bE</sup>             | 23.87 <sup>BC</sup>       | 32.85 <sup>BCE</sup>            | 1.73                   | <0.01           | <0.05  | NS              | <0.001              |
|                          | Sobrecarga      | 28.78 <sup>a</sup>             | 43.31 <sup>DE</sup>             | 31.70 <sup>A</sup>        | 48.90 <sup>ACE</sup>            | 21.40 <sup>b</sup>            | 38.55 <sup>E</sup>              | 20.48 <sup>B</sup>        | 28.67 <sup>BCE</sup>            | 1.69                   | <0.01           | <0.05  | NS              | <0.001              |
| CDA<br>(%)               | Normal          | 25.96 <sup>a</sup>             | 51.58 <sup>aE</sup>             | 34.67 <sup>AC</sup>       | 53.29 <sup>AE</sup>             | 19.22 <sup>b</sup>            | 44.53 <sup>bE</sup>             | 25.06 <sup>BC</sup>       | 33.99 <sup>BCE</sup>            | 2.55                   | <0.01           | <0.05  | NS              | <0.001              |
|                          | Sobrecarga      | 26.81 <sup>a</sup>             | 48.37 <sup>bE</sup>             | 30.21 <sup>A</sup>        | 54.73 <sup>ACE</sup>            | 20.32 <sup>b</sup>            | 40.47 <sup>bE</sup>             | 19.46 <sup>B</sup>        | 29.58 <sup>BCE</sup>            | 2.17                   | <0.01           | <0.05  | NS              | <0.001              |
| Cu urinario<br>(µg/día)  | Normal          | 4.40                           | 4.70                            | 5.52                      | 4.91                            | 3.71                          | 4.23                            | 4.39                      | 5.11                            | 0.29                   | NS              | NS     | NS              | NS                  |
|                          | Sobrecarga      | 4.70                           | 4.82                            | 3.28 <sup>A</sup>         | 6.15 <sup>ACD</sup>             | 4.67                          | 3.13                            | 5.08 <sup>B</sup>         | 3.91 <sup>B</sup>               | 0.32                   | <0.05           | NS     | NS              | NS                  |
| Cu retenido<br>(µg/día)  | Normal          | 20.98 <sup>a</sup>             | 44.62 <sup>E</sup>              | 29.60 <sup>AC</sup>       | 48.56 <sup>AE</sup>             | 12.21 <sup>b</sup>            | 39.77 <sup>E</sup>              | 19.47 <sup>BC</sup>       | 27.79 <sup>BCE</sup>            | 1.98                   | <0.01           | <0.05  | NS              | <0.001              |
|                          | Sobrecarga      | 24.07 <sup>a</sup>             | 38.45 <sup>E</sup>              | 28.41 <sup>A</sup>        | 43.14 <sup>ACE</sup>            | 16.73 <sup>b</sup>            | 35.27 <sup>E</sup>              | 15.40 <sup>B</sup>        | 24.21 <sup>BCE</sup>            | 1.73                   | <0.01           | <0.05  | NS              | <0.001              |
| R/A<br>(%)               | Normal          | 82.31                          | 90.35 <sup>E</sup>              | 86.87                     | 94.86 <sup>AE</sup>             | 76.50                         | 90.43 <sup>E</sup>              | 81.43                     | 84.08 <sup>B</sup>              | 2.09                   | NS              | NS     | NS              | <0.05               |
|                          | Sobrecarga      | 83.22                          | 87.21 <sup>E</sup>              | 89.74 <sup>A</sup>        | 99.25 <sup>ACE</sup>            | 76.98                         | 91.12 <sup>E</sup>              | 74.87 <sup>B</sup>        | 85.03 <sup>BE</sup>             | 3.79                   | <0.05           | NS     | NS              | <0.01               |
| R/I<br>(%)               | Normal          | 21.46 <sup>a</sup>             | 46.41 <sup>aE</sup>             | 30.03 <sup>AC</sup>       | 50.84 <sup>AE</sup>             | 12.32 <sup>b</sup>            | 40.35 <sup>bE</sup>             | 20.45 <sup>BC</sup>       | 28.74 <sup>BCE</sup>            | 2.48                   | <0.01           | <0.01  | NS              | <0.001              |
|                          | Sobrecarga      | 22.43 <sup>a</sup>             | 37.22 <sup>DE</sup>             | 26.45 <sup>A</sup>        | 53.78 <sup>ACE</sup>            | 15.89 <sup>b</sup>            | 36.87 <sup>E</sup>              | 14.63 <sup>B</sup>        | 25.36 <sup>BCE</sup>            | 1.83                   | <0.01           | <0.05  | NS              | <0.001              |

<sup>1</sup> Efectos principales: Dieta, efecto principal del tipo de dieta; Anemia, efecto principal de la ferodeficiencia; Sobrecarga de Fe, efecto principal de la sobrecarga; Contenido de ácido fólico, efecto principal del contenido de ácido fólico en las dietas.

<sup>2</sup>DER, Desviación estándar residual.

<sup>3</sup>NS, no significativo.

<sup>a,b</sup> Valores entre grupos de animales controles con distinto superíndice minúscula en la misma fila indican diferencia significativa mediante one-way ANOVA (test de Tukey).

<sup>A,B</sup> Valores entre grupos de animales anémicos con distinto superíndice mayúscula en la misma fila indican diferencia significativa mediante one-way ANOVA (test de Tukey).

<sup>C</sup> Valores estadísticamente diferentes del correspondiente grupo de animales controles (comparación entre ratas controles y anémicas) ( $P < 0.05$ ) mediante test de la *t de Student*.

<sup>D</sup> Valores estadísticamente diferentes del correspondiente grupo de animales alimentados con dietas con contenido normal de Fe (comparación entre dietas con contenido normal y con sobrecarga de Fe) ( $P < 0.05$ ) mediante test de la *t de Student*.

<sup>E</sup> Valores estadísticamente diferentes del correspondiente grupo de animales alimentados con dietas con contenido normal de ácido fólico (comparación entre dietas con contenido normal y con sobrecarga de ácido fólico) ( $P < 0.05$ ) mediante test de la *t de Student*.

## Resultados y Discusión

**Tabla IX.** Utilización nutritiva de cinc en ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche de cabra o vaca, con contenido normal o sobrecarga de Fe y contenido normal o suplemento de ácido fólico.

| Parámetros            | Contenido de Fe | Dieta basada en leche de cabra |                                 |                           |                                 | Dieta basada en leche de vaca |                                 |                           |                                 | Nivel de significación           |                 |        |                 |                     |
|-----------------------|-----------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------|---------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|---------------------------|---------------------------------|----------------------------------|-----------------|--------|-----------------|---------------------|
|                       |                 | Grupos control                 |                                 | Grupos anémicos           |                                 | Grupos control                |                                 | Grupos anémicos           |                                 | Efectos principales <sup>1</sup> |                 |        |                 |                     |
|                       |                 | Fólico normal<br>(n = 20)      | Fólico suplementado<br>(n = 20) | Fólico normal<br>(n = 20) | Fólico suplementado<br>(n = 20) | Fólico normal<br>(n = 20)     | Fólico suplementado<br>(n = 20) | Fólico normal<br>(n = 20) | Fólico suplementado<br>(n = 20) | DER <sup>2</sup>                 | Dieta           | Anemia | Contenido de Fe | Contenido de fólico |
| S.S. ingerida (g/día) | Normal          | 15·04                          | 15·56                           | 15·04                     | 15·56                           | 15·04                         | 15·45                           | 15·04                     | 15·45                           | 0·00                             | NS <sup>3</sup> | NS     |                 | NS                  |
|                       | Sobrecarga      | 15·12                          | 15·61                           | 15·12                     | 15·61                           | 15·12                         | 15·53                           | 15·12                     | 15·53                           | 0·00                             | NS              | NS     | NS              | NS                  |
| Zn ingerido (µg/día)  | Normal          | 585·05 <sup>a</sup>            | 588·20                          | 585·05                    | 588·20                          | 601·77                        | 631·04                          | 601·77                    | 631·04                          | 0·00                             | NS              | NS     | NS              | NS                  |
|                       | Sobrecarga      | 660·74                         | 653·90                          | 660·74                    | 653·90                          | 594·08                        | 618·76                          | 594·08                    | 618·76                          | 0·00                             | NS              | NS     | NS              | NS                  |
| Zn fecal (µg/día)     | Normal          | 302·12 <sup>a</sup>            | 275·12 <sup>a</sup>             | 304·99 <sup>A</sup>       | 283·14 <sup>A</sup>             | 419·28 <sup>b</sup>           | 396·76 <sup>b</sup>             | 412·45 <sup>B</sup>       | 465·51 <sup>B</sup>             | 21·29                            | <0·05           | NS     |                 | NS                  |
|                       | Sobrecarga      | 330·55                         | 278·19 <sup>aE</sup>            | 336·44                    | 385·52 <sup>ACDE</sup>          | 448·07                        | 435·69 <sup>b</sup>             | 435·07                    | 498·47 <sup>BCE</sup>           | 15·63                            | <0·05           | <0·05  | NS              | <0·01               |
| Zn absorbido (µg/día) | Normal          | 282·93 <sup>a</sup>            | 312·54 <sup>aE</sup>            | 280·06 <sup>A</sup>       | 305·26 <sup>AE</sup>            | 182·49 <sup>b</sup>           | 234·29 <sup>bE</sup>            | 189·32 <sup>B</sup>       | 165·53 <sup>BCE</sup>           | 16·75                            | <0·001          | NS     | <0·05           | <0·05               |
|                       | Sobrecarga      | 330·19 <sup>a</sup>            | 375·57 <sup>aE</sup>            | 324·30 <sup>A</sup>       | 268·46 <sup>ACE</sup>           | 146·01 <sup>bD</sup>          | 183·07 <sup>bDE</sup>           | 159·01 <sup>BD</sup>      | 131·90 <sup>BCDE</sup>          | 14·87                            | <0·001          | <0·05  | <0·05           | <0·05               |
| CDA (%)               | Normal          | 48·36 <sup>a</sup>             | 53·65 <sup>a</sup>              | 47·87 <sup>A</sup>        | 51·26 <sup>A</sup>              | 30·32 <sup>b</sup>            | 37·13 <sup>b</sup>              | 31·46 <sup>B</sup>        | 26·23 <sup>BC</sup>             | 2·44                             | <0·01           | <0·05  |                 | NS                  |
|                       | Sobrecarga      | 50·84 <sup>a</sup>             | 57·15 <sup>a</sup>              | 49·95 <sup>A</sup>        | 42·30 <sup>AC</sup>             | 24·58 <sup>b</sup>            | 29·59 <sup>bD</sup>             | 26·77 <sup>B</sup>        | 21·32 <sup>BC</sup>             | 2·74                             | <0·01           | <0·05  | NS              | NS                  |
| Zn urinario (µg/día)  | Normal          | 7·60                           | 5·65 <sup>E</sup>               | 6·74                      | 4·60 <sup>E</sup>               | 7·41                          | 3·97 <sup>E</sup>               | 5·64                      | 3·75 <sup>E</sup>               | 0·519                            | NS              | NS     | <0·05           | <0·01               |
|                       | Sobrecarga      | 5·52 <sup>D</sup>              | 3·56 <sup>DE</sup>              | 5·33                      | 4·23                            | 5·17 <sup>D</sup>             | 4·20                            | 6·47                      | 3·25                            | 0·562                            | NS              | NS     | <0·05           | <0·05               |
| Zn retenido (µg/día)  | Normal          | 271·33 <sup>a</sup>            | 306·33 <sup>a</sup>             | 273·31 <sup>A</sup>       | 300·84 <sup>A</sup>             | 175·08 <sup>b</sup>           | 230·31 <sup>b</sup>             | 183·68 <sup>B</sup>       | 161·78 <sup>BC</sup>            | 16·85                            | <0·001          | NS     | <0·05           | NS                  |
|                       | Sobrecarga      | 321·66 <sup>aD</sup>           | 371·01 <sup>a</sup>             | 318·98 <sup>A</sup>       | 264·46 <sup>AC</sup>            | 140·85 <sup>b</sup>           | 178·87 <sup>bD</sup>            | 152·54 <sup>B</sup>       | 128·78 <sup>BCD</sup>           | 15·48                            | <0·001          | <0·05  | <0·05           | NS                  |
| R/A (%)               | Normal          | 95·82                          | 97·44                           | 97·61                     | 98·26                           | 95·74                         | 98·59                           | 96·98                     | 97·67                           | 3·54                             | NS              | NS     | NS              | NS                  |
|                       | Sobrecarga      | 96·22                          | 98·11                           | 97·74                     | 98·85                           | 96·44                         | 97·67                           | 95·79                     | 97·46                           | 3·88                             | NS              | NS     | NS              | NS                  |
| R/I (%)               | Normal          | 46·38 <sup>a</sup>             | 52·08 <sup>a</sup>              | 46·66 <sup>A</sup>        | 51·66 <sup>A</sup>              | 29·48 <sup>b</sup>            | 36·50 <sup>b</sup>              | 30·52 <sup>B</sup>        | 25·64 <sup>BC</sup>             | 2·43                             | <0·01           | NS     |                 | NS                  |
|                       | Sobrecarga      | 48·55 <sup>a</sup>             | 56·93 <sup>a</sup>              | 48·29 <sup>A</sup>        | 48·93 <sup>AC</sup>             | 23·71 <sup>b</sup>            | 28·91 <sup>bD</sup>             | 25·68 <sup>B</sup>        | 20·81 <sup>BC</sup>             | 2·54                             | <0·01           | <0·05  | NS              | NS                  |

