

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




“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

SILVIA M^a HIJANO FERNÁNDEZ

2010

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Silvia María Hijano Fernández
D.L.: GR 3091-2010
ISBN: 978-84-693-3316-7

The seal of the University of Granada is a circular emblem. It features a central shield with a crown on top, flanked by two lions. The shield is supported by two columns. The entire emblem is surrounded by a circular border containing the Latin text "UNIVERSITATIS GRANATENSIS CAROLVS RO IMP SEMPER AVG HISPAN R EX FVNDATOR".

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

D. Javier Díaz Castro. Contratado Postdoctoral de la Universidad de
Granada.

D^a Margarita Sánchez Campos. Catedrática de Fisiología de la Universidad
de Granada.

D^a Teresa Nestares Pleguezuelos. Profesora Contratada Doctora de la
Universidad de Granada.

CERTIFICAN:

Que los trabajos de investigación que se exponen en la Memoria de
Tesis Doctoral: **“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”**, han sido
realizados bajo nuestra dirección por la licenciada Silvia M^a Hijano
Fernández y la encontramos conforme para ser presentada y aspirar
al Grado de Doctor por la Universidad de Granada con el Tribunal
que en su día se designe.

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



**MEMORIA QUE PRESENTA LA LDA. SILVIA M^a HIJANO FERNÁNDEZ
PARA ASPIRAR AL GRADO DE DOCTOR POR LA UNIVERSIDAD DE
GRANADA**

ESTA TESIS DOCTORAL HA SIDO REALIZADA BAJO LA DIRECCIÓN DE:

Dr.D. Javier Díaz Castro

Prof. Dra.D^a Margarita Sánchez Campos

Prof. Dra.D^a Teresa Nestares Pleguezuelos

Lda. D^a Silvia M^a Hijano Fernández

Granada, 2010



AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que con su paciencia, apoyo y colaboración, han hecho posible la realización de este trabajo de investigación.

Especialmente, a mi directora la Profesora D^a Margarita Sánchez Campos, que desde el primer momento confió en mí, permitiendo formar parte de su grupo de investigación. Gracias por su dedicación, cariño e interés mostrado en cada momento del trabajo.

A mi director, el Dr. Javier Díaz Castro, por su proximidad desde el comienzo, mi maestro de técnicas, con quien he compartido los hallazgos encontrados en este estudio, gracias por estar ahí día a día en el seguimiento de este trabajo y por su disponibilidad siempre y en cada uno de los momentos, aún en la distancia.

A mi directora, la Profesora D^a Teresa Nestares Pleguezuelos, la primera persona que me animó a empezar esta gran aventura que supone hacer una Tesis doctoral. Gracias por sus acertados consejos.

A las Profesoras D^a Inmaculada López Aliaga y D^a María José Muñoz Alférez, a nivel personal por su cariño, cercanía, y por su valiosa y generosa ayuda en muchos momentos de este trabajo. Trabajar con vosotras ha sido muy fácil.

Ha sido un lujo poder formar parte de este proyecto. Es un orgullo compartir este trabajo con vosotros.

A la Profesora D^a Magdalena López-Frías, por su amabilidad y cariño.

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

A la Directora del Departamento de Fisiología, la Profesora D^a María López-Jurado Romero de La Cruz, por poner a mi disposición los recursos humanos para el desarrollo de esta Tesis.

A Elisa Alcover, por su amabilidad en solucionar los temas administrativos.

A Mercedes buena amiga y gran compañera de trabajo, a veces de mucho agobio y haciendo de ello momentos alegres. Eres especial. Mil gracias.

A María, M^a Ángeles, Susana, Sergio, Pedro y todos mis compañeros del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos por su compañerismo y colaboración desinteresada y por estar dispuestos a dedicarme su tiempo siempre que lo he necesitado.

A todos mis amigos, que aunque no tengan relación con este trabajo, comparten conmigo todas mis ilusiones.

A mis padres por sus desvelos y preocupaciones, por ser un ejemplo de lucha y responsabilidad, y hacer de mí quien soy.

A mis hermanos Antonio, Javier, Jesús y Yolanda, y el resto de mi familia, que siempre han estado a mi lado apoyándome y dándome ánimos. A mi sobrino Mauricio, que con su compañía, me ha aportado momentos de tranquilidad mientras escribía.

A Salva, mi marido, por su gran apoyo y estar siempre a mi lado, aunque a veces las cosas sean complicadas. Por compartir buenos y malos momentos. Te quiero.

A mi hija Patricia, la niña más maravillosa que ha vivido intensamente todos los momentos de la realización de esta Tesis. Gracias por tu curiosidad y por saberte esta Tesis casi como yo.

A Patricia, mi éxito en la vida,
te dedico mi éxito en la ciencia.

“Aquel que duda y no investiga se torna no sólo a infeliz, sino también a injusto”.

Blaise Pascal.



1. OBJETO.....	1
2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	
2.1. El hierro en la nutrición	3
2.1.1. Introducción	3
2.1.2. Deficiencia de hierro. Anemia ferropénica nutricional	4
2.1.3. Manifestaciones clínicas de la anemia ferropénica nutricional	7
2.1.4. Tratamiento de la ferropénica. Sobrecarga oral de hierro	11
2.1.5. Patologías relacionadas con la sobrecarga de hierro	15
2.1.5.1. Causas de la sobrecarga de hierro	15
2.1.5.2. Hemocromatosis hereditaria	17
2.1.5.3. Mecanismos de toxicidad del hierro	23
2.1.5.4. Consecuencias de la sobrecarga de hierro	24
2.2. Funciones del hierro	28
2.3. Fuentes alimentarias de hierro y biodisponibilidad	32
2.3.1. Utilización nutritiva de hierro	42
2.3.2. Requerimientos	45
2.3.3. Absorción intestinal y transporte de hierro.....	50
2.3.4. Distribución de hierro en los tejidos y captación celular	54
2.3.5. Depósitos y metabolismo del hierro	56
2.3.6. Eliminación.....	59
2.3.7. Mecanismo de homeostasis del hierro	60
2.4. Estabilidad y estructura del ADN.....	67
2.4.1. Introducción	67
2.4.2. Antecedentes históricos	68
2.4.3. Propiedades fisicoquímicas del ADN.....	70
2.4.4. Componentes del material genético.....	71
2.4.5. Apareamiento de bases	75
2.4.6. Otro tipo de pares de bases	78
2.4.7. Estructura del ADN.....	81

2.4.8. Daño en el material genético.....	88
2.4.9. Mecanismos de reparación del material genético	89
2.4.10. Determinación de la estabilidad del material genético mediante ensayo “ <i>Comet alcalino</i> ”	92
2.5. Características nutricionales de la leche de cabra	99
2.5.1. Introducción	99
2.5.2. Características organolépticas	103
2.5.3. Composición de la leche de cabra	104
2.5.3.1. Proteína de la leche de cabra	106
2.5.3.2. Glúcidos en la leche de cabra	111
2.5.3.3. Lipídeos en la leche de cabra	112
2.5.3.4. Composición mineral	116
2.5.3.5. Composición vitamínica de la leche de cabra	121
2.5.3.6. Factores bioactivos	123

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Diseño experimental	125
3.2. Dietas ensayadas	128
3.3. Técnicas analíticas.....	131
3.3.1. Materia seca	131
3.3.2. Materia grasa	131
3.3.3. Contenido proteico.....	131
3.3.4. Mineralización por vía húmeda	131
3.3.4.1. Determinación de hierro	132
3.3.5. Recuento de hematíes, Hemoglobina, hematocrito, Volumen corpuscular medio y plaquetas	134
3.3.6. Ferritina sérica	134
3.3.7. Hierro sérico, TIBC (Capacidad total de unión al hierro) y saturación de la transferrina	135
3.3.8. Determinación de la estabilidad del material genético mediante electroforesis en gel de células aisladas (<i>Ensayo Comet Alcalino</i>)	135

3.3.9. Tratamiento estadístico	140
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1. Parámetros hematológicos en el PPE	141
4.2. Peso corporal, hepático, relación heptosomática y contenido de hierro en el PPE	142
4.3. Estabilidad del material genético en el PPE	144
4.4. Contenido de hierro hepático en el PE	148
4.5. Estabilidad del material genético en el PE	150
5. RESUMEN Y CONCLUSIONES	163
6. BIBLIOGRAFÍA	167



1. OBJETO

Aunque el estrés oxidativo ha sido ampliamente estudiado en situación de ferropdeficiencia y sobrecarga de Fe, existe muy escasa información en la literatura científica acerca de la estabilidad del material genético, tanto durante la instauración de esta patología como en el transcurso de la repleción crónica con Fe, el tratamiento más frecuente para paliar esta prevalente deficiencia nutricional.

El Grupo de Investigación “Alimentación, Nutrición y Absorción” (AGR-206) dirigido por la Profesora Sánchez Campos, con quienes he realizado la presente Memoria de Tesis, tiene amplia experiencia en el estudio del metabolismo mineral en situación de ferropdeficiencia y más recientemente en estrés oxidativo y sobrecarga de Fe. Además, 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 síndrome de malabsorción y ferropdeficiencia, acompañado de un descenso en los niveles de LDL-colesterol, manteniendo dentro del rango fisiológico los niveles de triglicéridos, HDL-colesterol y transaminasas.

Estos antecedentes nos llevaron a aprovechar la experiencia del Grupo en situación de anemia ferropénica y dar un paso más, profundizando en el impacto, no solo a nivel hematológico y mineral, sino también a nivel genético, durante el establecimiento y recuperación de dicha patología tras el consumo

de dietas basadas en leche de vaca o cabra, con un contenido normal o con sobrecarga de Fe.

El objetivo principal de este estudio es estudiar los parámetros hematológicos relacionados con el metabolismo del Fe y evaluar la estabilidad material genético de células aisladas (linfocitos de sangre periférica) en animales controles o con anemia ferropénica nutricional inducida experimentalmente, tanto durante el establecimiento de la patología como durante la recuperación, tras el consumo de dietas basadas en leche de vaca o cabra, con contenido normal o sobrecarga crónica de Fe.



**Antecedentes
bibliograficos**

2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2.1. EL HIERRO EN LA NUTRICIÓN

2.1.1. INTRODUCCIÓN

En términos de Salud Pública, la carencia de Fe es, con diferencia, la principal causa de anemia nutricional.

La anemia es un proceso patológico en el cual, la concentración de hemoglobina (Hb) en las células rojas es anormalmente baja. No hay duda de que la deficiencia de Fe es la causa de la gran mayoría de anemias. La anemia por deficiencia de Fe o anemia ferropénica nutricional (AFN) 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 o “total iron binding capacity” (TIBC).

Por otra parte, debido a sus efectos en el desarrollo y crecimiento, resistencia a las infecciones y asociación con la mortalidad de niños menores de dos años, se considera el mayor problema de salud pública y la deficiencia nutricional más común en el mundo. Además, la deficiencia de Fe tiene efectos negativos en la capacidad de trabajo y desarrollo motor y mental de niños,

adolescentes, mujeres fértiles, embarazadas y ancianos (Stephenson y col., 2000; Grantham-McGregor y Ani, 2001; Haas y Brownlie, 2001).

La anemia ferropénica se produce cuando las pérdidas de Fe o los requerimientos del mismo superan el aporte que proporciona la dieta, con lo cual se agotan las reservas del organismo, disminuye la síntesis de enzimas ferropendientes, desciende la eritropoyesis y por último, disminuye la concentración de hemoglobina.

2.1.2. DEFICIENCIA DE HIERRO

La deficiencia de Fe es la más común de todas las enfermedades por deficiencia de nutrientes en el mundo.

Es un indicador de una nutrición inadecuada y salud deficiente. La carencia de Fe en su forma más severa resulta en anemia ferropénica, aunque hay otras causas más complejas (Staubli y col., 2001). Las enfermedades infecciosas (paludismo, helmintiasis y otras como tuberculosis por VIH/SIDA) son factores importantes que contribuyen a la alta prevalencia de esta patología en muchas poblaciones (Van den Broek y Letsky, 2000; Staubli y col., 2001).

La anemia ferropénica es una enfermedad con una alta prevalencia, especialmente en niños y mujeres en edad de gestación. Los grupos que tienen un mayor riesgo de sufrir anemia ferropénica son: niños menores de 2 años, chicas adolescentes, embarazadas y la tercera edad. Las embarazadas

adolescentes tienen un elevadísimo riesgo de sufrir ferropenia, debido a sus pobres hábitos alimentarios y su continuo crecimiento. Mujeres en edad fértil que sufren ferropenia pueden beneficiarse de dietas ricas en Fe o suplementos orales (Patterson, 2001). Se ha observado que en países poco desarrollados, la prevalencia de la anemia ferropénica en mujeres supera normalmente el 20%, mientras que en hombres (5-6%), es similar a la observada en mujeres de países desarrollados (MacPhail y Bothwell, 1992).

La Organización Mundial de la Salud (OMS/WHO) calcula que en el mundo hay aproximadamente 2.000 millones de personas anémicas y que cerca del 50% de los casos puede atribuirse a la carencia de Fe (WHO, 2001).

Las consecuencias negativas de la anemia ferropénica en el desarrollo cognoscitivo y físico de los niños y la productividad laboral de los adultos son motivo de gran preocupación (Stoltzfus, 2001). Así, la alta prevalencia de anemia en los pacientes quirúrgicos puede aumentar el riesgo de morbilidad y mortalidad postoperatoria (WHO, 2003).

De acuerdo con 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 (Ania y col., 1997). La secreción de eritropoyetina aumenta cuando los niveles de hemoglobina descienden por debajo de 120 g/L, indicando que esos niveles de hemoglobina son necesarios para una oxigenación óptima de los tejidos (Gabilove, 2000).

La anemia por deficiencia de Fe se caracteriza por la reducción o ausencia de depósitos de Fe, baja concentración de Fe sérico, baja saturación de transferrina, una concentración de hemoglobina baja y una reducción del hematocrito. Inicialmente, los depósitos corporales de Fe, la ferritina y la hemosiderina decrecen, mientras que el hematocrito y la hemoglobina permanecen normales. Después de esto, disminuye el nivel de Fe sérico y de forma paralela aumenta la capacidad de fijación de Fe, reduciéndose 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”. La anemia por deficiencia de Fe es 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, los cuales dan lugar a hematíes microcíticos e hipocrómicos, además de una disfunción del transporte de oxígeno (Hercberg y Galan, 1992).

Una insuficiente ingesta de Fe biodisponible con la dieta es una causa importante de la deficiencia de Fe y en todo el mundo se están realizando intervenciones orientadas a proporcionar suplementos de Fe a sectores especialmente vulnerables de la población, en particular a las mujeres embarazadas. Los enfoques basados en la alimentación para aumentar el aporte de Fe mediante la fortificación de alimentos y diversificación nutricional son estrategias sostenibles para prevenir la carencia de este mineral y la anemia ferropénica en la población en general (WHO, 2003).

2.1.3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA ANEMIA FERROPÉNICA NUTRICIONAL

La enfermedad puede manifestarse de muy diversas formas: con una importante depleción de Fe, incluso con anemia moderada, en una persona asintomática; con signos iniciales atribuibles a un proceso oculto; o el paciente que acude al médico por primera vez con molestias inespecíficas atribuibles a la anemia, tales como fatiga, disminución de la capacidad para efectuar ejercicio, debilidad, palpitaciones, irritabilidad y cefalalgia (Branda, 2000).

Las manifestaciones clínicas son debidas en parte a la anemia y en parte a la falta de Fe tisular; en cuanto a los síntomas y signos por anemia, los hallazgos suelen ser inespecíficos e insidiosos y corresponden más al síndrome anémico que acompaña a la enfermedad, con palidez, fatiga y palpitaciones. La mayoría de las veces es la anemia la que obliga al paciente a solicitar la consulta medica, teniendo en cuenta que por regla general dicha anemia suele ser moderada y se transforma en severa cuando está complicada con otra causa, como la infección por anquilostoma (Massey, 1992).

El examen físico revela palidez de leve a intensa; efectos cardiovasculares atribuibles a la anemia como soplos sistólicos y en algunos pacientes, insuficiencia cardiaca congestiva.

El bazo se encuentra discretamente aumentado en sujetos con anemia severa y de larga duración. 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).

En cuanto a los síntomas y signos por falta de Fe tisular se puede presentar; la “pica” o sea el deseo irrefrenable de ingerir sustancias comestibles de escaso o nulo valor nutricional, tales como almidón, hielo, tierra o arcilla, la cual mejora rápidamente con el inicio de la feroterapia; la glosodinia (dolor en la lengua, causado por una inflamación aguda o crónica) y queilitis (lesiones labiales inflamatorias que cursan con dolor) en los ángulos de la boca. Además se encontrarán los llamados “signos de deficiencia hística de Fe” perfectamente correlacionados con los niveles bajos de ferritina sérica y que son: la depapilación de los bordes de la lengua y en casos severos con lengua lisa; el cabello seco, quebradizo y fácilmente desprendible, y las uñas delgadas, quebradizas con onicoquisis (aumento de estriación transversal de las uñas) y en casos avanzados aparece la verdadera coiloniquia (uña en cuchara) (Punnonen y col., 1997).

Entre otros hallazgos que pueden presentarse en los pacientes con deficiencia de Fe merecen mención especial los siguientes: los niños 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; el sistema neuromuscular está por lo general poco afectado, pero se pueden presentar 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 con deficiencia de Fe , con edad inferior a 4 años pueden presentar estados apáticos o de irritabilidad, así como también trastornos para el aprendizaje (Oski, 1993).

En los adultos puede presentarse disfunción de algunos sistemas donde el recambio celular es acelerado, así se ha demostrado tanto en animales como en humanos que la deficiencia de Fe disminuye la capacidad muscular para el trabajo ya que la disfunción de las enzimas oxidativas, especialmente la alfa glicerolfosfatasa impide la producción de energía celular, aumenta la cantidad de ácido láctico y acelera la fatiga muscular. Es importante señalar que esto ocurre cuando hay hipoxia, tanto por la presencia de la anemia como la disminución enzimática antes señalada.

La fatiga muscular se puede demostrar por pruebas clínicas de ejercicio muscular y en trabajos físicos que requieran fuerte e intenso trabajo muscular. La susceptibilidad a las infecciones en pacientes con deficiencia de Fe favorece el crecimiento de las bacterias, y en clínica quienes han recibido Fe parenteral para el tratamiento de la anemia por deficiencia de Fe, las infecciones son más frecuentes y severas que aquellos que no han recibido tratamiento (Swain y col., 1996).

Recientemente se observado en asociación con la deficiencia de Fe un aumento en la eliminación urinaria de catecolaminas, un aumento en la sangre de la fenilalanina y de la adeniltirosina hidroxilasa con la disminución de la síntesis

del ADN. La eliminación de las catecolaminas por la orina está relacionada con alteraciones en la termorregulación, así en los casos donde la deficiencia de Fe se acompaña de anemia severa, los sujetos experimentan una disminución de la temperatura corporal. Se ha sugerido, que durante ese proceso, el sujeto pierde calor y como consecuencia de ello se aumenta el consumo de oxígeno y los niveles de norepinefrina en el plasma (Hillman y Ault, 1995).

La biopsia de estómago practicada en anemia por deficiencia de Fe ha demostrado que en el 75% de los casos se presentan diversos grados de gastritis, acompañada de disminución de la secreción gástrica, además se ha observado en los niños, pero no en adultos, malabsorción intestinal (Oski, 1993).

En los estudios de laboratorio para el diagnóstico de la ferropdeficiencia, aparecen de forma general las siguientes alteraciones hemáticas:

- Hemoglobina: inferior a 130 g/L en el hombre y 120 g/L en la mujer
- Hematíes: hipocrómicos y microcíticos (volumen corpuscular medio, VCM < 80 fL)
- Fe sérico: inferior a 11 mmoles/L
- Porcentaje de saturación de transferrina: inferior al 16%
- Capacidad de fijación de Fe (TIBC): superior a 70 mmoles/L
- Ferritina: inferior a 40 mmoles/L
- Sideroblastos (tinción de Perls): No existe Fe teñible en aspirado de médula
- Otros datos hemáticos: los núcleos de los neutrófilos son hiperpigmentados y las plaquetas están aumentadas.

Hay 2 métodos en laboratorio de identificación de la ferropdeficiencia; screening de niveles de Fe en eritropoyesis y evaluar el estatus de Fe en los tejidos. Los tests más novedosos incluyen porcentaje de eritrocitos hipocrómicos, contenido de Hb en reticulocitos, y síntesis de receptores de transferrina (TfRs) (Beutler y col., 2003).

2.1.4. TRATAMIENTO DE LA FERRODEFICIENCIA. SOBRECARGA ORAL DE HIERRO

El suplemento de Fe oral ha sido utilizado como tratamiento de elección en la ferropdeficiencia con preferencia sobre el tratamiento con Fe parenteral. La mayor dificultad que presenta el tratamiento con Fe oral (sobrecarga oral de Fe), es que puede causar náuseas y molestias epigástricas a corto plazo tras su ingestión. Estos síntomas varían en proporción a la concentración de Fe ionizable en la parte alta del tracto gastrointestinal y puede ser reducida si se acompaña de la ingesta de alimentos, como es comúnmente consumido (Cook, 2005).

Las 3 principales estrategias para corregir la ferropdeficiencia en la población son:

- Educación en buenas prácticas dietarias, combinando la modificación y diversificación de la dieta que mejora la ingesta de alimentos, es decir, su asimilación y biodisponibilidad.

-Suplementación con Fe; usualmente en grandes dosis farmacológicas, independientemente de la ingesta alimentaria.

-Fortificación con Fe en los alimentos. Hoy en día la biofortificación es usada en cultivos o por aplicación de ingeniería genética.

La **suplementación con Fe**, es más característica en cierto grupo de pacientes de alto riesgo, (por ejemplo; embarazadas, cuando los niveles de Fe son bajos) y resulta ser muy efectiva (Baltussen y col., 2004).

Las sales de ión ferroso, como sulfato ferroso y gluconato ferroso, son las formas preferentes de Fe oral, por su bajo costo y alta biodisponibilidad (Cook, 2005). La terapia estándar para la anemia por deficiencia en Fe en adultos es 300 mg en un comprimido de sulfato ferroso (60 mg de Fe) 3 ó 4 veces al día.

La absorción de Fe, es mejor cuando se administra con el estomago vacío, aunque puede provocar náuseas y dolor epigástrico. Si este tipo de efectos se acentúan, se disminuirá la dosis o se administrará entre las comidas, ya que la ingesta de alimentos reduce la absorción del Fe medicinal en 2/3 partes (Cook, 2005). Otra alternativa es suministrar Fe oral cada pocos días; este régimen podría incrementar la absorción de una fracción de Fe (Cavalli-Sforza y col., 2005). Para asegurar que hay una respuesta al tratamiento, la anemia debe ser monitorizada. La causa más frecuente del fallo del tratamiento, es el incumplimiento terapéutico.

Puede aparecer reticulocitosis a los 4 días de tratamiento y alcanza un máximo entre los 7 y 10 días. Posteriormente aparece un aumento del hematocrito y la concentración de hemoglobina. La terapia debe continuar durante 2 a 3 meses después de la corrección de la anemia para reponer los depósitos del Fe del organismo.

Estudios aportados por OMS en Asia, para mujeres y niños en edad de crecimiento, revelan que los suplementos de Fe y ácido fólico cada semana, mejora el Fe nutricional y reduce la anemia por ferropdeficiencia (Cavalli-Sforza y col., 2005).

En los países industrializados, la suplementación con Fe en embarazadas es ampliamente defendido por las evidencias de los resultados beneficiosos para la madre y el feto, incrementa el peso del recién nacido y reduce las incidencias de los partos prematuros, pero no afecta a la prevalencia de la anemia en el tercer trimestre de gestación (Cogswell y col., 2003; Siega-Riz y col., 2006).

La carencia de suplementos de Fe en niños de países tropicales, muestra una alta transmisión de malaria asociada con un incremento de infecciones (Oppenheimer, 2001; Gera y Sachdev, 2002). Un reciente estudio de la OMS/WHO, sitúa la importancia de la suplementación con Fe y ácido fólico en niños con anemia y riesgo de ferropdeficiencia, y coincide con la protección de malaria y otras infecciones (WHO, 2007).

La **fortificación con Fe** es probablemente, más usada, por ser sostenible y tener un coste efectivo en el control de la deficiencia de Fe (Baltussen y col., 2004; WHO, 2006; Laxminarayan y col., 2006). La fortificación de alimentos con Fe es más difícil que con otros minerales. Los compuestos de Fe más biodisponibles son solubles en agua o ácidos débiles, sin embargo, reacciona con otros componentes alimentarios causando mal sabor y cambio de color, además de tener un gran poder de oxidación lipídica (Hurrell, 2002). Por esta razón, las formas menos solubles de Fe y por tanto menos biodisponibles, son siempre seleccionadas para fortificar y evitar los cambios organolépticos indeseables.

La fortificación con bajas cantidades de Fe, se aproxima más a las condiciones fisiológicas, que la suplementación, por lo que podría ser una intervención satisfactoria en pacientes con una anemia ferropénica no severa (WHO, 2006; WHO, 2007).

La fortificación con Fe en la leche y cereales no incrementa la morbilidad relacionada con infecciones en niños menores de 18 meses (Oppenheimer, 2001). En este sentido, la fortificación no causa efectos adversos visibles y de forma significativa protege contra las infecciones del tracto respiratorio (Gera y Sachdev, 2002).

El Fe parenteral está indicado principalmente en caso de hemorragia, intolerancia al Fe oral o malabsorción intestinal, detectando un incremento de Fe sérico tras 1 o 2 horas de la ingesta de 60 mg de Fe como sulfato ferroso.

Hasta hace poco el Fe-dextrano ha sido la principal forma disponible de Fe parenteral. El mayor inconveniente del Fe-dextrano son las reacciones anafilácticas, además de otros efectos secundarios como dolor muscular, articular y dolor de cabeza, en un 10% de los pacientes tratados. Estos síntomas son calmados con antiinflamatorios (Beutler y col., 2003).

Los productos orales de Fe se han abandonado en pacientes con enfermedad renal, que ahora son tratados con eritropoyetina. Los efectos adversos más frecuentes durante el tratamiento en pacientes con hemodiálisis son: hipotensión, calambres y náuseas (Nissenson y col., 2003).

2.1.5. PATOLOGÍAS RELACIONADAS CON LA SOBRECARGA DE HIERRO

2.1.5.1. CAUSAS DE LA SOBRECARGA DE HIERRO

El exceso de absorción intestinal de Fe, por lo general es el resultado de alteraciones hereditarias del metabolismo de dicho mineral, pero el Fe presente en ciertos preparados farmacológicos, también puede conducir a largo plazo a un exceso de Fe en el organismo. La fuente parenteral que conduce a la sobrecarga de Fe incluye transfusiones de sangre y en menor medida la terapia con Fe-dextrano. En algunas situaciones (por ejemplo en β -talasemia) pueden coexistir tanto la absorción elevada de Fe, como la carga de Fe por transfusión.

La sobrecarga de Fe por estos trastornos puede ser clasificada como primaria o secundaria, dependiendo del mecanismo subyacente (Pietrangelo,

2006). A continuación, se muestran los principales trastornos clínicos de sobrecarga de Fe (Anderson, 2007):

Primaria

- Hemocromatosis ligada al gen de HFE (Tipo 1)
- Hemocromatosis ligada al gen de TfR2 (Tipo 3)
- Hemocromatosis ligada al gen de a FPN (Tipo 4)
- Hemocromatosis Juvenil (ligada al gen de HJV) (Tipo 2A)
- Hemocromatosis Juvenil (ligada al gen de hepcidina) (Tipo 2B)

Secundaria

- Eritropoyesis ineficaz (p.ej. β -talasemia, anemia asideroblástica)
- Anemia hemolítica crónica (p.ej. deficiencia de piruvato quinasa, anemia falciforme)
- Anemia hipoplásica (p.ej. fallo renal crónico, anemia aplásica).

Otras

- Sobrecarga de Fe farmacológica (iatrogénica)
- Sobrecarga africana
- Atransferrinemia hereditaria
- Aceruloplasminemia hereditaria
- Hemocromatosis neonatal
- Transtorno hepático crónico
- Porfiria cutánea tardía

2.1.5.2. HEMOCROMATOSIS HEREDITARIA

Los primeros estudios de Hemocromatosis fueron realizados por Recklinghausen en 1889, determinando las condiciones clínicas de lo que se dio en llamar “cirrosis en diabetes de bronce” (Ajuar, 1865; Camaschella y col., 2002). La clonación del gen HFE (Feder, 1996) y la comprensión de su interacción con otras proteínas implicadas en el metabolismo de Fe han ayudado al estudio molecular de los procesos de la enfermedad.

La **sobrecarga** de Fe **primaria** (hereditaria) es resultado de la absorción aumentada de Fe procedente de la dieta en el intestino. En algunos casos se produce por alteración de la síntesis de ferroportina y su redistribución de Fe en los tejidos.

El tipo más común de sobrecarga primaria de Fe es la hemocromatosis ligada al gen de HFE (Tipo 1) (Pietrangelo, 2002; Pietrangelo, 2006). Este trastorno autosómico recesivo es comúnmente causado por una mutación homocigótica del gen HFE en el cromosoma 6 conduciendo a la sustitución de C282Y. Este tipo de hemocromatosis HFE es particularmente frecuente en las poblaciones del norte europeo (Bomford, 2002).

Otros trastornos genéticos menos comunes, de sobrecarga primaria de Fe son resultado de mutaciones en los genes que codifican la TfR2, hepcidina, y hemojuvelina, pero todos siguen un modelo similar de depósito de Fe en los tejidos (Bomford, 2002; Pietrangelo, 2006).

Esta sobrecarga de Fe en última instancia puede conducir al daño del órgano de forma irreversible con complicaciones como la cirrosis hepática, diabetes, disfunción cardíaca y la artritis (O'Neil y Powell, 2005). Un rasgo común de cada uno de estos trastornos es que los niveles de hepcidina son bajos en relación con la carga de Fe en el organismo y esto puede explicar la absorción aumentada de Fe asociada con estas condiciones.

La absorción intestinal de Fe aumentada con una eritropoyesis ineficaz implica una situación paradójica de anemia con sobrecarga Fe y esta condición se agrava por la transfusión de eritrocitos. Las anemias más comunes que conducen a la sobrecarga de Fe son las formas intermedias y mayor de β -talasemia, y anemias raras que incluyen la anemia congénita diseritropoyética, la anemia sideroblástica ligada al cromosoma X y anemias debidas a mutaciones en el transportador de metales divalentes 1 (DMT1) (Papanikolaou y col., 2005). El hecho de que la eritropoyesis conduzca a un aumento de la absorción de Fe, parece suprimir en estas condiciones la síntesis de hepcidina como se hace evidente por los bajos niveles urinarios de hepcidina en estos pacientes (Kearney y col., 2007).

La hemocromatosis FPN tiene un aspecto histológico diferente, pero con las mismas consecuencias patológicas, esta es la forma más común de hemocromatosis no-HFE (Franchini, 2006).

La **sobrecarga** de Fe **secundaria**, es resultado principalmente del Fe acumulado como consecuencia de las transfusiones de sangre que son

administradas para tratar las enfermedades del sistema eritroide (Gabutti y Borgna-Pignatti, 1994). Estas enfermedades incluyen aquellas asociadas con eritropoyesis ineficaz (p.ej. β -talasemia, anemia sideroblástica), anemias hemolíticas crónicas (p.ej. deficiencia de piruvato quinasa, anemia falciforme, o anemias hipoplásicas, insuficiencia renal crónica, anemia aplásica). Mientras que la transfusión es por lo general la fuente principal de exceso de Fe en estas condiciones, en algunos casos, por ejemplo en la β -talasemia, hay también absorción excesiva de Fe. La sobrecarga crónica de Fe debida a transfusiones sanguíneas conduce a una significativa morbilidad y a la temprana mortalidad a no ser que se administre una adecuada terapia de quelación. El mesilato de deferoxamina (Desferal®) es el compuesto de elección para la terapia de quelación de Fe y debe ser administrada por vía subcutánea o intravenosa. (Delea y col., 2007).

Hay también formas mixtas de sobrecarga de Fe de etiologías variables, pero la mayor parte de estas son raras. Estas incluyen la sobrecarga farmacológica de Fe, la hemocromatosis africana, las enfermedades raras que afectan a la síntesis de proteínas plasmáticas como la atransferrinemia congénita y la aceruloplasminemia, la hemocromatosis neonatal, la siderosis asociada con la enfermedad hepática crónica y la porfiria cutánea tardía (Anderson, 2007).

Tipos de Hemocromatosis:

La enfermedad que conduce a la sobrecarga de Fe primaria o Hemocromatosis hereditaria (HH) parece ser mediada por acontecimientos mutacionales en cuatro genes que conducen a alteraciones en la adquisición de Fe. Según la mutación en uno a varios genes implicados en la homeostasis del Fe y la presentación clínica de síntomas, la HH puede ser clasificada en cuatro fenotipos.

- El **tipo 1 HH** con trastorno de sobrecarga de Fe más común, que ocurre debido a mutaciones en el gen HFE. La proteína principal de histocompatibilidad transcrita por este gen forma un complejo con β -2-microglobina (Feder y col., 1996). Dos mutaciones predominantes en este gen (Feder, 1997) interfieren con su capacidad de unión al complejo con β -2-microglobina y también cambian la unión con TFR1. El papel y la participación de hepcidina en la regulación de este complejo no están bien dilucidados. En este tipo de hemocromatosis, la absorción aumentada de Fe y la eliminación de Fe en el hígado, corazón, páncreas y la piel, conduce tarde o temprano a cirrosis hepática, fibrosis y diabetes.

-El **tipo 2 HH** se caracteriza por una disfunción cardíaca y endocrina severa, debido a la sobrecarga aumentada de Fe que conduce a la mortalidad antes de los 30 años, y también conocida como Hemocromatosis juvenil. Las mutaciones en la hepcidina (HAMP) y hemojuvelina (HJV o HFE2) están implicadas en el desarrollo de la enfermedad. El HJV actúa como co-receptor

para la BMP y por este mecanismo regulador aumenta la síntesis de hepcidina que conduce a la sobrecarga de Fe.

-El **tipo 3 HH** causada por mutaciones en TFR2, un homólogo de TFR1, con una distribución tisular limitada. La sobrecarga de Fe en esta enfermedad es lenta y no fatal. Los estudios sobre TRF2 apuntaron que mutaciones génicas en ratones parecen estar asociadas con la producción disminuida de hepcidina y en consecuencia la sobrecarga de Fe (Domenico y col., 2008).

-El **cuarto tipo de HH** es debido a mutaciones en el gen de la ferroportina. Con dos tipos de fenotipos: la acumulación de Fe en macrófagos y baja saturación de transferrina, eritropoyesis limitada o aumento en la acumulación de Fe hepático y alta saturación de transferrina. Estudios en ratones con mutaciones génicas indicaron que la proteína ferroportina mutada, no hace posible el transporte de Fe en la superficie celular, sobrecargando al macrófago (Feder y col., 1998; Liu y col., 2005). Esta mutación provoca una resistencia a la entrada inducida por la hepcidina y conduce a una mayor acumulación de Fe en los hepatocitos (Drakesmith y col., 2005).

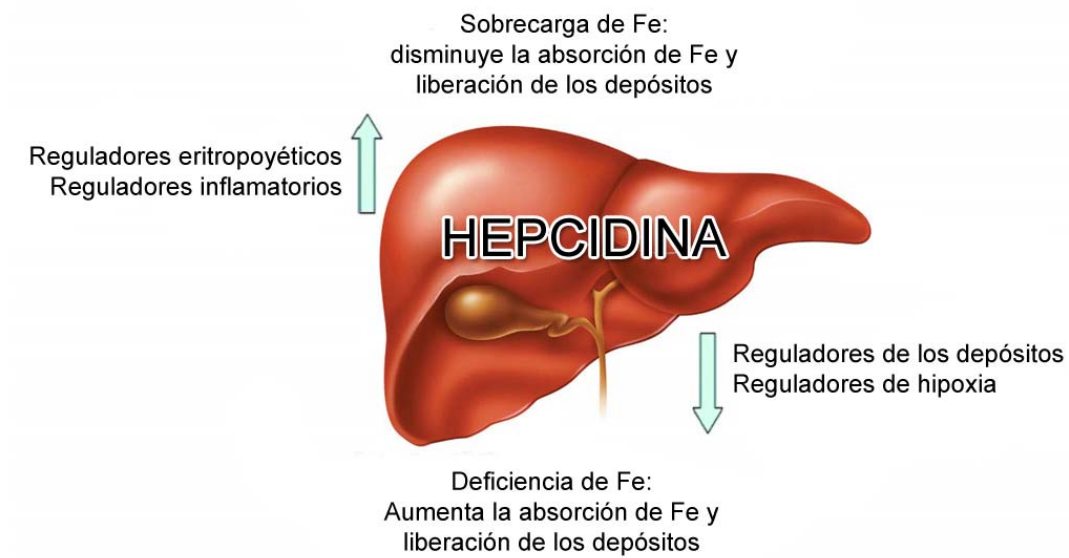


Figura 1. La *Hepcidina*, es un péptido de 25 aminoácidos, que juega un papel crítico en los mecanismos homeostáticos del Fe, siendo regulado hormonalmente por la expresión inducida/inhibida de hepcidina en los hepatocitos, y por consiguiente sus niveles en el suero son cada vez más reconocidos como un punto clave para mediar la información de diversas señales para la absorción de Fe (eflujo de enterocitos/macrófagos) y la interacción de transferrina (Tf) unida al Fe con el receptor transferrina (TfR) sobre la membrana celular. Así en la sobrecarga de Fe (inducida o hereditaria), en la deficiencia de Fe debido a la baja ingesta alimentaria, o en anemia crónica, diversas señales modulan la síntesis de hepcidina en el hígado y la nivelan en el suero (Nadadur y col., 2008).

2.1.5.3. MECANISMOS DE TOXICIDAD DEL HIERRO

En situación de hemocromatosis y otros estados de sobrecarga de Fe, la capacidad de saturación de transferrina puede ser excedida, y por lo tanto se produce un marcado aumento de la proporción de Fe libre en el plasma. El Fe no unido a transferrina (Hider, 2002; Esposito y col., 2003) puede alcanzar altas concentraciones (hasta 20 μM en algunas condiciones patológicas), y es eliminado muy rápidamente del plasma por el hígado y otros órganos (Brissot y col., 1985; Craven y col., 1987). En consecuencia, hay una acumulación progresiva de Fe en estos tejidos que puede llegar a la toxicidad (Breuer y col., 2000). Se piensa que el Fe no unido a transferrina en el plasma no es excesivamente tóxico, pero su componente inestable entra en las células y es potencialmente dañino (Esposito y col., 2003).

Esposito y col. (2003) han definido el Fe lábil en plasma, como la forma no unida a transferrina que tiene actividad redox, es quelable, y capaz de entrar en los órganos e inducir sobrecarga de Fe en los tejidos. Además, el Fe lábil intracelular puede proceder de la degradación de la transferrina.

La capacidad del Fe lábil para catalizar la formación de radicales de oxígeno, sumamente reactivos es la base de su toxicidad celular, ya que estos radicales pueden dañar una amplia gama de macromoléculas celulares (Gutteridge y col., 1995). Aunque las especies reactivas de oxígeno (ROS) sean perjudiciales, también son generados durante el metabolismo normal en mitocondrias y peroxisomas.

En condiciones normales el organismo utiliza una gama de estrategias de defensa para protegerse ante la acumulación excesiva ROS y sus efectos. Estos incluyen varias enzimas antioxidantes que degradarán las ROS, procesos de reparación (p.ej. Reparación del ADN), y mecanismos de almacenaje de Fe (Halliwell y Gutteridge, 1995). El almacén de Fe intracelular dentro de la transferrina y hemosiderina es particularmente importante para secuestrar el Fe en su forma no tóxica (Harrison y Arosio, 1996; Orino y col., 2001).

Varias ROS incluyendo el anión superóxido, el radical hidroxilo, alcoxilo, peroxilo, ácido hipocloroso, y peroxinitrito, cuando no se mantienen controlados producen daños en procesos celulares atacando al ADN, proteínas y lípidos. El principal daño es la peroxidación de lípidos de membrana y orgánulos celulares. El radical **hidroxilo** es muy reactivo y puede atacar a la mayor parte de biomoléculas, pero los radicales derivados del **hidroperóxido** son también muy importantes en la producción de peroxidación lipídica (Gutteridge y col., 1995).

2.1.5.4. CONSECUENCIAS DE LA SOBRECARGA DE HIERRO

El Fe tiene la capacidad de aceptar y donar electrones fácilmente, por su conversión entre férrico (Fe^{3+}) y ferroso (Fe^{2+}). Esta capacidad hace que sea fisiológicamente indispensable, ya que participa en el metabolismo oxidativo, crecimiento y proliferación celular, así como en el transporte (hemoglobina) y almacenamiento de oxígeno (mioglobina). Sin embargo, el Fe también es bioquímicamente peligroso, por su interacción con el oxígeno, catalizando la conversión a peróxido de hidrógeno y a radical superóxido, mediante su

participación en las reacciones de Fenton y Haber-Weiss, que terminan generando radicales hidroxilos que inducen riesgos para las membranas celulares, proteínas y ADN, provocando la fragmentación y desestabilización de la doble hélice (Fiers y col., 1999; Haliwell, 2001). Por otra parte, (Cragg y col., 1998) examinaron los efectos del peróxido de hidrógeno en células HepG2. Ellos demostraron que la sobrecarga de Fe incrementaba enormemente el daño en el ADN inducido por peróxido de hidrógeno y que un quelante de Fe (desferritocina) ejercía un efecto protector en las células, confirmando el efecto genotóxico del Fe.

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

Las condiciones patológicas, el metabolismo del Fe y el del radical superóxido están íntimamente vinculados. Cada uno puede exacerbar la toxicidad de los demás. La sobrecarga de Fe puede amplificar los efectos nocivos de la sobreproducción del radical superóxido. Además, el estrés oxidativo crónico

puede modular la absorción del Fe y su almacenamiento, lo que puede llevar a efectos citotóxicos y mutagénicos (Emerit y col., 2001).

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

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

El hígado y el corazón son los objetivos principales del daño inducido por las especies reactivas catalizadas por Fe, pero otros órganos como el páncreas y

órganos endocrinos son también sensibles a los efectos tóxicos del Fe (Anderson y col., 2001; O'Neil y col., 2005).

El **hígado** es el principal órgano de almacén de Fe en el organismo, y no es sorprendente la hepatotoxicidad como una consecuencia principal de la sobrecarga de Fe (Ramm y Ruddell, 2005). El daño que el Fe produce en hígado puede conducir a fibrosis y cirrosis y, en casos avanzados, al cáncer de hígado.

En el **corazón**, la formación de radicales hidroxilo inducidos por Fe no unido a transferrina causa una disfunción en la cadena respiratoria mitocondrial que conduce al paro cardíaco (Anderson y col., 2001). Los efectos cardíacos más destacados (p.ej. hipertrofia, degeneración de fibra, arritmias, y el paro cardíaco congestivo) tienden a ser vistos en situaciones donde hay carga muy rápida de Fe. Por ejemplo, complicaciones cardíacas son más comunes en las formas agresivas juveniles de hemocromatosis que en el inicio adulto de la enfermedad HFE, y el daño cardíaco a menudo acompañan la sobrecarga de Fe transfusional.

La sobrecarga de Fe también afecta el **sistema endocrino**, en particular la glándula pituitaria y las glándulas de tiroides/paratiroides. La disfunción gonadal es una consecuencia secundaria de la sobrecarga de Fe en la glándula pituitaria anterior.

La **artritis** es también muy común en la sobrecarga de Fe y, en algunos casos hay una sensibilidad aumentada a ciertas infecciones.

Otros factores que contribuyen al grado de daño en los tejidos está relacionado con la velocidad de acumulación de Fe (la carga rápida es más perjudicial que la carga lenta), la duración de Fe elevado, el equilibrio de la sobrecarga entre el parénquima (siendo estas células más susceptibles al daño oxidativo) y la carga de la célula reticuloendotelial , la presencia de otros factores que causan daños hepáticos (p.ej. hepatotoxinas como el alcohol y la hepatitis viral en el hígado) y niveles de ascórbico.

2.2. FUNCIONES DEL HIERRO

El Fe es un elemento clave en el metabolismo de todos los organismos vivos. Las funciones se deben a su capacidad de participar en procesos de oxidación y reducción (Beard, 2001). Químicamente, el Fe es un elemento altamente reactivo que puede interaccionar con el oxígeno, dando lugar a especies intermedias con una capacidad potencial de dañar las membranas celulares o degradar el ADN. El Fe debe estar unido fuertemente a proteínas para evitar estos potenciales efectos perjudiciales sobre las células.

Las funciones principales del Fe son:

-Transporte y almacenamiento de oxígeno en los tejidos: El grupo hemo forma parte de la hemoglobina y mioglobina y está compuesto por un átomo de Fe. Estas proteínas están implicadas en el transporte y almacenamiento de oxígeno en nuestro organismo.

La **hemoglobina** es la principal proteína de las células rojas de la sangre y representa aproximadamente 2/3 de todo el Fe presente en el organismo. El papel vital que desempeña la hemoglobina en el transporte de oxígeno desde los pulmones al resto del organismo se deriva de su capacidad única para captar oxígeno rápidamente, durante el corto intervalo de tiempo que está en contacto con los pulmones, y liberar posteriormente este oxígeno según las necesidades a través de su circulación por los distintos tejidos.

La **mioglobina** juega un papel fundamental en el transporte y almacén de oxígeno a corto plazo en las células musculares, regulando el oxígeno de acuerdo a la demanda por parte de los músculos cuando entran en acción (Beard, 2001).

-Sensibilización al oxígeno: Un inadecuado aporte de oxígeno, (p. ej. el que experimentan las personas que viven a grandes altitudes, o los que sufren una enfermedad crónica de pulmón) induce una respuesta compensatoria fisiológica que incluye un aumento de la formación de células rojas, un aumento del crecimiento de vasos sanguíneos (angiogénesis) y una mayor producción de enzimas utilizadas en el metabolismo anaerobio. Bajo condiciones de hipoxia, los factores de transcripción conocidos como factores inducibles por la hipoxia, se unen a elementos de respuesta en ciertos genes que codifican varias proteínas implicadas en la respuesta compensatoria a la falta de oxígeno e incrementan la síntesis de dichas proteínas. Recientes estudios revelan que la enzima prolil-hidroxilasa Fe-dependiente juega un papel crucial en la regulación de estos factores inducibles por la hipoxia y consecuentemente en la respuesta fisiológica

a esta situación. Cuando la tensión celular es adecuada, las subunidades α de los recién sintetizados factores inducibles por la hipoxia, son modificados por la enzima prolil-hidroxilasa en un proceso dependiente de Fe que las hacen muy sensibles a la degradación. Cuando la tensión celular de oxígeno cae por debajo de un umbral crítico, la prolil-hidroxilasa no puede modificar la subunidad α para su degradación, lo que permite que esta subunidad α se una a la subunidad β y formen un factor de transcripción activo, que es capaz de entrar en el núcleo y unirse a elementos de respuesta específicos en ciertos genes (Ivan y col., 2001; Jaakkola y col., 2001).

-Transporte de electrones, metabolismo energético y detoxificación del organismo: El Fe interviene en el transporte de energía en todas las células, en la producción de ATP mitocondrial donde participan multitud de enzimas que contienen Fe hemo y no hemo. Los ***citocromos*** que tienen al grupo hemo en su composición, presentes en prácticamente todas las células, ejercen su función en la cadena de transporte electrónico mitocondrial, transfiriendo electrones y almacenando energía gracias a las reacciones de oxidación y reducción del Fe. Numerosos xenobióticos insolubles en agua y moléculas orgánicas tóxicas son transformadas por el sistema del citocromo P-450 hepático, en otras moléculas mucho más hidrosolubles que pueden ser excretadas por vía biliar (Beard, 2001).

-Antioxidante y funciones pro-oxidantes beneficiosas: La ***catalasa*** y la ***peroxidasa*** son enzimas que contienen el grupo hemo y protegen a la célula contra la acumulación de peróxido de hidrógeno, una especie reactiva del oxígeno altamente perjudicial, convirtiéndola en agua y oxígeno (Brody, 1999).

-Sistema inmune: La enzima *mieloperoxidasa* está presente en los neutrófilos que forman parte de las células sanguíneas, encargadas de defender al organismo contra las infecciones o materiales extraños. Esta enzima, que presenta en su composición un grupo hemo, produce la síntesis de ácido hipocloroso (una especie reactiva del oxígeno) usada por los neutrófilos para destruir a bacterias patógenas y otros microorganismos, consiguiendo así eliminar los agentes patógenos (Brody, 1999).

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

Se ha observado en ferropdeficiencia un aumento en la eliminación urinaria de catecolaminas, un aumento de la fenilalanina en la sangre y de la adeniltirosina hidroxilasa con la disminución de la síntesis del ADN (Hillman y col., 1995).

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

En ferropdeficiencia, se pueden afectar determinadas estructuras cerebrales que requieren un contenido relativamente elevado de Fe, como demuestra el dato indirecto de las **reservas hepáticas** de dicho elemento. Las funciones más afectadas son las relacionadas con el sistema dopaminérgico de neurotransmisión, posiblemente porque conduce a una disminución del receptor D2 de la dopamina, asociado con alteración del catabolismo de las aminas biógenas como la serotonina y el de opiopéptidos endógenos.

En el nacimiento solo existe en el encéfalo un 10% del Fe presente en la edad adulta, aumentando el contenido neuronal hasta el 50% a los 10 años y alcanzando el nivel máximo entre los 20 y 30 años. Se ha observado en animales de experimentación, que si no se alcanzan los niveles de Fe, sobre todo durante la época de crecimiento, no se pueden conseguir posteriormente a pesar de un importante suministro, lo que conlleva un riesgo de afectación neuronal (Hallterman y col., 2001).

2.3. FUENTES ALIMENTARIAS DE HIERRO Y BIODISPONIBILIDAD

La biodisponibilidad está definida como la eficiencia con la cual el Fe obtenido de la dieta es utilizado biológicamente (Wienk y col., 1999), depende del tipo de Fe que se suministre en los alimentos, de la cantidad del mismo, de la combinación de alimentos en una comida, el estado nutricional del Fe y de algunos eventos que requieran modificar la movilización de Fe entre los tejidos o la absorción del mismo como: la eritropoyesis aumentada, la hipoxia y las infecciones (Hallberg, 1981; Raja y col., 1988; Lynch, 1997; Hallberg y col., 1998;

Gaitán y col., 2006). La absorción de Fe se encuentra aumentada durante la deficiencia del metal, las anemias hemolíticas y en la hipoxia, mientras que en los procesos infecciosos o inflamatorios existe una reducción de la absorción del mismo.

Varios factores afectan la biodisponibilidad del Fe de la dieta. La tasa de absorción depende del estatus de Fe del individuo, es decir, del nivel de este nutriente en los depósitos del organismo. Una baja cantidad de Fe en los depósitos implica una mayor tasa de absorción. Individuos con anemia ferropénica son capaces de absorber entre un 20 y un 30% del Fe presente en la dieta, mientras que un individuo sin anemia solo absorbe un 5-10% del total ingerido (Zlotkin, 2001; Conrad y Umbreit, 2002).

La deficiencia de Fe asociada a la nutrición, donde las dietas tienen bajo contenido de Fe hemo y alto aporte de Fe no hemo, tienen una baja biodisponibilidad, debido a los inhibidores presentes en las dietas ricas en productos de origen vegetal y pobres en carnes.

El Fe es el único micronutriente cuya biodisponibilidad se puede determinar directamente, lo que se logra mediante técnicas que cuantifican la cantidad de una dosis de los isótopos radioactivos ^{55}Fe o ^{59}Fe , o bien de los isótopos estables ^{57}Fe o ^{58}Fe , que se incorpora a la hemoglobina. Se asume como constante que entre el 80-90% del metal absorbido se usa para la síntesis de hemoglobina. Debido a que no hay una vía específica de excreción, es posible

utilizar indistintamente los términos de biodisponibilidad y absorción (Fairweather-Tait, 2001a).

En la dieta humana, el Fe se encuentra como Fe hemo en las carnes, o como Fe no hemo (inorgánico) en los alimentos de origen vegetal, las sales minerales y algunos alimentos de origen animal como la leche y los huevos (Fairweather-Tait, 2001b; Swain y col., 2007).

El Fe no hemo es la mayor fuente del mineral en la dieta de las poblaciones de los países en vías de desarrollo. El Fe hemo se halla en las carnes (rojas y blancas) y la sangre, también existe un contenido muy bajo de Fe hemo en las semillas de las plantas, asociado a los anillos tetrapirrólicos de la clorofila, el sirohemo, la fitocromobilina e incluso al grupo Hemo (Santana y col., 1998). A pesar del alto contenido de Fe no hemo de los alimentos, su biodisponibilidad varía desde menos del 1% hasta un 20%, esto se debe a que otros nutrientes de la dieta pueden aumentar o disminuir la eficiencia con la cual es solubilizado y/o reducido por el pH gástrico, compitiendo por el transportador DMT1 en la membrana apical del enterocito o afectando el metabolismo del metal. Sólo uno de estos efectos o la combinación de varios hace que algunos compuestos tengan importancia como inhibidores o estimuladores de la biodisponibilidad del Fe (Hallberg, 1981; Lynch, 1997; Sandstrom, 2001; Miret y col., 2003).

-Potenciadores de la absorción del Fe no hemo:

Ácido ascórbico (Vitamina C) y **otros ácidos orgánicos**; cítrico, málico, tartárico y láctico tienen efecto potenciador sobre la absorción del Fe no hemo, tienen la cualidad de aumentar la biodisponibilidad del Fe y su efecto se atribuye a la capacidad que estos compuestos tienen para reducir el Fe no hemo y mantener su solubilidad a pH alto, por lo tanto, aumentan la cantidad de Fe^{+2} que es más soluble en el lumen duodenal (Teucher y col., 2004). La vitamina C potencia fuertemente la absorción de Fe no hemo, reduciendo el Fe férrico de la dieta (Fe^{3+}) a Fe ferroso (Fe^{2+}) y formando un complejo absorbible Fe-ácido ascórbico.

Carne, pescado y aves: aparte de proporcionar Fe hemo altamente absorbible, también potencian la absorción de Fe no hemo. El mecanismo para favorecer la absorción de Fe no está aún claro (Lynch, 1997; Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, 2004).

El factor carne: En la década de los 60, Layrisse propuso que el consumo de carnes a parte de contener Fe hemo aumentan la biodisponibilidad del Fe no hemo (Layrisse y col., 1968). En base a este hallazgo se propuso que la proteína de origen animal estaba implicada en este proceso. Sin embargo, estudios posteriores encontraron que este efecto positivo no se observaba con la proteína animal contenida en la clara de huevo o en la leche, la cual tiene grandes cantidades de coalbúmina (proteína quelante del metal) y caseína (proteína que oxida el Fe^{2+}) (Bjorn-Rasmussen y Hallberg, 1979; Hurrell y col., 1988; Emery,

1992; Gaitán, 2006) por lo tanto, al efecto de las proteínas sobre la absorción del Fe no hemo se le conoce como "factor cárnico".

Las proteínas de las carne además de proveer Fe hemo (altamente absorbible) favorecen la absorción de Fe no hemo promoviendo la solubilidad del Fe ferroso. El mecanismo mediante el cual el factor cárnico aumenta la absorción del Fe no hemo se relaciona con el contenido de aminoácidos ricos en histidinas y en enlaces sulfhidrilos de la proteína ingerida, por esto, las carnes con alto contenido de actina y mucina son las que más aumentan la biodisponibilidad; estos enlaces, promueven la solubilidad del Fe^{2+} y además, facilitan la reducción del Fe^{3+} (Mulvihill y col., 1998).

También se ha evaluado el efecto de la cisteína, un aminoácido rico en enlaces sulfhidrilos, encontrándose aumento de la absorción del Fe no hemo en estudios *in vitro* (Baech y col., 2003). Para el caso del Fe hemo, se reconoce que cuando es consumido en conjunto con proteínas su biodisponibilidad aumenta. Se especula que las proteínas evitan la degradación del anillo de protoporfirina en el lumen gástrico manteniendo intacto al grupo hemo o bien participan en el mecanismo de captación del grupo hemo por el enterocito.

Vitamina A: Es usual que las deficiencias de vitamina A y Fe coexistan en los países en vías de desarrollo y está claramente establecido que las estrategias para mejorar el estado nutricional del Fe tengan mayor efectividad cuando se realiza suplementación del metal y de vitamina A. La combinación de vitamina A con Fe se usa para mejorar la anemia ferropénica. El mecanismo mediante el

cual estos dos micronutrientes interaccionan no está dilucidado, sin embargo se ha postulado que esta vitamina es necesaria para la movilización de las reservas de Fe y para la reutilización del mismo durante la hematopoyesis, (Bloem, 1995; Gaitán, 2006) por otro lado, es posible que la vitamina A y los β -carotenos contribuyan en mantener solubilización del Fe no hemo contenido en alimentos ricos en algunos compuestos que lo fijan en el lumen e impiden su absorción, tal como ocurre con los fitatos y polifenoles (Garcia-Casal y col., 1998; Gaitán, 2006).

-Inhibidores de la absorción del Fe no hemo:

Ácido Fítico: presente en las legumbres, el arroz y granos enteros, si bien en las legumbres y los cereales tienen un alto contenido de Fe no hemo, no se considera una buena fuente de Fe, ya que también son ricos en fitatos (mio-Inositol hexafosfato) (Hurrell, 2003). Este compuesto une eficientemente varios metales en el duodeno inhibiendo su absorción (Agte, 2005). Debido a que las dietas de los países en vías de desarrollo son pobres en carne y ricas en legumbres y cereales, se le ha atribuido al fitato una gran responsabilidad en la génesis de las anemias ferropénicas. El efecto inhibitorio del fitato sobre la absorción del Fe no hemo se relaciona proporcionalmente con la cantidad del compuesto que se encuentra en los alimentos (Hallberg y Hulthen, 2000).

La pérdida de los grupos fosfato del mio-Inositol hexafosfato genera los derivados mioinositol pentafosfato, tetrafosfato, trifosfato, difosfato y monofosfato. Esta degradación es catalizada por fitasas o por las temperaturas de cocción de los alimentos que podrían favorecer la absorción del Fe no hemo, debido a que se ha comprobado que los compuestos con menos de 5 grupos fosfato tienen

una capacidad muy reducida para interferir con la biodisponibilidad de los micronutrientes minerales (Sandberg y col., 1999; Hurrell y col., 2003). Dentro de los programas de fortificación encaminados a prevenir las deficiencias del Fe, se contempla la adición de ácido ascórbico, debido a que al promover la reducción del metal, disminuye la cantidad de Fe^{3+} que es la forma del metal que se fija al fitato.

Actualmente la industria alimentaria intenta disminuir el contenido de fitatos utilizando fitasas (capaces de degradar el ácido fítico), además se están manipulando genéticamente algunas plantas, con el fin de producir alimentos bajos en el compuesto y de este modo disminuir la incidencia de deficiencias de Fe (Gibson y col., 2003).

Pequeñas cantidades de ácido fítico (de 5 a 10 mg) pueden reducir la absorción de Fe no hemo en un 50% (Fairbanks, 1999; Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, 2004).

Polifenoles (taninos): Estos compuestos presentes en ciertas frutas, verduras, café, té y especias (orégano), pueden inhibir de forma notable la absorción de Fe no hemo, ya que se combinan con el metal formando un compuesto insoluble. Este efecto se reduce en presencia de la vitamina C (Fairbanks, 1999; Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, 2004).

Proteínas vegetales: Las proteínas de la soja (tofu), tienen un efecto inhibitorio en la absorción de Fe no hemo, que no depende del contenido en ácido fítico (Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, 2004).

Algunos minerales: La absorción del Fe no hemo se ve afectada por distintos minerales con propiedades fisicoquímicas similares en cierta medida al Fe, entre los que se encuentran el Zn, Mn, Cu y Ca (Reddy y Cook, 1997). Se ha estudiado el efecto de estos minerales en la biodisponibilidad del Fe (Sharp, 2004). El efecto de estos minerales se debe a que compiten por los transportadores de membrana de los enterocitos, modifican el estado de oxidación o interfieren en el metabolismo del Fe (Sandstrom, 2001).

La interacción del **Ca** y el Fe es de particular importancia, debido a que, además de afectar la biodisponibilidad del Fe no hemo, es el único micronutriente implicado en la disminución de la biodisponibilidad del Fe hemo. Es sabido que el efecto del Ca sobre la biodisponibilidad del Fe es dosis dependiente, no teniendo efectos a dosis menores a 40 mg de Ca y cuando es más de 300 mg de Ca la biodisponibilidad del Fe disminuye hasta en un 50% (Hallberg y col., 1991; Gaitán, 2006). El Ca y el Fe no hemo compiten por el transportador DMT1, lo cual explica este efecto.

Sin embargo, López-Aliaga y col. (2000), estudiaron la influencia de la leche de cabra y vaca sobre la utilización digestiva y metabólica de Fe y Ca en ratas adultas. Este estudio demostró el efecto beneficioso de la leche de cabra, que favorece la utilización de Fe y Ca, y minimiza la interacción entre estos dos

minerales. Cuando el Ca se consume junto al Fe en una comida, el Ca disminuye la absorción de Fe hemo como el no hemo. En cuanto al efecto sobre el Fe hemo, se reconoce que disminuye su biodisponibilidad cuando los dos minerales se administran en solución, pero no cuando se administra en comidas completas, es donde no se puede aislar el efecto de otros inhibidores (Grinder-Pedersen y col., 2004), a pesar de que el transporte del Fe hemo a través de la membrana apical del enterocito es diferente al del Fe no hemo, es probable que el DMT1 también esté implicado en el efecto del Ca sobre la biodisponibilidad del Fe hemo (Roughead y col., 2005).

El **Zn** y el Fe no hemo compiten por el transportador DMT1, por lo tanto, en teoría, existe una disminución de la biodisponibilidad recíproca entre ambos microminerales. Sin embargo, los estudios realizados indican que a pesar de que cuando se ingieren ambos metales en solución en relaciones de Zn:Fe mayores a 5:1, la biodisponibilidad del Fe se disminuye hasta en un 56%. Este efecto no se ve cuando la misma relación molar de los metales se consume en una mezcla de alimentos (Whittaker, 1998; Arredondo y Nunez, 2005). Díaz-Castro y col., en 2009 encontraron que el consumo de leche de cabra resultaba beneficioso dado su contenido en vitamina C y D (Hartiti y col., 1994; Alférez y col., 2006). Sus especiales características nutricionales contribuyen a una mayor biodisponibilidad de Fe y Zn en situación de ferropdeficiencia en ratas que consumen dieta basada en leche de cabra (Alférez y col., 2006; Campos y col., 2007; Nestares y col., 2008; Díaz-Castro y col., 2009).

El efecto del **Cu** sobre la biodisponibilidad del Fe es paradójico, inicialmente, el Cu fue reconocido como un factor antianémico debido a que la suplementación de este metal mejoraba las anemias ferropénicas, independientemente, de la suplementación con Fe, actualmente se sabe que la ceruloplasmina es una enzima dependiente de Cu implicada en la absorción intestinal y la movilización del Fe entre los distintos tejidos (Sharp, 2004) de esta forma, las deficiencias del Cu afectarían la biodisponibilidad de los dos tipos de Fe. Por otra parte, estudios realizados *in vitro* en células caco-2 sugieren que el Cu disminuye la biodisponibilidad del Fe no hemo, debido a que ambos metales utilizan el transportador de membrana apical DMT1 para su absorción (Arredondo y col., 2006).

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

Tabla 1. Contenido en Fe de algunas fuentes alimentarias (modificado de Yip, 2000)

FUENTE	RACIÓN	Fe (mg)
Tofu	¼ de bloque	6.22
Ostras	6 (medianas)	5.04
Patata con piel	½ patata, cocida	2.75
Riñones	½ taza, cocinados	2.60
Melaza	1 cucharada sopera	3.50
Ternera	100g, cocinado	2.31
Zumo de ciruelas	Un vaso de 250 ml	2.27
Carne de pollo	100g, cocinado	1.13

2.3.1. UTILIZACIÓN NUTRITIVA Y METABÓLICA DEL HIERRO

El Fe es un elemento traza esencial requerido para todos los organismos vivos y es tóxico en exceso. En la naturaleza hay un equilibrio que controla la cadena de entrada, transporte a los lugares que se necesita, y eliminación del exceso de Fe. Debido a la naturaleza del metabolismo y homeostasis del Fe, se integran mecanismos especializados en mantener los niveles celulares del organismo. En estos mecanismos implicados en la elevación de los niveles de Fe en enterocitos, transporte a nivel de membrana, y distribución en los diferentes tejidos, coordinando la homeostasis es clave la regulación molecular y esta relacionada con la deficiencia o sobrecarga de Fe.

El papel y la participación de varias proteínas y moléculas peptídicas en el mantenimiento del equilibrio de la homeostasis del Fe, sugiere que la interrupción o la sobreexpresión de cualquiera de estas entidades puedan conducir a consecuencias de salud significativas. Los estudios de comparativos en animales transgénicos y ciertas enfermedades genéticas humanas, implican mutaciones en HFE, TfR2, hepcidina, HJV, IREG1, Tf, ceruloplasmina y ferritina en algunas patologías relacionadas con la sobrecarga de Fe. Estas observaciones ayudan a un mejor entendimiento de los mecanismos moleculares implicados en la sobrecarga heredada de Fe (Domenico Domenico y col., 2008).

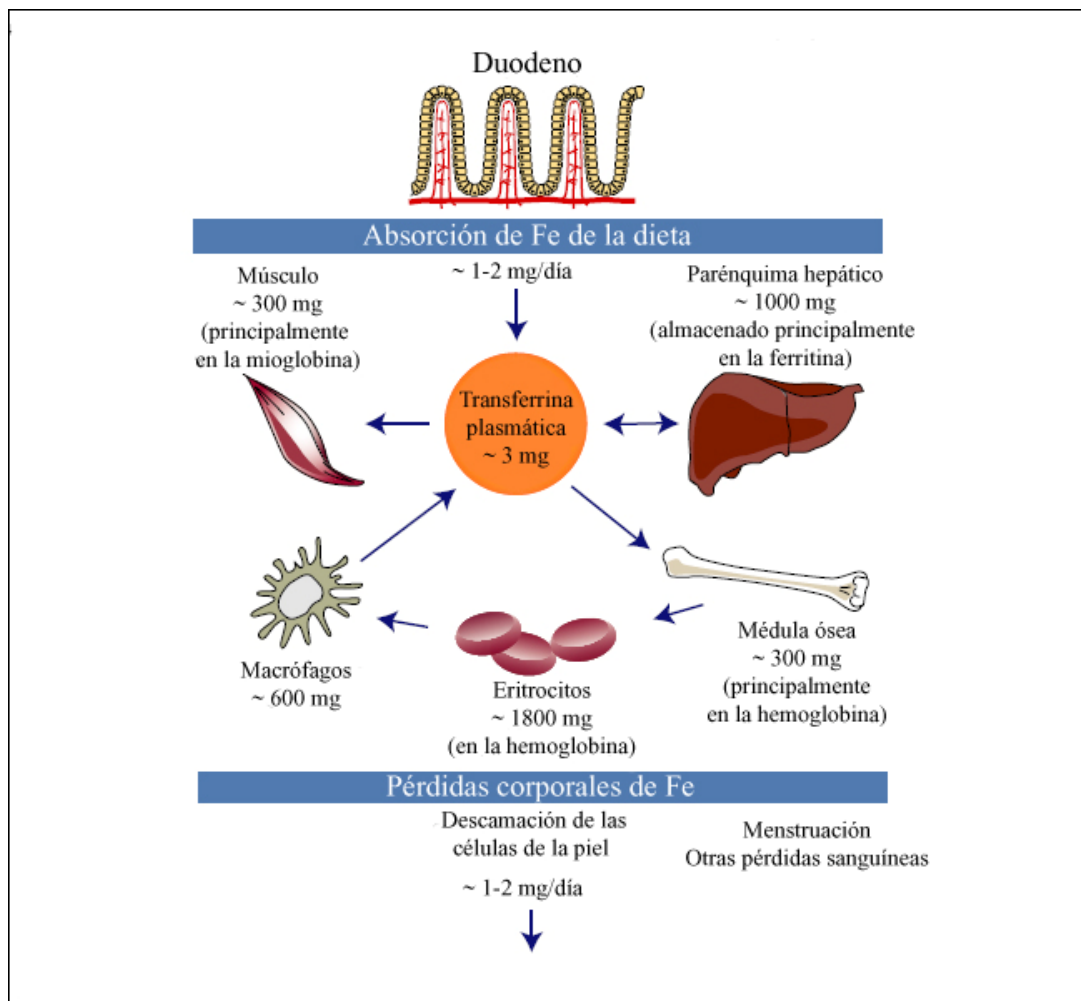
La alteración de la homeostasis, como elevación de los niveles de Fe, esta relacionada con la patología hemocromatosis hereditaria y enfermedad de Parkinson debido a la influencia de factores medioambientales y estilos de vida (Rouault, 2006).

El Fe es un micronutriente por lo que debe ser ingerido en una cantidad adecuada para la salud del organismo. Es necesario para la vida participando en numerosos procesos metabólicos específicos para cada célula viva y formando parte de complejos moleculares y enzimáticos. A pesar de los bajos requerimientos en la dieta, la deficiencia de Fe debido a la malnutrición es un problema de salud pública.

En un adulto el contenido de Fe es aproximadamente 4 g y un 50% de este, está unido a hemoglobina de los hematíes, 25% en el hígado y el resto

constituye mioglobina y otras proteínas que contienen Fe. El contenido total de Fe en los hombres es de unos 50 mg/Kg, mientras que las mujeres tienen una proporción ligeramente inferior (Papanikolau y Pantopoulos, 2004).

Figura 2. Distribución de Fe en el organismo (Papanikolau y Pantopoulos, 2004)



Los mamíferos obtienen Fe exclusivamente de la dieta, mientras que el Fe hemo, lo obtienen de la absorción de hemoglobina y mioglobina, el Fe inorgánico no-hemo proviene de una muy amplia variedad en la dieta y éste se

absorbe ineficazmente. La ingesta humana es aproximadamente 12-18 mg/día de la cual solo 1-2 mg es absorbido (Crichton y col., 2002).

El estatus de Fe en el organismo es mantenido por la regulación de la absorción y depósito de este micronutriente, pero no es bien conocido el mecanismo corporal de eliminación de Fe.

2.3.2. REQUERIMIENTOS

Los requerimientos de Fe en cada etapa de la vida están determinados por el estatus y los cambios fisiológicos a los que se enfrenta el organismo durante su desarrollo. Los requerimientos estimados son el promedio en respuesta de la biodisponibilidad del Fe, en un 5% para una dieta estrictamente vegetariana, un 10% en carne con ácido ascórbico y un 15% para dietas ricas en carne y frutas. Por ejemplo se estima una recomendación tres veces mayor (27,4 mg Fe/día), con Fe de un 5% de biodisponibilidad (WHO/FAO, 2004).

El **recién nacido** sustituye el Fe suministrado por la placenta por otro aporte de los alimentos, que frecuentemente es insuficiente.

Durante el primer año de vida, el niño crece rápidamente, triplicando su peso y duplicando el contenido Fe corporal (Dallman y col., 1993). En este periodo se estima que las necesidades de Fe oscilan en un rango de entre 0.6 y 1.0 mg/Kg/día (11 mg/día) (Bothwell, 1995; Food and Nutrition Board, 2004).

Se pueden distinguir tres períodos característicos, dependientes del estado nutricional del Fe.

-El primer período de 6 a 8 primeras semanas, durante las cuales se produce un descenso progresivo de los niveles de hemoglobina, de 170 g/L al nacer a 110 g/L, como consecuencia de la disminución de la eritropoyesis. El Fe liberado resultado de la destrucción de los hematíes, es insuficiente para cubrir las necesidades durante este periodo, almacenando el que no se utiliza, para satisfacer las demandas de las siguientes etapas del desarrollo. En este periodo, la cantidad de Fe absorbido a partir de los alimentos no es significativa (Lönnerdal y Dewey, 1995).

-El segundo periodo se caracteriza por el inicio de la eritropoyesis, a expensas fundamentalmente del Fe almacenado como producto de la destrucción de los hematíes en la etapa anterior, conduciendo a un incremento de los niveles de hemoglobina.

-El tercer periodo comienza alrededor del 4^o mes, se caracteriza por un aumento progresivo de la dependencia de Fe alimentario para garantizar una eritropoyesis eficiente. Hay que asegurar que el lactante tiene una dieta rica en Fe, garantizando un suministro adecuado para cubrir sus requerimientos (Dallman y col., 1993).

En niños prematuros y con bajo peso al nacer, la susceptibilidad de desarrollar una ferropdeficiencia es mucho mayor, ya que sus reservas

corporales son menores, unido a un crecimiento postnatal más acelerado. Esto hace que las reservas se agoten más fácilmente, por lo que se hace necesario el suministro de Fe exógeno antes del 4º mes de vida.

Lönnerdal y Dewey en 1995, afirman que durante la **infancia**, las necesidades de Fe para el crecimiento son menores, alrededor de 10 mg/día, pero continúan siendo elevadas en términos de ingesta relativa, comparadas con las del adulto, por lo que no desaparece el riesgo de desarrollar una ferropdeficiencia. En este periodo es fundamental evitar los malos hábitos dietéticos que limitan la ingesta de Fe o alteran su biodisponibilidad.

En la **adolescencia** se produce un nuevo incremento de las demandas de Fe, como consecuencia del crecimiento acelerado. Durante el desarrollo puberal, un adolescente aumenta unos 10 Kg de peso, y debe acompañarse de un incremento de 300 mg de su Fe corporal para mantener constante los niveles de la hemoglobina, que aumentan en este periodo de 50-100 g/L/año. En consecuencia, un adolescente varón requiere alrededor de 350 mg de Fe al año durante el pico de crecimiento (Uzel y Conrad, 1998). En las adolescentes las necesidades de Fe son superiores, ya que aunque la velocidad de crecimiento es menor, se adicionan las pérdidas menstruales (Lönnerdal y Dewey, 1995). El aumento de unos 9 Kg de peso de una adolescente durante la pubertad, implica un aporte de unos 280 mg de Fe para mantener la concentración de hemoglobina en niveles adecuados. Un sangrado menstrual promedio de unos 30 mL de sangre implica la pérdida de unos 75 mg de Fe. En

consecuencia, una adolescente en pleno pico de crecimiento requiere unos 455 mg de Fe al año.

En las **mujeres** en **edad fértil**, los requerimientos son similares a los de una adolescente, fundamentalmente debido a las pérdidas menstruales. Estos requerimientos pueden aumentar por el uso de dispositivos intrauterinos, que provocan aumentos imperceptibles de las pérdidas, unido en ocasiones a una dieta inadecuada; los embarazos y la lactancia pueden agravar esta situación (Conrad y Umbreit, 2000).

En **embarazadas** las pérdidas basales son de 14 mg Fe/día, para un peso de 64 Kg durante 280 días y se asegura que el depósito de Fe en el feto y la placenta es 315 mg de Fe. El incremento de la concentración de la hemoglobina se asume de 500 mg de Fe. Esto suma a 1070 mg de Fe durante el embarazo, estimando que las pérdidas en el parto corresponden solo a 250-350 mg Fe. (WHO/FAO, 2004). Por lo que el balance de Fe no depende solo de la dieta, sino también del almacén de Fe, que varía en el curso del embarazo (Hallberg, 1988).

En la **postmenopausia**, las mujeres que no experimentan pérdidas menstruales, y que tienen una media de peso corporal, tienen los mismos requerimientos que los hombres de su misma edad.

En el **hombre** adulto, solo las pérdidas de Fe basal son un determinante en el requerimiento de este mineral. Se asumen pérdidas de 14 mg de

Fe/Kg/día y siendo las recomendaciones de 8 mg/día. (Food and Nutrition Board, 2004).

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

Tabla 2. Ingestas diarias recomendadas (RDA) de Fe (modificado de Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, 2004)

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

2.3.3. ABSORCIÓN INTESTINAL Y TRANSPORTE DE HIERRO

El Fe de la dieta se absorbe principalmente en el intestino proximal, cerca de la unión gastroduodenal. Tres caminos se proponen en el proceso de la absorción. El Fe inorgánico no es eficientemente absorbido (Andrews, 1999). Cada transportador de membrana es específico de un grupo de proteínas transportadoras y enzimas accesorias que cambian el estado de oxidación del Fe facilitando el proceso de transporte.

El Fe hemo es absorbido en los enterocitos por un transportador de proteínas 1 no identificado, el cual es reconocido por proteínas de membrana en el intestino proximal, donde es absorbido el grupo hemo en su mayoría. Sin embargo, queda incierto si algún grupo hemo podría atravesar las células intactas, dejando la acción a través de los enterocitos por los transportadores de hemo, Bcrp/Abcg2 (Krishnamurthy y col., 2007).

El Fe no hemo o Fe elemental de la dieta es solubilizado por el medio ácido del estómago y de la luz duodenal. El Fe³⁺ es convertido a Fe²⁺ por el **citocromo-b** (Dcytb), es el primero en identificar la ferroreductasa presente en la superficie apical de los enterocitos. El incremento de la expresión de Dcytb en ferodeficiencia indica su importancia en la bomba apical de Fe (McKie y col., 2001).

El Fe^{2+} es transportado a través de la membrana celular por el **transportador de metales divalentes 1** (DMT1), también son conocidos SLC11A2, NRAMP2 y DCT1.

El DMT1 transporta otros metales divalentes como Zn, Mn, Co, Cu, Cd, Ni, Mg, etc. (Andrews, 1999; Muñoz y col., 2005), aunque es el único transportador de Fe conocido en el intestino, expresado en los endosomas de todas las células y se mantiene a través de las especies. El papel de DMT1 en la absorción intestinal es evidenciada por estudios en anemia microcítica en una mutación espontánea (G185R) en ratones y ratas de *Belgrade*, se encontró la causa significativa de defectos en la absorción intestinal de Fe y su asimilación por precursores eritrocitarios (Feming y col., 1998). Pero estos estudios sugieren que el DMT1 no es esencial para la transferencia placentaria o asimilación de Fe por otros tejidos (Gunshin y col., 2005). Sin embargo, mutaciones en el DMT1 observadas en humanos con anemia congénita no causó interferencia con la absorción de Fe intestinal. Este efecto puede ser compensado con la eficaz absorción del Fe hemo, pero ha sido asociado con sobrecarga hepática de Fe.