<sup>1</sup> Efectos principales: Dieta, efecto principal del tipo de dieta; Anemia, efecto principal de la ferodeficiencia; Sobrecarga de Fe, efecto principal de la sobrecarga; Contenido de ácido fólico, efecto principal del contenido de ácido fólico en las dietas. <sup>2</sup>DER, Desviación estándar residual. <sup>3</sup>NS, no significativo.

<sup>a,b</sup> Valores entre grupos de animales controles con distinto superíndice minúscula en la misma fila indican diferencia significativa mediante one-way ANOVA (test de Tukey).

<sup>A,B</sup> Valores entre grupos de animales anémicos con distinto superíndice mayúscula en la misma fila indican diferencia significativa mediante one-way ANOVA (test de Tukey).

<sup>C</sup> Valores estadísticamente diferentes del correspondiente grupo de animales alimentados con dietas con contenido normal de Fe (comparación entre dietas con contenido normal y con sobrecarga de Fe) ( $P < 0.05$ ) mediante test de la *t de Student*.

<sup>D</sup> Valores estadísticamente diferentes del correspondiente grupo de animales alimentados con dietas con contenido normal de ácido fólico (comparación entre dietas con contenido normal y con sobrecarga de ácido fólico) ( $P < 0.05$ ) mediante test de la *t de Student*.

## 5. Discusión

### 5.1 Parámetros hematológicos

Bajo nuestras condiciones experimentales, tras 40 días de restricción de Fe en la dieta, se induce una anemia ferropénica nutricional severa como se corrobora con los parámetros hematológicos mostrados en la Tabla I. La clave para entender mejor estos resultados obtenidos en este estudio para la medida del estado del Fe radica en el conocimiento del circuito interno de Fe resultado de la retirada y reemplazamiento cada día de 30-40 mg de Fe-hemoglobina de las células rojas senescentes. Durante la ingestión por parte de los macrófagos de las células rojas más viejas en bazo y médula ósea, el Fe es extraído de la hemoglobina y devuelto posteriormente al plasma donde se une estrechamente a su transportador, la transferrina. Más tarde, el Fe se liga en la médula ósea a la superficie de receptores específicos de precursores de células rojas. Este ciclo se completa cuando los eritrocitos recién formados pasan a la circulación sanguínea general en los siguientes días. Existen otras importantes vías de comunicación entre el Fe plasmático y el hígado o la mucosa intestinal, si bien son menos relevantes que la anteriormente mencionada.

El déficit de Fe se produce en las ratas como consecuencia de una gran pérdida de las reservas de Fe corporal que preceden a la caída en los niveles de hemoglobina. El parámetro más utilizado en la medida de la anemia por deficiencia de Fe es el porcentaje de saturación de la transferrina plasmática, el cual es bajo en esta patología (Thomas and Thomas, 2002), algo que está en concordancia con los resultados obtenidos en este estudio al demostrarse que estos niveles están bajos durante el PPE y se recuperan tras los 30 días de aporte normal de Fe en la dieta. La introducción de analizadores hematológicos automáticos mejoró sustancialmente la precisión de los índices de medida de las células rojas, por lo que el volumen corpuscular medio (VCM) pasó a ser el marcador biológico de células rojas más importante para la detección de anemia ferropénica en células rojas sanguíneas (Cook, 2005). Sin embargo, aun en condiciones de anemia ferropénica severa, este parámetro tiene los mismos valores tanto en los animales controles como en los anémicos en el día 70 del experimento. Por su

## Resultados y Discusión

parte, la ferritina sérica ha sido el parámetro más útil en la evaluación del estado del Fe ya que se trata de un indicador bien estandarizado que ofrece importantes ventajas en el examen de médula ósea para identificar la ferro-deficiencia.

Una de sus principales características es que su concentración está relacionada directamente con los depósitos corporales de Fe (Finch y col., 1986).

Tras estas consideraciones, podemos concluir que las reservas corporales de Fe se agotaron completamente tras la restricción férrica de los 40 días del PPE y que tales reservas se recuperaron nuevamente en su totalidad después de alimentar a los animales durante 30 días con los diferentes tipos de leche, ya fuera con o sin sobrecarga de Fe.

En lo que respecta al ácido fólico, podemos afirmar que su suplementación aumentó el recuento de células rojas sanguíneas en los grupos con dieta con contenido normal de Fe, algo que puede ser explicado gracias al importante papel del fólico en el crecimiento y diferenciación celular (Gursu y col., 2004). La reducción por su parte del VCM en los grupos con suplementación de fólico puede ser atribuida a la mayor pérdida celular en estos grupos dando lugar a células más pequeñas.

La sobrecarga de Fe en los animales alimentados con dieta basada en leche de vaca aumentó los niveles plasmáticos de transaminasas (ALT y AST), parámetros indicadores de daño hepatocelular, produciendo su liberación al torrente sanguíneo por la toxicidad inducida en el hepatocito. La suplementación de ácido fólico redujo los niveles plasmáticos de transaminasas en animales alimentados con leche de cabra lo que sugiere que el suplemento de ácido fólico tiene un claro efecto hepatoprotector en condiciones basales y especialmente en condiciones de sobrecarga de Fe. Este hecho pone de manifiesto las beneficiosas cualidades nutricionales de la leche de cabra, entre las que destaca la mayor biodisponibilidad de Zn, aumentando su capacidad antioxidante y además la mejor utilización nutritiva de la grasa presente en la leche de cabra produce una menor cantidad de sustrato para la peroxidación lipídica hepática con la consecuente disminución de la producción de radicales libres (Díaz-Castro y col., 2012).

La suplementación de ácido fólico aumentó los niveles plasmáticos de creatinina y CK debido a la mayor síntesis de creatina, proceso que requiere de grupos metilo y que es imprescindible en el metabolismo de los folatos (Gamble y col., 2007).

La creatina incrementa la masa muscular y la síntesis de ATP. En las 4-6 horas posteriores a dicha síntesis, el nivel de ácido tioglicólico (TDGA) aumenta rápidamente, lo que origina la disminución del pool de glutatión (GSH) poniendo en peligro las vías metabólicas dependientes de esta sustancia (Navrátil y col., 2010). Esto refleja lo perjudicial que puede llegar a ser el aumento de la síntesis de creatina, ya que la oxidación de xenobióticos deriva también en la formación de TDGA. No obstante, bajo nuestras condiciones experimentales, se observó que la suplementación con ácido fólico reduce el consumo de glutatión y mejora asimismo la capacidad antioxidante del hígado neutralizando el exceso de radicales libres generados en el metabolismo de la creatina. Además, este efecto hepatoprotector se ve potenciado por la mejora de las actividades enzimáticas antioxidantes (SOD, CAT, GPx) analizadas también en este estudio.

## 5.2. Daño oxidativo

Teniendo en cuenta el papel pro-oxidante del Fe como catalizador en las reacciones de Fenton y Harber-Weiss, el incremento en la generación de especies reactivas induce un aumento en la peroxidación lipídica, como se pone de manifiesto por los mayores niveles de TBARS. Sin embargo, este incremento es más significativo en los animales alimentados con dieta a base de leche de vaca que en los que consumen leche de cabra. Estos resultados pueden ser debidos a las beneficiosas características nutricionales de este tipo de leche que, como se ha mencionado anteriormente, aumenta la biodisponibilidad de minerales antioxidantes tales como el Zn (Díaz-Castro y col., 2012), impidiendo que se produzca el daño oxidativo causado por el Fe al reemplazarlo y reducir la oxidación en las membranas plasmáticas. Además, la mejor utilización nutritiva de la grasa de la leche de cabra proporciona menos sustrato para la peroxidación lipídica, reduciéndose así la generación de radicales libres en los animales alimentados con este tipo de leche, hecho que a su vez explica los niveles más bajos de

TBARS. Por otra parte, la suplementación con ácido fólico tiene efectos beneficiosos al reducir la peroxidación lipídica en los animales alimentados con ambos tipos de leche. Estos resultados se pueden explicar debido a que el ácido fólico atrapa radicales libres y algunos de sus metabolitos, manteniendo muy eficientemente el equilibrio fisiológico celular normal e impidiendo el daño oxidativo lipídico (Gursu y col., 2004; Valko y col., 2007).

### 5.3 Actividad enzimática antioxidante

En general, la anemia ferropénica no afecta a la actividad enzimática de la SOD, CAT y GPx por lo que no se induce daño oxidativo en los tejidos estudiados. Este hallazgo se ve apoyado por estudios previos de nuestro grupo de investigación en los que se demostró que un estado antioxidante adecuado junto con una carencia de Fe disponible tendría un efecto protector en el animal al impedir la generación de radicales libres por vías dependientes de Fe como las reacciones de Fenton y de Haber-Weiss (Díaz-Castro y col., 2008).

Los animales alimentados con dieta elaborada a base de leche de vaca, con o sin sobrecarga de Fe, experimentaron un considerable aumento de la actividad enzimática de la SOD en todos los órganos estudiados. Sin embargo, la suplementación con ácido fólico en las distintas condiciones experimentales disminuyó la actividad de la SOD. También se observó un aumento concomitante de la CAT en todos los órganos, especialmente con el suplemento de ácido fólico. Estos resultados indican que existe un aumento en la generación de hidroperóxidos causado por la actividad aumentada de la SOD y que este exceso de especies reactivas es neutralizado por la CAT (cuya actividad también se encuentra aumentada), necesitando por tanto un incremento de la actividad de la GPx para eliminar el exceso de especies altamente perjudiciales para la célula y evitar que se produzca una situación de estrés oxidativo.

Sin embargo, la sobrecarga de Fe disminuye la actividad de la GPx, especialmente en hígado y eritrocito de los animales alimentados con dieta basada en leche de vaca. Esto puede deberse a la progresiva reducción de la actividad de esta

## Resultados y Discusión

enzima en el proceso de neutralización de radicales libres. No obstante, esta reducción de la actividad de la GPx es menor en hígado y cerebro de los animales alimentados con dieta basada en leche de cabra debido a sus mejores características nutricionales, entre las que destaca su mejor calidad lipídica que da lugar a la generación de menos radicales libres (Díaz-Castro y col., 2012).