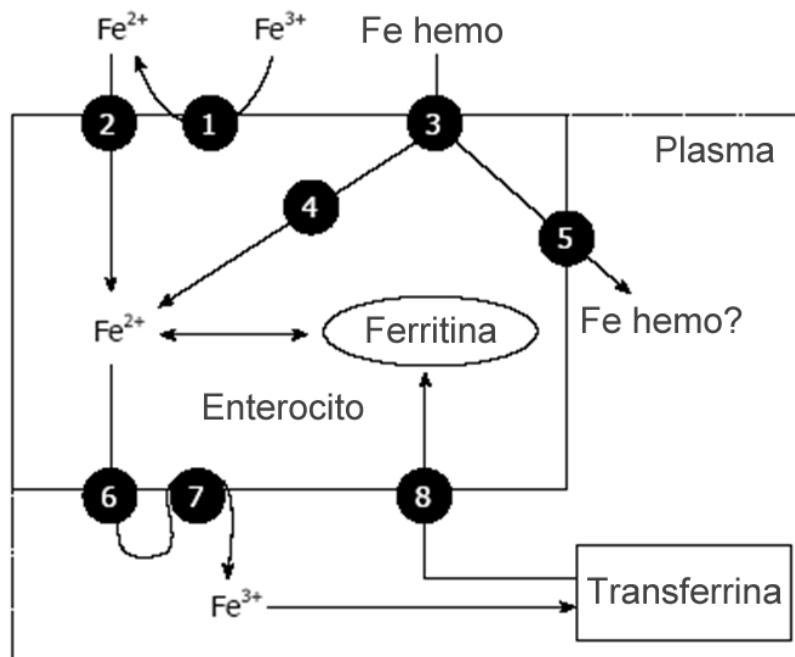


Figura 3. Principales rutas de absorción de Fe en los enterocitos (Muñoz y col., 2009). [1: Ferroreductasa; 2: Transportador de Metales Divalentes 1 (DMT1); 3: Proteína transportadora de hemo 1 (HPC1); 4: Hemo-oxigenasa; 5: Exportador de hemo; 6: Ferroportina (FPN, IREG-1); 7: Hefastina; 8: Receptor de Transferrina 1 (TfR1)].

- Transporte de Fe al plasma:

La identificación y la caracterización de numerosos modelos de transporte en mutaciones espontáneas, muestran el fenotipo de la deficiencia o sobrecarga de Fe, tiene gran importancia para entender el papel de las distintas proteínas involucradas en el transporte de Fe. El Fe puede ser almacenado en el citosol unido a ferritina o exportado al plasma por una proteína transportadora en la membrana basolateral. Simultáneamente y de forma independiente se identificó el transportador proteico, conocido como

proteína reguladora de Fe 1 (IREG1), **Ferroportina 1** (FPN) o (MTP1) (Abboud y Haile, 2000; Donavan y col., 2000; McKie y col., 2000).

También otra proteína la **Hefastina** es necesaria para el transporte del Fe en la membrana basolateral. La hefastina está ligada a oxidasas de Cu en el suero, (ceruloplasmina), actuando como ferroxidasa (Vulpe y col., 1999). Las hipótesis actuales de difusión de Fe^{2+} a través de la membrana basolateral es facilitada por la proteína reguladora de Fe 1 (IREG1)/ Ferroproteína 1 (FPN)/ MTP1 y Hefastina, como proteína de unión que promueve la oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} anterior a la liberación del transportador molecular.

El Fe^{3+} como forma más abundante encontrada en la sangre, se encuentra a la **apotransferrina** en el plasma como complejo “ Fe^{3+} -transferrina (Tf)”.

La **Transferrina** es una glucoproteína de 80 KDa, con dominios de unión al Fe en su extremo homólogos N- y C-terminal. Es sintetizada en el hígado, retina, testículo y cerebro.

Los 3-5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Fe presentes en el suero se encuentran en su mayor parte en forma de transferrina. Una pequeña cantidad de Fe se encuentra ligado a la **albúmina** u otra molécula de bajo peso molecular, tal como citrato, constituyendo el llamado Fe no unido a transferrina. La transferrina juega dos papeles importantes en la fisiología del Fe, por un lado facilita el transporte de Fe a las células expresando los receptores de transferrina (TfR) y por otro,

obliga al Fe a **limitar** la **capacidad de generar radicales libres**. Por esta razón la transferrina protege a los sistemas orgánicos de los efectos tóxicos del Fe.

Hay una clara especificidad que diferencia el porcentaje de saturación de la transferrina, siendo de un 80% en ratones y tan sólo 30% en células de humanos. También varía con el ciclo diurno (ritmo circadiano) o situaciones específicas tales como la circulación de la vena porta y la medula ósea (Uchida y col., 1983; Andrews y Schmidt, 2007).

2.3.4. DISTRIBUCIÓN DE HIERRO EN LOS TEJIDOS Y CAPTACIÓN CELULAR

La entrada, almacén y transporte de Fe depende de las demandas funcionales de los diferentes tipos de células. En la mayoría de las células eucariotas, el Fe circula primero por la vía endocitaria mediante el receptor de transferrina (TfR). En los acontecimientos moleculares asociados con la unión del complejo Fe-transferrina y liberación de la apotransferrina al plasma por la reutilización o reciclado, hay dos receptores de transferrina, llamados TfR1 y TfR2 (Crichton y col., 2008).

El **TfR1**, tiene una alta afinidad por el Fe, está involucrado en la entrada de Fe en la mayoría de las células, mientras que **TfR2** es primero expresado en el hígado y se une con menos afinidad al complejo Fe³⁺-transferrina. Esto se demostró en células embrionarias muertas de ratones Knockout TfR-1,

reforzando el importante papel de TfR-1 en los niveles de Fe celular (Hentze y col., 2004).

Una vez que el complejo Fe³⁺-transferrina se une a su receptor en la superficie celular, el complejo transferrina-TfR-1 es englobado por las vesículas endocitarias. En el interior de las células el complejo se internaliza en el endosoma, siendo acidificado por la bomba H⁺-ATPasa (V-ATPasa) que baja el pH del lumen a 5.5, proceso inducido por los cambios del complejo transferrina-TfR-1 con la consiguiente liberación de Fe (Sipe y Murphy, 1991; Andrews, 2008).

El transportador DMT1 endosomal de Fe²⁺ en el citosol, es el principal transportador de Fe y la transferrina, recién cargada de Fe, se reciclará para el transporte. En condiciones de pH ácido, la apotransferrina se mantiene unida a TfR1 y el complejo es reciclado en la superficie celular y con un pH neutro del plasma la apotransferrina se disocia de TfR1 y está preparada para una nueva captura de Fe. Es también reconocido que existe cierto sistema de transporte Fe-transferrina-independiente de Fe, facilitando el transporte de Fe en otros tejidos (Quidt y col., 2006).

Estudios con mutantes de ratón *nm1054*, explican el daño en la síntesis debido a la disminución de los niveles de Fe, identificando en 6 antígenos epiteliales transmembrana (STEAP3) la feroreductasa endosomal, responsable de la reducción del Fe³⁺ endosomal (Ohgami y col., 2005a). Las

mutaciones en el STEAP3 tienen una implicación en la anemia microcítica, debido al defecto del Fe en los reticulocitos (Ohgami y col., 2005b).

En estudios en pacientes con mutaciones que causan anemia microcítica hipocrómica, tienen como resultado el descenso eritroide de utilización del Fe, pero lo principal es el incremento de almacén de Fe en el hígado (Iolascon y col., 2009).

Sin embargo, el STEAP3 no se requiere para niveles eficaces de Fe en otros tipos celulares, sugiriendo la existencia de varias feroreductasas que quedan por identificar (Conard y Umbreit, 1993).

2.3.5. DEPÓSITOS Y METABOLISMO DEL HIERRO

La entrada, almacén y salida de Fe está regida según las diferentes necesidades fisiológicas y metabólicas de los distintos tipos celulares. No todo el Fe es utilizado en procesos metabólicos, algo es almacenado en las reservas para usarlo cuando los niveles de Fe son bajos y previene de los efectos tóxicos del Fe libre en las células. Los hepatocitos son el mejor depósito para almacenar Fe, aunque el ciclo de la transferrina pueda estar involucrado en la absorción, la no unión de transferrina al Fe en su entrada parece jugar un papel importante cuando los niveles de Fe exceden de la capacidad de fijación de transferrina.

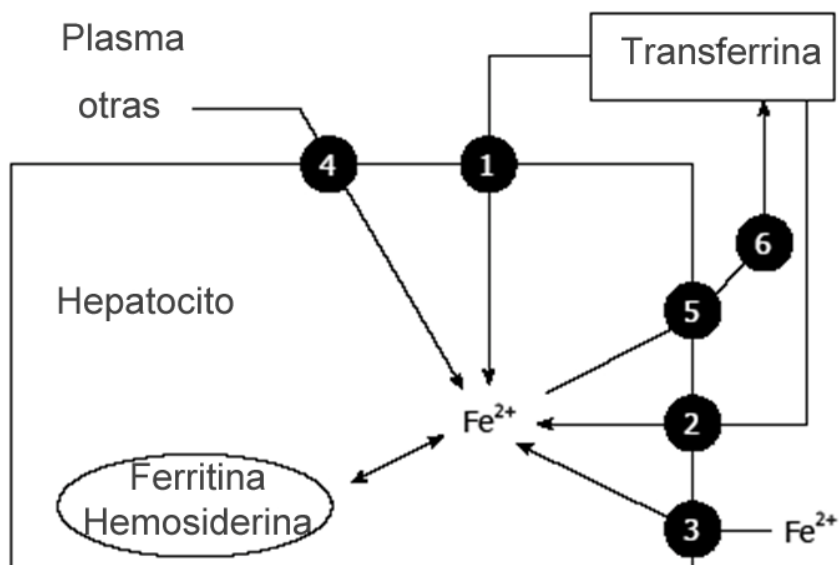


Figura 4. Principales rutas almacenamiento y liberación de Fe en los hepatocitos. (Muñoz y col., 2009). [1: TfR1; 2: TfR2; 3: DMT1; 4: Otras: hemoglobina, hemo, ferritina; 5: Ferroportina (IREG-1); 6: Ceruloplasmina]

El almacén de Fe supone un 20-30% del Fe corporal y la mayoría de éste se encuentra unido a la ferritina.

La **Ferritina** es un polímero de 24 subunidades que comprende dos subtipos H (pesada, 21 kD) o L (ligera, 9 kD) con un núcleo central que contiene 4,500 átomos de Fe (Koorts y Viljoen, 2007). Una característica importante de la subunidad H es su actividad ferroxidasa que facilita la oxidación del Fe²⁺ (forma predominante en citosol) a Fe³⁺, uniéndose así a la ferritina. Las dos subunidades de ferritina son muy estables y muestran diferentes combinaciones dependiendo del tejido. Por ejemplo, en el hígado y

el bazo abundan más las subunidades L, mientras que en corazón es rico en subunidad H.

En el interior de las células, el Fe puede ser almacenado en 2 formas en el citosol, como ferritina y el Fe en su forma insoluble es también almacenado en baja cantidad, en la proteína de almacén hemosiderina, que presumiblemente deriva de la degradación lisosomal de la ferritina y en su mayor parte en los macrófagos del sistema retículo endotelial, incrementando drásticamente en situación de sobrecarga (Vaghefi y col., 2005).

Bajo condiciones de sobrecarga, el contenido de esta proteína fue encontrada con un drástico incremento, en particular en el hígado, páncreas y corazón (Theil, 2004).

La recuperación de Fe desde los eritrocitos envejecidos también juega un importante papel en el mantenimiento de los niveles de Fe. Al final de 120 días, los eritrocitos experimentan una alteración superficial como señal para ser fagocitados y digeridos por los macrófagos en el bazo e hígado.

La importancia del almacén de Fe en los macrófagos es la seguridad de que no genera daño oxidativo. La eritropoyetina reduce la retención de Fe en los macrófagos por el decrecimiento de la expresión del DMT-1 y el incremento de la expresión de la ferroportina 1 (Kong y col., 2008).

En los macrófagos el Fe es recuperado en su mayor parte desde el grupo hemo, por acción de la forma inducida de la hemo-oxigenasa (Ganz, 2007) y los transportadores de metales, NRMP-2 y DMT1. El Fe recuperado a través de la membrana fagosomal al citoplasma es almacenado en el fagocito unido a la ferritina. La participación de las proteínas ferroportina y ceruloplasmina facilita el transporte eventual por la transferrina, del Fe almacenado (Harris y col., 1999; Donovan y col., 2005).

La observación en anemia severa de la rápida acumulación de Fe en ratones deficientes en ferroportina (FPN), sugiere que dicha proteína es esencial para la reutilización de Fe (Hahn y col., 1943; Nadadur y col., 2008).

2.3.6. ELIMINACIÓN

De 1-2 mg de Fe se pierde diariamente en los procesos de descamación de la mucosa intestinal y epidermis (42 µg/Kg), por orina (14 µg/Kg) y bilis (84 µg/Kg). En mujeres hay una pérdida adicional asociada a la menstruación y en consecuencia los requerimientos son más altos que en los hombres (Anderson y Vulpe, 2002; Pietrangelo y col., 2002; Ganz y Nemeth, 2006).

El contenido de Fe en la hemoglobina es 3.46 mg/g. Con una concentración de hemoglobina en sangre de 130 g/L, la pérdida de 1 mL de sangre equivale a 0.45 mg de Fe. Pérdidas escasas de sangre, usualmente de unos mililitros por día del tracto digestivo, es una causa común de deficiencia severa de Fe, especialmente en la tercera edad.

La lactancia materna supone unas pérdidas de Fe para la mujer de 0.3-0.6 mg/día (Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, 2004).

Las pérdidas de Fe por la orina son relativamente escasas, porque muchas proteínas que contienen Fe son demasiado grandes para filtrar a nivel glomerular. Además la hemoglobina libre y el hemo son eliminados rápidamente de la circulación bajo muchas circunstancias y la concentración de Fe libre en sangre es muy baja. Sin embargo, las pequeñas cantidades de transferrina que son filtradas se unen a cubilina en el borde en cepillo de la membrana del túbulo proximal y son captadas con la ayuda de la mesalina (Kozyraki y col., 2001). La falta de alguno de estos receptores incrementan las pérdidas de Fe notablemente.

2.3.7. MECANISMOS DE HOMEOSTASIS DEL HIERRO

El equilibrio de los niveles de Fe en el organismo tiene que ser meticulosamente guardado para proveer Fe según las necesidades y la cantidad requerida que evite la toxicidad asociada a la excesiva acumulación de Fe. Esta coordinación es regulada por varias señales desde las células y los tejidos, en respuesta a varios sucesos fisiológicos. En ausencia de la estabilidad del mecanismo de la excreción, la absorción y almacén, los mecanismos homeostáticos actúan para equilibrar al Fe, mientras que en el organismo los niveles celulares son regulados por mecanismos de transcripción y post-transcripción.

-Sistema homeostático del Fe:

El sistema de homeostasis del Fe es llevado a cabo por la regulación de mecanismos de absorción, almacén y reciclaje. La absorción intestinal es regulada en respuesta a las necesidades de Fe y su biodisponibilidad. Los estudios de Hahn y col. (1943) y Stewart y col (1950) hace 4 décadas indican que una gran dosis oral de Fe, reduce la absorción más que una pequeña dosis de Fe administrada después de unas horas (Nadadur y col., 2008). Esto demuestra la inmediatez de la regulación bajo el transportador de proteínas DMT1 en el borde de cepillo (Frazer y col, 2003), sin alterar el transporte basolateral de Fe en el intestino. Estas observaciones sugieren que esos enterocitos pueden recibir señales de otros tejidos o células que están involucradas en el consumo por precursores eritroides, almacén en hepatocitos, enterocitos duodenales y macrófagos para el mantenimiento de la homeostasis.

Esta señal se origina en sitios de almacén para compensar la absorción intestinal, en reguladores de almacén, mientras que la señal de los reguladores eritrocitarios cuando el consumo de la demanda de Fe en la médula ósea, precursores eritrocitarios y eritrocitos circulantes, excede de la cantidad presente en el almacén.

Por otra parte, los reguladores inflamatorios comunican una señal en respuesta a la infección o inflamación, resultado de la acumulación de Fe en los macrófagos. La homeostasis del Fe también se encuentra alterada debido a

las señales de regulación en situación de hipoxia. Los reguladores implicados en la absorción intestinal pueden modular la liberación de Fe desde los hepatocitos y macrófagos, por las proteínas del suero y del plasma pudiendo actuar en múltiples lugares.

Se ha observado que, con la sobrecarga de Fe en ratones mutantes del factor 2(USF-2), se conduce a un error en el gen de la hepcidina (HAMP) que codifica un péptido antimicrobiano, mediador de la inmunidad innata (Nicolas y col., 2001). Hay 2 genes de la hepcidina en el ratón, pero solo un gen “Hepcidina-1” parece tener actividad biológica (Lou y col., 2004). La delección puntual en ratones o mutación en el gen en humanos resulta de la elevación del almacén de Fe corporal, presumiblemente debido a la hiperabsorción asociada con el descenso de Fe en los macrófagos titulares (Knuston y col., 2003). La deficiencia de Fe observada en ratones transgénicos que una expresan la hepcidina, sugiere que este péptido interviene regulando el almacenamiento del mineral (atenuando tanto la absorción intestinal de Fe como la liberación del Fe de los macrófagos). Por otra parte, una baja expresión de la hepcidina en la carga de Fe, observada en ratones con mutaciones en el gen de TfR (TfR-hpx), sugiere que la hepcidina es también un factor en la señal de la regulación eritroide (Weinstein y col., 2002).

La expresión disminuida de la hepcidina en respuesta a la no hipoxia anémica, y su expresión aumentada en ratones y humanos con inflamación, sugiere que la hepcidina también puede participar en la mediación de la hipoxia y en la cascada de reguladores inflamatorios (Nicolas y col., 2002). La

hepcidina también controla los niveles de Fe directamente actuando recíprocamente con la FPN1 (ferroportina 1), conduciendo a la internalización y degradación de FPN1 cuando niveles de Fe son altos, por consiguiente bloqueando la liberación del Fe en los sitios de almacén; hepatocitos, enterocitos y macrófagos (Nemeth y col., 2004; Nemeth y Ganz, 2006).

Aunque no hay interacción directa entre la hepcidina y las proteínas duodenales de transporte, DMT1 y Dcytb, algunos estudios indican que estas proteínas también están reguladas negativamente por la hepcidina (Babit y col., 2007). Básicamente, la expresión génica de la hepcidina es mediada por las proteína morfogénicas BMP (Bone Morphogenetic Proteins) y SMAD (Nemeth y Ganz, 2006; Babit y col., 2007; Pauline y col., 2009).

Los mediadores inflamatorios como IL-6 y otras citoquinas inducen la transcripción de la hepcidina en los hepatocitos (Nemeth y Ganz, 2006; Domenico y col., 2008).

La región del promotor del gen HAMP en ratones y humanos, tiene el factor de hipoxia inducible (HIF) como factor de transcripción que une sitios con la regulación negativa de la expresión hepcidina (Peyssonaux y col, 2007; Pauline y col., 2009).

- Regulación del metabolismo del Fe:

Las numerosas proteínas implicadas en la respuesta del Fe al transporte, al depósito y al metabolismo, tienen que ser reguladas por los mecanismos intrínsecos coordinados por reguladores que controlan su expresión, estabilidad, traducción y modificación post-transduccional.

La homeostasis del Fe intracelular se consigue con la regulación coordinada de la proteína de almacenaje de Fe, la ferritina y la proteína de respuesta de Fe, el receptor de transferrina 1 (TfR1). La reproducción de las subunidades H y L de la ferritina, conduce a la identificación de elementos de respuesta al Fe (IREs) en las regiones introducidas (UTRs) (Monsen, 1988; Nadadur y col., 2008).

Los IREs son estructuras localizadas en los extremos UTRs 5' y 3' de mRNA con gran parecido estructural. Los IREs en general tienen seis nucleótidos en el extremo apical del lazo con una secuencia de acuerdo general de 5'-CAGUGN-3' (Hentze y col., 1988; Nadadur y col., 2008). Las proteínas citosólicas reconocen y unen los IREs a las proteínas llamadas reguladoras de Fe (IRP-1 y IRP-2), que controlan la expresión de genes que contienen los IREs. EL IRP1 fue reconocido como compañero de la aconitasa mitocondrial debido a su capacidad de unión al cluster [Fe-4S] (Rouault, 2006).

La unión de IRP a IRE en los extremos 5' UTR de ARNm codifica ferritina, ferroportina, y enzimas de la biosíntesis del grupo hemo,

aminolevulinato sintetasa que interfieren con la iniciación de la traducción. Por otra parte, si la IRE está en los extremos 3' UTR de ARNm, como en el caso de TfR-1, la unión de las IRPS a múltiple IREs en los extremos 3' UTR de TFR1 conduce a la estabilización de ARNm-TfR-1 inhibiendo su degradación por la digestión de nucleasas (Hentze y col., 2004).

En condiciones de deficiencia de Fe, las IRPs activan la unión de la IRE y estabilizan al ARNm-TfR1, simultáneamente disminuyen la traducción de ARNm-ferritina, por consiguiente aumentando la respuesta de la disponibilidad de Fe en la célula. Por el contrario, cuando los niveles de Fe son altos la unión de la IRE, estará disminuida facilitando la traducción de ARNm-ferritina, disminuyendo la estabilidad del ARNm-TfR1 y conduciendo la respuesta a la captura de Fe. La mayoría de estos mecanismos reguladores son estudiados *in vitro* y su papel *in vivo* no está claro.

Los estudios con ratones knockout con bloqueo en IRP-1 o IRP-2 en el establecimiento de su papel son inconcluyentes (Hentze y col., 2004). Los mediadores inflamatorios como TNF- α , IL-6, IFN- γ se ha visto que también regulan la expresión de proteínas implicadas en la homeostasis celular del Fe (ferritina, TfR-1), incluyendo el DMT-1 por mecanismos IRP1/IREs (Torti y Torti, 2002; Ludwiczek y col., 2003).

En ratones transgénicos knockout para IRP1, IRP2 indica que el doble bloqueo produce letalidad embrionaria (Smith y col., 2004). Sorprendentemente no se observa ningún cambio fenotípico para ratones IRP1-/- que sugiere que

la IRP2 puede compensar la pérdida de IRP (Hentze y col., 2004). Los ratones IRP2^{-/-} manifestaron un aumento en el contenido de Fe y la expresión de DMT1, ferritina y ferroportina, aumentando la ferritina en suero y el contenido de Fe en hígado (Galy y col., 2005). Estas observaciones sugieren que hay otros factores no identificados que pueden participar con las proteínas IRPs en la homeostasis celular del Fe.

2.4. ESTABILIDAD Y ESTRUCTURA DEL ADN

2.4.1. INTRODUCCIÓN

El **ácido desoxirribonucleico**, es una macromolécula que forma parte de todas las células. Contiene la información genética usada en el desarrollo y el funcionamiento de los organismos vivos. Es el responsable de la transmisión hereditaria.

Desde el punto de vista químico, el ADN es un polímero de nucleótidos, es decir, un **polinucleótido**. Cada nucleótido, a su vez, está formado por un azúcar; la desoxirribosa, una base nitrogenada; Adenina, Timina, Citosina o Guanina y un grupo fosfato. La secuencia del ADN se especifica según la secuencia de sus bases. La disposición secuencial es la que codifica la información genética. En los organismos vivos, el ADN se presenta como una doble cadena de nucleótidos, en la que las dos hebras están unidas entre sí por puentes de hidrógeno.

Las secuencias de ADN que constituyen la unidad fundamental, física y funcional de la herencia se denominan **genes**. La información contenida en los genes (genética) se emplea para generar ARN y proteínas.

Dentro de las células, el ADN está organizado en estructuras llamadas **cromosomas** que, durante el ciclo celular, se duplican antes de que la célula se divida. Los organismos eucariotas, almacenan la inmensa mayoría de su

ADN dentro del núcleo celular y una mínima parte en las mitocondrias.

Existen multitud de proteínas; las histonas y los factores de transcripción, unidas al ADN dotándolo de una estructura tridimensional determinada y regulando su expresión. Los factores de transcripción reconocen secuencias reguladoras del ADN y especifican la pauta de transcripción de los genes. El material genético completo de una dotación cromosómica se denomina genoma y, con pequeñas variaciones, es característico de cada especie.

2.4.2. ANTECEDENTES HISTÓRICOS

El ADN fue aislado por vez primera en 1869 por el médico suizo **Friedrich Miescher** en la Universidad de Tubinga. Lo llamó "nucleína", debido a que lo había extraído a partir de núcleos celulares (Dahm, 2008). Se necesitaron casi 70 años de investigación para poder identificar los componentes y la estructura de los ácidos nucleicos.

En 1919, **Phoebus Levene** identificó que un nucleótido está formado por una base, un azúcar y un fosfato (Levene, 1919; Drake y Tan, 2004). Levene sugirió que el ADN formaba una estructura con forma de solenoide con unidades de nucleótidos unidos a través de los grupos fosfato. En 1930 Levene y su maestro **Albrecht Kossel** probaron que la nucleína de Miescher es un ácido desoxirribonucleico (ADN) formado por cuatro bases nitrogenadas (citosina (C), timina (T), adenina (A) y guanina (G)), el azúcar desoxirribosa y un grupo fosfato, y que, en su estructura básica, el nucleótido está compuesto

por un azúcar unido a la base y al fosfato (Drake y Tan, 2004). Sin embargo, Levene pensaba que la cadena era corta y que las bases se repetían en un orden fijo. En 1937 **William Astbury** produjo el primer patrón de difracción de rayos X que mostraba que el ADN tenía una estructura regular (Astbury, 1947).

En cuanto a la caracterización química de la molécula, en 1940 **Chargaff** realizó algunos experimentos que le sirvieron para establecer las proporciones de las bases nitrogenadas en el ADN. Descubrió que las proporciones de purinas eran idénticas a las de pirimidinas; la "equimolecularidad" de las bases ([A]=[T], [G]=[C]) y que la cantidad de G+C en una determinada molécula de ADN no siempre es igual a la cantidad de A+T y puede variar desde el 36% al 70% del contenido total (Drake y Tan., 2004). Con esta información y junto con los datos de difracción de rayos X proporcionados por **Rosalind Franklin**; **James Watson y Francis Crick** propusieron en 1953 el modelo de la doble hélice de ADN para representar la estructura tridimensional del polímero (Watson y Crick, 1953). En una serie de cinco artículos en el mismo número de *Nature* se publicó la evidencia experimental que apoyaba el modelo de Watson y Crick. De éstos, el artículo de Franklin y Raymond Gosling fue la primera publicación con datos de difracción de rayos X que apoyaba el modelo de Watson y Crick (Franklin, 1953), y en dicho número de *Nature* también aparecía un artículo sobre la estructura del ADN de **Maurice Wilkins** y sus colaboradores (Wilkins, 1953).

En 1962, después de la muerte de Franklin, los científicos Watson, Crick y Wilkins recibieron conjuntamente el Premio Nobel en Fisiología o Medicina.

Sin embargo, el debate continúa sobre quién debería recibir crédito por el descubrimiento (Brenda Maddox, 2003).

2.4.3. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL ADN

El ADN es un largo polímero formado por unidades repetitivas, los nucleótidos (Alberts y col., 2002; Butler, 2005). Una doble cadena de ADN mide de 22 a 26 Angstroms (2,2 a 2,6 nanómetros) de ancho, y una unidad (un nucleótido) mide 3,3 Å (0,33 nm) de largo (Mandelkern y col., 1981). Los polímeros de ADN pueden ser moléculas enormes que contienen millones de nucleótidos (Gregory y col., 2006).

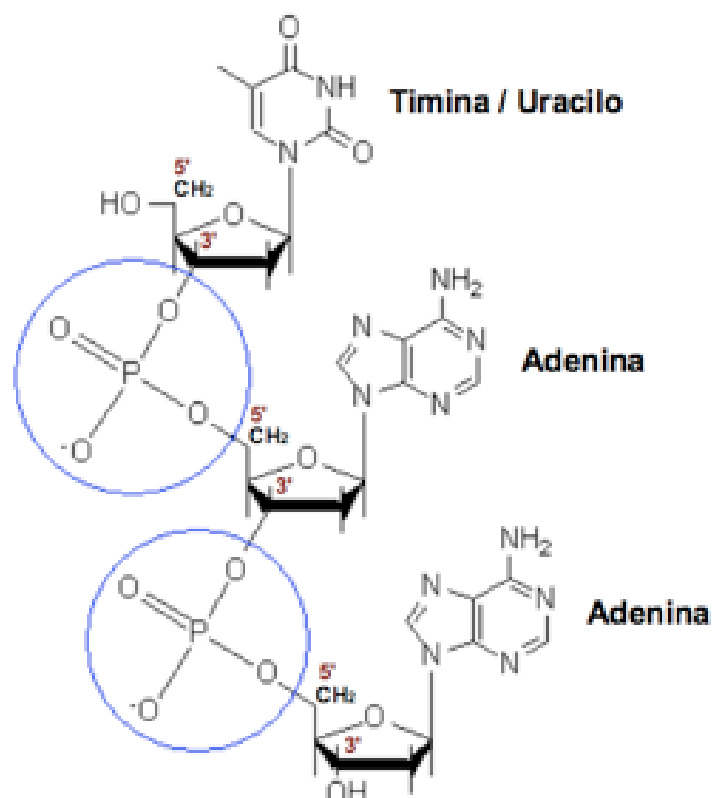
Las cadenas de ADN forman moléculas estrechamente asociadas, formando una doble hélice enrollada sobre sí misma, en forma de escalera de caracol. El modelo de **estructura en doble hélice** fue propuesto en 1953 por **James Watson y Francis Crick** (el artículo *Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid* fue publicado el 25 de abril de 1953 en *Nature*) (Watson y Crick , 1953). El éxito de éste modelo radicaba en su consistencia con las propiedades físicas y químicas del ADN. El estudio mostraba además que la complementariedad de bases podía ser relevante en su replicación, y también la importancia de la secuencia de bases como portador de información genética (Berg y col., 2002; Andrew, 2005). Cada unidad que se repite, el nucleótido, contiene un segmento de la estructura de soporte (azúcar + fosfato), que mantiene la cadena unida, y una base, que interacciona con la otra cadena de ADN en la hélice. En general, una base

ligada a un azúcar se denomina nucleósido y una base ligada a un azúcar y a uno o más grupos fosfatos recibe el nombre de nucleótido. Cuando muchos nucleótidos se encuentran unidos, como ocurre en el ADN, el polímero resultante se denomina polinucleótido.

2.4.4. COMPONENTES DEL MATERIAL GENÉTICO

La estructura de soporte de una hebra de ADN está formada por unidades alternas de grupos fosfato y azúcar (Ghosh y Bansal, 2003).

Figura 5. Estructura del ADN



Desoxirribosa: un monosacárido de 5 átomos de carbono (una pentosa) derivado de la ribosa ($C_5H_{10}O_4$).

Ácido fosfórico: El grupo fosfato (H_3PO_4) une el carbono 5' del azúcar de un nucleósido con el carbono 3' del siguiente, mediante un enlace fosfodiéster.

La formación de enlaces asimétricos implica que cada hebra de ADN tiene una dirección. En la doble hélice, la dirección de los nucleótidos en una hebra ($3' \rightarrow 5'$) es opuesta a la dirección en la otra hebra ($5' \rightarrow 3'$). Son antiparalelas. Los extremos asimétricos de las hebras de ADN se denominan extremo 5' y extremo 3'.

Bases nitrogenadas: Se clasifican en dos grupos: las bases púricas (adenina y guanina), derivadas de la purina y formadas por dos anillos unidos entre sí, y las bases pirimidínicas (citosina y timina), derivadas de la pirimidina y con un solo anillo (Berg y col., 2002).

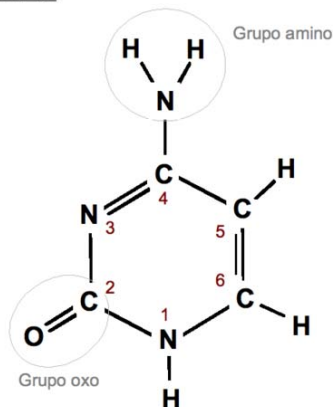
Cada base está unida al armazón de azúcar-fosfato a través del azúcar para formar el nucleótido completo (base-azúcar-fosfato). Las bases son compuestos heterocíclicos y aromáticos con dos o más átomos de nitrógeno.

En los ácidos nucleicos existe una quinta base pirimidínica, denominada uracilo (U), que normalmente ocupa el lugar de la timina en el ARN y difiere de ésta en que carece de un grupo metilo en su anillo. El uracilo no se encuentra

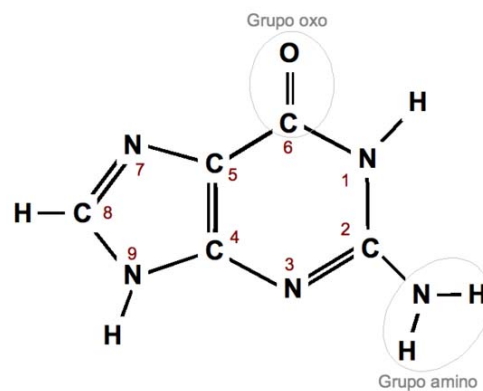
habitualmente en el ADN, sólo aparece raramente como un producto residual de la degradación de la citosina por procesos de desaminación oxidativa.

Figura 6. Tipos de Bases Nitrogenadas

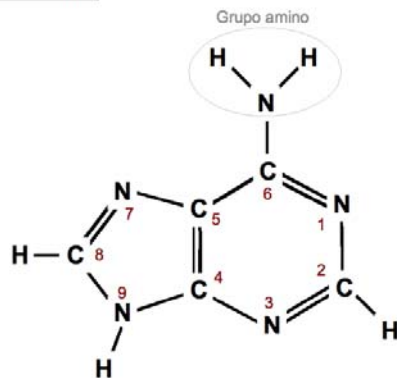
CITOSINA



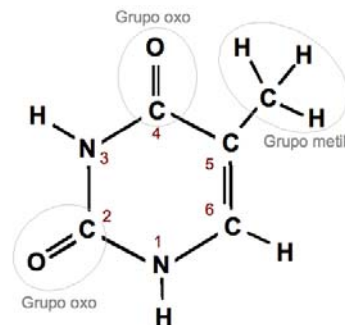
GUANINA



ADENINA



TIMINA



Timina: 2, 4-dioxo, 5-metilpirimidina. En el código genético se representa con la letra **T**. Es un derivado pirimidínico con un grupo oxo en las posiciones 2 y 4, y un grupo metil en la posición 5.

En el ADN, la timina siempre se empareja con la adenina de la cadena complementaria mediante 2 puentes de hidrógeno, **T=A**.

Citosina: 2-oxo, 4-aminopirimidina. En el código genético se representa con la letra **C**. Es un derivado pirimidínico, con un grupo amino en posición 4 y un grupo oxo en posición 2.

La citosina siempre se empareja en el ADN con la guanina de la cadena complementaria mediante un triple enlace, **C≡G**. La citosina fue descubierta en 1894 cuando fue aislada en tejido del timo de carnero.

Adenina: 6-aminopurina. En el código genético se representa con la letra **A**. Es un derivado de la purina con un grupo amino en la posición 6.

En el ADN siempre se empareja con la timina de la cadena complementaria mediante 2 puentes de hidrógeno, **A=T**. La adenina, junto con la timina, fue descubierta en 1885 por el médico alemán Albrecht Kossel.

Guanina: 6-oxo, 2-aminopurina. En el código genético se representa con la letra **G**. Es un derivado púrico con un grupo oxo en la posición 6 y un grupo amino en la posición 2.

La guanina siempre se empareja en el ADN con la citosina de la cadena complementaria mediante tres enlaces de hidrógeno, **G≡C**.

Se estima que el **genoma** humano haploide tiene alrededor de 3.000 millones de pares de bases. Para indicar el tamaño de las moléculas de ADN se indica el número de pares de bases, y como derivados hay dos unidades de medida muy utilizadas, la kilobase (kb), que equivale a 1.000 pares de bases, y la megabase (Mb), que equivale a un millón de pares de bases.

2.4.5. APAREAMIENTO DE BASES

La doble hélice de ADN se mantiene estable mediante la formación de **puentes de hidrógeno** entre las bases asociadas a cada una de las dos hebras. Por complementariedad de las bases, cada tipo de base en una hebra forma un enlace únicamente con tipo de base en la otra hebra. Según esto, las purinas forman enlaces con las pirimidinas, de forma que A se enlaza sólo con T, y C sólo con G. Este emparejamiento corresponde a la observación ya realizada por Erwin Chargaff, que mostró que la cantidad de adenina era muy similar a la cantidad de timina, y que la cantidad de citosina era igual a la cantidad de guanina en el ADN.

Figura7. Unión Citosina y Guanina

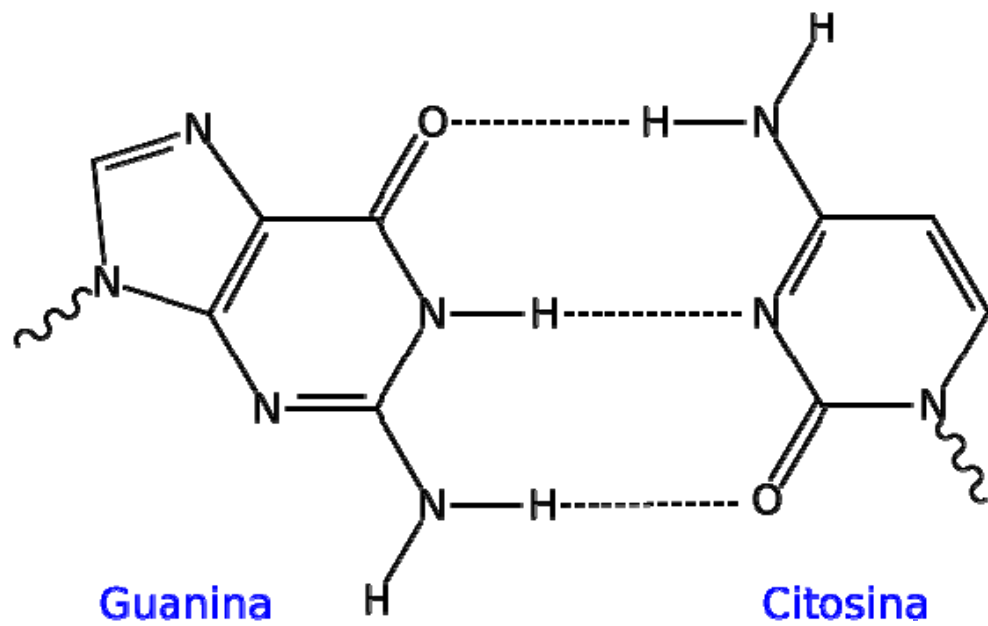
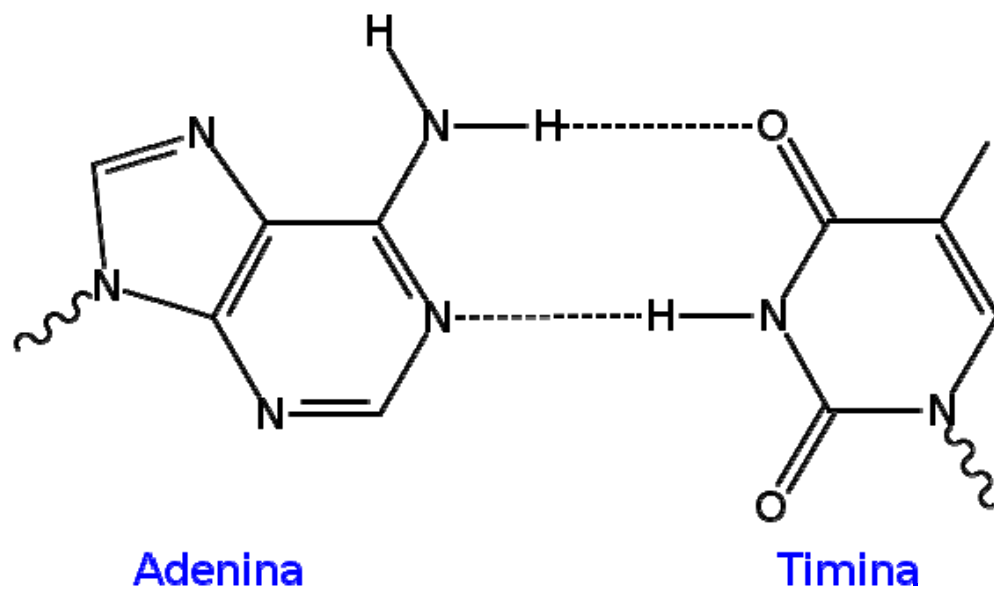


Figura 8. Unión Adenina y Timina



Los puentes de hidrógeno se muestran como líneas discontinuas (**C≡G** con tres puentes de hidrógeno y **A=T** con dos puentes de hidrógeno).