Como hemos mencionado anteriormente, el ácido fólico disminuyó la actividad de la SOD, primera línea de defensa del organismo. De hecho, las dietas con déficit en ácido fólico originan alteraciones del estrés oxidativo y de los metabolitos monocarbonados, debido fundamentalmente a un descenso del ratio glutatión oxidado/reducido, un desequilibrio del sistema celular de defensa antioxidante y, por último, una alteración en la expresión y actividad de las enzimas antioxidantes (SOD, CAT y GPx) con la consiguiente alteración oxidativa de las biomoléculas (Bagnyukova y col., 2008). Así pues, la suplementación con ácido fólico tuvo una buena repercusión sobre los biomarcadores oxidativos, demostrando su efecto beneficioso en la defensa antioxidante.

En este sentido, la suplementación con ácido fólico condujo a una disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes en cerebro y eritrocito que puede ser interdependiente (Valko y col., 2007), debido al efecto *scavenging* del folato, capaz de secuestrar el exceso de radicales libres propiciando así el descenso de la actividad enzimática de la SOD y la consecuente disminución de la producción de hidroperóxidos.

Por otro lado, los radicales libres tienen un efecto perjudicial en el cerebro al producir un daño oxidativo importante si bien los mecanismos de defensa antioxidante siguen sin estar completamente dilucidados en este tejido. Algunos autores sugieren que este órgano no dispone de suficientes mecanismos de defensa (Uttara y col., 2009), mientras que otros proponen que existen algunos sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos que lo protegen frente al daño oxidativo (Ozturk y col., 2005), indicando incluso la presencia en este órgano de enzimas antioxidantes como la CAT, SOD o GPx (Manikandan y col., 2005; Alférez y col., 2011).

## Resultados y Discusión

En nuestras condiciones experimentales, las actividades de estas enzimas antioxidantes apenas sufrieron modificaciones en el tejido nervioso, ya sea con dietas con o sin sobrecarga de Fe, probablemente debido a que el receptor TfR1 de la barrera hematoencefálica no aumenta su expresión en condiciones de anemia o sobrecarga de Fe (Moos y col., 2007), limitando la cantidad de Fe que ingresa en el tejido nervioso.

El hígado es un tejido particularmente sensible al estrés oxidativo, algo que se refleja en el aumento de la actividad de la SOD en el citosol hepático cuando se administra una dieta con sobrecarga de Fe, lo que conduce a una mayor expresión de hepcidina que conlleva a su vez una activación de la ferroportina 1, bloqueando la liberación de Fe en los hepatocitos y favoreciendo su acumulación en este órgano (Ben-Assa y col., 2009). En consecuencia, aumenta la generación de radicales libres, hecho por el cual aumenta la actividad de la SOD (Díaz-Castro y col., 2012). Todos estos factores conllevan a una excesiva activación de los mecanismos de defensa antioxidante y una desactivación progresiva de las enzimas, lo cual puede explicar la disminución de la actividad GPx.

La suplementación de ácido fólico aumenta los niveles de CAT en el hígado. Por otro lado, el incremento de la actividad de la SOD en los animales alimentados con dietas con contenido normal de fólico (sobre todo a base de leche de vaca) conduce a un incremento en la formación de hidroperóxidos, aumentando también por consecuencia la actividad de la CAT a fin de neutralizar los efectos de esta sobreproducción de radicales. Los mayores niveles de CAT encontrados en hígado de los animales alimentados con una dieta suplementada en ácido fólico se deben al efecto antioxidante y *scavenging* del mismo, gracias a los cuales se protegen los hepatocitos del estrés oxidativo al disminuir la concentración de homocisteína y al aumentar la capacidad antioxidante de la CAT (Yamakura y col., 1998; Handy y col., 2005). Además, el ácido fólico puede tener efectos antioxidantes independientes del descenso de los niveles de homocisteína al inhibir la NADPH oxidasa que media en la producción del anión superóxido (Woo y col., 2006), al mejorar la capacidad antioxidante total del plasma cuando se capta el exceso de radicales libres producidos debido al incremento de la actividad de la SOD (Alvares Delfino y col., 2007), y al evitar la progresiva inactivación de la CAT. Estos hechos desencadenan un aumento concomitante de la actividad de la GPx, ya que se necesita para la eliminación de los productos

intermediarios originados tan perjudiciales para la célula. Esto conduce a la inactivación progresiva de las defensas antioxidantes justificándose de esta manera el descenso de la actividad de la GPx, especialmente en los grupos de animales con sobrecarga de Fe.

La actividad de la SOD se incrementa al administrar la dieta basada en leche de vaca sobrecargada en Fe. Esto puede ser el resultado de un mecanismo compensatorio del organismo frente al estrés oxidativo, sin embargo, el incremento de las especies reactivas resultantes de la peroxidación lipídica (TBARS) en estos grupos sugiere una alteración del funcionamiento del sistema de defensa antioxidante. De este modo, tal peroxidación lipídica está directamente relacionada con el considerable incremento de la actividad de la SOD. Aunque esta enzima sea la principal defensa frente al daño oxidativo, actúa conjuntamente con la GPx y la CAT, enzimas que no actúan sobre el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado en exceso por la actividad de la SOD (Agay y col., 2005). De esta manera, el aumento de la actividad de la SOD conlleva una acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que desencadena la aparición de reacciones de Fenton en las que se generan altas cantidades de radicales libres causando la oxidación de las proteínas hepáticas. Por tanto, existe una relación evidente entre las actividades de la SOD y la GPx y la producción de TBARS en el hígado.

### 5.4 Utilización nutritiva de cobre y cinc

El átomo de Cu es esencial para la actividad catalítica de la enzima SOD Cu/Zn, mientras que el de Zn le proporciona estabilidad. La SOD se encuentra mayoritariamente en el citosol y el núcleo de las células eucarióticas, algunas SOD Cu/Zn pueden estar presentes en los peroxisomas o incluso en fluidos extracelulares, donde parece tener un efecto protector (Rojkind y col., 2002).

La mayor utilización digestiva y metabólica de Cu y Zn en animales controles y anémicos alimentados con las dietas elaboradas a base de leche de cabra en todas las

## Resultados y Discusión

condiciones experimentales podría ser debido a varios factores: por una parte los mayores valores de eficacia de regeneración de hemoglobina (Alfárez y col., 2006); el mayor contenido en cisteína en la leche de cabra (0.32 g/ 100 g leche) respecto a la de vaca (0.21 g/ 100 g leche) (Alfárez y col., 2006), aminoácido principal componente de la metalotioneína, proteína involucrada en el metabolismo del Cu y del Zn (Hempe y Cousins, 1991); el mayor contenido de MCT respecto a la leche de vaca (Alfárez y col. 2006), que podría favorecer el transporte de nutrientes como el Cu a través de la membrana basolateral del enterocito (Tappenden y col., 1997) ya que los MCT son absorbidos sin re-esterificación entrando directamente en circulación portal y metabolizados para obtener rápidamente energía (García-Unciti, 1996). Además, la leche de cabra contiene mayor cantidad de vitaminas C y D (Alfárez y col., 2006), favoreciendo la vitamina D el aumento en la concentración de la proteína ligadora de Cinc (CRIP) (Hartiti y col., 1994), la cual se une al Zn durante el transporte a través de la mucosa intestinal, aunque también la vitamina C favorece la absorción de Zn pero con una menor influencia que la D (Sandstrom y Cederblad, 1987).

En el enterocito, parte del cobre (entre un 50-55%) es captado por el DMT1 y el hCTRI situado en la membrana apical de dicha célula. En esta zona del enterocito existen oxido-reductasas que reducen el  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{1+}$  favoreciendo su captación por diversos transportadores no saturables (Olivares y col., 2010). En nuestro caso, observamos que el suplemento de ácido fólico duplica la absorción de cobre, hecho que podemos atribuir al carácter reductor y antioxidante de esta vitamina, que favorece la conversión de  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{1+}$ , lo que podría incidir de manera positiva en la actividad enzimática de la SOD dado el papel que juega el Cu como cofactor de su actividad catalítica. Este hallazgo no es observado con el cinc ya que este mineral se absorbe exclusivamente a través del DMT1 como catión divalente.



# **V.CONCLUSIONES**

## Conclusiones

La investigación llevada a cabo estudia algunos parámetros bioquímicos relacionados con la fisiología hepática, los mecanismos de peroxidación lipídica y la defensa enzimática antioxidante durante la recuperación de la anemia ferropénica nutricional tras el consumo de dietas basadas en leche de cabra o vaca con un contenido normal o con sobrecarga crónica de Fe y suplementadas o no en ácido fólico.

Los animales se sometieron a un periodo pre-experimental (PPE) de 40 días en el que un grupo control se alimenta con una dieta estándar con contenido normal de Fe (45 mg/Kg dieta), y otro grupo se alimenta con una dieta con bajo contenido en Fe (5 mg/Kg dieta) para inducir experimentalmente la anemia ferropénica nutricional, realizándose un estudio hematológico en ambos grupos al final de dicho periodo.

Posteriormente, ambos grupos de animales se someten a un periodo experimental (PE) en el que son alimentados “pair feed” durante 30 días 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) y contenido normal (2 mg/Kg dieta) o suplemento de ácido fólico (40 mg/Kg dieta). En los últimos 7 días de este PE se recogen por separado heces y orina para la determinación de la utilización digestiva y metabólica de Cu y Zn.

Al final del PE, se determinan parámetros hematológicos, transaminasas, creatina, creatin-kinasa, TBARS y las principales enzimas antioxidantes (SOD, CAT y GPx) en plasma y citosol de hígado, cerebro y eritrocito.

## Conclusiones

After analyzing the data obtained, we have reached the following CONCLUSIONS:

### **FIRST CONCLUSION**

Cow milk-based diet with iron-overload increased *alanine transferase* and *aspartate transaminase* plasma levels in control and anaemic rats, indicating hepatocellular damage and subsequently release of both transaminases into the bloodstream. Dietary folate supplementation in goat milk's diet reduced plasma transaminases levels, suggesting a hepatoprotective effect under basal conditions and more noticeably in situation of Fe-overload. This fact can be explained by the better zinc bioavailability and nutritive utilisation of goat milk fat, which provides lower substrate for hepatic lipid peroxidation and consequently reduces free radicals production in the animals consuming this type of milk.

### **SECOND CONCLUSION**

Folic acid supplementation in goat and cow milk-based diets with normal or iron-overload increased creatinine and creatin-kinase plasma levels in the control and anaemic groups, because of high production of creatine, which is a major consumer of methyl groups. From an oxidative point of view, the increase in plasma creatinine would be negative because the oxidative degradation of xenobiotics via thiodiglycolic acid formation decreases the plasma glutathione, one of the main intracellular antioxidant; therefore, this fact lead to a decrease of all metabolic pathways dependent on glutathione. However, it can be postulated that folate supplementation reduces the glutathione consumption and also improves hepatic antioxidant capacity, scavenging the

## Conclusiones

excessive free radicals produced in the course of creatine metabolism, finding supported by the activities of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase recorded in the current study.

### **THIRD CONCLUSION**

Cow milk-based diet with iron-overload increased lipid peroxidation products levels (TBARS) in control and anaemic groups, suggesting an imbalance in the functioning of the enzymatic antioxidant defence system. On the other hand, folate supplement in goat and cow milk-based diets has beneficial effects on antioxidant status, avoiding lipid peroxidation in liver, brain and erythrocyte.

### **FOURTH CONCLUSION**

Cow milk-based diet either with normal-iron or iron-overload provoked a remarkable increase in the superoxide dismutase and catalase activity in liver, brain and erythrocyte, especially with folate supplementation for catalase, inducing a concomitant augmentation in the formation of hydroperoxides. The increased activity of both enzymes recorded with cow milk-based diet and iron-overload is a compensatory mechanism of the body to cope with the increase in oxidative stress. The lower levels of glutathione peroxidase in the groups fed iron-overload diets, especially in liver and erythrocyte of the animals fed cow milk, can be explained by the reduction of the enzyme in the process of neutralisation of free radicals generated.