Los puentes de hidrógeno son uniones más débiles que los enlaces covalentes, como los que conectan los átomos en cada hebra de ADN, pero más fuertes que interacciones hidrófobas individuales, enlaces de Van der Waals, etc. Pueden romperse y formarse de nuevo de forma relativamente sencilla. Por esta razón, las dos hebras de la doble hélice pueden separarse como una cremallera, bien por fuerza mecánica o por alta temperatura (Clausen-Schaumann y col., 2000). La doble hélice se estabiliza además por el efecto hidrofóbico y el apilamiento, que no están influenciados por la secuencia de bases del ADN (Ponnuswamy y Gromiha, 1994).

Como los pares de bases forman un número diferente de enlaces de hidrógeno: A=T forman dos puentes de hidrógeno, y C≡G forman tres puentes de hidrógeno. El par de bases GC es por tanto más fuerte que el par de bases AT. Como consecuencia, tanto el porcentaje de pares de bases GC como la longitud total de la doble hélice de ADN determinan la fuerza de la asociación entre las dos hebras de ADN. Las dobles hélices largas de ADN con alto contenido en GC tienen hebras que interaccionan más fuertemente que las dobles hélices cortas con alto contenido en AT (Chalikian y col., 1999).

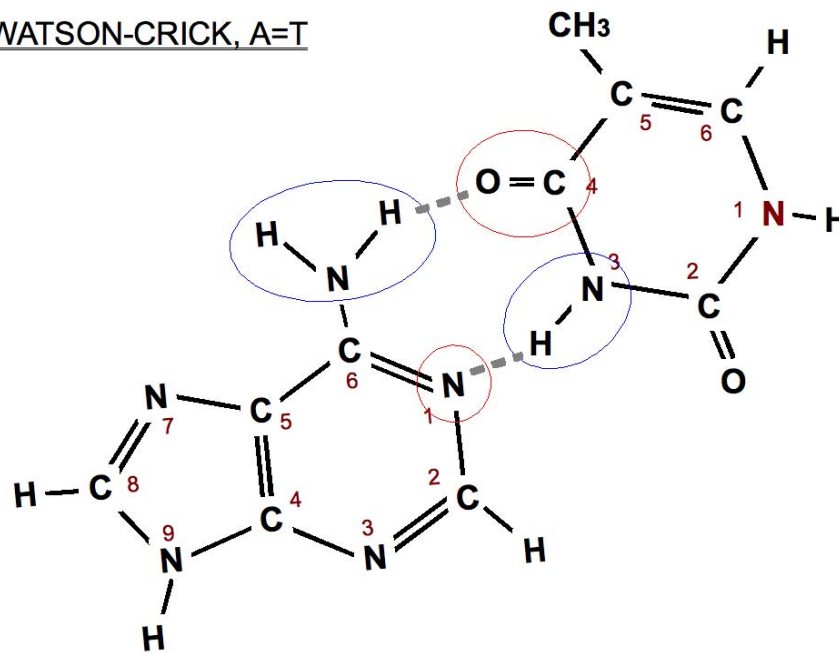
2.4.6. OTRO TIPO DE PARES DE BASES

Existen diferentes tipos de pares de bases que se pueden formar según cómo se forman los puentes de hidrógeno. Los que encontramos en la doble hélice de ADN son los llamados pares de bases Watson-Crick, pero también existen otros posibles pares de bases, como los denominados *Hoogsteen* y *Wobble* u oscilante, que pueden aparecer en circunstancias particulares. Además, para cada tipo existe a su vez el mismo par reverso, es decir, el que se da si se gira la base pirimidínica 180° sobre su eje.

Watson-Crick (pares de bases de la doble hélice): los grupos de la base púrica que intervienen en el enlace de hidrógeno son los que corresponden a las posiciones 1 y 6 (N aceptor y $-NH_2$ donador si la purina es una A) y los grupos de la base pirimidínica los que se encuentran en las posiciones 3 y 4 ($-NH$ donador y $C=O$ aceptor si la pirimidina es una T). En el par de bases Watson-Crick reverso participarían los grupos de las posiciones 2 y 3 de la base pirimidínica.

Figura 9. Pares de bases de Watson-Crick

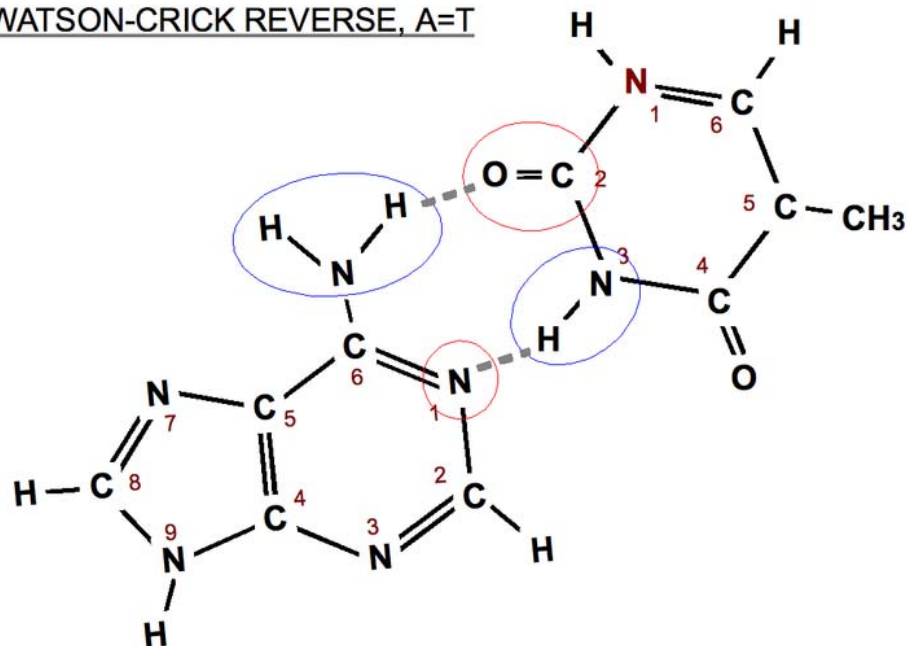
WATSON-CRICK, A=T



Par de bases A=T de tipo Watson-Crick. En azul el donador de hidrógenos y en rojo el aceptor.

Figura 10. Pares de bases de Watson-Crick reverso

WATSON-CRICK REVERSE, A=T



Par de bases A=T de tipo Watson-Crick reverso. En azul el donador de hidrógenos y en rojo el aceptor. Nótese que la pirimidina ha sufrido un giro de 180° sobre el eje del carbono 6.

Hoogsteen: en este caso cambian los grupos de la base púrica, que ofrece una cara diferente (posiciones 6 y 7) y que forman enlaces con los grupos de las pirimidinas de las posiciones 3 y 4 (como en Watson-Crick). También puede haber Hoogsteen reversos. Con este tipo de enlace pueden unirse A=U (Hoogsteen y Hoogsteen reverso) y A=C (Hoogsteen reverso).

Wobble u oscilante: este tipo de enlace permite que se unan guanina y citosina con un doble enlace (G=T). La base púrica (G) forma enlace con los grupos de las posiciones 1 y 6 (como en Watson-Crick) y la pirimidina (T) con los grupos de las posiciones 2 y 3. Este tipo de enlace no funcionaría con A=C, ya que quedarían enfrentados los 2 aceptores y los 2 donadores, y sólo se podría dar en el caso inverso. Se encuentran pares de bases de tipo oscilante en el ARN, durante el apareamiento de codón y anticodón. Con este tipo de enlace pueden unirse G=U (oscilante y oscilante reverso) y A=C (oscilante reverso).

En total, en su forma tautomérica mayoritaria, existen 28 posibles pares de bases nitrogenadas: 10 posibles pares de bases purina-pirimidina (2 pares Watson-Crick y 2 Watson-Crick reverso, 1 par Hoogsteen y 2 pares Hoogsteen reverso, 1 par oscilante y 2 pares oscilante reverso), 7 pares homo purina-

purina (A=A, G=G), 4 pares A=G y 7 pares pirimidina-pirimidina. Esto sin contar con los pares de bases que pueden formarse si también tenemos en cuenta las otras formas tautoméricas minoritarias de las bases nitrogenadas; éstos, además, pueden ser responsables de mutaciones puntuales por sustitución de tipo transición.

2.4.7. ESTRUCTURA DEL ADN

El ADN es una molécula bicatenaria, es decir, está formada por dos cadenas dispuestas de forma antiparalela y con las bases nitrogenadas enfrentadas. En su estructura tridimensional, se distinguen distintos niveles:

Estructura primaria: Secuencia de nucleótidos encadenados. Esta secuencia presenta un código, que determina la información genética según el orden de las bases nitrogenadas.

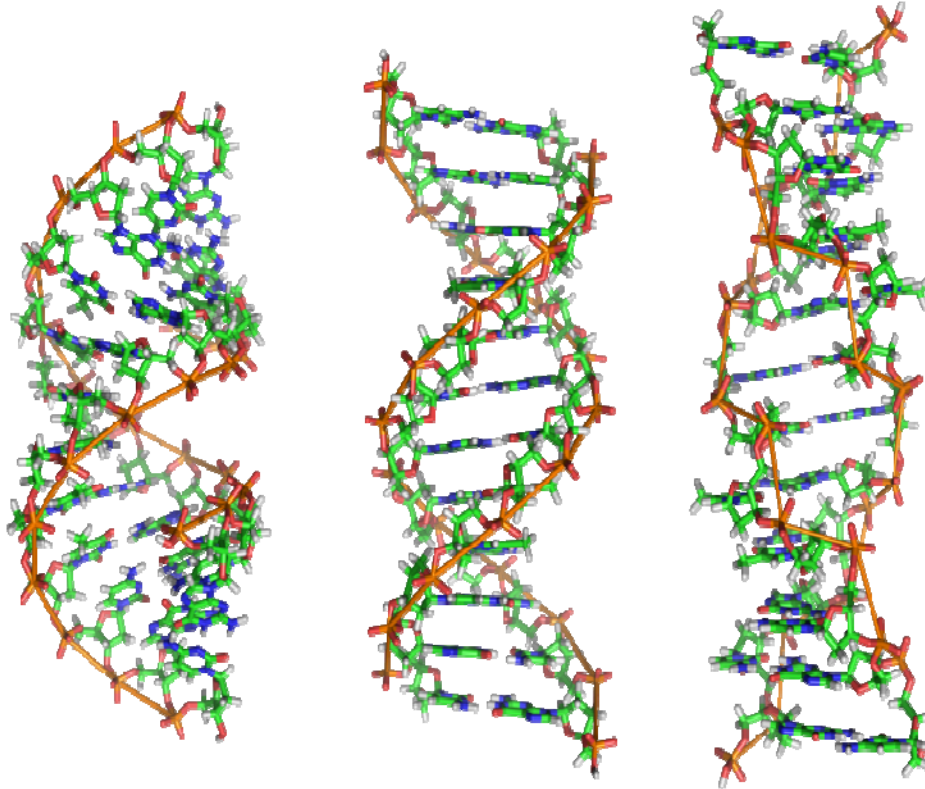
Estructura secundaria: Es una estructura en doble hélice, dextrógira o levógira, según el tipo de ADN. Permite explicar el almacenamiento de la información genética y el mecanismo de duplicación del ADN.

Existen tres modelos de ADN. El ADN de tipo B es el más abundante y es el descubierto por Watson y Crick.

Estructura terciaria: Referida al empaquetamiento complejo y compacto del ADN para formar los cromosomas en presencia de proteínas, las histonas y

otras proteínas de naturaleza no histónica (Hib y De Robertis, 1998).

Figura 11. Tipos de estructuras (De izquierda a derecha, las estructuras de ADN A, B y Z.)



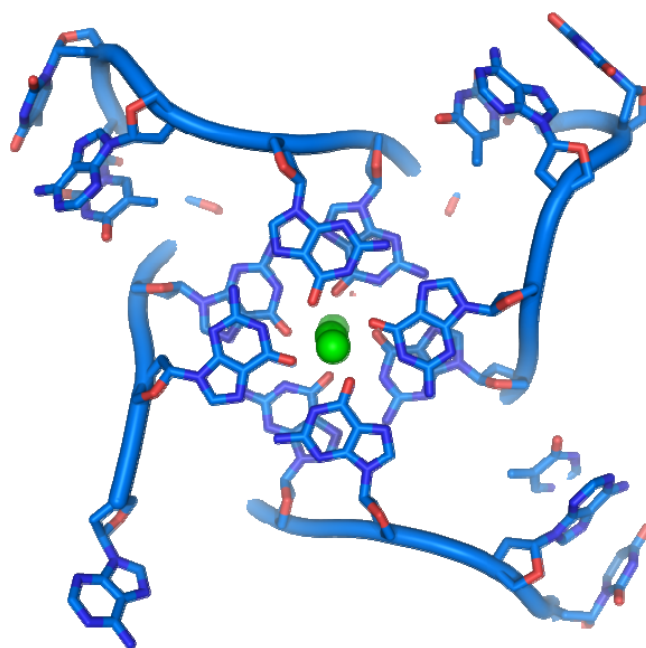
El ADN existe en muchas conformaciones (Ghosh y Bansal, 2003). Sin embargo, en organismos vivos sólo se han observado las conformaciones ADN-A, ADN-B y ADN-Z.

La conformación que adopta el ADN depende de su secuencia, la cantidad y dirección de superenrollamiento que presenta, la presencia de modificaciones químicas en las bases y las condiciones de la solución, tales como la concentración de iones de metales y poliaminas (Basu y col., 1988). De las tres conformaciones, la forma "B" es la más común en las condiciones existentes en las células (Leslie y col., 1980). Las dos dobles hélices alternativas del ADN difieren en su geometría y dimensiones.

La forma "A" es una espiral que gira hacia la derecha, más amplia que la "B", con una hendidura menor superficial y más amplia, y una hendidura mayor más estrecha y profunda. La forma "A" ocurre en condiciones no fisiológicas en formas deshidratadas de ADN, mientras que en la célula puede producirse en apareamientos híbridos de hebras ADN-ARN, además de en complejos enzima-ADN (Lu y col., 2000).

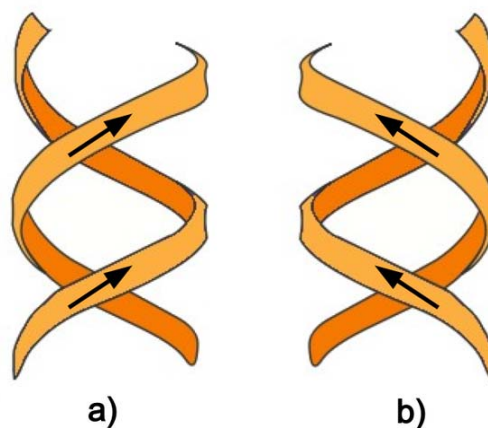
Los segmentos de ADN en los que las bases han sido modificadas por metilación pueden sufrir cambios conformacionales mayores y adoptar la forma "Z". En este caso, las hebras giran alrededor del eje de la hélice en una espiral que gira a mano izquierda, lo opuesto a la forma "B" más frecuente. Estas estructuras poco frecuentes pueden ser reconocidas por proteínas específicas que se unen a ADN-Z y posiblemente estén implicadas en la regulación de la transcripción. (Oh y col., 2002).

Figura 12. Estructura en cuádruplex



La **estructura del ADN en cuádruplex** está formada por repeticiones en los telómeros. La conformación de la estructura de soporte del ADN difiere significativamente de la típica estructura en hélice. En los extremos de los cromosomas lineales existen regiones especializadas de ADN denominadas telómeros. La función principal de estas regiones es permitir a la célula replicar los extremos cromosómicos utilizando la enzima telomerasa, puesto que las enzimas que replican el resto del ADN no pueden copiar los extremos 3' de los cromosomas. Estas terminaciones cromosómicas especializadas también protegen los extremos del ADN, y previenen que los sistemas de reparación del ADN en la célula los procesen como ADN dañado que debe ser corregido (Nugent y Lundblad, 1998). En las células humanas, los telómeros son largas zonas de ADN de hebra sencilla que contienen algunos miles de repeticiones de una única secuencia TTAGGG (Wright y col., 1997).

Figura 13. Hendiduras mayor y menor

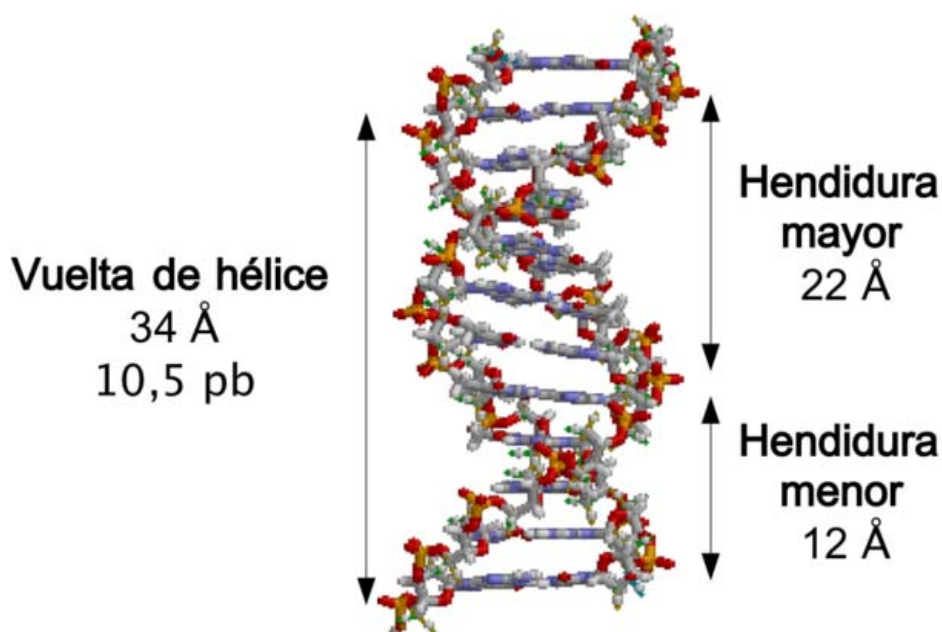


Doble hélice: a) Dextrógira, cada cadena gira a derechas .b) Levógira, si giran a izquierdas (esta forma puede aparecer en hélices alternativas debido a cambios conformacionales en el ADN).

Pero en la conformación más común que adopta el ADN, la doble hélice es dextrógira, girando cada par de bases respecto al anterior unos 36° .

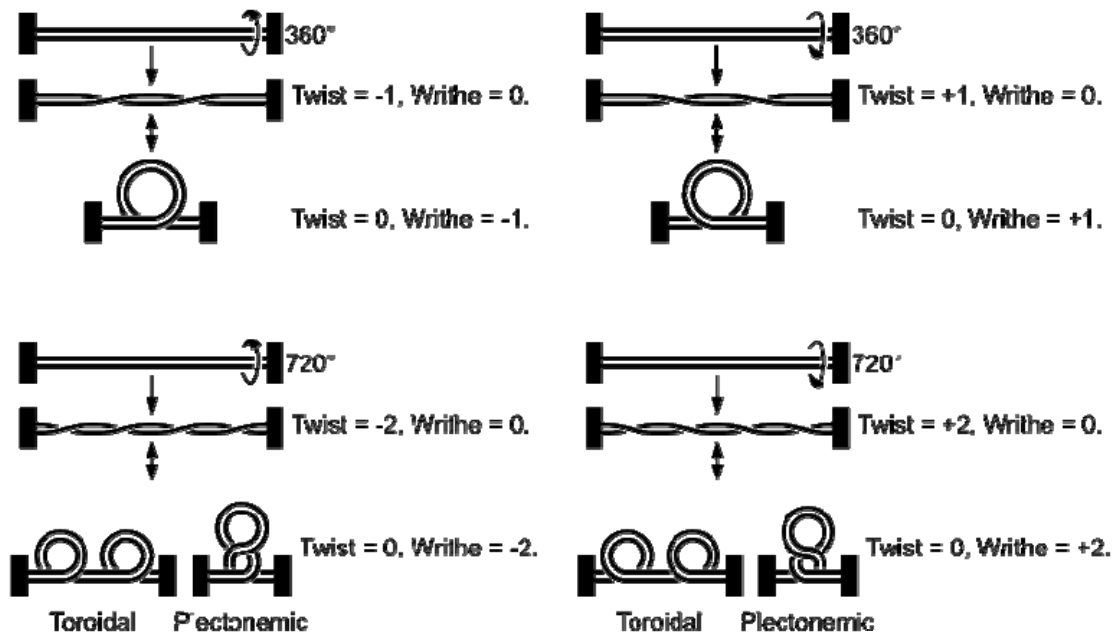
Cuando las dos hebras de ADN se enrollan una sobre la otra (sea a derecha o a izquierda), se forman huecos o hendiduras entre una hebra y la otra, dejando expuestos los laterales de las bases nitrogenadas del interior. Aparecen, como consecuencia de los ángulos formados entre los azúcares de ambas cadenas de cada par de bases nitrogenadas, dos tipos de hendiduras alrededor de la superficie de la doble hélice: una de ellas, la hendidura o surco mayor, que mide 22 \AA ($2,2 \text{ nm}$) de ancho, y la otra, la hendidura o surco menor, que mide 12 \AA ($1,2 \text{ nm}$) de ancho. Cada vuelta de hélice, que es cuando ésta ha realizado un giro de 360° o lo que es lo mismo, de principio de hendidura mayor a final de hendidura menor, medirá por tanto 34 \AA , y en cada una de esas vueltas hay unos $10,5 \text{ pb}$.

Figura 14. Hendidura mayor y menor



La anchura de la hendidura mayor implica que los extremos de las bases son más accesibles en ésta, de forma que la cantidad de grupos químicos expuestos también es mayor lo cual facilita la diferenciación entre los pares de bases A-T, T-A, C-G, G-C. Como consecuencia de ello, también se verá facilitado el reconocimiento de secuencias de ADN por parte de diferentes proteínas sin la necesidad de abrir la doble hélice. Así, proteínas como los factores de transcripción que pueden unirse a secuencias específicas, frecuentemente contactan con los laterales de las bases expuestos en la hendidura mayor (Pabo y Sauer, 1984). Por el contrario, los grupos químicos que quedan expuestos en la hendidura menor son similares, de forma que el reconocimiento de los pares de bases es más difícil; por ello se dice que la hendidura mayor contiene más información que la hendidura menor (Watson y col., 2006).

Figura 14. Superenrollamiento. Estructura de moléculas de ADN lineales con los extremos fijos y superenrolladas.



El ADN puede retorcerse como una cuerda en un proceso de superenrollamiento del ADN "supercoiling". Cuando el ADN está en un estado "relajado", una hebra normalmente gira alrededor del eje de la doble hélice una vez cada 10,4 pares de bases, pero si el ADN está retorcido las hebras pueden estar unidas más estrechamente o más relajadamente (Benham y Mielke, 2005). Si el ADN está retorcido en la dirección de la hélice, se dice que el superenrollamiento es positivo, y las bases se mantienen juntas de forma más estrecha. Si el ADN se retuerce en la dirección opuesta, el superenrollamiento se llama negativo, y las bases se alejan. En la naturaleza, la mayor parte del ADN tiene un ligero superenrollamiento negativo que es producido por enzimas denominadas topoisomerasas (Champoux, 2001).

2.4.8. DAÑO EN EL MATERIAL GENÉTICO

El ADN puede resultar dañado por muchos tipos de mutágenos, que cambian la secuencia del ADN: agentes alquilantes, además de radiación electromagnética de alta energía, como luz ultravioleta y rayos X. El tipo de daño producido en el ADN depende del tipo de mutágeno. Por ejemplo, la luz UV puede dañar al ADN produciendo dímeros de timina, que se forman por ligamiento cruzado entre bases pirimidínicas (Douki y col., 2003). Por otro lado, oxidantes tales como radicales libres o el peróxido de hidrógeno producen múltiples daños, incluyendo modificaciones de bases, sobre todo guanina, y roturas de la doble hebra "*double-strand breaks*" (Cadet y col., 1999).

En una célula humana cualquiera, alrededor de 500 bases sufren daño oxidativo cada día. De estas lesiones oxidativas, las más peligrosas son las roturas de doble hebra, ya que son difíciles de reparar y pueden producir mutaciones puntuales, inserciones y deleciones de la secuencia de ADN, así como translocaciones cromosómicas (Valerie y Povirk, 2003).

El daño en el ADN inicia una respuesta que activa diferentes mecanismos de reparación que reconocen lesiones específicas en el ADN, que son reparadas en el momento para recuperar la secuencia original del ADN. Asimismo, el daño en el ADN provoca una parada en el ciclo celular, que conlleva la alteración de numerosos procesos fisiológicos, que a su vez implica síntesis, transporte y degradación de proteínas. Alternativamente, si el daño genómico es demasiado grande para que pueda ser reparado, los mecanismos

de control inducirán la activación de una serie de rutas celulares que culminarán en la *muerte celular*.

2.4.9. MECANISMOS DE REPARACIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO

El daño en el ADN puede conducir a la detención de ciclo celular, producir una mutación o la muerte de la célula. La mayoría de mutaciones no causa la muerte celular, pero cuando se acumulan en número suficiente pueden conducir a la desregulación de patrones de transcripción, baja actividad metabólica y en última instancia generar un fenotipo envejecido y poco funcional (Bahar y col., 2006).

Dada la importancia del ADN, molécula que codifica la información vital acerca del contenido celular y su función, existen varias rutas a través de las cuales la célula puede reparar daños intrínsecos en el material genético a lo largo de su vida. Estas rutas principalmente son: ruta de reparación de errores de apareamiento o Mismatch Repair Pathway (MMR), ruta de reparación de la escisión de bases o Base Excision Repair (BER), ruta de reparación de la escisión de nucleótidos o Nucleotide Excision Repair (NER) y ruta de reparación de fracturas de la doble hélice o Doble Strand Break Repair (DSBR) (Gorbunova y col., 2007).

-Ruta de reparación de errores de apareamiento o Mismatch Repair Pathway (MMR):

La ruta MMR elimina bases desapareadas que son el resultado de

errores de replicación, recombinación entre secuencias imperfectamente emparejadas y desaminación de la 5-metil-citosina. La replicación del ADN tras un par de bases desapareadas causaría una mutación puntual. El sistema MMR también desempeña un papel en la reparación de daño oxidativo por mecanismos que todavía no están bien dilucidados (Skinner y Turker, 2005). Varias líneas de evidencia indican la importancia del sistema MMR en el proceso de envejecimiento celular. La MMR es esencial para el mantenimiento de secuencias repetidas, puesto que las mutaciones en genes MMR se asocian a una desestabilización sustancial de microsatélites, y la inestabilidad de los microsatélites se incrementa con el envejecimiento (Neri y col., 2005).

-Ruta de reparación de la escisión de bases o Base Excision Repair (BER):

Esta ruta suprime las lesiones que afectan sólo a una de las hebras de ADN, lo que permite la supresión de la lesión y el empleo subsecuente de la hebra complementaria para rellenar el hueco. La BER corrige las pequeñas alteraciones de ADN que no deforman completamente la estructura de la doble hélice de ADN, como son las bases oxidadas, o la incorporación de uracilo. La BER es crucial para reparar el daño inducido por especies reactivas del oxígeno en las bases que componen el ADN. La BER posee dos subrutas: rama corta de la BER (mecanismo por el cual sólo un nucleótido es sustituido) o rama larga de la BER (mecanismo por el cual de dos a trece nucleótidos son sustituidos). La BER es iniciada por ciertas ADN-glicosilasas, que separan el resto N-glicosílico de bases dañadas dejando el lugar apurínico/apirimidínico. Este sitio entonces es procesado por una endonucleasa, dejando un hueco en la cadena de ADN.

Este hueco es rellenado por la ADN-polimerasa β y ligado por la ADN-ligasa (Almeida y Sobol, 2007).

-Ruta de reparación de la escisión de nucleótidos o Nucleotide Excision Repair (NER):

La NER elimina pequeños oligonucleótidos de ADN que contienen una base dañada (Hanawalt, 2002). La NER reconoce lesiones considerables causadas por compuestos cancerígenos y enlaces covalentes entre pirimidinas adyacentes resultantes de la exposición a la radiación UV. Esta ruta se clasifica en reparación genómica global (GG-NER) que ocurre a lo largo de todo el genoma y reparación de emparejamiento transcripcional (TCR-NER) que elimina lesiones en las cadenas transcritas de genes activos. La ruta NER es un proceso multisequencial que involucra a múltiples proteínas (Hanawalt, 2002). En la ruta GG-NER, el ADN es desenrollado por unas helicasas, eliminando la cadena dañada y la reparación se completa por una ADN-polimerasa y una ADN-ligasa. En la ruta TCR-NER la ARN-polimerasa II inicia la reparación en la cadena dañada (Gorbunova y col., 2007).

-Ruta de reparación de fracturas de la doble hélice o Doble Strand Break Repair (DSBR):

Una rotura en la doble hélice del ADN es la más letal de todas las posibles lesiones del material genético. Si no se repara, una rotura en la doble hélice conduce a la pérdida de segmentos del cromosoma y pone en peligro la supervivencia celular. Igualmente dañinos para los organismos son los errores de reparación de las fragmentaciones en la doble hélice, puesto

que desestabilizan el genoma y causan reestructuración del mismo. La reestructuración genómica es bastante común en organismos envejecidos (Vijg y Dolle, 2002), lo que conduce a desregulación en la transcripción y malignidad. Las rupturas de la doble hélice son reparadas por dos mecanismos: recombinación homóloga y asociación final no homóloga. Durante la recombinación homóloga, la cromátida hermana se usa como molde para copiar la información perdida en el lugar dañado (Helleday, 2003). Puesto que las cromátidas hermanas son idénticas, el daño en el ADN puede ser reparado fielmente sin consecuencias genéticas. Por el contrario, en la asociación final no homóloga, simplemente une dos extremos rotos, sin tener en cuenta la secuencia homóloga. Normalmente, esta ruta suele introducir errores en la secuencia del ADN (Seluanov y col., 2003).

2.4.10. DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DEL MATERIAL GENÉTICO MEDIANTE ENSAYO “COMET ALCALINO”

El ensayo de electroforesis en gel de células individuales (single cell gel electrophoresis assay) o “*Ensayo Comet*” es un método simple, rápido y sencillo para medir daño en el ADN de células eucariotas (animales y vegetales) individuales, así como en pequeñas muestras de tejido (Duthie, 2003). Ha sido un método estándar para evaluar el daño a nivel de ADN en la pasada década, con aplicaciones en epidemiología molecular y biomonitorización humana, comprobación de genotoxicidad, ecogenotoxicología, estudios de apoptosis, así como en la investigación básica de daño y reparación del ADN. Es una herramienta ampliamente difundida en

la comunidad científica usada para la detección de fracturas en la doble hélice del ADN, resultantes de daños producidos por factores genotóxicos (Collins, 2004; Moller, 2006).

Se trata de un método adaptado de la técnica de electroforesis en microgel de Östling y Johanson (1984) quienes observaron que, el ADN de células de linfoma de ratones previamente irradiadas con radiación gamma, suspendidas en gel de agarosa en un portaobjetos, lisadas con un detergente neutro y expuesto a un campo eléctrico débil, migró más hacia el ánodo que el ADN de aquellas células no irradiadas. Propusieron que la radiación produce roturas en la doble hélice de ADN, permitiendo la relajación del ADN superenrollado y dando lugar a una migración más pronunciada de éste en el gel, dando como resultado una imagen muy particular, semejante a un cometa.

Las variantes más comunes de ensayo *comet* son: *comet* alcalino, *comet* neutro, y uso de enzimas lesión-específicas. El ensayo *comet* alcalino fue descrito por primera vez como método para evaluar el daño en el ADN (Singh y col., 1988; Olive, 1989), quienes optimizaron la desnaturalización alcalina del ADN y las condiciones de electroforesis, permitiendo la evaluación del daño de una de las cadenas de ADN y de los lugares sensibles a un medio alcalino. Actualmente el protocolo empleado tiene ligeras variaciones técnicas del ensayo original, encaminadas a reducir el tiempo de exposición del ADN y agilizar la técnica, evitando el daño inducido por la manipulación del material genético (Duthie, 2003; Collins, 2004; Moller, 2006). Otras variantes menos comunes son: marcaje con Bromodeoxiuridina para detectar ADN replicante,

detección de intermediarios en la reparación de ADN, *comets* FISH (Fluoresce In Situ Hybridation) (Collins, 2004).

La técnica usada en nuestro estudio es el Ensayo *Comet Alcalino* (Alkaline single-cell gel electrophoresis), ya que permite cuantificar la estabilidad del ADN con mayor precisión. De forma general, el ensayo *comet alcalino* cursa con varias fases comenzando con el aislamiento de las células, incorporación de éstas en agarosa, lisis con detergente y un alto contenido en sales, tratamiento alcalino para desenmarañar las hebras de ADN, electroforesis, neutralización, tinción y cuantificación.

Cuando se deposita una célula aislada en el gel de agarosa, se crea una cavidad. Tras la lisis, todas las proteínas se liberan y se diluyen en el gel, permaneciendo únicamente las proteínas de andamiaje nucleares o nuclear scaffold proteins, expandiéndose todo el ADN superenrollado o “nucleoide” por la cavidad (Östling y Johanson, 1984). El ADN queda negativamente cargado tras el desenmarañamiento alcalino, y en la electroforesis se dirige hacia el ánodo, excepto aquellos lazos del ADN que contienen fracturas, que son liberados de la estructura superenrollada y van quedando atrapados en la estructura reticular del gel. Estos lazos quedan extendidos desde la cabeza del nucleoide formando la cola del cometa (Duthie, 2003).

Estas estructuras se marcan posteriormente con colorantes fluorescentes que se unen al ADN para poder ser visualizadas mediante microscopía de fluorescencia. El bromuro de etidio (BE) es probablemente el

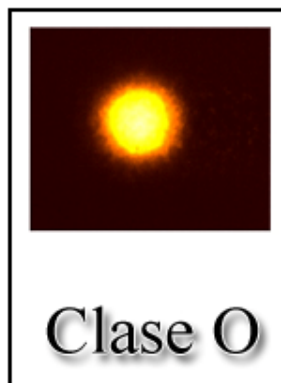
colorante más usado, seguido del 4,6-diamino-2-fenil indol (DAPI) (Collins, 2004). También hay otros colorantes como el ioduro de propidio, naranja de acridina, Hoechst 33258 (Duthie, 2003), SYBR Green I y YOYO-I (Hartmann y col., 2003).

La medida de los *comets* se puede llevar a cabo mediante un recuento manual o bien haciendo un análisis de imagen. Es posible calcular el daño del ADN de manera visual. Con un entrenamiento adecuado, visualmente se puede discriminar diferentes grados de daño en función del aspecto que presente el *comet* que se encuentra en ese momento en el campo de visión. De forma general, tenemos cinco clases de *comets*, numerados del 0 al 4 (Duthie, 2003; Collins, 2004), en función de la ausencia de cola (0) y de la forma, tamaño, e intensidad de la cabeza y la cola (1 al 4), como se muestra en la Figura 15.

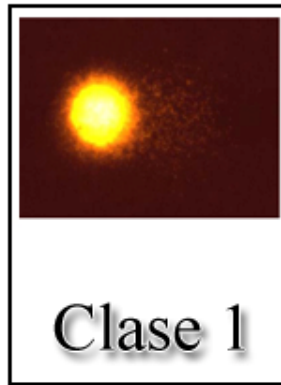
Sin embargo, el recuento mediante análisis de imagen es bastante más fiable, ya que se evita cualquier tipo de subjetividad del investigador y se hace a través de una serie de paquetes de software disponibles en el mercado. En nuestro estudio el análisis se realizó con una cámara Hitachi (Satandard Video with Meteor II) empleando el paquete informático para imágenes Kinetic Imaging Komet 5.5 (Kinetic Imaging Ltd, Liverpool, UK). Estos programas nos dan una gran variedad de parámetros relativos a los *comets*. Los más usados son la longitud de la cola, intensidad relativa de fluorescencia (normalmente expresado como porcentaje de ADN en la cola), *Olive Tail Moment* (definido como el producto de la longitud de la cola del *comet* y la fracción de ADN en la misma, $OTM = [\text{Media de la cola} - \text{Media de la cabeza}] \times \% \text{ ADN en cola}/100$) y

porcentaje de ADN en la cabeza. De ellos, el porcentaje de ADN en la cola representa el parámetro más útil, ya que guarda una relación lineal con la frecuencia de rotura, se afecta relativamente poco por los ajustes del umbral, y permite la discriminación del daño por encima del rango más amplio posible (en teoría, desde 0 a 100 % de ADN en la cola). Se recomienda contar al menos 50 *comets* por muestra (Collins, 2004).

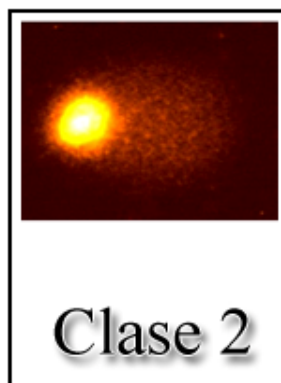
Figura 15. Clasificación de los tipos de *comets* en función del daño en el ADN



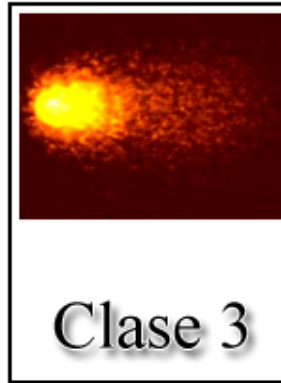
CLASE 0: Todo el ADN se encuentra en la cabeza del *comet* indicando que el daño en el material genético es prácticamente nulo.



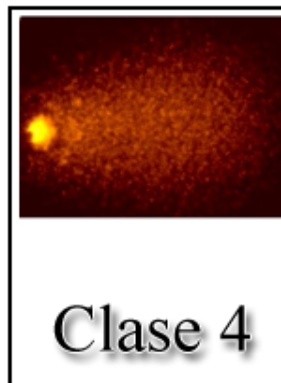
CLASE 1: Podemos observar pequeños y escasos fragmentos de ADN en la cola del *comet*. Presentan una cola tan pequeña que se asemeja a una aureola y una alta intensidad en la cabeza, el daño sigue siendo prácticamente nulo.



CLASE 2: Podemos observar mayor cantidad de fragmentos de ADN en la cola, por tanto la fluorescencia de la misma es mayor. Este tipo de *comet* corresponde a un nivel de daño moderado.



CLASE 3: La cola del *comet* es altamente fluorescente y redondeada, revelando que existe un alto porcentaje de ADN en la misma. La cabeza es mucho más pequeña que en los anteriores y con una intensidad mucho menor. Este tipo de *comet* corresponde a un nivel de daño alto.



CLASE 4: Prácticamente todo el ADN se encuentra en la cola y tienen una cabeza pequeña, con intensidad de fluorescencia muy baja, se considera que el daño en el ADN es máximo.

2.5. CARACTERÍSTICAS NUTRICIONALES DE LA LECHE DE CABRA

2.5.1 INTRODUCCIÓN

La leche de las distintas especies de rumiantes, directamente o como derivados lácteos, es un alimento de importancia excepcional para la población en cualquier etapa de la vida. La leche puede ser considerada como una fuente de macro y micronutrientes, además de contener un número de compuestos activos que tienen un papel significativo tanto en la nutrición como en la protección de salud (Boza y Sanz-Sampelayo, 1997). El contenido de ácido oleico, ácido linoleico conjugado, los ácidos grasos Omega 3, ácidos grasos de corta y media cadena, vitaminas, minerales y compuestos bioactivos, puede promover efectos positivos en la salud.

La leche de cabra es de interés en nuestra investigación debido a su composición específica, y por ser un alimento con unas características nutricionales altamente beneficiosas, por lo que se le ha considerado un alimento de gran calidad, en la dieta para niños y ancianos, así como para los ciertos sectores de la población con necesidades particulares (Haenlein, 1992; 1996; Boza y Sanz-Sampelayo, 1997; Lopez-Aliaga y col., 2003, Campos y col., 2003; Haenlein, 2004; Park, 2006).

Las características principales de su composición han sido comparadas con la leche producida por otras especies. (Haenlein, 1992; Davis y col., 1994; Boza y Sanz-Sampelayo, 1997; Alférez y col., 2001; Lopez-Aliaga y col., 2003,

Campos y col., 2003; Park, 2006; Haenlein, 2007). De particular interés, son las diferencias en la composición de las leches de vaca y cabra.

Así, 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), y al mismo tiempo es más tolerable, menos alergénica (Bevilacqua y col., 2001; Lara-Villoslada y col., 2004; Sanz Ceballos, 2007). Las fracciones de proteína que presentan diferencias evidentes, son sobre todo, la cantidad de α 1-caseína, que es inferior en la leche de cabra. El perfil de aminoácidos de las dos proteínas reveló ciertas diferencias, aunque la cantidad total de aminoácidos esenciales no varía (Sanz Ceballos y col., 2009).

Asimismo la grasa de leche de cabra es más digestible (Alferez y col., 2001; Haenlein, 2001), y puede ser considerada una fuente excelente de energía en varios procesos metabólicos (Boza y Sanz-Sampelayo, 1997; Sanz Ceballos, 2007) incluso para combatir problemas metabólicos (Babayán, 1981; García Unciti, 1996; Velázquez y col., 1996). La composición de grasas es bien diferenciada, principalmente en lo que concierne a los ácidos grasos de cadena media (C6-14), que son mayoritarios en la leche de cabra. Lo mismo ocurre para los ácidos grasos (n-6) y (n-3), junto con el nivel total del ácido linoleico conjugado (Sanz Ceballos y col., 2009).

En cuanto a su composición mineral, en general se encuentra en niveles moderados de los elementos principales, y muestra por su utilización nutritiva mayor calidad que la leche de vaca (Moreno, 1995; Boza y Sanz-Sampelayo,

1997; Lopez-Aliaga y col., 2000; Haenlein, 2001; Campos y col., 2003; Alférez y col., 2003; Barrionuevo y col., 2003; López Aliaga y col., 2003; Nestares y col., 2008). Las cantidades de Ca, P, Mg y Cu eran mayores en las cenizas obtenidas de la leche de cabra, debido a la mayor cantidad de componentes sólidos totales que presenta. Estas diferencias hacen que la leche de cabra constituya un alimento de un particular interés, tanto en términos de salud como en términos de nutrición. (Sanz Ceballos y col., 2009).

La composición de la leche depende de la especie, del estado de lactancia, alimentación y otras condiciones ambientales (zona geográfica); además, los valores registrados pueden variar según la metodología utilizada. Considerando estos factores, y dado el interés en comparar la composición de las leches de cabra y vaca, bajo las mismas condiciones, teniendo en cuenta las exigencias específicas alimenticias de cada una de ellas, y usando una metodología idéntica para determinar esta composición. En estudios de comparación en la composición de la leche de cabra Granadina y de vaca Holstein-Friesian, establecidas en la misma área del Sureste de España, y producidas durante lactancias consecutivas se ha comparado la composición de proteína (fracciones de proteína y perfil de aminoácidos), la composición lipídica (perfil de ácidos grasos), la composición mineral (Ca, P, Mg, Fe, Cu y Zn) y vitamínica, además de la composición química (alimentos sólidos totales, proteína, grasa, ceniza y lactosa) en cada tipo de leche.

La raza de cabra Granadina se caracteriza por producir gran cantidad de sustancias nutritivas, por ser una especie robusta, adaptada a la supervivencia

en condiciones ambientales extremas, y por su alimentación para producir grandes cantidades de la leche (Boza, 2005). Según Haenlein (1996), la leche de cabra provee una proporción más alta de sólidos totales que la leche de vaca, así como de proteína, grasa y minerales, pero al expresarlo como el contenido de materia seca las diferencias tienden a desaparecer.

En estudios realizados por Sanz Ceballos, y col. (2009), con leche de cabra y vaca, también se apreció un contenido más alto de componentes sólidos totales, proteína, grasa y minerales, en la leche de cabra. 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.

Muchas de las reacciones adversas que a veces se presentan por el consumo de leche de vaca, concretamente frente a ciertas fracciones proteicas, así como la intolerancia a la lactosa, se pueden evitar en muchas ocasiones por el cambio a la leche de cabra (Park, 1991). Desde hace bastantes años hay indicios evidentes en la literatura científica del beneficio de la leche caprina en problemas de acidez, úlcera de estómago, colitis, problemas hepáticos y biliares, asma, migraña, eccemas y estados de convalecencia. Además puede ser un alimento aconsejable y bien tolerado por niños y ancianos, debido a la elevada digestibilidad de su proteína y grasa (Dostalova, 1994). Zoppi y col. (1995), demostraron experimentalmente que el consumo de dietas que contienen leche de cabra reduce los niveles de LDL colesterol y colesterol total. Posteriormente (Alfárez y col., 2001; López-Aliaga y col, 2005) se demostró que el consumo de leche de cabra, además de reducir los niveles de LDL colesterol

y colesterol total, mantiene en el rango fisiológico los niveles de HDL colesterol, triglicéridos y transaminasas (GOT y GPT).

2.5.2. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS

La leche de cabra es **más blanca** que la de vaca, debido a que no tiene carotenos, que amarillean, en parte, a la última. Posee un fuerte olor y sabor, como consecuencia de la absorción de compuestos aromáticos durante su manejo. Sin embargo, estas características organolépticas poco atractivas desde el punto de vista del consumo humano, pueden eliminarse en gran parte por un sencillo tratamiento de desodorización al vacío (Borrás, 1968).

La leche de cabra no debería presentar problemas de rechazo en el consumidor debido a su **olor**, usualmente atribuido a los ácidos grasos de cadena mediana. Bajo condiciones normales, estos ácidos se encuentran encapsulados dentro del glóbulo graso, por lo cual la leche de cabra adecuadamente manipulada es difícil de distinguir de la leche de vaca utilizando el olfato. Los problemas se dan cuando la membrana del glóbulo graso se rompe y libera estos ácidos. No obstante, aunque se rompiera el glóbulo, si los ácidos grasos están en forma de triglicéridos, se necesitaría de una lipasa para liberar a los mismos, y esto sólo ocurriría si no se llevó a cabo correctamente el proceso de pasteurización, que en teoría destruye dichas enzimas. Además hay que añadir, que una vez rota la integridad de los glóbulos, la leche es más propensa a enranciarse (Chacón, 2005).

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

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

2.5.3. COMPOSICIÓN DE LA LECHE DE CABRA

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

Dependiendo de la raza de las cabras, condicionamientos genéticos, alimentación, factores medioambientales, momento de la lactación, etc., existen variaciones en la composición de la leche.

Tabla 3. Composición Química (San Ceballos, 2009)

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

Chandan y col. (1992) indican que en un clima templado, la leche a finales de verano contiene menor cantidad de grasa y sólidos totales. Además también tiene una marcada influencia el momento de la lactación, provocando unas fluctuaciones de composición que son más pronunciadas en la cabra que en la vaca (Parkash y Jenness, 1968).

Sin embargo, con total seguridad, es la dieta del animal la que incide en mayor medida sobre la composición de la leche, especialmente en su contenido proteico, graso y vitamínico, además de condicionar las características organolépticas de la misma (Boza, 1992).

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

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

2.5.3.1. PROTEÍNA EN LA LECHE DE CABRA

Una característica importante de la leche de cabra es que su composición proteica varía mucho de una raza a otra, debido a la gran variabilidad genética que caracteriza a este animal (Martin, 1996). Si consideramos un genotipo

“estándar”, la composición proteica global, así como la cantidad de proteínas es muy similar en las leches caprina y bovina. Sin embargo, y aunque la proporción caseínas/proteínas del lactosuero es también similar (80/20), las caseínas de la leche de cabra son **más solubles** y por tanto su absorción es mucho más fácil (Boza y Sanz-Sampelayo, 1997). Por tanto, la calidad de la proteína de la leche de cabra es mayor que la de leche de vaca. Esta **elevada calidad proteica** queda demostrada en un estudio realizado en ratas con resección parcial de intestino delgado, en el que se observó que las ratas que consumieron dieta elaborada a base de leche de cabra tenían un índice de crecimiento superior, con una mejor utilización digestiva y metabólica de la proteína, que las que consumieron dieta basada en leche de vaca (López-Aliaga y col., 2003).

La leche de cabra contiene alrededor de 5.2 g N/Kg, lo cual representa 33.2 g de proteína. La fracción proteica mayoritaria de la leche caprina, al igual que en la leche de vaca, son las caseínas que precipitan a un pH= 4.6. Las proteínas que permanecen en solución a dicho pH son las del lactosuero: α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, albúmina, inmunoglobulinas, péptidos y otras proteínas menores, algunas con carácter enzimático.

Como componentes de la proteína láctea, existen seis fracciones genéricas de la glándula mamaria de carácter mayoritario: α s1-caseína, α s2-caseína, β -caseína, χ -caseína, β -lactoglobulinas y α -lactoalbúminas, exhibiendo todas un polimorfismo genérico, producto de genes autosómicos alélicos codominantes (Swaisgood, 1992). La leche caprina tiene menos α s1-caseína que la leche de vaca (5% del total de proteínas en la cabra, frente al 35% de la vaca)

(Martín, 1996) y más β -caseína y κ -caseína (Park, 2006). La α 1-caseína, proteína, que no está presente en la leche humana, es considerada uno de los principales alérgenos responsables de la alergia a la proteína de la leche de vaca (Bianca-María y col., 2001).

El tamaño de las micelas de caseína es más pequeño en la leche de cabra (50 nm) en comparación con la leche de vaca (75 nm). Estas caseínas de la leche de cabra se caracterizan por contener más glicina, así como menos arginina y aminoácidos sulfurados, especialmente metionina (Chacón, 2005).

La alergia se produce por la generación en el organismo de Inmunoglobulinas E al entrar en contacto con las proteínas de la leche, especialmente en niños donde éstas suelen ser las primeras proteínas extrañas con las que tienen contacto. En este sentido las α -lactoalbúminas y β -lactoglobulinas que se encuentran en la fracción acuosa de la leche (el suero), son menos problemáticas ya que son alterables por la acción del calor, al ser termosensibles, y por lo tanto su poder alérgico se inactiva en productos tratados térmicamente como son las leches en polvo o de larga duración pasteurizadas con un sistema de ultra alta temperatura a 100 °C durante 10s por UHT (Chacón, 2005). Las caseínas son termoestables a los tratamientos estándar, y por lo tanto las personas sensibles a ellas reaccionarán ante cualquier producto que las contengan aunque haya sido tratado térmicamente.

En lo que concierne al valor nutritivo de las proteínas de la leche de cabra respecto a la de leche de vaca, son más fácilmente degradadas en el

estómago, y así las proteasas actúan favoreciendo su digestibilidad (Park, 1994; Haenlein, 2004; Park, 2006; Haenlein, 2007). Esto está de acuerdo con estudios de la calidad de la leche de cabra Granadina y vacas de Holstein Friesian para producir una mejor utilización alimentaria, sobre todo en términos de digestión (Sanz Ceballos, 2007).

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

En la leche de vaca, tras someterse a calentamiento y enfriarse rápidamente, se consigue la separación de la nata, facilitando esta aglomeración las euglobulinas lácteas. Este hecho no se produce con la leche de cabra, lo cual puede ser debido al pequeño volumen de los glóbulos grasos y escaso contenido en euglobulinas y aglutininas que son responsables de la escasa capacidad de la leche de cabra para formar crema (Chandan y col., 1992).

Tabla 4. Fracción Proteica (San Ceballos, 2009)

	Leche cabra (g/100g proteína)	Leche vaca (g/100g proteína)	Diferencias para leche de cabra (%)
Caseína (Cn)	82.70	82.65	
α1-Cn	18.92	30.80	- 62.8
α1-Cn	8.52	7.50	
β+κ-Cn	55.26	44.35	+19.7
Proteínas Séricas	17.30	17.35	

Composición de aminoácidos:

Aunque la composición de aminoácidos de cada fracción de proteína en la leche dependa de la especie (Marchalonis y Weltman, 1971), en general, es posible identificar ciertas semejanzas en esta composición según la fracción de proteína correspondiente. Así, Park (2006) divulgó que las caseínas presentan los niveles más altos de Asp, Lys y Tyr, y de β -caseína, pero bajos en Leu, Pro y Val, a excepción del contenido de **Lisina**, más alto en la proteína de leche de cabra, a pesar de tener menor cantidad de α 1-caseína. (Sanz Ceballos, 2007). Posati y Orr (1976) analizaron el contenido de los diferentes aminoácidos en 100 g de leche, y concluyó que la leche de cabra, en comparación con la leche de vaca, contiene cantidades mayores de 6 de los 10 aminoácidos esenciales. Este efecto es debido al mayor contenido de componentes sólidos totales en la leche de cabra, junto con la mayor cantidad de proteína en el extracto seco (el 25.64 % frente el 24.82 %) (Sanz Ceballos, 2007).

2.5.3.2. GLÚCIDOS EN LA LECHE DE CABRA

Una diferencia destacable en la composición glucídica de ambos tipos de leche reside en los oligosacáridos: en la leche de cabra encontramos concentraciones 10 veces superiores a las que hay en la leche de vaca. Además, los oligosacáridos caprinos se caracterizan por su gran variabilidad estructural, que los hace los más parecidos que existen a la leche humana. Además, su elevado contenido en **galactosa** es muy importante para el desarrollo cerebral, en las primeras etapas de vida (Martínez-Férez, 2004).

La **lactosa**, es el hidrato de carbono más importante tanto en la leche de vaca como en la de cabra (4,7-4,8% en ambas). En condiciones fisiológicas, la lactosa de la leche es hidrolizada por la lactasa en la superficie de las células de la mucosa intestinal, pero deficiencias de este enzima pueden producir diarreas, distensión abdominal y flatulencia, debido al aumento en la luz intestinal de este disacárido osmóticamente activo. En casi todos los mamíferos, la actividad lactásica intestinal es alta al nacer, declina en la niñez y permanece baja en la edad adulta; valores bajos de lactasa se asocian a la intolerancia láctea (Ganong, 2004). En este sentido, se ha demostrado *in vitro* que los oligosacáridos de la leche de cabra inducen a la maduración del epitelio intestinal, ya que favorecen la diferenciación de células Caco-2 (Martínez-Férez, 2004).

El contenido de lactosa es bajo en la leche de cabra en comparación con la leche de otras especies animales (aproximadamente de 1% a 13% menos que la de vaca y hasta 41% menos que la humana), lo cual está directamente

relacionado con que esta leche presente menos problemas asociados con la intolerancia (Chacón, 2005). La mayor tolerancia a la lactosa de la leche de cabra parece ser debida a su mayor digestibilidad, pudiendo existir una interacción entre calidad y cantidad proteica, de manera que la tasa de liberación de nutrientes desde el estómago al intestino es más ventajosa, optimizando así la utilización digestiva de la lactosa.

2.5.3.3. LÍPIDOS EN LA LECHE DE CABRA

La grasa de la leche de cabra es una fuente concentrada de energía, lo que se evidencia al observar que una unidad de esta grasa tiene 2,5 veces más energía que los carbohidratos comunes (Chacón, 2006). Los triglicéridos representan casi el 95% de los lípidos totales, mientras que los fosfolípidos rondan los 30-40 mg/100 mL y el colesterol 10 mg/100 mL.

La materia grasa de la leche es secretada por las glándulas mamaria en forma de glóbulos grasos, dando lugar a una emulsión lipídica. Estos glóbulos grasos están formados principalmente por un núcleo de triglicéridos, rodeado de una capa externa constituida por lípidos polares (principalmente fosfolípidos) y proteínas. El tamaño de los glóbulos grasos comparados con el de los glóbulos en la leche de vaca es de 2 μm en la leche de cabra frente a un promedio de 3-5 μm en la de vaca. Este menor tamaño de los glóbulos grasos de la leche de cabra da como resultado una emulsión más fina y uniforme, que influye favorablemente en su digestibilidad, puesto que estos pequeños glóbulos

son más accesibles para las lipasas que participan en la digestión lipídica (Chilliard, 1996).

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

La grasa de la leche caprina no contiene aglutinina que es una proteína cuya función es agrupar los glóbulos grasos para formar estructuras de mayor tamaño. Esta es la razón por la que sus glóbulos, al estar dispersos, son atacados más fácilmente por estas enzimas digestivas (especialmente las lipasas que rompen los enlaces éster), y se incrementa por tanto la velocidad de digestión (Chacón, 2006). Las lipasas se encuentran distribuidas en la crema de la leche (46%) y en el suero lácteo (46%) (Chilliard col., 1984).

Los resultados destacan que la leche de cabra tiene un 40 % más de ácidos grasos de cadena media que la leche de vaca. Los contenidos de 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 mediana poseen propiedades diferentes a los de cadena larga cuando son metabolizados por el ser humano, especialmente los ácidos caprílico y cáprico. Lo anterior se dá principalmente por la tendencia de estos ácidos a proporcionar energía y no a contribuir a la formación de tejido adiposo, así como por su habilidad para limitar y disolver los depósitos de colesterol sérico, lo que se relaciona con una disminución de las enfermedades coronarias, la fibrosis quística y los cálculos biliares (Haenlein, 2004).

Posiblemente, una de las principales diferencias en la composición lipídica de las leches de cabra y vaca está en el tipo de ácidos grasos que componen los triglicéridos. En la leche de cabra el porcentaje de ácidos grasos de cadena media (C6:0 caproico, C8:0 caprílico, C10:0 cáprico) es superior al de la leche de vaca. Así, la leche de cabra es más rica en **triglicéridos de cadena media** (MCT) (Alfárez y col., 2001; Haenlein, 2001; 2004; Sanz Ceballos, 2007). Estos triglicéridos son una fuente de energía rápida, ya que se absorben directamente en el intestino delgado proximal, fácilmente hidrolizados en la vía digestiva, proceso que comienza en el estómago por la acción de la lipasa y no necesitan la reesterificación y participación de las sales biliares para su absorción. Además, la oxidación mitocondrial de los ácidos grasos de cadena media es, en parte, independiente de los niveles de carnitina, lo cual supone una ventaja en casos de déficits de esta enzima (Odle, 1997).

La digestión rápida y eficiente es seguida de un rápido metabolismo oxidativo, siendo estos compuestos, por ello, unas excelentes fuentes de

energía (Leyton y col., 1987; Aurousseau y col., 1989; Velázquez y col., 1996; Matsuo y Takeuchi, 2004). Por esta razón, estos triglicéridos podrían tener efectos beneficiosos en situaciones metabólicas desfavorables, tales como enfermedades hepáticas, pacientes inmunodeprimidos o en el recién nacido, cuyo metabolismo es aún inmaduro. Así, los MCT han sido utilizados en nutrición parenteral de pacientes con enfermedades críticas y en niños prematuros, con mejores resultados que los triglicéridos de cadena larga (LCT) (Chan y col., 1998).

Debido a su rápida absorción, los MCT han sido utilizados en la prevención de la obesidad. Los ácidos grasos derivados de estos triglicéridos son rápidamente oxidados en el hígado, por lo que estimulan la saciedad de forma rápida, disminuyen los depósitos de grasa y facilitan el control de peso, sin modificar el aporte energético (St-Onge y Jones, 2002).

Alfárez y col. (2001), estudiaron el efecto de la grasa de las leches de cabra y vaca sobre la utilización digestiva de dicho nutriente y sobre parámetros bioquímicos relacionados con el metabolismo lipídico. En este estudio se emplearon ratas controles (transectadas) y otro grupo con resección intestinal del 50% del intestino delgado distal. La utilización digestiva de la grasa fue mayor en los animales que consumieron dieta elaborada a base de leche de cabra (rica en MCT), con respecto a los que consumían dieta basada en leche de vaca. Además el consumo de leche de cabra produce una reducción de 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).

Otro aspecto importante sobre el contenido de grasas de los dos tipos de la leche se debe al contenido de las diferentes formas del **ácido linoleico conjugado** (CLA), la proporción de CLA en la leche de cabra, es más alta que en la leche de vaca, a lo que se le atribuyen diversas propiedades beneficiosas para la salud. El ácido linoleico conjugado, tiene varios isómeros del ácido linoleico (C18:2). Varios estudios han investigado, los posibles efectos de CLA sobre la salud humana, sus propiedades están relacionadas con los isómeros específicos, con propiedades anticancerígenas (Ip y col., 1999), antiaterogénicas, (McGuire y McGuire, 2000) y antidiabéticas (tipo II) (Ryder y col., 2001), alterando la división de sustancia nutritiva y el metabolismo lipídico (Park y col., 1999), reduciendo la hiperglucemia, con modulación inmune y mejora de la mineralización de hueso (McGuire y McGuire, 2000; Pariza y col., 2001).

2.5.3.4. COMPOSICIÓN MINERAL

Los niveles de Ca, P, Mg, Fe, Zn y Cu en la composición seca de la leche de cabra son considerablemente más altos que los de la leche de vaca.

Aunque la composición mineral de la leche depende de la especie animal y de la alimentación proporcionada. Park en 2006, declaró que la leche de cabra, en comparación con la leche de vaca, proporciona cantidades más altas (en mg/100 la g de la leche) de Ca, P, K, Mg y Cl, y cantidades inferiores de Na y S. Sin embargo, Haenlein (2001) comentó que la leche de cabra presenta una composición mineral muy similar a la de leche de vaca en lo que

concierno a su contenido de Na, Fe, Zn y Mb, pero tiene las cantidades más altas de Ca, K, Mg, P, Cl y Mn.

Tabla 5. Composición Mineral (San Ceballos, 2009)

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

Al analizar la composición mineral de un determinado tipo de leche, no sólo hay que tener en cuenta las cantidades de cada mineral, sino también su biodisponibilidad. En este sentido, existen interacciones entre diferentes minerales y de éstos con otros componentes lácteos, que puede afectar a su absorción. Es destacable la mayor cantidad de **K** de la leche de cabra y su menor contenido en **Na**, y existen estudios científicos que demuestran que la biodisponibilidad de ciertos minerales es diferente, siendo mucho más ventajosa en la leche de cabra. (Gueguen, 1996).

El **Fe** es un claro ejemplo de cómo las interacciones entre componentes de los alimentos pueden aumentar su biodisponibilidad. La leche de cabra contiene una cantidad de Fe ligeramente superior a la de vaca, y además la biodisponibilidad de este elemento es mucho mayor en la leche de cabra. López-Aliaga y col. (2000) estudiaron el efecto de las leches de cabra y vaca sobre la utilización digestiva y metabólica de Fe y Ca, usando como control una dieta estándar (sin leche). La utilización digestiva del Fe y Ca, así como el depósito en órganos diana fue superior en los animales que ingirieron dietas basadas en leche de cabra. Por tanto, la leche de cabra minimiza las interacciones entre Fe y Ca, favoreciendo así su metabolismo. Además, Alférez y col. (2006) estudiaron el efecto de la leche de cabra comparativamente a la de vaca en ratas con anemia ferropénica nutricional inducida, concluyendo que el Fe presente en la leche de cabra favorece su depósito en órganos diana y la vuelta a la normalidad de los parámetros hematológicos alterados como consecuencia de la anemia ferropénica nutricional.

En ocasiones se ha vinculado a la leche de cabra y de vaca con anemias infantiles debido a los bajos contenidos de Fe. No obstante, esto resulta fácilmente reversible por medio de la fortificación (Chacón, 2006).

El efecto beneficioso de la leche de cabra sobre la utilización digestiva de Fe puede deberse a varios factores nutricionales que se encuentran en la leche de cabra en mayor proporción como son: cisteína y lisina que solubilizan el Fe^{3+} a Fe^{2+} por formar quelatos tridentados, principal factor asociado con una mayor absorción del metal (Van Campen, 1973). Por otra parte, el mayor

contenido de ácido ascórbico (vitamina C) en la leche de cabra, contribuye a aumentar la absorción de Fe en las ratas alimentadas con dieta elaborada con leche de cabra, ya que es conocido que la vitamina C forma un quelato con este mineral que permanece soluble a un pH más alto del intestino delgado (Czajka-Narins, 1998).

La leche es la principal fuente de **Ca** dietario para el ser humano, sin importar si es de cabra, vaca u otra especie. Comparativamente, la leche de cabra aporta 13% más Ca que la leche de vaca (Chacón, 2006). La mayor absorción de Ca en los animales que consumen la dieta con leche de cabra se puede atribuir, en parte, al alto contenido en Vitamina D de la leche de cabra respecto a la leche de vaca, que favorece la absorción de esta mineral (Alfárez y col., 1996).

Otro factor que puede contribuir a esta mayor absorción de Ca con la dieta elaborada con leche de cabra es su mayor contenido en lisina respecto a la leche de vaca. El efecto de este aminoácido parece que está relacionado con el transporte de Ca pasivo, ya que no hay diferencias significativas entre los dos estereoisómeros de la lisina.

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

cadena media. Esto favorece la absorción de proteínas y minerales, haciendo recomendable este alimento en caso de anemia.

La cantidad de **Mg** en la leche de cabra también es ligeramente superior a la de vaca. Un estudio en ratas con resección intestinal demostró que la leche de cabra aumentaba la absorción de magnesio (López-Aliaga y col, 2003) mejorando su biodisponibilidad (Nestares y col., 2008). También los MCT parecen responsables de este efecto beneficioso en el metabolismo mineral.

Además Campos y col. (2003) demostraron que el consumo de leche de cabra en ratas resecadas mejoraba la absorción de Ca y P, así como su destino metabólico en los órganos diana implicados en la homeostasis de estos minerales.

La leche de la cabra contiene **Se**, el cual actúa como antioxidante (USDA, 2004). El Se es muy importante no sólo porque suele ser deficiente en el cuerpo humano, si no por que ayuda a controlar el sistema inmunológico así como por actuar directamente sobre ciertos virus impidiendo su multiplicación.

El Se se vincula más con la parte acuosa que con la fracción grasa de la leche, pues en la leche descremada queda el 94% del Se total, del cual un 69% se asocia con la fracción de caseína (Dael y col., 1992).

Hoy en día, se considera de mejor calidad alimenticia la leche de cabra comparada a la leche de vaca, en cuanto a su composición mineral, no solo de los minerales proporcionados, sino también por la utilización del organismo,

tanto en procesos digestivos como metabólicos (Park y col., 1986; Barrionuevo y col., 2002; Campos y col., 2003; López-Aliaga y col., 2003; Alférez y col., 2006).

2.5.3.5. COMPOSICIÓN VITAMÍNICA DE LA LECHE DE CABRA

El único inconveniente de este tipo de leche en comparación con la leche de vaca y la humana es el bajo contenido en ácido fólico (vitamina B₉) de la leche de cabra. La leche de la vaca contiene cinco veces más vitamina B₁₂ que la leche de cabra (Mehala y Al-Kahnai, 1989; Chacón, 2004; USDA, 2004; Haenlein, 2004; Chacón, 2005; Haenlein, 2007). Algunos casos descritos de anemia megaloblástica (patología asociada al déficit de esta vitamina) en niños de 3 a 12 meses alimentados exclusivamente con leche de cabra, fue una de las razones del descrédito que sufrió la leche caprina en los años 60 y 70 (Sullivan y col., 1966). Esta carencia se debe a una glicoproteína que presenta la capacidad de unir el ácido fólico y que no se encuentra en la leche de vaca (Chandan y col., 1992).

Sin embargo, la leche de cabra contiene niveles más altos de vitaminas del grupo B que la leche de vaca, excepto, las **vitaminas B₆** y **B₁₂** que están en menor cantidad (Jauber y Kalantzopoulos, 1996). Igual ocurre para el contenido en **vitamina D** y **ácido nicotínico** que también es superior en la leche de cabra.

Hay que destacar de la leche de cabra su elevado contenido en **vitamina A** (2.074 que contiene la leche de cabra frente a 1.560 UI. de la leche

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

Estudios en niños han demostrado que los resultados obtenidos en cuanto a ganancias de peso, aumento en la estatura, mineralización esquelética, densidad de hueso y contenido de vitaminas en sangre (vitamina A, niacina, tiamina, riboflavina y niacina) son superiores cuando se da una alimentación con leche de cabra (American Dairy Goat Association, 2004).

Tabla 6. Composición vitamínica (Chandan y col., 1992; O'Connor, 1994)

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

2.5.3.6. FACTORES BIOACTIVOS

La leche de cabra también es más rica en nucleótidos. Al contrario de lo que ocurre con las **poliaminas** (espermidina, espermina y putrescina), compuestos presentes en la leche de mamíferos, importantes en el desarrollo intestinal de neonatos, siendo este muy similar en las leches caprina y bovina. En el calostro de la leche de vaca, la concentración de espermina y espermidina es máxima, y durante el primer mes de lactancia, la concentración de estas sustancias disminuye y permanece baja hasta el final de la lactancia (Martínez-Férez, 2004).

Por el contrario, la concentración de poliaminas en la leche de cabra permanece estable durante todo el periodo de lactación (a excepción de la putrescina que disminuye durante las primeras semanas) y siempre los niveles son superiores a los de la leche de vaca (Ploszaj y col., 1997). Este patrón de secreción es parecido al que ocurre en la leche humana.

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

Se destaca el hecho de que la leche de cabra, a diferencia de las otras leches, contiene solo cantidades trazas del ácido orótico, el cual se ha asociado con el síndrome del hígado graso (American Dairy Goat Association, 2004). El **ácido orótico** es un producto intermedio de la biosíntesis de los nucleótidos de pirimidina, y en la leche de vaca se encuentra en cantidades de 73 mg/L (Belitz y Grosch, 1997). Muy bajas cantidades de fosfatasa alcalinas y ácido N-acetilneuramínico son muy características en la leche de cabra (Haenlein, 2007). No obstante por su bajo nivel, la fosfatasa alcalina de la leche de cabra, puede emplearse como un parámetro adecuado para evaluar la calidad del proceso de pasteurización (Chacón, 2005).

La leche de cabra no se relaciona con la controvertida hormona del crecimiento Bovino conocida como rBGH o BST. Actualmente existen posiciones encontradas sobre el efecto de esta hormona en vacas inyectadas con el objetivo de mejorar el rendimiento lechero. Algunas fuentes afirman mientras que otras desmienten que se genera un marcado incremento del Factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) en la leche de vacas tratadas con rBGH, y que estos niveles anormales pueden estar asociados con varios tipos de cáncer en seres humanos (Chacón, 2005).

A la leche de cabra se le atribuyen propiedades anticancerígenas dado su contenido de **Coenzima Q** y de **ácido linolénico conjugado**. Además se le considera útil para combatir problemas sexuales y la dispepsia en la mujer embarazada (Chacón, 2005).



3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se han empleado 180 ratas macho (*Ratus norvegicus*, raza Wistar albina), recién destetadas, procedentes del Servicio de Animales de Laboratorio de la Universidad de Granada. Los protocolos de manejo, cuidado y sacrificio de animales empleados fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de Granada y de acuerdo con las directrices comunitarias de la Unión Europea.

Tras el destete, las ratas son divididas en dos grupos experimentales. La ferropdeficiencia es inducida en uno de los grupos por la técnica desarrollada previamente por nuestro grupo de investigación (Pallarés y col., 1993): las ratas son sometidas a un periodo pre-experimental (**PPE**) de 40 días, en los cuales se les suministra dieta estándar AIN-93G (Reeves y col., 1993), pero con bajo contenido en Fe (5 mg Fe/kg dieta). La dieta baja en Fe utilizada para inducir la anemia se obtuvo omitiendo el Fe del suplemento mineral de la dieta. El grupo control recibió la misma dieta, pero con un contenido normal en Fe (45 mg Fe/kg dieta) (Reeves y col., 1993).

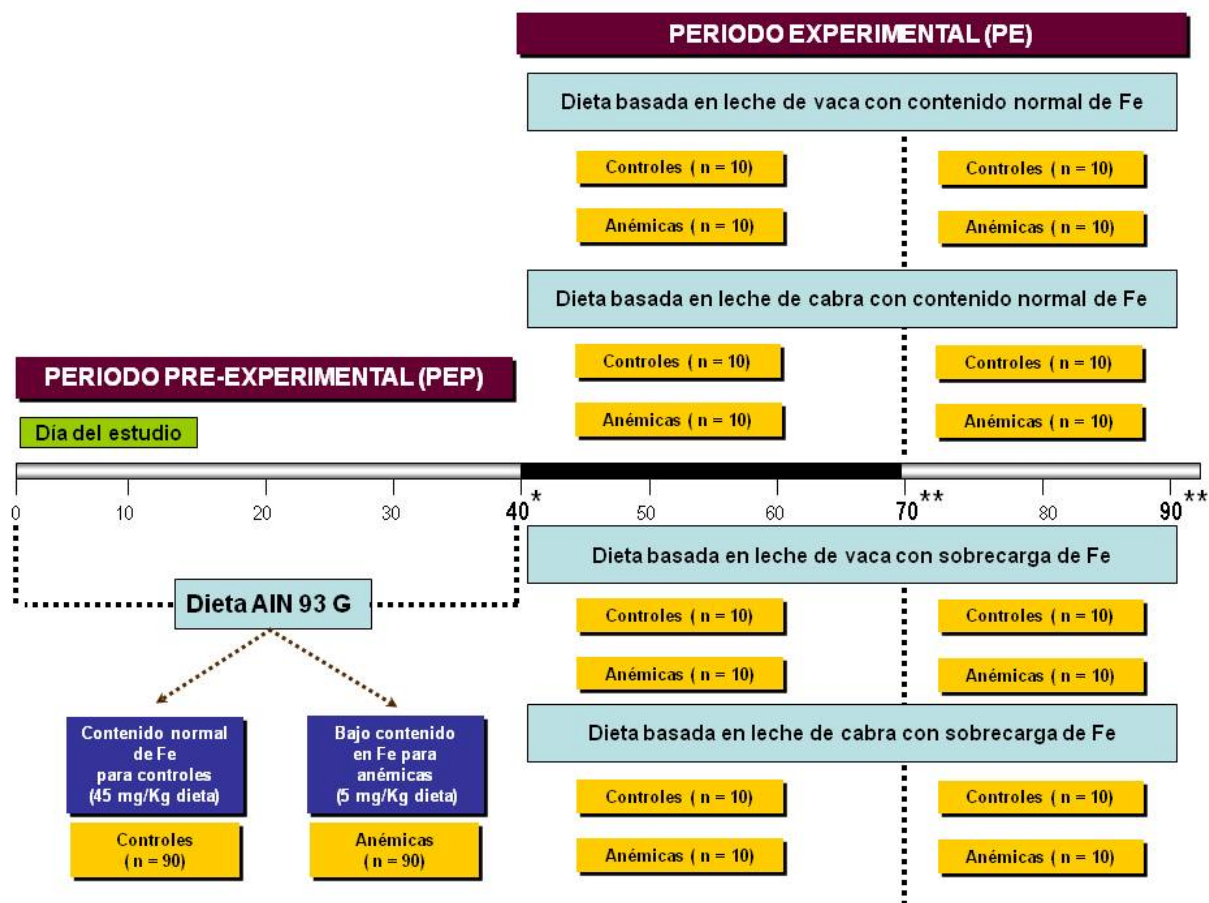
Desde el comienzo del estudio, las ratas fueron alojadas en células individuales de metabolismo. Estas células se encuentran situadas en una habitación aireada y termorregulada ($21 \pm 2^{\circ}\text{C}$) con fotoperíodo controlado de 12 horas (luz-oscuridad) y un 55-60% de humedad. La dieta y el agua bidestilada estaba disponible “*ad libitum*” para todas las ratas. En el día 40 del

PPE, se toman muestras de sangre periférica de la vena caudal para el control hematológico de la anemia y evaluar la estabilidad del ADN mediante ensayo *comet* en ambos grupos de animales. Además se sacrifican 10 animales por grupo (10 controles y 10 anémicos) siguiendo el Protocolo del Comité de Ética de la Universidad de Granada. Se anestesia al animal con pentobarbital sódico (Sigma Diagnostics, St Louis, MI, USA) a una dosis de 5 mg/100 g de peso por vía intraperitoneal y tras laparatomía media se extrae el hígado, se lava con solución salina (NaCl al 0.9%) y se conserva congelado a -40°C para evaluar posteriormente el contenido de Fe hepático y relación hepatosomática.

Tras el PPE, el resto de animales (n=160) se sometieron a un periodo experimental (**PE**) en el cual, los grupos controles y anémicos eran divididos en cuatro subgrupos, alimentados durante 50 días con 4 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). 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). La estabilidad del ADN fue evaluada mediante ensayo *comet alcalino*, tras toma de muestra sanguínea de la vena caudal, después de 30 y 50 días del suministro de las dietas ensayadas. Posteriormente, los animales son sacrificados (siguiendo el Protocolo del Comité de Ética de la Universidad de Granada) en cada periodo experimental (n=80) en el día 70 y el resto (n=80) en el día 90. Se anestesian los animales con pentobarbital sódico (Sigma Diagnostics, St Louis, MI, USA) a una dosis de 5 mg/100 g de peso por vía intraperitoneal y tras laparatomía media se extrae el hígado, se lava con solución salina (NaCl al 0.9%) y se conservan congelados a -40°C para calcular posteriormente la

relación hepatosomática y contenido de Fe hepático. La figura 16 muestra el diseño experimental del estudio.