## **FIFTH CONCLUSION**

Folate-supplementation in the diets led to a reduction in the peroxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in brain and erythrocyte, which suggest that the functions of the key intracellular antioxidant enzymes may be interdependent. This finding could be due to the antioxidant effects of folate and the capacity of scavenging the excessive free radicals output, a fact that can be directly correlated with the lower increase in superoxide dismutase activity in these tissues, reducing the formation of hydroperoxides. The unchanged activities of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in the nervous tissue, revealed that it is relatively independent of the iron variations in the organism.

## **SIXTH CONCLUSION**

In groups fed with goat milk-based diet under all experimental conditions, it exists a higher digestive and metabolic utilization of copper and zinc due to beneficial nutritional characteristics of this milk. Furthermore, folic acid supplement in goat or cow milk-based diets highly enhanced copper absorption due to the reducing and antioxidant character of this vitamin, provoking the transformation of  $\text{Cu}^{2+}$  into  $\text{Cu}^{1+}$ , influencing positively the enzymatic activity of SOD, fact that can be attributed to its role as a cofactor. This finding is not observed with zinc digestive and metabolic utilization, since this mineral is absorbed mainly via DMT1 uptake as a divalent cation.

## **OVERALL CONCLUSION**

Folate-supplemented goat milk-based diet consumption in situation of iron-overload leads to a reduction of *alanine transferase* and *aspartate transaminase* plasma levels, suggesting a hepatoprotective effect with beneficial effects, protecting cell from free radicals oxidative damage, improving the antioxidant enzymes activities and limiting lipid peroxidation. Therefore, it would be reccomendable the consumption of folate-supplemented caprine milk in populations suffering from nutritional ferropenic anaemia and intaking oral Fe supplements.



# **VI. BIBLIOGRAFÍA**

- Achón M., Alonso-Aperte E., Reyes L., Úbeda N., Varela-Moreiras G. "High-dose folic acid supplementation in rats: effects on gestation and the methionine cycle". *Br. J. Nutr.*, 2000; 83: 177-183.
- Aebi H. "Catalase in vitro". *Methods Enzymol*, 1984; 150: 121-127.
- Agay D., Sandre C., Ducros V., Faure H., Cruz C., Alonso A., Roussel A.M., Chancerelle Y. "Optimization of selenium status by a single intraperitoneal injection of Se in Se-deficient rat: possible application to burned patient treatment". *Free Rad. Biol. Med.*, 2005; 39: 762-768.
- Agte V., Jahagirdar M., Chiplonkar S. "Apparent absorption of eight micronutrients and phytic acid from vegetarian meals in ileostomized human volunteers". *Nutrition*, 2005; 21(6): 678-685.
- Alfárez M.J., Barrionuevo M, López-Aliaga I., Sanz-Sampelayo M.R., Lisbona F., Robles J.C., Campos M.S. "Digestive utilization of goat and cow milk fat in malabsorption syndrome". *J. Dairy Res.*, 2001; 68: 451-461.
- Alfárez M.J., Díaz-Castro J., López-Aliaga I., Rodríguez-Ferrer M., Pérez-Sánchez L.J., Campos M.S. "Development of nutritional iron deficiency in growing male rats: haematological parameters, iron bioavailability and oxidative defence". *Br. J. Nutr.*, 2011; 105(4): 517-525.
- Alfárez M.J.M., López-Aliaga I., Nestares T, Díaz-Castro J., Barrionuevo M, Ros P.B., Campos M.S. "Dietary goat milk improves iron bioavailability in rats with induced nutritional ferropenic anaemia in comparison with cow milk". *Int. Dairy J.*, 2006; 16: 813-821.
- Alfárez M.J.M., Navarro Alarcón M., Lisbona Delgado F. "Estudio de los minerales de la dieta con efecto antioxidante". *Curso del Master de Nutrición Humana, UGR*, 2012.

Alvares Delfino V.D., De Andrade Vianna A.C., Mocelin A.J., Sabbatini Barbosa D., Aiko Mise R., Matsuo T. "Folic acid therapy reduces plasma homocysteine levels and improves plasma antioxidant capacity in hemodialysis patients". *Nutrition*, 2007; 23: 242–247.

American Dairy Goat Association. *Goat Milk Facts*, 2004.

Anderson G.J., Frazer D.M., McLaren G.D. "Iron absorption and metabolism". *Curr Opin Gastroenterol* 2009, 25: 129–135.

Ania B.J., Suman V.J., Fairbanks V.F. "Incidence of anemia in older people: an epidemiologic study in a well defined population". *J. Am. Geriatr. Soc.*, 1997; 45: 825-831.

Arredondo M., Martínez R., Núñez M.T., Ruz M., Olivares M. "Inhibition of iron and copper uptake by iron, copper and zinc". *Biol. Res.*, 2006; 39: 95-102.

Arredondo M., Núñez M.T. "Iron and copper metabolism". *Mol. Aspects Med.*, 2005; 26(4-5): 313-327.

Aruoma O.I., Halliwell B. "DNA damage and free radicals". *Chem Brit*, 1991; 2: 149-152.

Babayan V.K. "Medium chain length fatty acids esters and their medical and nutritional applications". *JAOCS*, 1981 ; 59: 49A-51A.

Babior BM. "The leukocyte NADPH oxidase". *Isr. Med. Ass. Journal.*, 2002; 4 (11): 1023-1024.

Baech S.B., Hansen M., Bukhave K., Jensen M., Sorensen S.S., Kristensen L., Purslow P.P., Skibsted L.H., Sandström B. "Nonheme-iron absorption from a phytate-rich meal is increased by the addition of small amounts of pork meat". *Am. J. Clin. Nutr.*, 2003; 77(1): 173-179.

- Bagnyukova T.V., Powell C.L., Pavliv O., Tryndyak V.P., Pogribny I.P. “Induction of oxidative stress and DNA damage in rat brain by a folate/methyl-deficient diet”. *Brain Res.*, 2008; 1237: 44–51.
- Ballester M. “Antioxidantes, radicales libres y salud. Un enfoque químico-orgánico-físico”. *Med Clin*, 1996; 107: 509-515.
- Baltussen R., Knai C., Sharan M. “Iron fortification and iron supplementation are cost-effective interventions to reduce iron deficiency in four subregions of the world”. *J. Nutr.*, 2004; 134: 2678-2684.
- Barbi de Moura M., Santana dos Santos L., Van Houten B. “Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases and cancer”. *Environ. Mol. Mut.*, 2010; 51: 391-405.
- Beard J.L. “Iron biology in immune function, muscle, metabolism, and neuronal functioning”. *J. Nutr.*, 2001; 131: 568S-579S.
- Ben-Assa E., Youngster I., Kozer E., Abu-Kishk I., Bar-Haim A., Bar-Oz B., Berkovitch M. “Changes in serum hepcidin levels in acute iron intoxication in a rat model”. *Toxicol. Letters*, 2009; 189: 242-247.
- Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L. “Biochemistry”, 6th edition. Eds.: W. H. Freeman and co., New York, 2007.
- Bergmeyer H.U., Scheibe P., Wahlefeld A.W. “Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase”. *Clin. Chem.*, 1978; 24: 58–73.
- Beutler E., Hoffbrand A.V., Cook J.D. “Iron deficiency and overload”. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, 2003; 40-61.
- Bevilacqua C., Martin P., Candalh C., Fauquant J., Piot M., Roucayrol A.M., Pilla F., Heyman M. “Goats’ milk of defective  $\alpha$ S1-casein genotype decreases intestinal

and systemic sensitization to  $\beta$ -lactoglobulin in guinea pigs". *J. Dairy Res.*, 2001; 68(2): 217-227.

Bodgen JD. "Influence of zinc on immunity in the elderly". *J. Nutr. Health Aging*; 2004; 8(1): 48-54.

Bondo T., Jensen S.K. 2011 "Administration of RRR- $\alpha$ -tocopherol to pregnant mares stimulates maternal IgG and IgM production in colostrum and enhances vitamin E and IgM status in foals". *J. An. Phys. & An. Nutr.*, 95: 214-222.

Boza J., Sanz-Sampelayo M.R. "Nutritional aspects of goat milk". *An. Acad. Cienc. Vet. Andalucía Oriental.*, 1997; 10: 109-139.

Branda R.F. "Anemia ferropriva". In: Wood M.E. "Secretos de hematología y oncología". 2ª Ed., Rio de Janeiro, McGraw-Hill Interamericana, 2000; pp: 37-41.

Brito A., Hertrampf E., Olivares M., Gaitán D., Sánchez H., Allen L.H., Uauy R. "Folatos y vitamina B<sub>12</sub> en la salud humana". *Rev. Med. Chile* 2012; 140: 1464-1475.

Brownlie T., Utermohlen I.V., Hinton P.S., Giordano C., Haas J.D. "Marginal iron deficiency without anemia impairs aerobic adaptation among previously untrained women". *Am. J. Clin. Nutr.*, 2002; 75: 734-742.

Bysokogorskiĭ V.E., Veselov P.V. "Estimation of antioxidizing properties of goat and cow milk". *Vopr Pitan.* 2010; 79(1): 56-58.

Camougrand N., Rigoulet M. "Aging and oxidative stress: studies of some genes involved both in aging and in response to oxidative stress". *Resp. Phys.*, 2001; 128: 393-401.

Campos M.S., Barrionuevo M., Alferez M.J.M., Gómez-Ayala A.E., Rodríguez- Matas, M.C., López-Aliaga I., Lisbona, F. "Interactions among iron, calcium,

phosphorus and magnesium in nutritionally iron-deficient rats”. *Exp. Physiol.*, 1998; 83: 771-781.

Campos M.S., Barrionuevo M., Alférez M.J.M., Nestares T., Díaz-Castro J., Ros P.B., Ortega E., López-Aliaga I. “Consumption of caprine milk improves metabolism of calcium and phosphorus in rats with nutritional ferropenic anaemia”. In. *Dairy J.*, 2007; 17: 412-419.

Cappa C., Marti A. “Nuevas moléculas que regulan el metabolismo del hierro”. *Revista Hospital El Cruce*. Año 1, N°3. 2009.

Carruth BR. “Adolescencia”. En: Brown ML, Filer LJ, Guthrie HA y Filer LJ, Jr, Lavender OA, McCormick DB, Olson RE, Eds. «Conocimientos actuales sobre nutrición». Washington: OPS, 1991; pp: 375-384.

Castillo R., Huerta P., Carrasco R., Rodrigo R. “Estrés oxidativo y daño renal”. *Ciencia e Investigación Médica Estudiantil Latinoamericana*, 2003; 8(1): 43-52.

Caulfield LE, Zavaleta N, Shankar AH, Merialdi M. “The potential contribution of maternal zinc supplementation during pregnancy to maternal and child survival”. *Am. J. Clin. Nutr.* 1989; 68: 499S-509S.

Cavalli-Sforza T., Berger J., Smitasiri S., Viteri F. “Weekly iron-folic acid supplementation of women of reproductive age: impact overview, lessons learned, expansion plans, and contributions toward achievement of the millennium development goals “. *Nutr. Rev.*, 2005; 63: S152-S158.

Cea Bonilla A., del Arenal Mena I.P., Riveros Rosas H., Vázquez-Contreras E. “Mensaje bioquímico”. Vol XXVI. Dpto. Bioquímica. Fac. Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, 2002.

Chacón A. “Aspectos nutricionales de la leche de cabra (*Capra hircus*) y sus variaciones en el proceso agroindustrial”. *Agronomía Mesoamericana*, 2005; 16: 239-225.