Figura 16. Diseño experimental del estudio



* Toma de sangre de la vena caudal para el control hematológico de la anemia y ensayo *comet alcalino*. Sacrificio de 10 animales por grupo para extirpación de hígado y cálculo de contenido de Fe hepático e índices hepatosomáticos.

** Toma de sangre de la vena caudal para el ensayo *comet alcalino*. Sacrificio de los animales para extirpación de hígado y cálculo de contenido de Fe hepático e índices hepatosomáticos.

3.2. DIETAS ENSAYADAS

La Tabla 7 muestra la composición de las dietas ensayadas durante el PPE y PE.

Tabla 7. Dietas ensayadas durante el PPE y PE

Componente	Cantidad (g/kg)
PPE	
Dieta AIN 93 G (contenido normal o bajo contenido en Fe)^a	
Caseína	200
Aceite de Oliva Virgen	100
Almidón de trigo	501
Ingredientes constantes ^b	199
PE	
Dietas con leche de vaca (contenido normal o sobrecarga de Fe)^c	
Proteína de leche de vaca	200
Lactosa de leche de vaca	353
Grasa de leche de vaca	100
Almidón de trigo	148
Ingredientes constantes ^b	199
Dietas con leche de cabra (contenido normal o sobrecarga de Fe)^c	
Proteína de leche de cabra	200
Lactosa de leche de cabra	341
Grasa de leche de cabra	100
Almidón de trigo	160
Ingredientes constantes ^b	199

Leyenda de la Tabla 7:

^a 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).

^b Los ingredientes constantes (g/kg dieta) fueron: fibra (celulosa micronizada) 50, sacarosa 100, Cloruro de colina 2.5, L-cistina 1.8, corrector mineral 35, corrector vitamínico 10. El **corrector vitamínico** se preparó de acuerdo a las directrices del Instituto Americano de nutrición (Reeves y col., 1993). El **corrector mineral** se preparó de acuerdo a las recomendaciones del Instituto Americano de Nutrición (Reeves y col., 1993) para las dietas en el PEP. Para las dietas basadas en leche de cabra y vaca empleadas en el PE se formularon correctores minerales específicos teniendo en cuenta el contenido mineral que aportaban las leches para alcanzar las citadas recomendaciones.

^c Contenido de Fe en la dieta durante el PE: Las dietas se prepararon de acuerdo a las recomendaciones del del Instituto Americano de Nutrición (Reeves y col., 1993) para los grupos control (45 mg/kg dieta) y con elevado contenido en Fe (450 mg/kg dieta) para los grupos de sobrecarga (Raja y col., 1994).

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 usadas durante PEP 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 vaca (raza Holstein) o cabra (raza Murciano-Granadina). Se tomaron las cantidades necesarias de leche en polvo de cabra o vaca para obtener una dieta con un 20% de proteína (553.71 g/kg dieta de leche de cabra y 570.13 g/kg dieta de leche de vaca). Puesto que el contenido de grasa en la dieta era indetectable (< 0.01%, debido a que se trata de leches desnatadas), esta se añadió para conseguir una dieta con un 10% de grasa. La grasa se obtuvo por purificación de nata o mantequilla (de cabra o vaca, respectivamente). Ambos tipos 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. 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: 39.6 (dieta basada en leche de vaca) y 40.5 (dieta basada en leche de cabra).

-Dietas con sobrecarga de Fe: 481.87 (dieta basada en leche de vaca) y 476.44 (dieta basada en leche de cabra).

3.3. TÉCNICAS ANALÍTICAS

3.3.1. MATERIA SECA

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

3.3.2. MATERIA GRASA

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

3.3.3. CONTENIDO PROTEICO

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

3.3.4. MINERALIZACIÓN POR VÍA HÚMEDA

Un gramo de muestra (hígado y dietas) en sustancia seca se coloca 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°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 mL en un matraz aforado. Como resultado final obtenemos una solución transparente que se emplean en la posterior determinación de minerales.

3.3.4.1. DETERMINACIÓN DE HIERRO

Las concentraciones de Fe en el hígado y en las dietas se determinan por espectrofotometría de absorción atómica (EAA) (PERKIN ELMER 1100B, Norwalk, USA) a partir de una muestra adecuada, previamente mineralizada por vía húmeda y diluida convenientemente, comparándose frente a una serie de patrones de concentración conocida. En la espectroscopia 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.

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

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

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

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

3.3.6. FERRITINA SÉRICA

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

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

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

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

3.3.8. DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DEL MATERIAL GENÉTICO MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GEL DE CÉLULAS AISLADAS (ENSAYO COMET ALCALINO)

La técnica usada en nuestro estudio es el Ensayo *Comet Alcalino* (Alkaline single-cell gel electrophoresis). De forma general, el ensayo *comet alcalino* cursa con varias fases comenzando con el aislamiento de las células, incorporación de éstas en agarosa, lisis con detergente y un alto contenido en sales, tratamiento alcalino para desenmarañar las hebras de ADN, electroforesis, neutralización, tinción y cuantificación.

Aislamiento de linfocitos de sangre periférica

Se utilizan portas de cristal donde se depositan 85 μL de agarosa HMP (High Melting Point) al 1% en PBS que es desecada previamente en la estufa a 40° C. De esta manera se consigue que las sucesivas capas de agarosa queden

fijadas al portaobjetos. Una vez desecada, se depositan 85 μ l de agarosa HMP al 1% en PBS a 37°C y pH= 7.4. Se coloca un cubreobjetos y se deja el porta en la nevera (5 minutos) para que solidifique. Se retiran los cubres después de la solidificación.

Para el aislamiento de los linfocitos se toman 50 μ L de sangre periférica de la vena caudal y se introducen en un eppendorf con EDTA como anticoagulante y completando hasta un volumen final de 1 mL con medio de cultivo RPMI 1640 (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, USA) suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal (Gibco, Scotland, UK).

Posteriormente se depositan suavemente en el fondo del eppendorf 100 μ l de Histopaque-1077-1 y se centrifuga a 200 g durante 3 minutos (4° C y oscuridad). A continuación se procede al lavado de las células (retirada del Histopaque que es tóxico para los linfocitos), para ello se recogen los 100 μ l de la interfase rosa (corresponde a linfocitos) y se llevan a un tubo eppendorf con 900ml de PBS (37°C y pH=7.4), volviendo a centrifugar a 200 g durante 3 minutos (4° C y en oscuridad).

Inclusión de linfocitos en agarosa

Cuando se procede a la inclusión de linfocitos en agarosa se ha de recoger la mayor cantidad de células que se encuentran en una de las paredes del tubo. Para ello se pipetea 85 μ l de agarosa LMP (Low Meeting Point) al 1% precalentada a 37° C, y se mezclan con las células; esta mezcla se ha de depositar en la capa de agarosa HMP que se elaboró en el primer paso.

Lisis de las membranas celulares con detergente

Para conseguir la ruptura de las membranas celular y nuclear, se colocan los portas en solución de lisis [2.5 M NaCl, 10 mM Tris, 100 mM Na₂EDTA, NaOH to pH=10 y 1% (v/v) Triton X-100 (Sigma Diagnostics, St. Louis, MI, USA)] durante al menos 1 hora, con lo cual se consigue que se desestructuren las membranas plasmáticas y se eliminan las proteínas celulares, así queda al descubierto el nucleoide con el material genético, donde finalmente se evalúa el daño.

Tratamiento alcalino

Posteriormente, los portas se colocan de forma ordenada (asegurando el contacto entre ellos, para que la migración de los fragmentos de ADN sea correcta) en una cubeta de electroforesis que contiene tampón alcalino (0.3 M NaOH y 1 mM Na₂EDTA) durante 40 minutos a 4° C, con el fin de que se produzca la desnaturalización o separación de las cadenas de ADN.

Electroforesis en gel de las células aisladas

Transcurridos los 40 minutos de tratamiento alcalino, se inicia el proceso de electroforesis durante 30 minutos a un voltaje constante de 25 V y 300 mA, donde el ADN migra hacia el ánodo, en cantidad y velocidad dependiente del número de lesiones existentes en la doble hélice.

Neutralización

Una vez terminada la electroforesis, se necesita neutralizar el álcali de los geles lavando los portaobjetos con una tampón adecuado (0.4M Tris base a

pH 7.5). Se someten a tres lavados consecutivos de 5 minutos cada uno manteniendo la temperatura de 4° C y oscuridad.

Tinción y cuantificación del ensayo mediante microscopía y software

Finalizado el proceso de neutralización, se realiza la tinción de las muestras colocando una alícuota de 20 µL de 4,6–diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro (DAPI) en cada gel a una concentración de 5 µg/mL.

Los nucleoides teñidos con DAPI se examinan bajo un microscopio-UV Leica DMLS (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) con filtro de excitación de 435nm, y amplificador de 400. El análisis se realizó con una cámara Hitachi (Satandard Video with Meteor II) empleando el software para imágenes Kinetic Imaging Komet 5.5 (Kinetic Imaging Ltd, Liverpool, UK). Se contabilizaron un total de 100 *comets* por cada gel (seleccionados al azar en diversos campos). Los parámetros usados para la cuantificación del daño en el ADN han sido: el porcentaje de fluorescencia en la cola del *comet* (representando la fracción de ADN en la misma), porcentaje de ADN en la cabeza (representando la fracción del material genético en la misma) y el *Olive Tail Moment* (definido como el producto de la longitud de la cola del *comet* y la fracción de ADN en la misma, $OTM = [\text{Media de la cola} - \text{Media de la cabeza}] \times \% \text{ ADN en cola}/100$). El OTM es un buen índice para cuantificar el daño en el ADN, porque evalúa no sólo que cantidad de ADN ha migrado desde la región de la cabeza, sino que además indica la distancia que ha recorrido ese fragmento de ADN.

Figura 17. Esquema simplificado de las diferentes fases del Ensayo

Comet Alcalino

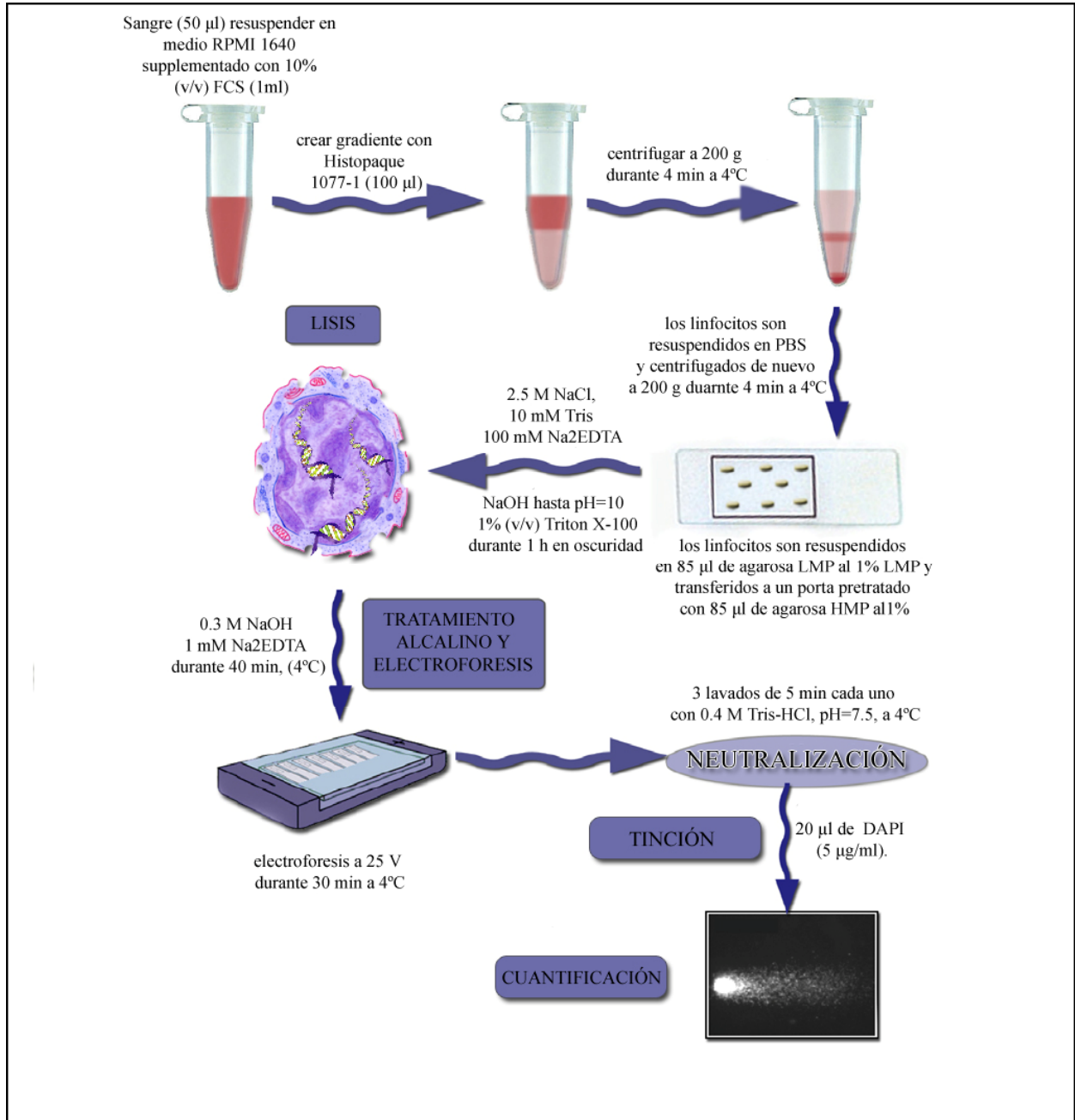
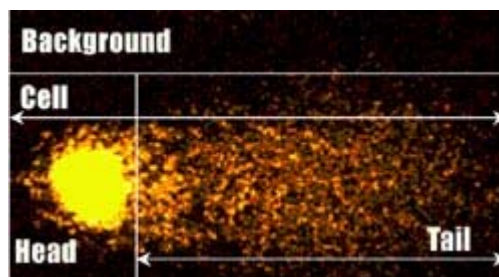


Figura 18. Representación de los índices empleados para la determinación del OTM



3.3.9. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Los datos se presentan como valor medio \pm EEM. Para comprobar las diferencias entre grupos (controles vs. anémicas, y contenido normal de Fe vs. sobrecarga de Fe) se usa el test de la “*t de Student*” para muestras independientes. Se usa el análisis de la varianza (One-Way ANOVA) para comparar las diferentes dietas suministradas a los dos grupos de animales (controles y anémicas) durante el PE. Las medias individuales se compararon usando el test “*post hoc*” de Tukey, cuando los efectos principales y sus interacciones resultaban significativas. Los datos fueron analizados mediante three-way ANOVA para determinar los efectos de la anemia, tipo de dieta y sus interacciones (dieta x anemia, dieta x contenido de Fe, anemia x contenido de Fe, dieta x anemia x contenido de Fe). Las diferencias son consideradas significativas para todos los tratamientos estadísticos a un nivel de $P < 0.05$. Todos los análisis se han efectuado con el paquete estadístico “*Statistical Package for Social Sciences*” (SPSS, versión 15.0).

A decorative banner featuring various scientific and health-related icons. On the left, there is a colorful fish, a white bottle of milk, and a glass of milk. In the center, a blue DNA double helix is shown with red and yellow spheres. To the right of the DNA, there are two red pills and two yellow pills. The background includes green horizontal lines, plus signs, and a small airplane icon on the right side.

Resultados y discusión

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. 1.PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS EN EL PPE

En ratas controles, todos los parámetros hematológicos estudiados (recuento de hematíes, VCM, hematocrito, plaquetas, Hb, Fe sérico, ferritina sérica, porcentaje de saturación de la transferrina y TIBC) están dentro de los límites normales para esta especie al comienzo y al final del periodo principal de la experiencia. Después de consumir una dieta con bajo contenido en Fe durante 40 días (PPE), las ratas eran anémicas, con una concentración de Hb media de 77.3 ± 2.6 g/L. Además, el hematocrito, el Fe sérico, ferritina sérica y la saturación de la transferrina eran bajos ($P < 0.001$), mientras que los niveles de plaquetas y TIBC estaban marcadamente elevados ($P < 0.001$), debido a la depleción progresiva de Fe desde los depósitos corporales (tabla 8). Todos estos hallazgos eran esperados y consistentes con la anemia ferropénica severa inducida experimentalmente tras 40 días de privación de Fe en la dieta.

Tabla 8. Parámetros hematológicos de ratas controles y anémicas en el día 40 del PPE (datos expresados como media \pm error estándar de la media)

Parámetro hematológico	Dieta	
	Contenido normal en Fe grupo control	Bajo contenido en Fe grupo anémico
Fe sérico ($\mu\text{g/L}$)	1387 \pm 122	699 \pm 56 *
Concentración de Hb (g/L)	127.7 \pm 2.7	77.3 \pm 2.6 *
Glóbulos rojos ($10^{12}/\text{L}$)	7.1 \pm 0.15	6.47 \pm 0.17 *
Hematocrito (%)	38.8 \pm 0.76	27.5 \pm 0.48 *
Plaquetas ($10^9/\text{L}$)	737 \pm 24.5	1361 \pm 67.2 *
VCM (fL)	55.2 \pm 0.2	39.3 \pm 0.7 *
Ferritina sérica ($\mu\text{g/L}$)	82.5 \pm 2.7	50.1 \pm 1.3 *
Saturación transferrina (%)	47.5 \pm 7.2	3.7 \pm 0.3 *
TIBC ($\mu\text{g/L}$)	2842 \pm 202	17899 \pm 731 *

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

4.2. PESO CORPORAL, HEPÁTICO, RELACIÓN HEPATOSOMÁTICA Y CONTENIDO DE HIERRO EN HÍGADO EN EL PPE

El hígado es el principal órgano de almacén de Fe en el organismo, y no es sorprendente la hepatotoxicidad como una consecuencia principal de la sobrecarga de Fe, dado el papel crucial que juega este tejido en la homeostasis de dicho mineral. Los niveles de Fe en hígado pueden ser considerados por tanto

un reflejo del estatus de Fe en el organismo (Ramm y Ruddell, 2005; Nemeth y Ganz, 2006).

Tabla 9. Contenido de Fe en hígado en el día 40 del PPE (datos expresados como media \pm error estándar de la media)

Grupo experimental	Contenido de Fe en hígado
Controles	796.47 \pm 39.42
Anémicas	555.02 \pm 43.11*

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

Como se puede observar en el día 40 del PEP (tabla 9), las diferencias entre ratas controles y anémicas ($P < 0.001$) revelan que los depósitos de Fe hepáticos se encuentran deplecionados, indicando que se ha alcanzado una severa ferropdeficiencia inducida por el consumo de una dieta con bajo contenido en Fe (Nemeth y Ganz, 2006).

Tabla 10. Peso corporal, hepático y relación hepatosomática de ratas controles y anémicas en el día 40 del PPE (datos expresados como media \pm error estándar de la media)

Grupo experimental	Peso corporal (g)	Peso hígado (g)	Peso hígado/Peso corporal (%)
Controles	298.4 \pm 7.8	7.926 \pm 0.25	2.60 \pm 0.06
Anémicas	270.2 \pm 7.5 *	7.598 \pm 0.33	2.79 \pm 0.09 *

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

Los efectos de la anemia ferropénica nutricional tras 40 días de suministro de una dieta con bajo contenido en Fe sobre el peso corporal y hepático se muestran en la tabla 10. El peso corporal de las ratas anémicas fue significativamente menor ($P < 0.01$), mientras que el peso hepático descendió ligeramente en ratas anémicas comparadas con las controles. Como consecuencia, la relación hepatosomática (peso hígado/peso corporal) fue significativamente más alta ($P < 0.01$) en los animales ferrodeficientes.

4. 3. ESTABILIDAD DEL MATERIAL GENÉTICO EN EL PPE

El daño oxidativo en el ADN de linfocitos de sangre periférica (evaluado como rupturas de la doble hélice) se muestra en las figuras 19 y 20. Bajo nuestras condiciones experimentales, no se encontraron diferencias significativas entre ratas controles y ferrodeficientes, como se pone de

manifiesto por el porcentaje de ADN en cabeza (90.77 ± 0.697 en ratas controles vs. 88.23 ± 0.505 en ratas ferropdeficientes), cola (9.23 ± 0.697 en ratas controles vs. 11.76 ± 0.505 en ratas ferropdeficientes) (figura19) y OTM (0.155 ± 0.021 en ratas controles vs. 0.141 ± 0.016 en ratas ferropdeficientes) (figura 20).

Figura 19. Porcentaje de fluorescencia en cabeza y cola (representando el porcentaje de ADN en cabeza y cola) en linfocitos de sangre periférica de ratas controles y anémicas

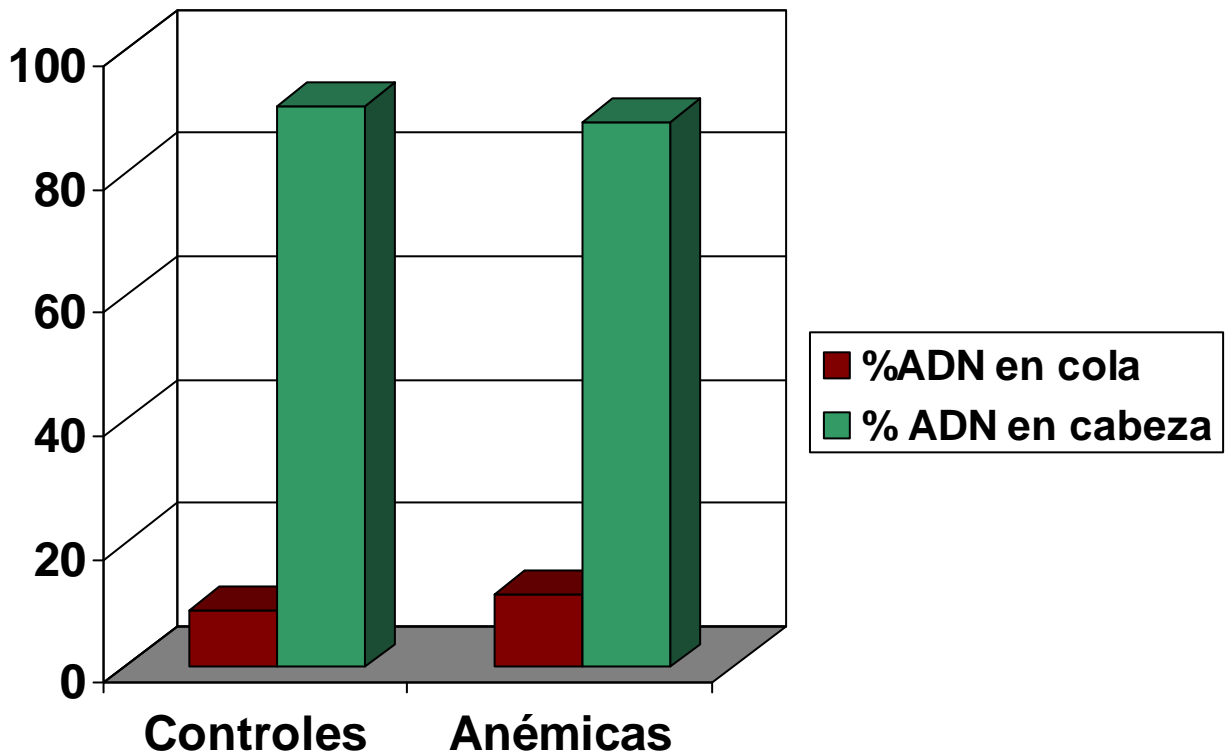
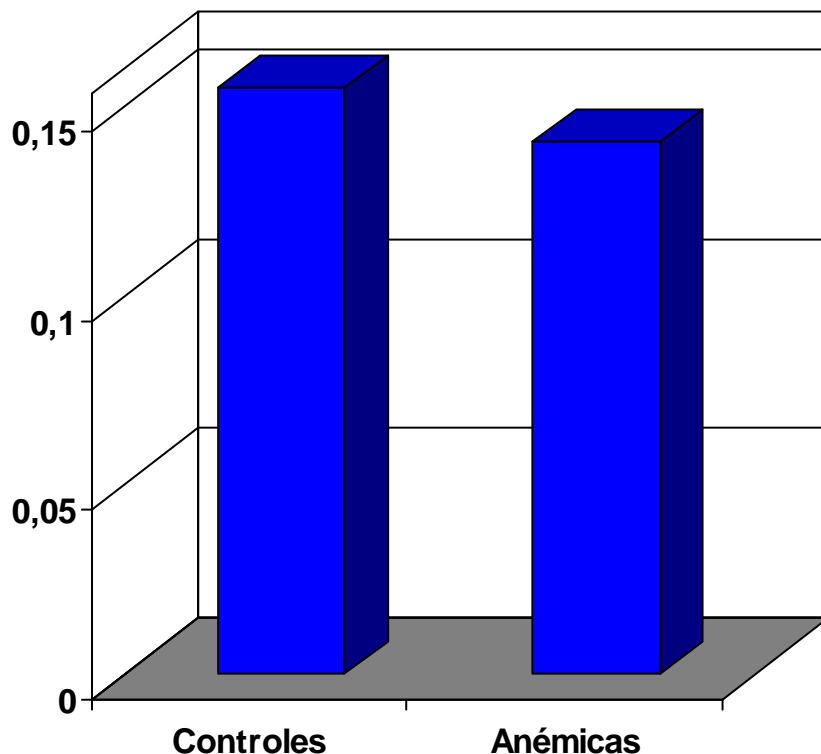


Figura 20. OTM de linfocitos de sangre periférica en ratas controles y anémicas



Las funciones fisiológicas y la integridad de las estructuras celulares pueden verse alteradas a través de la reactividad de los radicales libres. El organismo posee una maquinaria enzimática que trabaja eliminando y neutralizando estas dañinas especies. El balance entre prooxidantes y antioxidantes puede verse alterado en diversas condiciones patológicas, dependiendo del estrés oxidativo producido así como de la integridad del sistema de defensa antioxidante (Vives Corrons y col., 1995; Kumerova y Col., 1998; Aslan y col., 2006). Además los metales de transición, particularmente el Fe, reaccionan con peróxido de hidrógeno en el núcleo celular generando

radicales libres del oxígeno y el consiguiente daño al ADN (Aust y Eveleigh, 1999).

Varios autores, defienden que la actividad de la GSH-Px en situación de anemia es similar a la de células normales (Acharya y col., 1991; Isler y col., 2002; Díaz-Castro y col., 2008). La GSH-Px está implicada en la reducción de peróxidos que pueden dañar los ácidos grasos poliinsaturados, por tanto previene la peroxidación lipídica así como la degradación de los fosfolípidos de membrana y la consiguiente formación de TBARS (Meister y Anderson, 1983). Díaz-Castro y col. (2008) encontraron que la producción de TBARS era similar en citosoles hepáticos de ratas anémicas y ferodeficientes, sugiriendo que la capacidad antioxidante hepática es normal, probablemente debido al estado adecuado de la defensa enzimática antioxidante. Un estado antioxidante adecuado, junto con una insuficiente cantidad de Fe disponible, ejercería un efecto protector en el animal, evitando la generación de radicales libres catalizados por Fe a través de las rutas de Fenton y Haber-Weiss.

La ferodeficiencia induce cambios en la homeostasis celular de Fe. Un aporte insuficiente de Fe en la dieta produce un incremento en la actividad de la proteína IRP1 hepática, lo cual incrementa la síntesis del receptor de transferrina (TfR) y disminuye la actividad aconitasa mitocondrial (Chen y col., 1997). La disminución de la actividad aconitasa mitocondrial puede prevenir la liberación de oxidantes procedentes de la mitocondria por disminución del suministro de equivalentes reductores a la cadena de transporte electrónico. El flujo electrónico reducido puede ser uno de los mecanismos por los cuales la

célula se protege del estrés oxidativo en situación de anemia (Chen y col., 1997). Además, el exceso de Fe promueve la generación de radicales del oxígeno (especialmente radicales hidroxilo a través de la vías de Fenton y Haber-Weiss), los cuales pueden causar daño oxidativo así como degeneración del ADN, provocando la fragmentación y desestabilización de la doble hélice (Aust y Eveleigh, 1999), por tanto la ferropenia podría ejercer un efecto protector, evitando al menos en parte, la generación de radicales libres y el consiguiente daño en el ADN. Además, Cragg y col. (1998) examinaron los efectos del peróxido de hidrógeno en células HepG2. Estos autores demostraron que la sobrecarga de Fe incrementaba enormemente el daño en el ADN inducido por peróxido de hidrógeno y que un quelante de Fe (desferritocina) ejercía un efecto protector en las células, hechos que apoyan nuestros hallazgos en relación a la estabilidad del ADN en linfocitos de sangre periférica.

4.4. CONTENIDO DE HIERRO HEPÁTICO EN EL PE

En el día 70 del estudio se aprecian diferencias significativas en el contenido de Fe hepático ($P < 0.001$), siendo mayor en animales controles que en anémicos alimentados con las dietas basadas en leche, debido a la severa ferropenia inducida en las ratas durante el PPE. El contenido de Fe hepático es mucho mayor en ratas controles puesto que los depósitos estaban muy deplecionados en ratas anémicas (Muñoz y García-Erce, 2009). El menor contenido de Fe en hígado, observado en pacientes con anemia ferropénica se debe a la disminución de la hepcidina hepática (Theur y col., 2009).

Tabla 11. Contenido de Fe en hígado ($\mu\text{g/g ss}$) de ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche de cabra o vaca, con un contenido normal o sobrecarga de Fe en el día 70 y 90 del estudio (datos expresados como valor medio \pm error estándar de la media)

Día del estudio y contenido de Fe en la dieta	Dieta basada en leche de cabra		Dieta basada en leche de vaca		Valor de P (three-way ANOVA)							
	Grupo Control	Grupo Anémico	Grupo Control	Grupo Anémico	Dieta* (D)	Anemia (A)	Dieta x Anemia (D x A)	Sobrecarga de Fe (S)	A x S	D x S	D x S x A	
Día 70	(Fe normal)	627.10 \pm 35.22a	450.04 \pm 23.14cA	562.93 \pm 28.31b	418.81 \pm 29.28cA	<0.05	<0.001	<0.01				
	(sobrecarga)	1097.59 \pm 36.91Ca	786.97 \pm 22.96cCA	999.47 \pm 35.20Ca	710.76 \pm 42.16cCA	<0.05	<0.01	<0.05	<0.001	<0.01	<0.001	<0.01
Día 90	(Fe normal)	623.74 \pm 31.66a	580.05 \pm 31.55A	617.99 \pm 33.27a	567.13 \pm 23.19cA	NS ¹	<0.01	<0.01				
	(sobrecarga)	919.97 \pm 32.00Ca	1045.85 \pm 33.05CA	944.32 \pm 33.61Ca	934.06 \pm 28.48BC	<0.05	<0.05	NS ¹	<0.001	<0.01	<0.01	<0.05

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

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

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

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

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

Interacciones: D x A, A x S, D x S y D x S x A

¹NS, no significativo.

Los efectos de la sobrecarga a nivel hepático se aprecian en ambos periodos 70 y 90 días ($P < 0.001$), hecho que pone de manifiesto que se había alcanzado la sobrecarga, si bien, como es lógico las diferencias se hacen más acusadas al final del estudio (día 90), debido a la sobrecarga crónica (Feder y col., 1998; Breuer y col., 2000; Hider, 2002; Esposito y col., 2003).

Por último y dado que los animales han recibido dietas con contenido normal o sobrecarga de Fe, las diferencias entre los grupos controles y anémicos desaparecen al final del estudio, debido a que los depósitos han sido completamente replecionados.

4. 5. ESTABILIDAD DEL MATERIAL GENÉTICO EN EL PE

El daño oxidativo en el material genético durante el PE (determinado como fracturas en la doble hélice mediante ensayo *comet alcalino*) se muestra en las tablas 12 (día 70 del estudio) y 13 (día 90 del estudio).

Tabla 12. Parámetros de estabilidad del ADN en ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche de cabra o vaca, con contenido normal o sobrecarga de Fe en el día 70 del estudio (datos expresados como valor medio \pm error estándar de la media)

Parámetro de estabilidad del material genético y contenido de Fe en la dieta	Dieta basada en leche de cabra		Dieta basada en leche de vaca		Valor de <i>P</i> (three-way ANOVA)						
	Grupo Control	Grupo Anémico	Grupo Control	Grupo Anémico	Dieta* (D)	Anemia (A)	Dieta x Anemia (D x A)	Sobrecarga de Fe (S)	A x S	D x S	D x S x A
% ADN en cabeza (Fe normal)	95.37 \pm 0.278 a	94.42 \pm 0.289 cA	87.90 \pm 0.317 b	86.63 \pm 0.477 cB	<0.001	<0.05	<0.001				
(sobrecarga)	85.31 \pm 1.826 C	80.97 \pm 1.424 CA	83.04 \pm 1.811C	74.73 \pm 1.522 cCB	<0.01	<0.05	<0.01	<0.001	<0.01	<0.001	<0.05
% ADN en cola (Fe normal)	4.63 \pm 0.278 a	5.58 \pm 0.289 cA	12.10 \pm 0.317 b	13.37 \pm 0.477 cB	<0.001	<0.05	<0.001				
(sobrecarga)	14.69 \pm 1.826 C	19.03 \pm 1.424 CA	16.96 \pm 1.811C	25.27 \pm 1.522 cCB	<0.01	<0.05	<0.01	<0.001	<0.01	<0.01	<0.05
OTM ¹ (Fe normal)	0.064 \pm 0.003 a	0.077 \pm 0.003 cA	0.117 \pm 0.006 b	0.136 \pm 0.006 cB	<0.001	<0.05	<0.001				
(sobrecarga)	0.067 \pm 0.008 a	0.082 \pm 0.018 A	0.167 \pm 0.025 b	0.154 \pm 0.022B	<0.01	<0.05	<0.01	NS ²	<0.05	NS ²	<0.05

¹OTM, olive tail moment.

²NS, no significativo.

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

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

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

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

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

Tabla 13. Parámetros de estabilidad del ADN en ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche de cabra o vaca, con contenido normal o sobrecarga de Fe en el día 90 del estudio (datos expresados como valor medio \pm error estándar de la media)

Parámetro de estabilidad del material genético	Dieta basada en leche de cabra		Dieta basada en leche de vaca		Valor de P (three-way ANOVA)						
	Grupo Control	Grupo Anémico	Grupo Control	Grupo Anémico	Dieta* (D)	Anemia (A)	Dieta x Anemia (D x A)	Sobrecarga de Fe (S)	A x S	D x S	D x S x A
% ADN en cabeza (Fe normal)	95.00 \pm 0.177 a	93.98 \pm 0.262 cA	91.64 \pm 0.191 b	89.98 \pm 0.240 cB	<0.001	<0.05	<0.001				
(sobrecarga)	84.32 \pm 1.401C	87.97 \pm 1.001 CA	80.01 \pm 1.537 C	83.90 \pm 1.271 CB	<0.01	NS ²	<0.05	<0.001	<0.01	<0.001	<0.01
% ADN en cola (Fe normal)	5.00 \pm 0.177 a	6.02 \pm 0.262 cA	9.36 \pm 0.191 b	10.02 \pm 0.240 cB	<0.001	<0.05	<0.001				
(sobrecarga)	15.68 \pm 1.401C	12.23 \pm 1.001 cCA	18.99 \pm 1.537 C	16.10 \pm 1.271C B	<0.05	<0.05	<0.05	<0.001	<0.01	<0.001	<0.01
OTM ¹ (Fe normal)	0.062 \pm 0.005 a	0.065 \pm 0.003	0.059 \pm 0.002 b	0.069 \pm 0.003 c	<0.001	<0.05	<0.001				
(sobrecarga)	0.079 \pm 0.006 a	0.072 \pm 0.008 CA	0.179 \pm 0.012CB	0.159 \pm 0.008	<0.01	NS ²	<0.05	<0.01	<0.01	<0.05	<0.01

¹OTM, olive tail moment.

²NS, no significativo.

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

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

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

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

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

-Efecto de la dieta (día 70):

El daño oxidativo en el ADN durante el periodo experimental se muestra en la tabla 12. Después de 30 días del suministro de las dietas normales en Fe (día 70 del estudio), el daño intrínseco en el ADN de linfocitos de sangre periférica era mucho más bajo en ambos grupos, controles y anémicas, alimentadas con la dieta basada en leche de cabra, como se pone de manifiesto por el porcentaje de ADN en cabeza, cola y OTM, en comparación con los animales que consumen la dieta basada en leche de vaca ($P < 0.001$). En el caso de las dietas con sobrecarga de Fe, el tipo de dieta consumida no tiene influencia en la estabilidad genómica de ratas controles, como se observa por el porcentaje de ADN en cabeza y cola. Sin embargo, en ratas anémicas, se aprecia un efecto negativo en la estabilidad del ADN cuando se consume la dieta basada en leche de vaca ($P < 0.01$ para % ADN en cabeza, $P < 0.001$ para % ADN en cola y OTM), con un valor de OTM que duplica el que se encuentra para los animales que consumen la dieta basada en leche de cabra. El OTM proporciona la medida más estable para determinar el daño en el ADN en términos relativos, porque presenta un mayor grado de uniformidad en dispersiones cuartiles.

-Efecto de la anemia (día 70):

La anemia tiene un efecto negativo en la estabilidad del ADN con ambos tipos de dietas basadas en leche con contenido normal en Fe ($P < 0.05$ para todos los parámetros de estabilidad del ADN estudiados). Además, es bastante destacable que la sobrecarga de Fe en el día 70 incrementa el daño en el ADN de ratas anémicas con respecto a sus controles, cuando consumen la dieta

basada en leche de vaca ($P < 0.001$ para % ADN en cabeza y cola); sin embargo, este efecto negativo en la estabilidad del material genético no se observa cuando los animales consumen las dietas basadas en leche de cabra.

-Efectos de la sobrecarga de Fe (día 70):

La sobrecarga de Fe, como era de esperar, produce un daño en el ADN con ambos tipos de dietas tanto en animales controles como en anémicos ($P < 0.001$ para % ADN en cabeza y cola).

-Efectos interactivos (día 70):

Todos los parámetros de estabilidad del material genético estudiados están afectados por la dieta, la anemia, el contenido de Fe en las mismas y sus interacciones, excepto la sobrecarga de Fe y la interacción dieta x sobrecarga de Fe para el OTM (ver niveles de significación en tabla 12).

-Efecto de la dieta (día 90):

Al final del estudio, tras 50 días de suministro de las dietas con contenido normal de Fe (día 90 del estudio), la influencia positiva del consumo de leche de cabra sobre la estabilidad genómica, todavía es claramente apreciable. El daño intrínseco en el ADN de linfocitos de sangre periférica es todavía mucho más bajo en ratas controles y anémicas alimentadas con la dieta basada en leche de cabra ($P < 0.001$ para % ADN en cabeza y cola) en comparación con las que consumen la dieta basada en leche de vaca. Con respecto a las dietas con sobrecarga de Fe, también se observa una influencia positiva en la estabilidad del material genético, entre las ratas que consumen la

dieta basada en leche de cabra, en comparación con las que son alimentadas con leche de vaca. Este efecto es estadísticamente significativo ($P < 0.001$ para el OTM), con valores dos veces superiores en el caso de las dietas basadas en leche de vaca, que en las que consumen leche de cabra, en ambos grupos experimentales, controles y anémicas (tabla 13).

-Efecto de la anemia (día 90):

La influencia negativa en la estabilidad del ADN todavía es notable en el día 90, con ambas dietas basadas en leche con un contenido normal de Fe. Este efecto negativo es más pronunciado entre los animales que consumen las dietas basadas en leche de vaca, como revela el porcentaje de ADN en cabeza de ratas anémicas alimentadas con leche de vaca ($P < 0.001$), en comparación con las que reciben dieta basada en leche de cabra ($P < 0.01$). Sin embargo, tras el suministro de las dietas basadas en leche con sobrecarga de Fe, el efecto negativo de la anemia en la estabilidad del material genético deja de observarse.

-Efecto de la sobrecarga de Fe (día 90):

Finalmente, en el día 90, es de gran interés el hecho de que la sobrecarga de Fe no tenga efecto negativo en la estabilidad del ADN (observado en el OTM) en ninguno de los dos grupos experimentales (controles y anémicas) alimentados con la dieta basada en leche de cabra. Sin embargo, se observa que la sobrecarga de Fe tiene un efecto negativo en la estabilidad genómica de ratas controles y anémicas alimentadas con dieta basada en leche de vaca, donde el OTM alcanza valores que eran más del doble de los

encontrados para la misma dieta con un contenido normal de Fe ($P < 0.001$), revelando que el tamaño de los fragmentos de ADN y el número de fracturas en la doble hélice es mayor.

-Efectos interactivos (día 90):

En el día 90 del PE, todos los parámetros de estabilidad del ADN están afectados por la dieta, la anemia, el contenido de Fe y sus interacciones (ver significaciones en tabla 13).

El resultado más relevante del presente estudio es el papel positivo en la estabilidad genómica del consumo habitual de leche de cabra, incluso con sobrecarga de Fe, obtenido al final del estudio. Las características nutricionales altamente beneficiosas de este tipo de leche, que mejora la biodisponibilidad de Mg (Nestares y col., 2008) y Zn (Alfárez y col., 2003; Díaz-Catro y col., 2009), junto con su mejor calidad lipídica (Alfárez y col., 2001), pueden ser responsables del efecto protector contra el daño oxidativo en el ADN de linfocitos de sangre periférica.

Nuestro Grupo de Investigación ha encontrado que la leche de cabra mejora el metabolismo del Mg (Nestares y col., 2008) gracias a varias características nutricionales que favorecen el proceso digestivo, incluyendo el hecho de que su grasa es rica en triglicéridos de cadena media (MCT) y que su proteína es de origen animal y más soluble lo que favorece la absorción de dicho mineral. Además, la leche de cabra disminuye la excreción urinaria de Mg, en comparación a la leche de vaca, debido en gran parte, a la mejor

calidad proteica de la leche de cabra (López-Aliaga y col., 2003). Esta mejora en el metabolismo del Mg contribuye de manera sustancial al efecto protector sobre la estabilidad genómica, como se explica a continuación.

El ADN está continuamente expuesto a daños causados por mutágenos ambientales y por procesos endógenos, resultantes del metabolismo celular. Para mantener la frecuencia de mutaciones baja, las células han desarrollado diferentes sistemas de reparación del ADN.

La ruta NER (reparación de la escisión de nucleótidos) está principalmente involucrada en la eliminación del daño inducido en el ADN por mutágenos ambientales y el Mg es un cofactor esencial en prácticamente todos los pasos de esta ruta (Hartwig, 2001; Hanawalt, 2002).

El daño endógeno en el ADN es reparado principalmente por la ruta BER (reparación de escisión de bases), que se inicia eliminando la base modificada por una N-glicosilasa específica, que está activada por Mg (Barzilay y col., 1995). Otro ejemplo de endonucleasa Mg-dependiente en la ruta BER es la actividad endonucleasa asociada con la 5-hidroximetiluracil-ADN-glicosilasa (Frank y col., 1998; Almeida y Sobol, 2007).

El tercer sistema de reparación es la ruta MMR (reparación de errores de apareamiento), la cual contribuye enormemente a la estabilidad genómica corrigiendo errores de replicación (Ban y Yang, 1998; Neri y col., 2005). Las actividades enzimática de dos proteínas la MutS y MutL juegan un papel importante en la iniciación del proceso de reparación de errores de apareamiento. Se ha demostrado que dichas proteínas tienen un requerimiento

absoluto de Mg (Ban y Yang, 1998). Además, el Mg también se requiere para la reparación de fracturas de la doble hélice del ADN (Baechtold y col., 1999).

Por otra parte, Alférez y col., (2003) y Díaz-Castro y col., (2009) han mostrado que el consumo de leche de cabra incrementa la biodisponibilidad de Zn, con respecto al consumo de leche de vaca. Esta mejora en el metabolismo del Zn puede contribuir al efecto protector contra el daño oxidativo al ADN de la leche de cabra. Varios metales pueden interactuar con Zn en los sistemas biológicos y esta interacción puede tener efectos beneficiosos, previniendo el daño oxidativo mediado por Fe. De particular importancia es la interacción entre Fe y Zn. Uno de los mecanismos aceptados que están implicados en la acción antioxidante del Zn, un metal que no posee actividad redox, es la capacidad del Zn para competir con el Fe por múltiples sitios de unión a nivel celular. El reemplazo de Fe por Zn puede prevenir el ciclo redox del Fe, por tanto minimiza la tasa de oxidación de los grupos químicos en las cercanías de los lugares de unión del metal. En este contexto, el Zn puede reducir la oxidación lipídica, proteica y el daño oxidativo del ADN causado por Fe. En este sentido, Girotti y col. (1985) mostraron que el Zn claramente puede prevenir la oxidación lipídica mediada por Fe en hematíes.

Profundizando en la investigación de los mecanismos involucrados en la protección del Zn contra la oxidación lipídica mediada por Fe, Zago y Oteiza (2001) mostraron que el Zn actuaba en parte compitiendo con el Fe en estado ferroso por los sitios de unión cargados negativamente en la membrana celular, y estos efectos eran observados a concentraciones de Zn fisiológicas en la

membrana. La acción competitiva del Zn por el Fe en los sitios de unión celulares es particularmente importante, teniendo en cuenta que una consecuencia de la deficiencia de Zn es un marcado incremento en la concentración de Fe intracelular y en la propia membrana, lo cual puede incrementar la generación de radicales libres a esos niveles.

Además estudios *in vitro* revelan que el Zn puede reducir marcadamente el daño inducido por Fe y Cu en el material genético. La capacidad del Zn para proteger el ADN del daño oxidativo es mayor incluso contra el Fe que contra el Cu (Har-El y Chevion, 1991). Esta protección contra el daño genómico es particularmente importante puesto que el daño oxidativo al ADN, especialmente las fracturas de la doble hélice, es altamente dependiente de la cantidad de Fe unido al ADN. El Fe unido a las moléculas de ADN puede catalizar la generación de radicales hidroxilo específicos en cada sitio de unión. Este hecho apoya nuestros hallazgos con respecto a la estabilidad del ADN en ratas que consumen dietas basadas en leche de cabra, incluso en situación de sobrecarga crónica de Fe.

Por otra parte, la elevada calidad lipídica de la leche de cabra puede contribuir al efecto positivo del consumo de este tipo de leche en la estabilidad del ADN. Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) son oxidados rápidamente generando hidroperóxidos y especies reactivas del oxígeno. Estos productos de peroxidación lipídica pueden reaccionar con el ADN para formar productos derivados de eteno o malondialdehído, lo cual incidiría negativamente en el proceso de replicación, causando errores importantes durante la síntesis del

ADN (Fang y col., 1996; Nair y col., 1997). Estos autores encontraron un drástico incremento en la formación de productos eteno-ADN en linfocitos de sangre periférica de mujeres que recibían una dieta con alto contenido en PUFA. Además, resultados de estudios animales indican que el nivel de grasa en la dieta puede tener influencia en el daño oxidativo en el ADN del tejido hepático y en glándula mamaria de ratas después de sólo 2 semanas de modulación en la dieta (Djuric y col., 1992). Otros estudios más recientes han demostrado que el incremento de la ingesta de PUFA tiene como resultado un claro incremento en la peroxidación lipídica y está íntimamente relacionado con la formación de aductos de ADN (Fang y col., 1996). En este sentido, como nuestro Grupo ha mostrado (Alfárez y col., 2001), la calidad lipídica de la leche de cabra es mejor que la de vaca, puesto que la leche de cabra es más rica en triglicéridos de cadena media (MCT) y tiene un mayor contenido en carnitina (Penn y col., 1987), que a nivel mitocondrial favorece la tasa de β -oxidación (Bach y Babayan, 1985), incrementando la producción de energía derivada de los ácidos grasos (Fushiki y col., 1995; Van Zyl y col., 1996) y por tanto disminuyendo la disponibilidad de sustratos para la peroxidación lipídica, reduciendo la producción de radicales libres, hecho que una vez más incide positivamente en la estabilidad del material genético.

Se ha observado un efecto negativo en la estabilidad del ADN causado por la anemia en el día 70 del estudio con ambas dietas basadas en leche, debido a que los depósitos de Fe no estaban completamente replecionados en ese momento, pero en el día 90, tras suministrar las dietas con sobrecarga de Fe, la anemia estaba completamente recuperada y por tanto el efecto

perjudicial en la estabilidad del ADN observado en el día 70 desaparece al final del estudio. Este efecto negativo de la anemia se observa tan solo durante el proceso de repleción con Fe, ya que como se ha mencionado anteriormente (PPE), la anemia no perjudica la estabilidad genética. Este daño causado por la anemia en el transcurso de la repleción probablemente sea debido al tráfico de Fe que se crea en el organismo para la recuperación de los depósitos del mineral que estaban profundamente deplecionados.

Los mecanismos de retroalimentación o feedback que controlan la absorción de Fe aún están siendo estudiados. Han sido identificadas varias proteínas reguladoras: Transportador de metales divalentes 1, ferritina, transferrina, hefaestina, citocromo duodenal b, entre otros. En general, la homeostasis del Fe es mediada por “elementos de respuesta al Fe” (Eisenstein y Blemings, 1998; McKie y col., 2000; McKie y col., 2001). Este hecho explicaría por qué se observa un efecto negativo de la estabilidad del ADN en ratas controles y anémicas en el día 70 del estudio con las dietas sobrecargadas en Fe, con respecto a las dietas con un contenido normal. Sin embargo, se observa un efecto positivo en la estabilidad del ADN de la dieta basada en leche de cabra con sobrecarga de Fe, frente a la que tiene un contenido normal (como se pone de manifiesto por el porcentaje de ADN en cabeza y cola) al final del PE (día 90) en ratas controles y anémicas. Este hecho es debido, al menos en parte, a que todas estas proteínas reguladoras implicadas en la homeostasis de Fe necesitan más tiempo para modificar su expresión y transcripción (McKie y col., 2000; McKie y col., 2001), así como

para adaptarse y regular el excesivo tráfico de Fe causado por la sobrecarga en el organismo.

A decorative banner featuring various icons related to science and health: a DNA double helix, a microscope, a glass of milk, a bottle of milk, a tomato, and some grains. The text 'Resumen y conclusiones' is written in a stylized, blue, gothic font across the center of the banner.

**Resumen
y conclusiones**

5. RESUMEN Y CONCLUSIONES

La investigación llevada a cabo estudia la estabilidad del material genético, así como los parámetros hematológicos relacionados con el metabolismo del Fe en ratas controles y con anemia ferropénica nutricional inducida experimentalmente, alimentadas con dietas basadas en leche de vaca o cabra, con un aporte normal o sobrecarga de Fe.

Los animales se someten a un PPE de 40 días, en los que un grupo se alimenta con dieta estándar, con un contenido normal de Fe (45 mg/Kg dieta) en los animales controles o bajo contenido en Fe (5 mg/Kg dieta) en los animales anémicos. Las dietas empleadas en el PPE se han preparado con igual contenido de grasa (procedente de aceite de oliva, 10%) y proteína (aportada por caseína, 20%). Las diferencias entre las dietas empleadas en el PPE están determinadas por el corrector mineral, que en el caso de la dieta que reciben los animales anémicos, se prepara omitiendo el Fe, para inducir la ferrodeficiencia. Tras suministrar las dietas con contenido normal o bajo contenido en Fe, se determina la estabilidad del material genético mediante ensayo *comet alcalino* y los siguientes parámetros hematológicos en ambos grupos: recuento de hematíes, volumen corpuscular medio, hematocrito, plaquetas, hemoglobina, Fe sérico, saturación de la transferrina, ferritina, TIBC y se sacrifican 10 animales por grupo para extracción del hígado, determinación de índices hepatosomáticos y contenido de Fe hepático.

Posteriormente, los animales se someten a un PE, en los que son alimentados con dietas basadas en leche de cabra o vaca (elaboradas con un 10% de grasa y un 20% de proteína, aportada por cada tipo de leche), con un contenido normal (45 mg/kg dieta) o sobrecarga de Fe (450 mg/Kg dieta). Tras 30 y 50 días del consumo de las dietas basadas en leche, se determina la estabilidad del material genético mediante ensayo *comet alcalino* en todos los grupos, además de los índices hepatosomáticos y contenido de Fe hepático.

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

CONCLUSIÓN PRIMERA

Tras 40 días de una dieta restrictiva en Fe, todos los parámetros hematológicos de las ratas anémicas estaban alterados con respecto a las controles, debido a la depleción progresiva de Fe de los depósitos corporales.

CONCLUSIÓN SEGUNDA

La anemia ferropénica nutricional no afecta a la estabilidad del ADN, sugiriendo que existe suficiente capacidad compensatoria en el organismo para mantener las defensas antioxidantes elevadas.

CONCLUSIÓN TERCERA

Durante el transcurso de la repleción crónica con Fe, se observa un efecto perjudicial de la anemia en la estabilidad del material genético, debido en parte, a la recuperación de los depósitos de Fe que se encontraban profundamente deplecionados, lo cual puede crear un tráfico de Fe en el organismo que causa el daño observado en el material genético.

CONCLUSIÓN CUARTA

La sobrecarga de Fe tiene un efecto negativo en la estabilidad genómica, debido a la excesiva producción de especies reactivas de oxígeno catalizadas por Fe.

CONCLUSIÓN QUINTA

El consumo habitual de leche de cabra protege la estabilidad del ADN contra el daño oxidativo, incluso durante la sobrecarga crónica de Fe, debido en parte a su mejor calidad lipídica y a la mayor biodisponibilidad de Mg y Zn que tiene este tipo de leche.

CONCLUSIÓN GENERAL

El consumo habitual de leche de cabra, alimento natural con unas excelentes características nutricionales, tiene efectos positivos sobre la estabilidad del material genético, incluso en situación de sobrecarga de Fe. Por tanto, sería aconsejable la inclusión en la dieta de este tipo de leche, en la población general y en la afectada por anemia ferropénica nutricional, especialmente en aquellos grupos sometidos a tratamiento oral de Fe.



Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- ABBOUD, S. and HAILE, D.J. «A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism». *J. Biol. Chem.*, 275:19906-19912, (2000).
- ACHARYA, J.; PUNCHARD, N.A.; TAYLOR, I.A.; TOMPSON, R.P.H. and PEASON, T.C. «Red Cell peroxidation and antioxidant enzymes in iron deficiency». *Eur. J. Haematol.*, 47:287-291, (1991).
- AGTE, V.; JAHAGIRDAR, M. and CHIPLONKAR, S. «Apparent absorption of eight micronutrients and phytic acid from vegetarian meals in ileostomized human volunteers». *Nutrition*, 21(6):678-685, (2005).
- ALFÉREZ, M.J.; BARRIONUEVO, M.; LÓPEZ ALIAGA, I.; SANZ-SAMPELAYO M.R.; LISBONA, F.; ROBLES, J.C. and CAMPOS, M.S. «Digestive utilization of goat and cow milk fat in malabsorption syndrome». *J. Dairy Res.*, 68:451-461, (2001).
- ALFÉREZ, M.J.M.; LÓPEZ-ALIAGA, I.; BARRIONUEVO, M. and CAMPOS, M.S. «Effect of dietary inclusion of goat milk on the bioavailability of zinc and selenium in rats». *J. Dairy Res.*, 70:181-187, (2003).
- ALFÉREZ, M.J.M.; LÓPEZ-ALIAGA, I.; BARRIONUEVO, M.; LISBONA, F.; HARTITI, S.; PALLARÉS, I. and CAMPOS, M.S. «Calcium absorption in rats with distal intestinal resection: influence of dietary fat, cholecalciferol and nature of the adaptive response». *Int. J. Vit. Nutr. Res.*, 66:59-65, (1996).
- ALFÉREZ, M.J.M.; LÓPEZ-ALIAGA, I.; NESTARES, T; DÍAZ-CASTRO, J.; BARRIONUEVO, M; ROS, P.B. and CAMPOS, M.S. «Dietary goat milk

- improves iron bioavailability in rats with induced nutritional ferropernic anaemia in comparison with cow milk». *Int. Dairy J.*, 16:813-821, (2006).
- ALMEIDA, K.H. and SOBOL, R.W. «A unified view of base excision repair: lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification». *DNA Repair (Amst)*, 6:695-711, (2007).
- AMERICAN DAIRY GOAT ASSOCIATION. *Goat Milk Facts*, (2004).
- and treatment». *Am. J. Hematol.*, 81:202-209, (2006).
- ANDERSON, G.J. «Mechanisms of iron loading and toxicity». *Am. J. Hematol.*, 82:1128-1131, (2007).
- ANDERSON, G.J. and VULPE, C.D. «Regulation of intestinal iron transport». In: «Molecular and Cellular Iron Transport». New York: Marcel Dekker, pp: 559-596, (2002).
- ANDERSON, G.J.; FRAZER, D.M.; MCKIE, A.T.; VULPE, C.D. and SMITH. «Mechanisms of Haem and Non-Haem Iron Absorption: Lessons from Inherited Disorders of Iron Metabolism». *BioMetals*, 18(4):339-348, (2005)
- ANDERSON, L.J.; HOLDEN, S., DAVIS, B.; PRESCOTT, E.; CHARRIER, C.C.; BUNCE, N.H.; FIRMIN, D.N.; WONKE, B.; PORTER, J.; WALKER, J.M. and PENNELL, D.J. «Cardiovascular T2-star (T2*) magnetic resonance for the early diagnosis of myocardial iron overload». *Eur. Heart J.*, 22:2171-2179, (2001).
- ANDREWS, N.C. «Disorders of iron metabolism». *N. Engl. J. Med.*, 341:1986-1995, (1999).
- ANDREWS, N.C. «Forging a field: the golden age of iron biology». *Blood*, 112:219-230, (2008).

- ANDREWS, N.C. «The iron transporter DMT1». *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 31:991-994, (1999).
- ANDREWS, N.C. and SCHMIDT, P.J. «Iron homeostasis». *Annu. Re. Physiol.*, 69:69-85, (2007).
- ANIA, B.J.; SUMAN, V.J. and FAIRBANKS, V.F. «Incidence of anemia in older people: an epidemiologic study in a well defined population». *J. Am. Geriatr. Soc.*, 45:825-831, (1997).
- ARBIZA, S.F. «Producción de caprinos». AGT Editores México. pp: 105-128, (1986).
- ARREDONDO, M. and NUNEZ, M.T. «Iron and copper metabolism». *Mol. Aspects Méd.*, 26(4-5):313-327, (2005).
- ARREDONDO, M.; MARTINEZ, R.; NUNEZ, M.T.; RUZ, M. and OLIVARES, M. «Inhibition of iron and copper uptake by iron, copper and zinc». *Biol. Res.*, 39:95-102, (2006).
- ASLAN, M.; HOROZ, M.; KOCYIGIT, A.; OZGONUL, S.; CELIK, H.; CELIK, M. and EREL, O. «Lymphocyte DNA damage and oxidative stress in patients with iron deficiency anemia». *Mutat. Res.*, 601:144-149, (2006).
- ASOBAYIRE, F.S.; ADOU, P.; DAVIDSSON, L.; COOK, J.D.; HURRELL, R.F.; «Prevalence of iron deficiency with and without concurrent anemia in population groups with high prevalence of malaria and other infections: a study in Côte d'Ivoire». *Am. J. Clin. Nutr.*, 74:776-782, (2001).
- ASTBURY, W. "X-ray Studies of Nucleic Acids," *Symp. Soc. Exp. Biol.* 1:66-76, (1947).
- AUROSSEAU, B. ; VERMOREL, M. ; THERIEZ, M. and VEZINHET, A. «Effects of substitution of tricapyling or coconut oil for tallow in milk

- replacers offered to preruminant lambs». *Annales de Zootechnie*, 38:49-59, (1989).
- AUST, A.E. and EVELEIGH, J.F. «Mechanisms of DNA oxidation». *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 222:246-252, (1999).
- BABAYAN, V.K. «Medium chain length fatty acids esters and their medical and nutritional applications». *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 59:49A-51A, (1981).
- BABIT, J.; HUANG, F.W.; XIA, Y.; SIDIS, Y.; ANDREWS, N.C. and LIN, H. «Modulation of bone morphogenetic protein signaling in vivo regulates systemic iron balance». *J. Clin. Invest.*, 117:1933-1939, (2007).
- BACH, A.C. and BABAYAN, U.K. «Medium-chain triglycerides: an uptake». *Am. J. Clin. Nutr.*, 4:67-71, (1985).
- BAECH, S.B.; HANSEN, M.; BUKHAVE, K.; JENSEN, M.; SORENSEN, S.S.; KRISTENSEN, L.; PURSLOW, P.P.; SKIBSTED, L.H. and 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.*, 77(1):173-179, (2003).
- BAECHTOLD, H.; KURODA, M.; SOK, J.; RON, D.; LOPEZ, B.S. and AKHMEDOV, A. «Human 75 kDa DNA pairing protein is identical to the pro-oncoprotein TLS/FUS and is able to promote D-loop formation». *J. Biol. Chem.*, 274:34337-34342, (1999).
- BALTUSSEN, R.; KNAI, C. and SHARAN, M. «Iron fortification and iron supplementation are cost-effective interventions to reduce iron deficiency in four subregions of the world». *J. Nutr.*, 134: 2678-2684, (2004).

- BAN, C. and YANG, W. «Crystal structure and ATPase activity of MutL: implications for DNA repair and mutagenesis». *Cell*, 95:541-552, (1998).
- BARRIONUEVO, M.; ALFÉREZ, M.J.M.; LÓPEZ ALIAGA, I.; SANZ SAMPELAYO, M.R., and CAMPOS, M.S. «Beneficial effect of goat milk on nutritive utilization of iron and copper in malabsorption syndrome». *J. Dairy Sci.* 85:657-664, (2002).
- BARRIONUEVO, M.; LÓPEZ ALIAGA, I.; ALFÉREZ, M.J.; MESA, E. NESTÁRES, T. and CAMPOS M.S. «Beneficial effect of goat milk on bioavailability of copper, zinc and selenium in rats » *J. Physiol. Biochem.*, 59(2):111-118, (2003).
- BARZILAY, G.; MOL, C.D.; ROBSON, C.N.; WALKER, L.J.; CUNNINGHAM, R.P.; TAINER, J.A. and HICKSON, I.D. «Identification of critical active-site residues in the multifunctional human DNA repair enzyme HAP1». *Nat. Struct. Biol.*, 2:561-568, (1995).
- BASU, H.; FEUERSTEIN, B.; ZARLING, D.; SHAFER, R. and MARTON, L. «Recognition of Z-RNA and Z-DNA determinants by polyamines in solution: experimental and theoretical studies». *J. Biomol Struct. Dyn.*, 6(2)299-309, (1988).
- BATES, A.D. and MAXWELL, A. «DNA structure». In: «DNA topology». 2ª Ed. Oxford University Press, pp: 216, (2005).
- BEARD, J.L. «Iron biology in immune function, muscle, metabolism, and neuronal functioning». *J. Nutr.*, 131:568S-579S, (2001).
- BELITZ, H.D. and GROSCH, W. «Química de los alimentos». 2ª Ed. Acribia. Zaragoza, pp: 813, (1997).

- BENHAM, C. and MIELKE, S. «DNA mechanics». *Ann. Rev. Biomed. Eng.* 7:21-53, (2005).
- BERG, J.; TYMOCZKO, J. and STRYER, L. «Biochemistry». 5^a Ed. W. H. Freeman and Company, pp: 1050, (2002).
- BEUTLER, E.; HOFFBRAND V.A. and COOK, J.D. «Iron Deficiency and Overload». *Hematology*, 40-61, (2003).
- BEVILACQUA, C.; MARTIN, P.; CANDALH, C.; FAUQUANT, J.; PIOT, M.; ROUCAYROL, A.M.; PILLA, F. and HEYMAN, M. «Goats' milk of defective α S1-casein genotype decreases intestinal and systemic sensitization to β -lactoglobulin in guinea pigs». *J. Dairy Sci.*, 68:217-222, (2001).
- BIANCA-MARÍA, E.; RAVILACQUA, C.; MARTIN, P. and CHANDAL, C. «Goat's milk of defective α s₁-casen genotype decreases intestinal and systemic sensibilization to β -lactoglobulin in guinea pigs». *J. Dairy Res.*, 68:217-227, (2001).
- BJORN-RASMUSSEN, E. and HALLBERG, L. «Effect of animal proteins on the absorption of food iron in man». *Nutr. Metab.*, 23(3):192-202, (1979).
- BLOEM, M.W. «Interdependence of vitamin A and iron: an important association for programmes of anaemia control». *Proc. Nutr. Soc.*, 54(2):501-508, (1995).
- BOMFORD, A. «Genetics of haemochromatosis». *Lancet*, 360:1673–1681, (2002).
- BORRÁS, A. «Cómo comer y beber leche». *Comité Nacional Lechero*, 8:7-130, (1968).

- BOTHWELL, T.H. «Overview and mechanism of iron regulation». *Nutr. Rev.*, 53:237-245, (1995).
- BOZA, J. «Obtención de hidrolizados enzimáticos de proteínas lácteas. Estudio del valor nutritivo y de la capacidad antigénica». Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada, (1992).
- BOZA, J. «Papel del ganado caprino en las zonas desfavorecidas». In: «Proceedings of the XXX National and IX International of the SEOC». Annual Meeting. Inaugural Conference, Granada, Spain, (2005).
- BOZA, J. and SANZ-SAMPELAYO, M.R. «Nutritional aspects of goat milk». *An. Acad. Cienc. Vet. Andalucía Oriental*, 10:109-139, (1997).
- BRANDA, R.F. «Anemia Ferropriva». In: WOOD, M.E. «Secretos de Hematología y Oncología». 2ª Ed. McGraww-Hill interamericana, pp: 37-41, (2000).
- BREUER, W.; HERSHKO, C. and CABANTCHIK, Z.I. «The importance of non-transferrin bound iron in disorders of iron metabolism». *Transfus. Sci.*, 23:185-192, (2000).
- BRISSOT, P.; WRIGHT, T.L.; MA, W.L. and WEISIGER, R.A. «Efficient clearance of non-transferrin-bound iron by rat liver. Implications for hepatic iron loading in iron overload states». *J. Clin. Invest.*, 76:1463-1470, (1985).
- BRODY, T. «Nutritional Biochemistry». 2ª Ed. San Diego: Acad. Press, (1999).
- BRUCE, A; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. and WALTERS, P. «Molecular Biology of the Cell». 4ª Ed. New York, NY: Garland Science, pp: 1616, (2002).
- BUTLER, J.M. «Forensic DNA Typing». In: BURLINGTON, M.A. «Biology, technology and genetics of STR markers». 2ª Ed. Elsevier Academic Press, pp: 660, (2005).

- CADET, J.; DELATOUR, T.; DOUKI, T.; GASPARUTTO, D.; POUGET, J.; RAVANAT, J. and SAUVAIGO S. «Hydroxyl radicals and DNA base damage», *Mutat. Res.*, 424(1-2):9-21, (1999).
- CAMASCHELLA, C.; ROETTO, A. and DE COBBI, M. «Genetic hemochromatosis: genes and mutations associated with ironoverloading». *Best Pract. Res. Clin. Hematol.*, 15:261-276, (2002).
- CAMPOS, M.S.; BARRIONUEVO, M.; ALFÉREZ, M.J.M.; GÓMEZ-AYALA, A.E.; RODRÍGUEZ-MATAS, M.C.; LÓPEZ-ALIAGA, I. and LISBONA, F. «Interactions among iron, calcium, phosphorus and magnesium in nutritionally iron – deficient rats». *Exp. Physiol.*, 83:771-781, (1998).
- CAMPOS, M.S.; BARRIONUEVO, M.; ALFÉREZ, M.J.M.; NESTARES, T.; DÍAZ-CASTRO, J.; ROS, P.B.; ORTEGA, E. and LOPEZ-ALIAGA, I. «Consumption of caprine milk improves metabolism of calcium and phosphorus in rats with nutritional ferropenic anaemia». *In. Dairy J.*, 17:412-419, (2007).
- CAMPOS, M.S.; LÓPEZ ALIAGA, I.; ALFÉREZ, M.J.M.; NESTARES, T. and BARRIONUEVO, M. «Effects of goats' or cows' milk on nutritive utilization of calcium and phosphorus in rats with intestinal resection». *Br. J. Nutr.*, 90:61-67, (2003).
- CAVALLI-SFORZA, T.; BERGER, J.; SMITASIRI, S. and 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.*, 63: S152-S158, (2005).

- CHACÓN, A. «Aspectos nutricionales de la leche de cabra (*Capra hircus*) y sus variaciones en el proceso agroindustrial». *Agronomía Mesoamericana*, 16(2): 239-225, (2005).
- CHACÓN, A. «Comparación de la titulación de la acidez de leche caprina y bovina con hidróxido de sodio y cal común saturada». *Agronomía Mesoamericana*, 17(1):55-61, (2006).
- CHALIKIAN, T.; VÖLKER, J.; PLUM, G. and BRESLAUER, K. « A more unified picture for the thermodynamics of nucleic acid duplex melting: a characterization by calorimetric and volumetric techniques». *Proc. Natl. Ac. Sci. USA*, 96(14)7853-7858, (1999).
- CHAMPOUX, J. «DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism» *Annu. Rev. Biochem.*, 70:369-413, (2001).
- CHAN, S.; MC COWEN, K.C. and BISTRIAN, B. «Medium-chain triglyceride and n-3 polyunsaturated fatty acid-containing emulsions in intravenous nutrition». *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 1(2):163-169, (1998).
- CHANDAN, R.C.; ATTAIE, R. and SAHANI, K.M. «Nutritional aspects of goat milk and its products». In: «Recent advances in goat production». *Pre-Conference Proceedings, Vol. I, part II*, pp: 399-420, (1992).
- CHEESEMAN, K.H. and SLATER, T.F. «Free radical in medicine». *British Council Bulletin*, (1993).
- CHEN, O.S.; SCHALINSKE, K.L. and EISENSTEIN, R.S. «Dietary iron intake modulates the activity of iron regulatory proteins and the abundance of ferritin and mitochondrial aconitase in rat liver». *J. Nutr.*, 127:238-248, (1997).

- CHILLARD, Y.; SELSELET, G.; BAS, P. and MORAND, P. «Characteristics of lipolytic system in goat milk». *J.Dairy Sci.*, 67(10):2216-2223, (1984).
- CHILLIARD, Y. «Caractéristiques biochimies des lipids du lait de chèvre. Comparison avec les laits de vache et humain». In: «Intérêts nutritionnel et diététique du lait de chèvre». INRA editions, pp: 51-65, (1996).
- CLAUSEN-SCHAUMANN, H.; RIEF, M.; TOLKSDORF, C. and GAUB, H. «Mechanical stability of single DNA molecules». *Biophys. J.*, 78(4):1997-2007, (2000).
- COGSWELL, ME.; PARVANTA, I.; ICKES, L.; YIP, R. and BRITTENHAM, GM. «Iron supplementation during pregnancy, anemia, and birth weight: a randomized controlled trial ». *Am. J. Clin. Nutr.*, 78:773-781, (2003).
- COLLINS, A.R. «The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations». *Mol. Biotech.*, 26:249-261, (2004).
- CONARD, M.E. and UMBREIT, J.N. «A concise review: iron absorptionthe mucin-mobilferrin-integrin pathway: a competitive pathway for metal absorption». *Am. J. Hematol.*, 42:67-73, (1993).
- CONRAD, M.E. and UMBREIT, J.N. « Iron absorption and transport». *Am. J. Hematol.*, 64:287-298, (2000).
- CONRAD, M.E. and UMBREIT, J.N. «Pathways of iron absorption». *Blood Cells Mol. Dis.*, 29:336-355, (2002).
- COOK, J.D. «Diagnosis and management of iron-deficiency anaemia». *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 18:319-332, (2005).
- CRAGG, L.; HEBEL, R.P.; MILLER, W.; SOLOVEY, A.; SELBEY, S. and ENRIGHT, H. «The iron chelator L1 potentiates oxidative DNA damage in iron-loaded liver cells». *Blood*, 92:632-638, (1998).

- CRAVEN, C.M.; ALEXANDER, J.; ELDRIDGE, M.; KUSHNER, J.P.; BERNSTEIN, S. and KAPLAN J. «Tissue distribution and clearance kinetics of non-transferrin-bound iron in the hypotransferrinemic mouse: A rodent model for hemochromatosis». Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:3457-3461, (1987).
- CRICHTON, R.R.; DANIELSSON, B.G. and GEISSER, P. «Iron metabolism: biologic and molecular aspects». In: CRICHTON, R.R.; DANIELSSON, B.G. and GEISSER, P. «Iron therapy with special emphasis on intravenous administration». 4ª Ed. Bremen: UNI-Med Verlag AG, pp: 14-24, (2008).
- CRICHTON, R.R.; WILMET, S.; LEGSSYER, R. and WARD, R.J. «Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cell». J. Inorg. Biochem., 9:9-18, (2002).
- CZAJKA-NARINS, D.M. «Minerals». In: «Krause's Food, Nutrition and Diet Theraphy». 9ªEd. Mc-Graw-Hill Interamericana, México D.F., pp: 123-167, (1998).
- DAEL, P.; SHEN, L.; RENTERGHEM, R. and DEELSTRA, H. «Selenium content of goat milk and its distribution in protein fractions». Zeitschrift fuer Lebensmittel Untersuchung und Forschung, 195(1):3-7, (1992).
- DAHM, R. «Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research». Hum Genet, 122(2):565-581, (2008).
- DALLMAN, P.R.; YIP, R. and OSKI, F.A. «Iron deficiency and related nutritional anemias». In: NATHAM and OSKI'S. «Hematology of infancy and childhood». 4ª Ed. Philadelphia: W.B. Saunders, pp: 413-450, (1993).

- DANDRIFOSSE, G.; PEULEN, O.; EL KHEFIF, N.; DELOYER, P.;
DANDRIFOSSE, A.C. and GRANDFILS, C. «Are milk polyamines
preventive agents against food allergy?». Proc. Nutr. Soc., 59:81-86,
(2000).
- DAVIS, T.A.; NGUYEN, H.V.; GARCÍA-BRAVO, R.; FLOROTTO, N.L.;
JACKSON, E.M.; LEWIS, D.S.; LEE, D.R. and REEDS, P.J. «Aminoacid
composition of human milk is not unique». J. Nutr., 124:1126-1130,
(1994).
- DELEA, T.E.; SOFRYGIN, O.; THOMAS, S.K.; BALADI, J.F.; PHATAK, P.D. and
COATES, T. «Cost effectiveness of once-daily oral chelation therapy with
Deferasirox versus infusional Deferoxamine in transfusiondependent
thalassaemia patients». Pharmacoeconomics, 25:329–342, (1994).
- DÍAZ-CASTRO, J.; ALFÉREZ, M.J.M.; LÓPEZ-ALIAGA, I.; NESTARES, T. and
CAMPOS, M.S. «Effect of calcium-supplemented goat or cow milk on zinc
status in rats with nutritional ferropenic anaemia». Int. Dairy J., 19:116-121,
(2009).
- DÍAZ-CASTRO, J.; ALFÉREZ, M.J.M.; LÓPEZ-ALIAGA, I.; NESTARES, T.;
GRANADOS, S.; BARRIONUEVO, M. and CAMPOS, M.S. «Influence of
nutritional iron deficiency anemia on DNA stability and lipid peroxidation in
rats». Nutrition, 24:1167-1173, (2008).
- DJURIC, Z.; LU, M.H. and LEWIS, S.M. «Oxidative DNA damage levels in rats fed
low-fat, high-fat, or calorie-restricted diets». Toxicol. Appl. Pharmacol.,
115:156-160, (1992).

- DOMENICO, I.D.; WARD, D.M. and KAPLAN, J. «Regulation of iron acquisition and storage: consequences for iron-linked disorders». *Nat. Rev.*, 9:72-81, (2008).
- DONAVAN, A.; BROWNLIE, A.; ZHOU, Y.; SHEPARD, J.; PRATT, S.J.; MOYNIHAN, J.; PAW, B.H.; DREJER, A.; BARUT1, B.; ZAPATA, Z.; LAWT.C.; BRUGNARA, C.; LUX, S.E.; PINKUS, G.S.; PINKUS, J.L.; KINGSLEY, P.D.; PALIS, J.; FLEMING, M.D.; ANDREWS, N.C. and ZON, L.I. «Positional cloning of zebrafish ferroportin 1 identifies a conserved vertebrate iron exporter». *Nature*, 403:776-781, (2000).
- DONOVAN, A.; LIMA, C.A.; PINKUS, J.L.; PINKUS, G.S.; ZON, L.I.; ROBINE, S. and ANDREWS, N.C. «The iron exporter ferroportin/slc40a1 is essential for iron homeostasis». *Cell Metab.*, 1:191-200, (2005).
- DOSTALOVA, J. «Goat milk». *Vyziva*, 49:43-44, (1994).
- DOUKI, T.; REYNAUD-ANGELIN, A.; CADET, J. and SAGE, E. «Bipyrimidine photoproducts rather than oxidative lesions are the main type of DNA damage involved in the genotoxic effect of solar UVA radiation». *Biochemistry*, 42(30):9221-9226, (2003).
- DRAKE, T. and TAN, W. «Molecular beacon DNA probes and their bioanalytical applications». *Applied Spectroscopy*, 58:269-280, (2004).
- DRAKESMITH, H.; SCHIMANSKI, L.M.; ORMEROD, E.; MERRYWEATHER-CLARKE, A.T.; VIPRAKASIT, V.; EDWARDS, J.P., SWEETLAND, E.; BASTIN, J.M.; COWLEY, D.; CHINTHAMMITR, Y.; ROBSON, K.J. and TOWNSEND, A.R.. «Resistance to hepcidin is conferred by haemochromatosis-associated mutations of ferroportin». *Blood*, 106:1092-1097, (2005).