- Chacón A. “Comparación de la titulación de la acidez de leche caprina y bovina con hidróxido de sodio y cal común saturada”. *Agronomía Mesoamericana*, 2006; 17(1): 55-61.
- Chandan R.C., Attaie R., Sahani K.M. “Nutritional aspects of goat milk and its products”. In: «Recent advances in goat production». Pre-Conference Proceedings, 1992; Vol. I, part II, pp: 399-420.
- Cheeseman K.H., Slater T.F. “Free radical in medicine”. *British Council Bulletin*, 1993.
- Chilliard Y. “Caractéristiques biochimies des lipids du lait de chèvre. Comparaison avec les laits de vache et humain”. In: «Intérêts nutritionnel et diététique du lait de chèvre». Niort, INRA editions, 1996; pp: 51-65.
- Chilliard Y., Glasser F., Ferlay A., Bernard L., Rouel J., Doreau M. “Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat”. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2007; 109: 828-855.
- Choi S.W., Mason J.B. “Folate and carcinogenesis: an integrated scheme”. *J. Nutr.*, 2000; 130: 129-132.
- Conor Reilly B. “Metal contamination of foods”. *Applied Science Publishers Ltd.* London, 1980; 354.
- Conrad M.E., Umbreit J.N. “Pathways of iron absorption”. *Blood Cells Mol. Dis.*, 2002; 29: 336-355.
- Constantinou C., Papas A., Constantinou A.I. “Vitamin E and cancer: An insight into the anticancer activities of vitamin E isomers and analogs”. *Internat. J. Canc.*, 2008; 123(4):739-52.
- Cook J.D. “Diagnosis and management of iron-deficiency anaemia”. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.*, 2005; 18: 319-332.

- Costa J.M. "Diccionario de química física". Ediciones Díaz de Santos, 2005.
- Crapo J.D., McCord J.M., Fridovich I. "Preparation and assay of superoxide dismutases". *Methods Enzymol.*, 1978; 53: 382–393.
- Csapo J., Stefler J., Martin T.G., Makray S., Csapo-Kiss Z. 1994 "Fat content, fatty acid composition and vitamin content of mare's milk". *Acta alimentaria*, 23(2): 169-178.
- Darnton I., Coveney J., Davey G.R. "Goat milk, nutritional and public health aspects: a review". *Food Tech. Australia.*, 1987; 39: 572-688.
- DeSandro V., Chevrier M., Boddaert A., Melcion C., Cordier A., Richiert L. "Comparison of the effects of propylthiouracil, diphenyl hydantoin, phenobarbital and 3 methylcholanthrene on hepatic and renal T4 metabolism and thyroid gland function in rats". *Toxicol Appl Pharmacol* 1991; 111: 263–278.
- Devle H., Vetti I., Naess-Andresen C.F., Rukke E., Vergarud G., Ekeberg D. 2012 "A comparative study of fatty acid profiles in ruminant and non-ruminant milk". *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 114: 1036-1043.
- De Paz R., Hernández-Navarro F. "Manejo, prevención y control de la anemia megaloblástica secundaria a déficit de ácido fólico". *Nutr Hosp*, 2006; 21(1): 113-119.
- Díaz-Castro J., Alférez M.J.M., López-Aliaga I., Nestares T., Campos M.S. "Effect of calcium-fortified milk-rich diets (either goat's or cow's milk) on copper bioavailability in iron-deficient anemia". *Dairy Sci. Technol.*, 2011; 91: 203–212.
- Díaz-Castro J., Alférez M.J.M., López-Aliaga I., Nestares T., Campos M.S. "Effect of calcium-supplemented goat or cow milk on zinc status in rats with nutritional ferropenic anaemia". *Int. Dairy J.*, 2009; 19: 116-121.

- Díaz-Castro J., Alferez M.J.M., Lopez-Aliaga I., Nestares T., Granados S., Barrionuevo M., Campos M.S. “Influence of nutritional iron deficiency anemia on DNA stability and lipid peroxidation in rats”. *Nutrition*, 2008; 24: 1167–1173.
- Díaz-Castro J., Alferez M.J.M., López-Aliaga I., Nestares T., Sánchez-Alcover A., Campos M.S. “Bile composition, plasma lipids and oxidative hepatic damage induced by calcium supplementation; effects of goat or cow milk consumption”. *J. Dairy Res.*, 2013; 80: 246–254.
- Díaz-Castro J., Hijano S., Alferez M.J.M., López-Aliaga I., Nestares T., López-Frías M., Campos M.S. “Goat milk consumption protects DNA against damage induced by chronic iron overload in anaemic rats”. *Int. Dair J.*, 2010; 20: 495-499.
- Díaz-Castro J., Pérez-Sánchez L.J., López-Frías M.R., López-Aliaga I., Nestares T., Alferez M.J.M., Ojeda M.L., Campos M.S. “Influence of cow or goat milk consumption on antioxidant defence and lipid peroxidation during chronic iron repletion”. *Br. J. Nutr.*, 2012; 108: 1–8.
- Díaz-Castro J., Pulido M., Alferez M.J.M., Ochoa J.J., Rivas E., Hijano S., López-Aliaga I. “Goat milk consumption modulates liver divalent metal transporter 1 (DMT1) expression and serum hepcidin during Fe repletion in Fe-deficiency anemia”. *J Dairy Sci.*, 2014; 97(1): 147-154.
- Doreau M.1994 “Le lait de jument et sa production: particularités et facteurs de variation”. *Lait*, 74: 401-418.
- Doreau M., Boulot S.1989“Recent knowledge on mare milk production: a review”. *Livest. Prod. Sci.*, 22: 213-235.
- Doreau M., Martuzzi F.2006a “Fat content and composition of mare’s milk”. *Nutr. Feed. Broodmare, Part B*, 77-88.

- Doreau M., Martuzzi F.2006b “Mare milk composition: recent findings about protein fractions and mineral content”. *Nutr. Feed. Broodmare, Part B*, 65-76.
- Doreau M., Martuzzi F.2006c “Milk yield of nursing and dairy mares”. *Nutr. Feed. Broodmare, Part B*, 57-64.
- Dröge W. “Free radicals in the physiological control of cell function”. *Physiol. Rev.*, 2002; 82(1): 47-95.
- Eichler K., Wieser S., Rütthemann I., Brügge U. “Effects of micronutrient fortified milk and cereal food for infants and children: a systematic review”. *BMC Public Health* 2012, 12: 506.
- Elejalde Guerra JI. “Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes”. *An. Med. Int.*, 2001; 18 (6): 326-335.
- Emery T. “Iron oxidation by casein”. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1992; 182(3): 1047-1052.
- Eun-Sun H., Bowen P.E. “Effects of lycopene and tomato paste extracts on DNA and lipid oxidation in LNCaP human prostate cancer cells”. *BioFactors* 01/2005, 2007; 23(2): 97-105.
- Evans P., Lyras L., Halliwell B. “Measurement of protein carbonyls in human brain tissue”. *Methods Enzymol*, 1999; 300: 145-156.
- Fairweather-Tait S.J. “Iron”. *J. Nutr.*, 2001a; 131(4): 1383S-1386S.
- Fairweather-Tait S.J. “Bioavailability of nutrients and other bioactive components from dietary supplements: iron”. *J. Nutr.*, 2001b; 131: S1383-S1386.
- FAO/WHO (Food and Agriculture/World Health Organization). “Necesidades en proteínas”. *Reunión sobre la Nutrición, nº37*. Roma, 1966.

- Fava M., Borus J.S., Alpert J.E., Nierenberg A.A., Rosenbaum J.F., Bottiglieri T. "Folate, vitamin B<sub>12</sub>, and homocysteine in major depressive disorders". *Am J Psych*, 1997; 154: 426-428.
- Finch C.A., Bellotti V., Stray S., Huebers H.A. "Plasma ferritin determination as a diagnostic tool". *West Journal of Medicine*, 1986; 145: 657-663.
- Finkel T., Holbrook N.J. "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing". *Nature*, 2000; 408(6809): 239-247.
- Flohé L., Gunzler W.A. "Assays of glutathione peroxidase". *Method. Enzymol.*, 1984; 105: 114-121.
- Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. "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.: Nat. Ac. Press, 2004; pp: 290-393.
- Freeman B.A., Grapo J.D. "Biology of disease. Free radicals and tissue injury". *Lab Inv*, 1982; 47: 412-426.
- Fridovich I. "Superoxide dismutase". *Ann. Rev. Biochem.*, 1974; 44: 147-159.
- Fridovich I. "Superoxide radical: and endogenous toxicant". *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1983; 23: 239-257.
- Gaitán D.C., Olivares M.G., Arredondo M.O., Pizarro A. "Iron bioavailability in humans". *Rev. Chil. Nutr.*, 2006 ; 33(2): 142-148.
- Gamble M.V., Liu X., Slavkovich V., Pilsner J.R., Ilievski V., Factor-Litvak P., Levy D., Alam S., Islam M., Parvez F., Ahsan H., Graziano J.H. "Folic acid supplementation lowers blood arsenic". *Am. J. Clin. Nutr.*, 2007; 86(4): 1202-1209.

- García Unciti M.S. “Utilidad terapéutica de los triglicéridos de cadena media (MCT). Dietas cetogénicas en la epilepsia infantil”. *Nutrición Clínica*, 1996; 16: 7-35.
- Genova ML., Merlo Pich M., Biondi A., Bernacchia A., Falasca A., Bovina C., Formiggini G., Parenti Castelli G., Lenaz G. “Mitochondrial production of oxygen radical species and the role of Coenzyme Q as an antioxidant”. *Exp Biol and Med*, 2003; 228(5): 506-513.
- Ghiselli A., Serafini M., Natella F., Scaccini C. “Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data”. *Free Radic Biol Med*, 2000; 29(11): 1106-1114.
- Gibson R.S., Yeudall F., Drost N., Mtitimuni B.M., Cullinan T.R. “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.*, 2003; 133(2): 3992S-3999S.
- González-Gross M., Sola R., Castillo M.J. “Folato: una vitamina en constante evolución”. *Med Clin (Barc)* 2002; 119(16): 627-635.
- Grace N.D., Pearce S.G., Firth E.C., Fennessy P.F. 1999 “Concentrations of macro- and micro-elements in the milk of pasture-fed thoroughbred mares”. *Aust. Vet. J.*, 77(3): 177-180.
- Grantham-McGregor S., Ani C. “A review of studies on the effect of iron deficiency on cognitive development in children”. *J. Nutr.*, 2001; 131: 649S-668S.
- Green R., Miller J.W. “Folate deficiency beyond megaloblastic anemia: hyperhomocysteinemia and other manifestation of dysfunctional folate status”. *Semin. Hematol*, 1999; 36: 47-64.
- Greenwald R.A., Moy W.W. “Effect of oxygen derived free radicals on hyaluronic acid”. *Arthritis Rheum*, 1980; 23: 455-463.

- Grinder-Pedersen L., Bukhave K., Jensen M., Hojgaard L., Hansen M. "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.*, 2004; 80: 404-409.
- Gursu M.F., Onderci M., Gulcu F., Sahin K. "Effects of vitamin C and folic acid supplementation on serum paraoxonase activity and metabolites induced by heat stress in vivo". *Nutr. Res.*, 2004; 24: 157-164.
- Gutteridge J.M.C. "Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection". *Chem. Biol. Interactions*, 1994; 91(2-3): 133-140.
- Gutteridge J.M.C., Halliwell B. "Antioxidants in nutrition, health, and disease". Oxford University Press, 1994; 4: 63-81.
- Haas J.D., Brownlie T. "Iron deficiency and reduced work capacity: a critical review of the research to determine a causal relationship". *J. Nutr.*, 2001; 131: 676S-690S.
- Haenlein G.F.W. "About the evolution of goat and sheep milk production". *Small Rumin. Res.*, 2007; 68: 3-6.
- Haenlein G.F.W. "Goat milk in human nutrition". *Small Rumin. Res.*, 2004; 51: 155-163.
- Haenlein G.F.W. "Past, present, and future perspectives of small ruminant dairy research". *J. Dairy Sci.*, 2001; 84: 2097-2115.
- Hallterman J.S., Kaczorowski J.M., Aligne C.A, Auinger P., Szilagyi P.G. "Iron deficiency and cognitive achievement among schoolaged children and adolescents in the United States". *Pediatrics*, 2001; 107(6): 1381-1386.
- Halliwell B. "Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies?". *Archiv Biochem Biophys*, 2008; 476(2): 107-112.

- Halliwell B. "Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life". *Plant Physiology*, 2006; 141: 312-322.
- Halliwell B., Chirico S. "Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance". *Am. J. Clin. Nutr.*, 1993; 57(S): 715-722.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. "Free Radicals in Biology and Medicine". 3rd ed. Oxford University Press. Oxford, 1999.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. "Protection against oxidants in biological systems; the superoxide theory of oxygen toxicity". En: Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Eds. *Free Rad. Biol. Med.* (2<sup>nd</sup> ed), Oxford, Clarendon Press, 1989; pp: 152-156.
- Hanahan D.J., Ekholm J.E. "The preparation of red cell ghost (membranes)". *Methods Enzymol.*, 1974; 31: 168-172.
- Handy D.E., Zhang Y., Loscalzo J. "Homocysteine down-regulates cellular glutathione peroxidase (GPx1) by decreasing translation". *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 15518–15525.
- Haro A., López-Aliaga I., Lisbona F., Barrionuevo M., Alferez MJ., Campos M. "Beneficial effect of pollen and/or propolis on the metabolism of iron, calcium, phosphorus, and magnesium in rats with nutritional ferropenic anemia". *J Agric Food Chem* 2000; 48(11): 5715-5722.
- Hartiti S., López-Aliaga I., Barrionuevo M., Lisbona F., Pallarés I., Alferez M.J.M., Gómez-Ayala A.E., Campos M.S. "Zinc metabolism in rats: effects of intestinal resection, cholecalciferol and ascorbic acid". *Nutrition Research*, 1994; 14: 1523–1534.
- Hempe J.M., Cousins R.J. "Cysteine-rich intestinal protein binds zinc during transmucosal zinc transport". *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 1991; 88: 9671–9674.

- Herberg S., Galan P. "Nutritional anemias". *Bailleres Clin. Haematol.*, 1992; 5: 143-168.
- Hijano Fernández S.M. "Estudio de la estabilidad del ADN en situación de anemia ferropénica nutricional. Influencia del consumo de leche de cabra o vaca enriquecida o no en hierro". Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada, 2010.
- Hillman R.S., Ault K.A. "Iron deficiency Anemia". In: Hillman R.S., Ault K.A., Rinder H.M. 'Hematology in Clinical Practice'. A guide to diagnosis and management». McGraw-Hill, Inc., 1995; pp: 72-85.
- Hoffmann B., Hecht H.J., Flohé L. "Peroxiredoxins". *Biol Chem*, 2002; 383: 347-364.
- Houston D.K., Johnson M.J., Nozza R.J., Gunter E.W., Shea K.J., Cutler G.M., Edmonds J.T. "Age-related hearing loss, vitamin B-12 and folate in elderly women". *Am J Clin Nutr*, 1999; 69: 564-571.
- Hughes C.F., Ward M., Hoey L., McNulty H. "Vitamin B<sub>12</sub> and ageing: current issues and interaction with folate". *Ann Clin Biochem*, 2013; 50: 315-329.
- Hurrell R.F., Lynch S.R., Trinidad T.P., Dassenko S.A., Cook J.D. "Iron absorption in humans: bovine serum albumin compared with beef muscle and egg white". *Am. J. Clin. Nutr.*, 1988; 47(1): 102-107.
- Hwang E.S., Bowen P.E. "DNA damage, a biomarker of carcinogenesis: its measurement and modulation by diet and environment". *Critic. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2007; 47(1): 27-50.
- Infante D., Tormo R., Zanduetta M. "Empleo de leche de cabra en pacientes con alergia a las proteínas de la leche de vaca" *An. Pediatr.*, 2003; 59: 138-142.
- Ip C., Banni S., Angioni E., Carta G., McGinley J., Thompson H.J.; Barbano D., Bauman D.E. "Conjugated linoleic acid-enriched butter fat alters mammary

gland morphogenesis and reduces cancer risk in rats". J. Nutr., 1999; 129: 2135-2142.

Ivan M., Kondo K., Yang H., Kim W., Valiando J., Ohh M., Salic A., Asara J.M., Lane W.S., Kaelin W.G. JR. "HIF $\alpha$  targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for oxygen sensing". Science, 2001; 292: 464-468.

Iyer R., Tomar S.K. "Folate: a functional food constituent". J Food Sci, 2009; 74(9): 114-122.

Jaakkola P., Mole D.R., Tian Y.M., Wilson M.I., Gielbert J., Gaskell S.J., Kriegsheim A.V., Hesbestreit H.F., Mukherji M., Schofield C.J., Maxwell P.H., Pugh C.W., Ratcliffe P.J. "Targeting of HIF-alpha to the Von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by oxygen regulated proline hydroxylation". Science, 2001; 292 :468-472.

Jandal J.M. "Comparative aspects of goat and sheep milk". Small Rumin. Res., 1996; 22: 177-185.

Jauber O., Kalantzopoulos O. "Quality of goat milk for cheese and other products". VI Int. Conf. Goats Int., 1996; 1: 274-284.

Ji L.L. "Exercise and oxidative stress: role of the cellular antioxidant systems". Exercise Sport Sci. R., Baltimore, 1995; pp. 135-166.

Keagy P.M., Shane B., Oace S.M. "Folate bioavailability in humans: effects of wheat bran and beans". Am. J. Clin. Nutr., 1988; 47: 80-88.

Kim Ha J., Lindsay R. "Contributions of cow, sheep and goat milk to characterizing branched-chain fatty acid and phenolic flavors in varietal cheeses". J. Dairy Sci., 1991; 74: 3267-3274.

Kim Y.I. "Folate and cancer prevention: a new medical application of folate beyond hyperhomocysteinemia and neural tube defects". Nutr. Rev., 1999; 57: 314-321.

- Kimmins S., Lambrot R., Xu C., Saint-Phar S., Chountalos G., Cohen T., Paquet M., Suderman M., Hallett M. "Low paternal dietary folate alters the mouse sperm epigenome and is associated with negative pregnancy outcomes". *Nature Communications* 4, 2013; 2889.
- Kinsey G.R., McHowat J., Beckett C.S., Schnellmann R.G. "Identification of calcium-independent phospholipase A2(Gamma) in mitochondria and its role in mitochondrial oxidative stress". *Am J Phys. Renal Phys*, 2007; 292: F853-F860.
- Kjeldahl J.Z. "Neue methode zur bestimmung des stickstoffs in organischen Körpern Z". *Anal. Chem.*, 1883; 22: 366-383.
- Klaunig J.E., Kamendulis L.M. "The role of oxidative stress in carcinogenesis". *Ann. Rev. Pharmac. and Toxic.*, 2004; 44: 239-267.
- Kong W.N., Zhao S.E., Duan X.L., Yang Z., Qian Z.M., Chang Y.Z. "Decreased DMT1 and increased ferroportin 1 expression is the mechanisms of reduced iron retention in macrophages by erythropoietin in rats". *J. Cell Biochem.*, 2008; 104: 629-641.
- Krishnamurthy P., Xie T., Schuetz J.D. "The role of transporters in cellular heme and porphyrin homeostasis". *Pharmacol. Ther.*, 2007; 114: 345-358.
- Lam J.R., Schneider J.L., Zhao W., Corley D.A. "Proton Pump Inhibitor and Histamine 2 Receptor Antagonist Use and Vitamin B<sub>12</sub> Deficiency". *JAMA*, 2013; 310(22): 2435-2442.
- Lamothe S., Robitaille G., St-Gelais D., Britten M. "Short communication: extraction of beta-casein from goat milk". *J. Dairy Sci.*, 2007; 90(12): 5380-5382.
- Lara-Villoslada F., Olivares M., Jiménez J., Boza J., Xaus J. "Goat milk is less immunogenic than cow milk in a murine model of atopy". *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 2004; 39: 354-360.

- Layrisse M., Martínez-Torres C., Roche M. "Effect of interaction of various foods on iron absorption". *Am. J. Clin. Nutr.*, 1968; 21(10): 1175-1183.
- Lee G.R. "Iron deficiency and iron deficiency anemia". In: Lea and Febiger Press. «Clinical Hematology». Wintrobe's. 9<sup>a</sup> Ed. Philadelphia-London, 1993; pp: 808-839.
- Li F., Watkins D., Rosenblatt D.S. "Vitamin B(12) and birth defects". *Mol Genet Metab*, 2009; 98(1-2): 166-172.
- Linder M.C. "Nutrición. Aspectos bioquímicos, metabólicos y clínicos". Pamplona: EUNSA 505, 1998.
- Lindsay D.G., Astley S.B. "European research on the functional effects of dietary antioxidants- EUROFEDA". *Mol. Aspects Med.*, 2002; 23: 1-38.
- Lisbona, F., Reyes-Andrada, M.D., López Aliaga, I., Barrionuevo, M., Alférez, M.J.M., Campos, M.S. "The importance of the proportion of heme/non heme iron in the diet to minimize the interference with calcium, phosphorus and magnesium metabolism on recovery from nutritional ferropenic anemia". *J. Agric. Food Chem.*, 1999; 47: 2026-2032.
- Liu J., Atamna H., Kuratsune H., Ames, B.N. "Delaying brain mitochondrial decay and aging with mitochondrial antioxidants and metabolites". *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2002; 959: 133-166.
- Lledías F., Hansberg W. "Catalase modification as a marker for singlet oxygen". *Methods Enzymol*, 2000; 319: 110-119.
- Lonnerdal B., Dewey K.G. "Epidemiología de la deficiencia de hierro en lactantes y niños". *An. Nestlé*, 1995; 53: 12-19.
- Lonnerdal B., Uauy R. (eds.). "Genetic and environmental determinants of copper metabolism". *Supplement to the Am. J. Clin. Nutr.*, 1998; 67(5): 960-965.

- López-Aliaga I., Alférez M.J.M., Barrionuevo M., Lisbona F., Campos MS. “Influence of goat and cow milk on the digestive and metabolic utilization of calcium and iron”. *J. Physiol. Biochem.*, 2000; 56: 201-208.
- López-Aliaga I., Alférez M.J.M., Barrionuevo M., Nestares T., Sanz Sampelayo M.R., Campos M.S. “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.*, 2003; 86: 2958-2966.
- López-Aliaga I., Alférez M.J.M., Nestares T., Ros P.B., Barrionuevo M., Campos M.S. “Goat milk feeding causes an increase in biliary secretion of cholesterol and a decrease in plasma cholesterol levels in rats”. *J. Dairy Sci.*, 2005; 88: 1024-1030.
- López-Aliaga I., Díaz-Castro J., Alférez M.J.M., Barrionuevo M., Campos M.S. “A review of the nutritional and health aspects of goat milk in cases of intestinal resection”. *Dairy Sci. Technol.*, 2010; 90: 611–622.
- Lowry O.H., Rosenburgh N.J., Farr A.L., Randall R.J. “Protein measurement with folin phenol reagent”. *J. Biol. Chem.*, 1951; 193: 265–270.
- Lucock M. “Folic acid: Nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes”. *Mol. Genet. Metab.*, 2000; 71: 121–138.
- Lynch S.R. “Interaction of iron with other nutrients”. *Nutr. Rev.*, 1997; 55(4): 102-110.
- Maehara K., Uekawa N., Isobe K. “Effects of histone acetylation on transcriptional regulation of manganese superoxide dismutase gene”. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 2002; 5; 295(1): 187-192.
- Manikandan S., Srikumar R., Jeya Parthasarathy N., Sheela Devi R. “Protective effect of *Acorus calamus* LINN on free radical scavengers and lipid peroxidation in

- discrete regions of brain against noise stress exposed rat”. *Biolog Pharmac Bulletin*, 2005; 28: 2327–2330.
- Marconi E., Panfili G. 1998 “Chemical composition and nutritional properties of commercial products of mare milk powder”. *J. Food Comp. Anal.*, 11: 178-187.
- Markiewicz-Keszycka M., Wojtowski J., Kuczynska B., Puppel K., Czyzak-Runowska G, Bagnicka E., Strzalkowska N., Jozwik A., Krzyzewski J. “Chemical composition and whey protein fraction of late lactation mare’s milk”. *Int. Dairy J.*, 2013; 31: 62-64.
- Marnett L.J. “Oxyradicals and DNA damage”. *Carcinogenesis*, 2000; 21(3): 361-370.
- Marnett L.J., Plastaras JP. “Endogenous DNA damage and mutation”. *Trends in Genetics*, 2001; 87: 212-216.
- Martín Garrido A. “El peróxido de hidrógeno como mediador en el proceso de contracción-relajación. Estudios in vitro e in vivo”. Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina. Universidad de Alcalá. Tesis doctoral, 2007.
- Martin P. “La composition protéique du lait de chèvre: ses particularités”. In: «Interêts nutritionnel et diététique du lait de chèvre». INRA Editions., 1996 ; pp: 27-49.
- Martínez Cayuela M. “Estrés oxidativo y mecanismos de defensa antioxidante”. En: Gil Hernández A, «Tratado de Nutrición», 2ª Edición. Tomo 1, Cap.19., Madrid, Editorial Panamericana, 2010; 627-657.
- Martínez-Férez A. “Obtención de oligosacáridos de la leche de diferentes especies por tecnología de membranas”. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada, 2004.
- Mataix Verdú J., Llopis González J. “Minerales”. En: Mataix Verdú J, «Nutrición y alimentación humana». 2<sup>th</sup> ed. Tomo I, Madrid: Ergon, 2009; pp: 265-301.

- Mataix Verdú J., Ochoa Herrera J. “Vitaminas”. En: Mataix Verdú J, Ed. «Nutrición y alimentación humana». 1<sup>st</sup> ed. Tomo I, Madrid: Ergon, 2002.
- Mataix Verdú J. “Minerales II”. Visión específica. En: Mataix Verdú J y Carazo Marín E, Eds. «Nutrición para educadores». 2<sup>th</sup> ed. Madrid: Díaz de Santos, 2005; pp: 163-177.
- McCord J.M. “The evolution of free radicals and oxidative stress”. Am. J Med., 2000; 108: 652-659.
- McGuire M.A., McGuire M.K. “Conjugated linoleic acid (CLA): A ruminant fatty acid with beneficial effects on human health”. Proc. Am. Soc. Anim. Sci. Annu., 2000; 77: 1-8.
- McKie A.T., Barrow D., Latunde-Dada G.O., Rolfs A., Sager G., Mudaly E., Mudaly M., Richardson C., Barlow D., Bomford A., Peters T.J., Raja K.B., Sgirali S., Hediger M.A., Farzaneh F., Simpson R.J. “An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron”. Science, 2001; 291: 1755-1759.
- Melov S. “Therapeutics against mitochondrial oxidative stress in animal models of aging”. Ann N. Y. Acad. Sci., 2002; 959: 330-340.
- Miján de la Torre A., de Mateo Silleras B. “Radicales libres y nutrientes antioxidantes”. In: ‘Nutrición clínica: bases y fundamentos’. Ed. DOYMA, 1998; pp. 391-407.
- Miret S., Simpson R.J., Mckie A.T. “Physiology and molecular biology of dietary iron absorption”. Annu. Rev. Nutr., 2003; 23: 283-301.
- Moreiras O., Carbajal A., Cabrera L., Cuadrado C. “Tablas de composición de alimentos.” 16 Ed., Editorial Pirámide; 2013.
- Morillas Ruiz J.M. “Los antioxidantes en la prevención del estrés oxidativo en la actividad física”. Editorial Planeta, S.A., 2010; 15-90.

- Moos T., Rosengren Nielsen T., Skjørringe T., Morgan E.H. “Iron trafficking inside the brain”. *J. Neurochem.*, 2007; 103: 1730–1740.
- Moyad M.A. “Zinc for prostate disease and other conditions: a little evidence, a lot of hype, and a significant potential problem”. *Urol. Nurs.*, 2004; 24(1): 49-52.
- Muller F.L., Liu Y., Van Remmen H. “Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane”. *J Biol Chem*, 2004; 279 (47): 49064-49073.
- Mulvihill B., Kirwan F.M., Morrissey P.A., Flynn A. “Effect of myofibrillar muscle proteins on the in vitro bioavailability of non-haem iron”. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 1998; 49(3): 187-192.
- Murphy M.P. “How mitochondria produce reactive oxygen species”. *Biochem. J.*, 2009; 417: 1–13.
- Naem N.E., El-Sayed N.M., Nossier S.A., Abu Zeid A.A. “Zinc status and dietary intake of pregnant women, Alexandria, Egypt”. *J. Egypt Public Health Assoc.*, 2014; 89(1): 35-41.
- National Research Council. “Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc”. Institute of Medicine/Food and Nutrition Board. National Academy Press. Washington DC, 2001.
- National Research Council. “Raciones Dietéticas Recomendadas”. Subcommittee on the Tenth Edition of RDAs. 1ª edición española de la 10ª edición original de: Recommended dietary allowances, Barcelona: Ediciones Consulta, S.A, 1991.
- Navrátil T., Kohlíková E., Petr M., Pelclová D., Heyrovský M., Pristoupilová K. “Supplemented creatine induces changes in human metabolism of thiocompounds and one- and two-carbon units”. *Physiol. Res.*, 2010; 59(3): 431-442.

- O'Connor D.L. "Folate in goat milk products with reference to other vitamins and minerals: a review". *Small Rumin. Res.*, 1994; 14: 143-149.
- Odle J. "New insights into the utilization of medium-chain triglycerides by the neonate: observations from a piglet model". *J. Nutr.*, 1997; 127: 1061-1067.
- Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. "Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction". *Anal. Biochem.*, 1979; 95: 351-358.
- Olivares Grohnert M., Castillo Durán C., Arredondo Olgúin M., Uauy Dagach-Imbarack R. "Cobre y zinc en nutrición humana". En: Gil Hernández A, «Tratado de Nutrición», 2ª Edición. Tomo 1, Cap.29., Madrid, Editorial Panamericana, 2010; 978-996.
- Oski F.A. "Iron deficiency in infancy and childhood". *New Engl. J. Med.*, 1993; 329: 190-198.
- Ozturk E., Demirbilek S., Kadir But A., Saricicek V., Gulec M., Akyol O., Ozcan Ersoy M. "Antioxidant properties of propofol and erythropoietin after closed head injury in rats". *Progress in Neuro-Psychopharm. Biolog. Psychiatry*, 2005; 29: 922-927.
- Packer L. "Antioxidant properties of lipoic acid and its therapeutic effects in prevention of diabetes complications and cataracts". *Ann N Y Acad Sci*, 1994; 738: 257-264.
- Pallarés I., Lisbona F., López-Aliaga I., Barrionuevo M., Alférez M.J.M., Campos M.S. "Effects of iron deficiency on the digestive utilization of iron, phosphorus, calcium and magnesium in rats". *Br. J. Nutr.*, 1993; 70: 609-620.
- Paesano R., Natalizi T., Berlutti F., Valenti P. "Body iron delocalization: the serious drawback in iron disorders in both developing and developed countries". *Rev Pathog and Glob Health*, 2012; 106(4): 200-216.

- Park Y.W. "Goat milk. Chemistry and nutrition". In: Park Y.W. and Haenlein G.F.W. «Handbook of Milk of Non-bovine Mammals». Oxford, Blackwell Publishing, 2006; pp: 34-58.
- Park Y.W. "Hypo-allergenic and therapeutic significance of goat milk". *Small Rumin. Res.*, 1994; 14: 151-155.
- Park Y.W. "Relative buffering capacity of goat and cow milk, soybased infant formulas and commercial non rescription antacid drug". *J. Dairy Sci.*, 1991; 74: 3326-3333.
- Pastor N., Weinstein H., Jamison E., Brenowitz M. "A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding". *J. Mol. Biol.*, 2000; 304(1): 55-68.
- Pecka E., Dobrzanski Z., Zachwieja A., SZULC T., Czyz K. 2012 "Studies of composition and major protein level in milk and colostrum of mares". *An. Sci. J.*, 83: 162-168.
- Peña M.O, Lee J., Thiele D.J. "A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution". *J. Nutr.* 1999; 129: 1251-1260.
- Peña-Rosas J.P., De-Regil L.M., Dowswell T., Viteri F.E. "Daily oral iron supplementation during pregnancy (Review)". *The Cochrane collaboration*, 2012.
- Pérez Surribas D. "Proteínas relacionadas con el metabolismo del hierro". *Revisión. Química Clínica* 2005; 24(1): 5-40.
- Pietrzak-Fiecko R., Tomczynski R., Smoczynski S.S. 2013 "Effect of lactation period on the fatty acid composition in mares' milk from different breeds". *Archiv. Tierzucht.*, 56(33): 335-343.

- Pietrzak-Fiecko R., Tomczynski R., Swistowska A., Borejszo Z., Kokoszco E., Smoczynska K. 2009 "Effect of mare's breed on the fatty acid composition of milk fat". Czech J. Anim. Sci., 54(9): 403-407.
- Ploszaj T., Ryniewicz Z., Motyl T. "Polyamines in goat's colostrum and milk". Comp. Biochem. Physiol., 1997; 118B: 45-52.
- Powers S.K., Hamilton K. "Antioxidants and Exercise". Clin Sports Med, 1999; 18(3): 525-536.
- Proctor P.H., Reynolds E.S. "Free radicals and disease in man". Physiol. Chem. Phys. Med. NMR, 1984; 16: 175-195.
- Pulido Morán M. "Parámetros de estrés oxidativo en el cáncer de mama". Trabajo fin de máster. Máster oficial de Atención farmacéutica (Europharmes), UGR; 2012.
- Radi R., Bush M., Freeman B.A. "The role of cytochrome c and mitochondrial catalase in hydroperoxide-induced heart mitochondrial lipid peroxidation". Arch. Biochem. Biophys, 1993; 300(1): 409-415.
- Raja K.B., Simpson R.J., Peters T.J. "Intestinal iron absorption studies in mouse models of iron-overload". Br. J. Haematol., 1994; 86: 156-162.
- Ralph A., McArdle H. "Copper metabolism and requirements in the pregnant mother, her fetus, and children". International Copper Association, Ltd. New York, NY, 2001.
- Ramírez Tortosa M.C., Quiles Morales J.L. "Vitamina C, vitamina E y otros antioxidantes de origen alimentario". En: Gil Hernández A, «Tratado de Nutrición», 2ª Edición. Tomo 1, Cap.20, Madrid, Editorial Panamericana, 2010; 663-694.
- Ray P.D., Bo-Wen H., Yoshiaki T. "Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling". Cell Sign, 2012; 24(5): 981-990.

- Reeves, P.; Nielsen, F. Fahey, G. "AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet". *J. Nutr.*, 1993; 123: 1939-1951.
- Reznick A.Z., Packer L. "Oxidative damage to proteins: Spectrofotometric method for carbonyl assay". *Methods Enzymol*, 1994; 233: 357-363.
- Rice-Evans C., Miller N.J. "Total antioxidant status in plasma and body fluids". *Methods Enzymol*, 1994; 234: 279:293.
- Rivas García E. "Utilización nutritiva de Cu y Zn y actividad SOD en la recuperación de la anemia con leche de cabra o vaca y sobrecarga de hierro". Trabajo Fin de Master; Master en Nutrición Humana, UGR, 2012.
- Rivas Gonzalo J.C., García Alonso M. "Flavonoides en alimentos vegetales: estructura y actividad antioxidante". *ANS*, 2002; 9(2): 31-38.
- Roberfroid M., Buc-Calderon P. "Free radical and oxidation phenomen in a biological system". Marce Dekker Inc., New York, USA, 1995.
- Rojkind M., Domínguez-Rosales J.A., Nieto N., Greenwel P. "Role of hydrogen peroxide and oxidative stress in healing responses". *Cell. Molec. Life Sci.*, 2002; 59(11): 1872-1891.
- Roughhead Z.K., Zito C.A., Hunt J.R. "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.*, 2005; 82(3): 589-597.
- Roy A., Sen S., Chakraborti A.S. "In Vitro Nonenzymatic Glycation Enhances the Role of Myoglobin as a source of Oxidative Stress". *FreeRad. Res.*, 2004; 38(2): 139-146.

- Rubio C., Weller D.G., Martín-Izquierdo R.E., Revert C., Rodríguez I., Hardisson A. "El zinc: oligoelemento esencial". *Nutr. Hosp.*; 2007; 22(1): 101-107.
- Ruiz-López M.D., Artacho Martín-Lagos R., López Martínez M.C. "Nutritional recommendations for the elderly". *Ars Pharm.*; 2000; 41(1): 101-113.
- Ryder J.W., Portocarrero C.P., Song X.M., Cui L., Yu M., Combatsiaris T., Galuska D., Bauman D.E., Barbano D.M.; Charron M.J., Zierath J.R., Houseknecht K.L. "Isomer-specific antidiabetic properties of conjugated linoleic acid". *Diabetes*, 2001; 50: 1149-1157.
- Saini A.L., Gill R.S. "Goat milk: An attractive alternate". *Indian Dairyman*, 1991; 42: 562-564.
- Salonen RM., Nyysönen K., Kaikkonen J. "Six-year effect of combined vitamin C and E supplementation in atherosclerotic progression. The antioxidant supplementation in atherosclerosis prevent (ASAP) study". *Circulation*, 2003; 107: 947-953.
- Sánchez Peralta A.M. "Deficiencia de hierro. Suplementos. Atención del farmacéutico". *Aula de la Farmacia*. Vol 8, Supl 1. Edit Grupo Saned, 2012.
- Sanderson P. "A new method of analysis of feeding stuffs for the determination of crude oils and fat". In: Haresing W., Cole D.J.A., 'Recent advances in animal nutrition'. Butterworths, London, UK, 1986; pp.77-86.
- Sandstrom B. "Micronutrient interactions: effects on absorption and bioavailability". *Br. J. Nutr.*, 2001; 85(2): S181-S185.
- Sandstrom B., Cederblad A. "Effect of ascorbic-acid on the absorption of zinc and calcium in man". *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 1987; 57: 87-90.

- Sanz Ceballos L. “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, 2007.
- Sanz Ceballos L., Ramos Morales E., De la Torre Adarve G., Díaz Castro J., Pérez Martínez L., Sanz Sampelayo M.R. “Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology”. *J. Food Comp. Anal.*, 2009; 22: 322-329.
- Sanz Sampelayo M.R., Martín A.J., Pérez L., Gil Extremera F., Boza J. “Dietary supplements for lactating goats by polyunsaturated fatty acid-rich protected fat. Effects after supplement withdrawal”. *J. Dairy Sci.*, 2004; 87: 1796-1802.
- Shaik-Dasthagirisaheb Y.B., Varvara G., Murmura G., Saggini A., Caraffa A., Antinolfi P., Tete' S., Tripodi D., Conti F., Cianchetti E., Toniato E., Rosati M., Speranza L., Pantalone A., Saggini R., Tei M., Speziali A., Conti P., Theoharides T.C., Pandolfi F. “Role of vitamins D, E and C in immunity and inflammation”. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.*, 2013; 27(2): 291-295.
- Sharp P. “The molecular basis of copper and iron interactions”. *Proc. Nutr. Soc.*, 2004; 63(4): 563-569.
- Siega-Riz A.M., Hartzema A.G., Turnbull C., Thorp J., McDonald T., Cogswell M.E. “The effects of prophylactic iron given in prenatal supplements on iron status and birth outcomes: a randomized controlled trial”. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2006; 194: 512-519.
- Snowdon D.A., Tully C.L., Smith C.D., Riley K.P., Markesbery W.R. “Serum folate and the severity of atrophy of the neocortex in Alzheimer disease: findings from the Nun Study”. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2000; 71: 993-998.
- Steel R.G.D., Torrie J.H., Dickey D.A. “Principles and procedures of statistics: A biometrical approach”. 3rd edition, New York, McGraw-Hill, 1997.

- Steinbicker A.U., Muckenthaler M.U. “Out of balance - systemic iron homeostasis in iron-related disorders”. Review. *Nutrients*, 2013; 5: 3034-3061.
- Stephenson L.S., Lathan M.C., Ottesen E.A. “Global malnutrition”. *Parasitology*, 2000; 121: S15-S22.
- Stoltzfus R.J. “Iron-deficiency anemia: reexamining the nature and magnitude of the public health problem”. *J. Nutr.*, 2001; 131(2): 697S-701S.
- St-Onge M.P., Jones P. “Physiological effects of medium chain triglycerides: potential agents in the prevention of obesity”. *J. Nutr.*, 2002; 132: 329-332.
- Swain J.H., Johnson L.K., Hunt J.R. “Electrolytic iron or ferrous sulphate increase body iron in women with moderate to low iron stores”. *J. Nutr.*, 2007; 137: 620-627.
- Tappenden K.A., Thomson A.B., Wild G.E., McBurney M.I. “Short-chain fatty acid-supplemented total parenteral nutrition enhances functional adaptation to intestinal resection in rats”. *Gastroenterology*, 1997; 112: 792-802.
- Teucher B., Olivares M., Cori H. “Enhancers of iron absorption: ascorbic acid and other organic acids”. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 2004; 74(6): 403-419.
- Theil E.C. “Iron homeostasis and nutritional iron deficiency”. *J. Nutr.*, 2011; 141: 724S–728S.
- Thomas C., Thomas L. “Biochemical markers and hematologic indices in the diagnosis of functional iron deficiency”. *Clin. Chem.*, 2002; 48: 1066–1076.
- Thomas K., Mitchell H.H. “A method of determining the biological value of protein”. *J. Biol. Chem.*, 1923; 58: 873-903.
- Uttara B., Singh A.V., Zamboni P., Mahajan R.T. “Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options”. *Current Neuropharmacol.*, 2009; 7: 65 –74.

- Vaghefi N., Nedjaoum F., Guillochon D., Bureau F., Arhan P., Bougle D. "Iron absorption from concentrated haemoglobin hydrolysate by rat". *J. Nutr. Biochem.*, 2005; 16: 347-352.
- Valko M., Leibfritz D., Moncola J., Croninc M.T.D., Mazura M., Telserd J. "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease". *Int. J. Biochem. Cell. B.*, 2007; 39(1): 44-84.
- Valko M., Morris H., Cronin M.T. "Metals, toxicity and oxidative stress". *Curr Medic Chem*, 2005; 12: 1161–1208.
- Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer". *Chem-Biolog Interac*, 2006; 160(1): 1-40.
- Vazquez-Vivar J., Kalyanaraman B. "Generation of superoxide from nitric oxide synthase". *FEBS Letters*, 2000; 481: 304–307.
- Velázquez O.C., Seto R.W., Rombeau J.L. "The scientific rationale and clinical application of short-chain fatty acids and medium-chain triglycerides". *Proc. Nutr. Soc.*, 1996; 55: 49-78.
- Verwei M., Arkbåge K., Havenaar R., van den Berg H., Witthöft C., Schaafsma G. "Folic acid and 5-methyltetrahydrofolate in fortified milk are bioaccessible as determined in a dynamic in vitro gastrointestinal model". *J Nutr*, 2003; 133: 2377-2383.
- Veum T.L., Ledoux D.R., Shannon M.C., Raboy V. "Effect of graded levels of iron, zinc, and copper supplementation in diets with low-phytate or normal barley on growth performance, bone characteristics, hematocrit volume, and zinc and copper balance of young swine". *J. Anim. Sci.* 2009; 87: 2625-2634.

- Wei M.M., Bailey L.B., Toth J.P., Gregory J.F. 3<sup>rd</sup>. "Bioavailability for humans of deuterium labelled monoglutamyl and polyglutamyl folates is affected by selected foods". *J. Nutrition*, 1996; 126: 3100-3108.
- Wei M.M., Gregory J.F. 3<sup>rd</sup>. "Organic acids in selected foods inhibit intestinal brush border Pteroylpolyglutamate hydrolase in vitro: potential mechanism affecting the bioavailability of dietary polyglutamate folate". *J. Agric. Food Chem*, 1998; 46: 211-219.
- Wendel A. "Glutathione peroxidase". En: Cheeseman K.H., Slater T.F. "Free Rad. Biol. Med". British Council Bulletin, 1993.
- Willis M.S., Monaghan S.A., Miller M.L., McKenna R.W., Perkins W.D., Levinson B.S., Bhushan V., Kroft S.H. "Zinc-induced copper deficiency: a report of three cases initially recognized on bone marrow examination". *Am. J. Clin. Pathol.*, 2005; 123(1): 125-131.
- Wintrobe M.M., Lee M.D., Thomas C., Bithell M.D., Dane R., Boss M.D., John W., Athens M.D., John Foerster M.D.. "Parte III: alteración de los glóbulos rojos: enfoque del paciente con anemia". En: Wintrobe MM, Lee MD, Thomas C, Bithell MD, Dane R, Boss MD, John W, Athens MD, John Foerster MD, «Hematología clínica». 4<sup>th</sup> Ed. Tomo I, Philadelphia: Intermédica editorial, 1979; pp: 537-568.
- WHO/FAO. "Guidelines on food fortification with micronutrients". Genova, 2006.
- WHO/FAO. "Requirements of vitamin A, iron, folate and vitamin B<sub>12</sub>". Food and Nutrition Series, 2004; Rome: FAO. 23: 33-50.
- Woo C.W.H., Prathapasinghe G.A., Siow Y.L., OK. "Hyperhomocysteinemia induces liver injury in rat: Protective effect of folic acid supplementation". *Biochim. Biophys. Acta*, 2006; 1762: 656-665.

- Wright A., Dainty J., Finglas P. “Folic acid metabolism in human subjects revisited: potential implications for proposed mandatory folic acid fortification in the UK”. *Br. J. Nutr.*, 2007; 98(4): 667-675.
- Xiu X. Han, Yong Y. Sun, Ai G. Ma, Fang Yang, Feng Z. Zhang, Dian C. Jiang, Yong Li. “Moderate NaFeEDTA and ferrous sulphate supplementation can improve both hematologic status and oxidative stress in anemic pregnant women”. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, 2011; 20(4): 514-520.
- Yagi K. “A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma”. *Biochem. Med.* 1976; 15: 212– 216.
- Yamakura F., Taka H., Fujimura T., Murayama K. “Inactivation of human manganese-superoxide dismutase by peroxynitrite is caused by exclusive nitration of tyrosine 34 to 3-nitrotyrosine”. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 14085–14089.
- Yasukazu Y., Yoshiro S., Leslie Sargent J., Yasushi S. “Chemical reactivities and physical effects in comparison between tocopherols and tocotrienols: physiological significance and prospects as antioxidants”. *J. Biosci. Bioeng.*, 2007; 104(6): 439-445.
- Zhou S.J., Sullivan T., Gibson R.A., Lönnerdal B., Prosser C.G., Lowry D.J., Makrides M. “Nutritional adequacy of goat milk infant formulas for term infants: a double-blind randomised controlled trial”. *Br. J. Nutr.* 2014; 111(9): 1641-1651.
- Zlotkin S. “Treatment of anemia with microencapsulated ferrous fumarate plus ascorbic acid supplied as sprinkles to complementary (weaning) foods”. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2001; 74: 791-795.