- DUTHIE, S.J. «The comet assay: protective effects of dietary antioxidants against oxidative DNA damage measured using alkaline single cell gel electrophoresis». In: CUTLE, R.G. and RODRÍGUEZ, H. «Critical reviews of oxidative stress and aging: Advances in biological sciences, diagnostics and intervention». World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., pp: 309-323, Singapore, (2003).
- ELSENSTEIN, R.S. and BLEMINGS, K.P. «Iron regulatory proteins, iron responsive elements and iron hemostasis». J. Nutr., 128:2295-2298, (1998).
- EMERIT, J., BEAMONT, C. and TRIVIN, F. «Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury». Biomed. Pharmacol., 55:333-339, (2001).
- EMERY, T. «Iron oxidation by casein». Biochem. Biophys. Res. Commun., 182(3):1047-1052, (1992).
- ESPOSITO, B.P.; BREUER, W.; SIRANKAPRACHA, P.; POOTRAKUL, P.; HERSHKO, C. and CABANTCHIK, Z.I. «Labile plasma iron in iron overload: Redox activity and susceptibility to chelation». Blood, 102:2670-2677, (2003).
- FAIRBANKS, V.F. «Iron in medicine and Nutrition». In: SHILS, M.; OLSON, J.A.; SHIKE, M. and ROSS, A.C. «Nutrition in health and disease». 9^aEd. Baltimore: Williams & Wilkins, pp: 223-239, (1999).
- FAIRWEATHER-TAIT, S.J. «Iron». J. Nutr., 131(4):1383S-1386S, (2001a).
- FAIRWEATHER-TAIT, S.J. «Bioavailability of nutrients and other bioactive components from dietary supplements: iron». J. Nutr., 131:S1383-S1386, (2001b).

- FANG, J.L.; VACA, C.E.; VALSTA. L.M. and MUTANEN, M. «Determination of DNA adducts of malonaldehyde in humans: effects of dietary fatty acid composition». *Carcinogenesis*, 17:1035-1040, (1996).
- FEDER, J.N.; GNIRKE, A.; THOMAS, W.; TSUCHIHASHI, Z.; RUDDY, D.A.; BASAVA, A.; DORMISHIAN, F.; DOMINGO, R. JR.; ELLIS, M.C.; FULLAN, A.; HINTON, L.M.; JONES, N.L.; KIMMEL, B.E.; KRONMAL, G.S.; LAUER, P.; LEE, V.K.; LOEB, D.B.; MAPA, F.A.; MCCLELLAND, E.; MEYER, N.C.; MINTIER, G.A.; MOELLER, N.; MOORE, T.; MORIKANG, E.; PRASS, C.E.; QUINTANA, L.; STARNES, S.M.; SCHATZMAN, R.C.; BRUNKE, K.J.; DRAYNA, D.T.; RISCH, N.J.; BACON, B.R. and WOLFF, R.K. «A novel MHC class 1-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis». *Nat. Genet.*, 13:399-408, (1996).
- FEDER, J.N.; PENNY, D.M.; IRRINKI, A.; LEE, V.K.; LEBRON, J.A.; WATSON, N.; TSUCHIHASHI, Z.; SIGAL, E.; BJORKMAN, P.J. and SCHATZMAN, R.C. «The haemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:1472-1477, (1998).
- FEDER, J.N.; TSUCHIHASHI, Z.; IRRINKI, A.; LEE, V.K.; MAPA, F.A.; MORIKANG, E.; PRASS, C.E.; STARNES, S.M.; WOLFF, R.K.; PARKKILA, S.; SLY, W.S. and SCHATZMAN, R.C. «The haemochromatosis founder mutation in HLA-H disrupts α -2-microglobulin interaction and cell surface expression». *J. Biol. Chem.*, 272:14025-14028, (1997).
- FEHR, P.; CHILLIARD, Y. and SAUVANT, D. «Goat milk and its components». *Proc. Int. Conf. Goat Production and Disease*, pp: 113-121, (1982).

- FEMING, M.D.; ROMANO, M.A.; SU M.A.; GARRICK, L.M.; GARRICK, M.D. and ANDREWS, N.C. «Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport». Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:1148-1153, (1998).
- FIERS, W.; BEYAERT, R.; DECLERCG, W. and VANDENABEELE, P. «More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage». Oncogene. 18:7719-7730, (1999).
- 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, pp: 290-393, (2004).
- FRANCHINI, M. «Hereditary iron overload: Update on pathophysiology, diagnosis, and treatment». Am. J. Hematol., 81:202-209, (2006).
- FRANK G, QIU J, SOMSOUK M, WENIG Y, SOMSOUK L, NOLAN JP and SHEN B. «Partial functional deficiency of E160D flap endonuclease-1 mutant in vitro and in vivo is due to defective cleavage of DNA substrates». J Biol Chem 273, 33064-33072, (1998).
- FRANKLIN, R.G.; ROSALIND, E. «Molecular Configuration in Sodium Thymonucleate. Franklin R. and Gosling R.G». Nature, 171:740-741, (1953).
- FRAZER, D.M.; WILKINS, S.J.; BECKEE, E.M.; MURPHY, T.L., VULPE, C.D.; MCKIE, A.T and ANDERSON, G. J. «A rapid decrease in the expression of DMT1 and Dcytb but not Ireg1 or hephaestin explains the mucosal block phenomenon of iron absorption». Gut, 52:340-346, (2003).

- FUSHIKI, T.; MATSUMOTO, K.; INOUE, K.; KAWADA, T. and SUGIMOTO, E. «Swimming endurance capacity of mice is increased by chronic consumption of medium-chain triglycerides». *J. Nutr.*, 125:531-539, (1995).
- GABRILOVE, J. «Overview: erythropoiesis, anemia and the impact of erythropoietin». *Semin. Hematol.*, 37:1-13, (2000).
- GABUTTI, V. and BORGNA-PIGNATTI, C. «Clinical manifestations and therapy of transfusional haemosiderosis». *Baillieres Clin. Haematol.*, 7:919-940, (1994).
- GAITÁN, D.C.; OLIVARES, M.G.; ARREDONDO, M.O. and PIZARRO, A. «Iron bioavailability in humans». *Rev. Chil. Nutr.*, 33(2):142-148, (2006).
- GALY, B.; FERRING, D.; MINANA, B.; BELL, O.; JANSER, H.G.; MUCKENTHALER, M.; SCHÜMANN, K. and HENTZE M.W. «Altered body iron distribution and microcytosis in mice deficient in iron regulatory protein 2 (IRP2) ». *Blood*, 106:2580-2589, (2005).
- GANONG, W.F. «Fisiología médica». 19ªEd. Editorial Manual Moderno, pp: 513-514, (2004).
- GANZ, T. «Molecular control of iron transport». *J. Am. Soc. Nephrol.*, 18:394-400, (2007).
- GANZ, T. and NEMETH, E. «Iron imports. IV. Hepcidin and regulation of body iron metabolism». *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.*, 290:G199-G203, (2006).
- GARCÍA UNCITI, M.S. «Utilidad terapéutica de los triglicéridos de cadena media (MCT). Dietas cetogénicas en la epilepsia infantil». *Nutrición Clínica*, 16:7-35, (1996).

- GARCIA-CASAL, M.N.; LAYRISSE, M.; SOLANO, L.; BARON, M.A.; ARGUELLO, F., LLOVERA, D.; RAMÍREZ, J.; LEETS, I. and TROPPER, E. «Vitamin A and beta-carotene can improve nonheme iron absorption from rice, wheat and corn by humans». *J. Nutr.*, 128(3):646-650, (1998).
- GERA, T. and SACHDEV, H.P. «Effect of iron supplementation on incidence of infectious illness in children: Systematic review». *B.M.J.*, 325:1142, (2002).
- GHOSH, A. and BANSAL, M. «A glossary of DNA structures from A to Z». *Acta Cryst. D. Biol.*, 59(4):620-626, (2003).
- GIBSON, R.S.; YEUDALL, F.; DROST, N.; MTITIMUNI, B.M. and 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.*, 133(2):3992S-3999S, (2003).
- GIROTTI, A.W.; THOMAS, J.P. and JORDAN, J.E. «Inhibitory effect of Zn (II) on free radical lipid peroxidation in erythrocyte membranes». *Free Radic. Biol. Med.* 1:395-401, (1985).
- GRANTHAM-MCGREGOR, S. and ANI, C. «A review of studies on the effect of iron deficiency on cognitive development in children». *J. Nutr.*, 131:649S-68S, (2001).
- GREGORY, S.; K. F. BARLOW, K.F.; MCLAY, K.E.; KAUL, R.; SWARBRECK, D.; DUNHAM, A.; SCOTT, C.E.; HOWE, K.L.; WOODFINE, K.; SPENCER, C.C.A.; JONES, C.M.; GILLSON, C.; SEARLE, S.; ZHOU, Y.; KOKOCINSKI, F.; MCDONALD, L.; EVANS, R.; PHILLIPS, K.; ATKINSON, A.; COOPER, R.; JONES, C.; HALL, R.E.; ANDREWS, T.D.; LLOYD, C.;

AINSCOUGH, R.; ALMEIDA, J.P.; AMBROSE, K.D.; ANDERSON, F.;
ANDREW, R.W.; ASHWELL, R.I.S.; AUBIN, K.; BABBAGE, A.K.;
BAGGULEY, C.L.; BAILEY, J.; BEASLEY, H.; BETHEL, G.; BIRD, C.P.;
BRAY-ALLEN, S.; BROWN, J.Y.; BROWN, A.J.; BUCKLEY, D.; BURTON,
J.; BYE, J.; CARDER, C.; CHAPMAN, J.C.; CLARK, S.Y.; CLARKE, G.;
CLEE, C.; COBLEY, V.; COLLIER, R.E.; CORBY, N.; COVILLE, G.J.;
DAVIES, J.; DEADMAN, R.; DUNN, M.; EARTHROWL, M.; ELLINGTON,
A.G.; ERRINGTON, H.; FRANKISH, A.; FRANKLAND, J.; FRENCH, L.;
GARNER, P.; GARNETT, J.; GAY, L.; GHORI, R.M.J.; GIBSON,R.J.;
GILBY, L.M.; GILLETT, W.; GLITHERO, R.J.; GRAFHAM, D.V.;
GRIFFITHS, C.; GRIFFITHS-JONES, S.; GROCOCK, R.; HAMMOND, S.;
HARRISON, E.S.I.; HART, E.; HAUGEN, E.; HEATH, P.D; HOLMES, S.;
HOLT, K.; HOWDEN, P.J.; HUNT, A.R.; HUNT, S.E.; HUNTER, G.;
ISHERWOOD, J.; JAMES, R.; JOHNSON, C.; JOHNSON, D.; JOY, A.;
KAY, M.; KERSHAW, J.K.; KIBUKAWA, M.; KIMBERLEY, A.M.; KING, A.;
KNIGHTS, A.J.; LAD, H.; LAIRD, G.; LAWLOR, S.; LEONGAMORNLERT,
D.A.; LLOYD, D.M.; LOVELAND, J.; LOVELL, J.; LUSH, M.J.; LYNE, R.;
MARTIN, S.; MASHREGHI-MOHAMMADI, M.; MATTHEWS, L.;
MATTHEWS,N.S.W.; MCLAREN, S.; MILNE, S.; MISTRY, S.; MOORE,
M.J.F.; NICKERSON, T.; O'DELL, C.N.; OLIVER, K.; PALMEIRI, A.;
PALMER, S.A.; PARKER, A.; PATEL, D.; PEARCE, A.V.; PECK, A.I.;
PELAN, S.; PHELPS, K.; PHILLIMORE, B.J.; PLUMB, R.; RAJAN, J.;
RAYMOND, C.; ROUSE, G.; SAENPHIMMACHAK, C.; SEHRA, H.K.;
SHERIDAN, E.; SHOWNKEEN, R.; SIMS, S.; SKUCE, C.D.; SMITH, M.;
STEWARD, C.; SUBRAMANIAN, S.; SYCAMORE, N.; TRACEY, A.;

TROMANS, A.; VAN HELMOND, Z.; WALL, M.; WALLIS, J.M.; WHITE, S.; WHITEHEAD, S.L.; WILKINSON, J.E.; WILLEY, D.L.; WILLIAMS, H.; WILMING, L.; WRAY, P.W.; WU, Z.; COULSON, A.; VAUDIN, M.; SULSTON, J.E.; DURBIN, R.; HUBBARD, T.; WOOSTER, R.; DUNHAM, I.; CARTER, N.P.; MCVEAN, G.; ROSS, M.T.; HARROW, J.; OLSON, M.V.; BECK, S.; ROGERS, J. and BENTLEY, D.R. «The DNA sequence and biological annotation of human chromosome 1». *Nature*, 441(7091):315-321, (2006).

GRINDER-PEDERSEN, L.; BUKHAVE, K.; JENSEN, M.; HOJGAARD, L. and 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.*, 80:404-409, (2004).

GUEGUEN, L. «Le valeur nutritionnelle minérale du lait du chèvre». En: «Intérêts nutritionnel er diététique du lait de chévre». INRA editions, pp: 67-80, (1996).

GUNSHIN, H.; FUJIWARA, Y.; CUSTODIO, A.O.; DIRENZO, C.; ROBINE, S. and ANDREWS, N.C. «Slc11a2 is required for intestinal iron absorption and erythropoiesis but dispensable in placenta and liver». *J. Clin. Invest.*, 115:1258-1266, (2005).

GUTTERIDGE, J.M. «Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage». *Clin. Chem.*, 41:1819-1828, (1995).

HAAS, J.D. and BROWNLIE, T. «Iron deficiency and reduced work capacity: a critical review of the research to determine a causal relationship». *J. Nutr.*, 131:676S-690S, (2001).

- HAENLEIN, G.F.W. «About the evolution of goat and sheep milk production». Small Rumin. Res., 68:3, (2007).
- HAENLEIN, G.F.W. «Goat milk in human nutrition». Small Rumin. Res., 51:55-163, (2004).
- HAENLEIN, G.F.W. «Nutritional value of dairy products of ewes and goats milk». Int. J. Anim. Sci., 11:395-411, (1996).
- HAENLEIN, G.F.W. «Past, present, and future perspectives of small ruminant dairy research». J. Dairy Sci., 84:2097-2115, (2001).
- HAENLEIN, G.F.W. «Role of goat meat and milk in human nutrition». In: «Proceedings of the V International Conference on Goats». New Delhi, pp: 575-580, (1992).
- HAHN, P.F.; BALE, W.F.; ROSS, J.F.; BALFOUR, W.M. and WHIPPLE, G.H. «Radioactive iron absorption by gastrointestinal tract: influence of anemia, anoxia and antecedent feeding distribution in growing dogs». J. Exp. Med., 78:169-88, (1943).
- HALLBERG L. «Iron balance in pregnancy». In: BERGER H. «Vitamins and minerals in pregnancy and lactation». Nestle Nutrition Workshop Series. New York: Raven Press, 16, pp: 115-127, (1988).
- HALLBERG, L. «Bioavailability of dietary iron in man». Annu. Rev. Nutr., 1:123-147, (1981).
- HALLBERG, L. and HULTHEN, L. «Prediction of dietary iron absorption: an algorithm for calculating absorption and bioavailability of dietary iron». Am. J. Clin. Nutr., 71(5):1147-1160, (2000).
- HALLBERG, L.; BRUNE, M.; ERLANDSSON, M.; SANDBERG, A.S. and ROSSANDER-HULTEN, L. «Calcium: effect of different amounts on

- nonheme- and heme-iron absorption in humans». *Am. J. Clin. Nutr.*, 53(1):112-119, (1991).
- HALLBERG, L; HULTHEN, L. and GARBY, L. «Iron stores in man in relation to diet and iron requirements». *Eur. J. Clin. Nutr.*, 52(9):623-631, (1998).
- HALLIWELL, B. «Role of free radicals in neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment». *Drugs Aging*, 18:685-716, (2001).
- HALLIWELL, B. and CHIRICO, S. «Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance ». *Am. J. Clin. Nutr.*, 57:715-722, (1993).
- HALLIWELL, B. and GUTTERIDGE, J.M. «The definition and measurement of antioxidants in biological systems». *Free Radic. Biol. Med.*, 18:125-126, (1995).
- HALLTERMAN, J.S.; KACZOROWSKI, J.M.; ALIGNÉ, C.A; AUINGER, P. and SZILAGYI, P.G. «Iron deficiency and cognitive achievement among schoolaged children and adolescents in the United States». *Pediatrics*, 107(6): 1381-1386, (2001).
- HANAWALT, P.C. «Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation». *Oncogene*, 21:8949-8956, (2002).
- HAR-EL, R. and CHEVION, M. «Zinc (II) protects against metal mediated free radical induced damage: studies on single and double-strand DNA breakage». *Free Radic. Res. Commun.* 12:509-515, (1991).
- HARRIS, Z.L.; DURLEY, A.P.; MAN, T.K. and GILTIN, J.D. «Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in cellular iron efflux». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 96:10812-10817, (1999).

- HARRISON, P.M. and AROSIO, P. «The ferritins: Molecular properties, iron storage function and cellular regulation». *Biochim. Biophys. Acta* , 1275:161-203, (1996).
- HARTITI, S.; LÓPEZ-ALIAGA, I.; BARRIONUEVO, M.; LISBONA, F.; PALLARÉS, I.; ALFÉREZ, M.J.M.; GÓMEZ-AYALA, A.E. and CAMPOS, M.S. «Zinc metabolism in rats: effects of intestinal resection, cholecalciferol and ascorbic acid». *Nutr. Res.*, 14:1523-1534, (1994).
- HARTMANN, A.; AGUERRÍ, E.; BEEPERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P.; COLLINS, A.; SMITH, A.; SPEIT, G.; THYBAUD, V. and TICE, R.R. «Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay». *Mutagenesis*, 18(1):45-51, (2003).
- HARTWIG, A. «Role of magnesium in genomic stability». *Mutat. Res.*, 465:113-121, (2001).
- HENTZE, M.W.; CAUGHMAN, S.W.; CASEY, J.L.; KOELLER, D.M.; ROUAULT, T.A.; HARFORD, J.B. and KLAUSNER, R.D. «A model for the structure and functions of iron-responsive elements». *Gene*, 72:201-208, (1988).
- HENTZE, M.W.; MUCKENTHALER, M.U. and ANDREWS, N.C. «Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism». *Cell*, 117:285-297, (2004).
- HERCBERG, S. and GALAN, P. «Nutritional anemias» *Baillieres Clin. Haematol.*, 5:143-168, (1992).
- HIB, J. and DE ROBERTIS, E. D. P. « Fundamentos De Biología Celular y Molecular». *El Ateneo*, 3ª Ed., pp: 416, (1998).
- HIDER, RC. «Nature of nontransferrin-bound iron». *Eur. J. Clin. Invest.*, 32:50-54, (2002).

- HILLMAN, R.S. and AULT, K.A. «Iron deficiency Anemia». In: HILLMAN, R.S., AULT, K.A. and RINDER, H.M. «Hematology in Clinical Practice. A guide to diagnosis and management». McGraw-Hill, inc., pp: 72-85, (1995).
- HURRELL, R.F. «Influence of vegetable protein sources on trace element and mineral bioavailability». *J. Nutr.*, 133(9):2973S-2977S, (2003).
- HURRELL, R.F.; LYNCH, S.R., TRINIDAD, T.P.; DASSENKO, S.A. and COOK, J.D. «Iron absorption in humans: bovine serum albumin compared with beef muscle and egg white». *Am. J. Clin. Nutr.*, 47(1):102-107, (1988).
- HURRELL, R.F.; REDDY, M..B.; JUILLERAT, M.A. and COOK, J.D. «Degradation of phytic acid in cereal porridges improves iron absorption by human subjects». *Am. J. Clin. Nutr.*, 77(5):1213-1219, (2003).
- HURRELL, RF. «How to ensure adequate iron absorption from iron-fortified food». *Nutr. Rev.*, 60: S7-S15, (2002).
- IOLASCON, A, DE FALCO, L. and BEAUMONT, C. «Molecular basis of inherited microcytic anemia due to defects in iron acquisition or heme synthesis». *Haematologica*, 94:395-408, (2009).
- IP, C.; BANNI, S.; ANGIONI, E.; CARTA, G.; MCGINLEY, J.; THOMPSON, H. J.; BARBANO, D. and BAUMAN, D. E. «Conjugated linoleic acid-enriched butter fat alters mammary gland morphogenesis and reduces cancer risk in rats». *J. Nutr.*, 129:2135-2142, (1999).
- ISLER, M., DELIBAS, N.; GUCLU, M.; GULTEKIN, F. ; SUTCU, R. ; BAHCECI, M. and KOSAR, A. «Superoxide dismutase and glutathione peroxidase in erythrocytes of patients with iron deficiency anemia: effects of different treatment modalities». *Coat. Med. J.*, 43:16-19, (2002).

- IVAN, M.; KONDO, K.; YANG, H.; KIM, W.; VALIANDO, J.; OHH, M.; SALIC, A.; ASARA, J.M.; LANE, W.S. and KAELIN W.G. JR. «HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hidroxilation: implications for oxigen sensing». *Science*, 292:464-468, (2001).
- JAAKKOLA, P.; MOLE, D.R.; TIAN, Y.M., WILSON, M.I.; GIELBERT, J., GASKELL, S.J.; KRIEGSHEIM, A.V.; HEBESTREIT, H.F.; MUKHERJI, M.; SCHOFIELD, C.J.; MAXWELL, P.H.; PUGH, C.W. and RATCLIFFE, P.J. «Targeting of HIF-alpha to the Von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by oxigen regulated proil hidroxilation». *Science*, 292:468-472, (2001).
- JAUBER, O. and KALANTZOPOULOS, O. «Quality of goat milk for cheese and other products». *VI Int. Conf. Goats Int.*, 1:274-284, (1996).
- KEARNEY, SL.; NEMETH, E.; NEUFELD, E.J.; THAPA, D.; GANZ, T.; WEINSTEIN, D.A. and CUNNINGHAM, M.J. «Urinary hepcidin in congenital chronic anemias». *Pediat. Blood Cancer*, 48:57-63, (2007).
- KIM HA, J. and LINDSAY, R. «Contributions of cow, sheep and goat milk to characterizing branched-chain fatty acid and phenolic flavors in varietal cheeses». *J. Dairy Sci.*, 74:3267-3274, (1991).
- KJELDAHL, J. Z. «Neue Methode zur Bestimmung des stickstoffs in organischen Körpern». *Z. Anal. Chem.* 22:366-382, (1883).
- KNUSTON, M.D.; VAFA, M.R.; HAILE, D.J., WESSLING-RESNICK, M. «Iron overloading and erythrophagocytosis increase ferroportin 1 (FPN1) expression in J774 macrophages». *Blood*, 102:4191-419, (2003).
- KONG, W.N.; ZHAO, S.E.; DUAN, X.L.; YANG, Z.; QIAN, Z.M. and 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.*, 104:629-641, (2008).
- KOORTS, A.M. and VILJOEN, M. «Ferritin and ferritin isoforms I: Structure-function relationships, synthesis, degradation and secretion». *Arch. Physiol. Biochem.*, 113:30-54, (2007).
- KOZYRAKI, R.; FYFE, J.; VERROUST, P.J.; JACOBSEN, C.; DAUTRY-VARSAT, A.; GBUREK, J. WILLNOW, T.E.; CHRISTENSEN, E.I. and MOESTRUP, S.K. « Megalin-dependent cubilin-mediated endocytosis is a major pathway for the apical uptake of transferrin in polarized epithelia». *Proc. Nat. Ac. Sci., USA.* 98:12491-12496, (2001).
- KRISHNAMURTHY, P.; XIE, T. and SCHUETZ, J.D. «The role of transporters in cellular heme and porphyrin homeostasis». *Pharmacol. Ther.*, 114:345-358, (2007).
- KUMEROVA, A.; LECE, A.,; SKESTERS, A.; SILOVA, A, and PETUHOVS, V. «Anaemia and antioxidant defence of the red blood cells». *Mater. Med. Pol.*, 30:2-5, (1998).
- LARA-VILLOSLADA, F.; OLIVARES, M.; JIMÉNEZ, J.; BOZA, J. and XAUS, J. «Goat milk is less immunogenic than cow milk in a murine model of atopy». *J.I Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 39:354-360, (2004).
- LAXMINARAYAN, R.; MILLS, A.J.; BREMAN, J.G.; MEASHAM, A.R.; ALLEYNE, G.; CLAESON, M.; JHA, P.; MUSGROVE, P.; CHOW, J.; SHAHID-SALLES, S. AND JAMISON, D.T. «Advancement of global health: key messages from the Disease Control Priorities Project». *Lancet*, 367:1193-1208, (2006).

- LAYRISSE, M.; MARTINEZ-TORRES, C. and ROCHE, M. «Effect of interaction of various foods on iron absorption». *Am. J. Clin. Nutr.*, 21(10):1175-1183, (1968).
- LEE, G.R. «Iron deficiency and iron deficiency anemia». In: LEA and FEBIGER. «Clinical Hematology». Wintrobe's. 9ª Ed. Philadelphia-London, pp: 808-839, (1993).
- LESLIE, A.G.; ARNOTT, S, CHANDRASEKARAN, R., y RATLIFF, R.L. «Polymorphism of DNA double helices». *J. Mol. Biol.*, 143(1):49-72, (1980).
- LEVENE, P. «The structure of yeast nucleic acid». *J Biol Chem.*, 40(2):415-424, (1919).
- LEYTON, J.; DRURY, P.J. and CRAWFORD, M.A. «Differential oxidation of saturated and unsaturated fatty acids in vivo in rats». *Br. J. Nutr.*, 57: 383-393, (1987).
- LIU, J.; ATAMNA, H.; KURATSUNE, H. and AMES, B.N. «Delaying brain mitochondrial decay and aging with mitochondrial antioxidants and metabolites». *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 959:133-166, (2002).
- LIU, X.B.; YNAG, F. and HAILE, D.J. «Functional consequences of ferroportin 1 mutations». *Blood Cell Mol. Dis.*, 35:33-46, (2005).
- LÖNNERDAL, B. and DEWEY, K.G. «Epidemiología de la deficiencia de hierro en lactantes y niños». *An. Nestlé*, 53:12-19, (1995).
- LÓPEZ ALIAGA, I.; ALFÉREZ, M.J.; BARRIONUEVO, M.; LISBONA, F. and CAMPOS, MS. «Influence of goat and cow milk on the digestive and metabolic utilization of calcium and iron». *J. Physiol. Biochem.*, 56:201-208, (2000).

- LÓPEZ-ALIAGA, I.; ALFÉREZ, M.J.M.; BARRIONUEVO, M.; NESTARES, T.; SANZ SAMPELAYO, M.R. and 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.*, 86:2958-2966, (2003).
- LÓPEZ-ALIAGA, I.; ALFÉREZ, M.J.M.; NESTARES, T.; ROS, P.B.; BARRIONUEVO, M. and 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.*, 88:1024-1030, (2005).
- LOU, D.Q.; NICOLAS, G. ; LESBORDES, J.C. ; VIATTE, L. ; GRIMBER, G.; SZAJNERT, M.F.; KAHN, A. and VAULONT, S. «Functional differences between hepcidin 1 and 2 in transgenic mice». *Blood*, 103:2816-2821, (2004).
- LU, X.J.; SHAKKED, Z. and OLSON W.K. «A-form conformational motifs in ligand-bound DNA structures». *J. Mol. Biol.*, 300(4):819-840, (2000).
- LUDWICZEK, S.; AIGNER, E.; THEURL, I. and WEISS, G. «Cytokine mediated regulation of iron transport in human monocytic cells». *Blood*, 101:4148-4154, (2003).
- LYNCH, S.R. «Interaction of iron with other nutrients». *Nutr. Rev.*, 55(4):102-110, (1997).
- MADDOX, B. «The double helix and the 'wronged heroine'». *Nature*, 421:407-408, (2003).
- MANDELKERN M, ELIAS J, EDEN D, CROTHERS D. «The dimensions of DNA in solution». *J. Mol. Biol.*, 152:153-161, (1981).

- MARCHALONIS, J.J. and WELTMAN, J.K. «Relatedness among proteins: a new method of estimation and its application to immunoglobulin». *Comparative Biochem. and Physiol.*, 38B:609, (1971).
- MARTIN, P. «La composition protéique du lait de chèvre: ses particularités». In: «Interêts nutritionnel et diététique du lait de chèvre». INRA Editions, pp: 27-49, (1996).
- MARTÍNEZ-FÉREZ, A. «Obtención de oligosacáridos de la leche de diferentes especies por tecnología de membranas». Tesis Doctoral, (2004).
- MASSEY, A.C. «Microcytic anemia: Differential diagnosis and management of iron deficiency anemia». *Med. Clin. North. Am.*, 76:549-566, (1992).
- MATSUO, T. and TAKEUCHI, H. «Effects of structural medium and long-chain triglycerides in diets with various levels of fat on body fat accumulation in rats». *Br. J. Nutr.*, 91:219-225, (2004).
- MCGUIRE, M. A. and MCGUIRE, M. K. «Conjugated linoleic acid (CLA): A ruminant fatty acid with beneficial effects on human health». *Proc. Am. Soc. Anim. Sci. Annu.*, (2000).
- MCKIE, A.T., MARCIANI, P.; ROLFS, A.; BRENNAN, K.; WEHR, K.; BARROW, D.; MIRET, S.; BOMFORD, A.; PETERS, T. and FARZANEH, F. «A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation». *Mol. Cell*, 5:299-309, (2000).
- 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. and SIMPSON, R.J. «An iron-regulated ferric reductase

- associated with the absorption of dietary iron». *Science*, 291:1755-1759, (2001).
- MEHALA, M.A. and AL-KAHNAI, M.A. «Studies on camel and goat milk proteins, nitrogen, distribution and amino acid composition». *Nutr.Reports Int.*, 39(2):351-35, (1989).
- MEISTER, A. and ANDERSON, M.E. «Glutathione». *Ann. Rev. Biochem.*, 52:711-760, (1983).
- MIRET, S.; SIMPSON, R.J. and MCKIE, A.T. «Physiology and molecular biology of dietary iron absorption». *Annu. Rev. Nutr.*, 23:283-301, (2003).
- MOLLER, P. «The alkaline Comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures». *Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 98:336-345, (2006).
- MONSEN, E.R. «Iron nutrition and absorption: dietary factors which impact iron bioavailability». *J. Am. Diet Assoc.*, 88:786-7890, (1988).
- MORENO, R. «Lácteos como fuente ideal de calcio/fósforo en la dieta». *Alimentación Nutrición y Salud*, 2:52-58, (1995).
- MULVIHILL, B.; KIRWAN, F.M.; MORRISSEY, P.A. and FLYNN, A. «Effect of myofibrillar muscle proteins on the in vitro bioavailability of non-haem iron». *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 49(3):187-192, (1998).
- MUÑOZ, M.; CAMPOS, A.; GARCÍA, J.A. and RAMÍREZ, G. «Fisiopathology of iron metabolism: diagnostic and therapeutic implications» *Nefrología*, 25:9-19, (2005).
- MUNOZ, M.; VILLAR, I. and GARCIA-ERCE, J.A. «An update on iron physiology *World J Gastroenterol*». *World J.Gastroenterol.*, 15(37):4617-4626, (2009).

- MUÑOZ, M.; VILLAR, I.; GARCÍA-ERCE, J.A. «An update on iron physiology». *World J. Gastroenterol.*, 15:4617-4626, (2009).
- NADADUR, S.S.; SRIRAMA, K. and MUDIPALLI A. «Iron transport & homeostasis mechanisms: Their role in health & disease» *Indian J. Med. Res.*, 128:533-544, (2008).
- NAIR, J.; VACA, C.E.; VELIC, I.; MUTANEN, M.; VALSTA, L.M. and BARTSCH, H. «High dietary ω -6 polyunsaturated fatty acids drastically increase the formation of etheno-DNA base adducts in white blood cells of female subjects». *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 6:597-601, (1997).
- NEMETH, E. and GANZ, T. «Hepcidin and iron-loading anemias». *Haematologica*, 91:727-732, (2006a).
- NEMETH, E. and GANZ, T. «Regulation of iron metabolism by hepcidin». *Annu. Rev. Nutr.*, 26:323-342, (2006b).
- NEMETH, E.; TUTTLE, M.S.; POWELSON, J.; VAUGHN, M.B.; DONOVAN, A.; WARD, D.M.; GANZ, T.; KAPLAN, J. «Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization». *Science*, 306:2090-2093, (2004).
- NERI, S. GARDINI, A.; FACCHINI, A.; OLIVIERI, F.; FRANCESCHI, C.; RAVAGLIA, G. and MARIANI, E. «Mismatch repair system and aging: microsatellite instability in peripheral blood cells from differently aged participants». *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, 60:285-292, (2005).
- NESTARES, T.; DÍAZ-CASTRO, J.; ALFÉREZ, M.J.M.; LÓPEZ-ALIAGA, I.; BARRIONUEVO, M. and CAMPOS, M.S. «Calcium-enriched goat milk, in comparison with similarly enriched cow milk, favours magnesium

- bioavailability in rats with nutritional ferropenic anaemia. *J. Sci. Food Agric.*, 88:319-327, (2008).
- NICOLAS, G. ; CHAUVET, C. ; VIATTE, L. ; DANAAAN, J.L. ; BIGARD, X. ; DEVAUX, I. ; BEAUMONT, C. ; KAHN, A. and VAULONT, S. «The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia and inflammation». *J. Clin. Invest.*, 110:1037-44, (2002).
- NICOLAS, G.; BENNOUN, M.; DEVAUX, I.; BEAUMONT, C.; GRANDCHAMP, B.; KAHN, A. and VAULONT, S. «Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98:8780-8785, (2001).
- NISSENSON, A.R.; BERNS, J.S.; SAKIEWICZ, P.; GHADDAR, S.; MOORE, G.M.; SCHLEICHER, R.B. and SELIGMAN, P.A. «Clinical evaluation of heme iron polypeptide: sustaining a response to rHuEPO in hemodialysis patients». *Am. J. Kidney Dis.*, 42:325-330, (2003).
- NUGENT, C.; and LUNDBLAD, V. «The telomerase reverse transcriptase: components and regulation». *Genes Dev.*, 12(8):1073-1085, (1998).
- O'CONNOR, D.L. «Folate in goat milk products with reference to other vitamins and minerals: a review». *Small Rumin. Res.*, 14:143-149, (1994).
- O'NEIL, J. and POWELL, L. «Clinical aspects of hemochromatosis». *Semin. Liver Dis.*, 25:381-391, (2005).
- ODLE, J. «New insights into the utilization of medium-chain triglycerides by the neonate: observations from a piglet model». *J. Nutr.*, 127:1061-1067, (1997).

- OH, D.; KIM, Y. and RICH, A. «Z-DNA-binding proteins can act as potent effectors of gene expression in vivo». Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 99(26):16666-16671, (2002).
- OHGAMI, R.S.; CAMPAGANA, D.R.; ANTICHOS, B.; WOOD, E.B. and SHARTP, J.J. «nm 1054: a spontaneous, recessive, hypochromatic, microcytic anemia mutation in the mouse». Blood, 106:3625-3631, (2005a).
- OHGAMI, R.S.; CAMPAGANA, D.R.; GREER, E.L.; ANTIOCHOS, B.; MCDONALD, A., CHEN, J; SHARP, J.J; FUJIWARA, Y.; BARKER, J.E. and FLEMING, M. D. «Identification of a ferredoxin required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells». Nat. Genet., 37:1264-1269, (2005b).
- OLIVE, P.L. «Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in chinese hamster V79 spheroids». Radiat. Res., 117:79-92, (1989).
- OPPENHEIMER, S.J. «Iron and its relation to immunity and infectious disease». J. Nutr., 131: 616S-633S, (2001).
- ORINO, K.; LEHMAN, L., TSUJI, Y.; AYAKI, H.; TORTI, S.V. and TORTI, F.M. «Ferritin and the response to oxidative stress». Biochem. J., 357:241-247, (2001).
- OSKI, F.A. «Iron deficiency in infancy and childhood». N. Engl. J. Med., 329:190-198, (1993).
- ÖSTLING, O. and JOHANSON, K. «Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells». Biochem. Biophys. Res. Com. 123:291-298, (1984).
- PABO, C. and SAUER, R. «Protein-DNA recognition». Ann. Rev. Biochem., 53:293-321, (1984).

- PALLARÉS, I.; LISBONA, F.; LÓPEZ-ALIAGA, I.; BARRIONUEVO, M.; ALFÉREZ, M.J.M. and CAMPOS, M.S. «Effects of iron deficiency on the digestive utilization of iron, phosphorus, calcium and magnesium in rats». *Br. J. Nutr.*, 70:609-620, (1993).
- PAPANIKOLAOU, G.; TZILIANOS, M.; CHRISTAKIS, J.I.; BOGDANOS, D.; SIMIRIKA, K.; MACXFARLANE, J.; GOLDBERG, Y.P.; SAKELLAROPOULOS, N.; GANZ, T. AND NEMETH, E.«Hepcidin in iron overload disorders». *Blood*, 105:4103-4105, (2005).
- PAPANIKOLAOU, G. and PANTOPOULOS, K. « Iron metabolism and toxicity». *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 202:199-211, (2004).
- PARIZA, M. W.; PARK, Y. and COOK, M. E. «The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Progr. Lipid Res.* 40:283-298, (2001).
- PARK, Y.; STORKSON, J. M.; ALBRIGHT, K. J.; LIU, W. and PARIZA, M. W. «Evidence that the trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice». *Lipids*, 34:235-241, (1999).
- PARK, Y.W. « Relative buffering capacity of goat and cow milk, soybased infant formulas and commercial non prescription antacid drug». *J. Dairy Sci.*, 74:3326-3333, (1991).
- PARK, Y.W. «Goat milk. Chemistry and nutrition». In: PARK, Y.W. and HAENLEIN, G.F.W. «Handbook of Milk of Non-bovine Mammals». Blackwell Publishing, Oxford, pp: 34-58, (2006).
- PARK, Y.W. «Hypo-allergenic and therapeutic significance of goat milk». *Small Rumin. Res.*, 14:151-155, (1994).

- PARK, Y.W.; MAHONEY, A.W. and HENDRICKS, D.G. « Bioavailability of iron in goat milk compared with cow milk fed to anaemic rats». *J. Dairy Sci.* 69:2608- 2615, (1986).
- PARKASH, S. and JENNESS, R. «The composition and characteristics of goat milk: review». *J. Dairy Sci. Abstr.*, 20:67-87, (1968).
- PATTERSON, A.J. «Dietary treatment of iron deficiency in women of child-bearing age». *Am. J. Clin. Nutr.*, 74:650-656, (2001).
- PAULINE, L.; LEE and BEUTLER, E. «Regulation of Heparin and Iron-Overload Disease». *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, 4:489-515, (2009).
- PENN, D.; DOLDERER, M. and SCHMIDT-SOMMERFELD, E. Carnitine concentrations in the milk of different species and infant formulas». *Biol. Neonate*, 52:70-79, (1987).
- PEYSSONAUX, C.; ZINKERNAGEL, A.S.; SCHUEPBACH, R.A.; RANKIN, E.; VAULONT, S.; HASSE; V.H.; NIZET, V. and JOHNSON, R.S. «Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs) ». *J. Clin. Invest.*, 117:1926-1932, (2007)
- PIETRANGELO, A. «Hereditary hemochromatosis». *Biochim. Biophys. Acta*, 1763:700-710, (2006).
- PIETRANGELO, A. «Physiology of iron transport and the hemochromatosis gene». *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.*, 282:G403-G414, (2002).
- PLOSZAJ, T.; RYNIWCZ, Z. and MOTYL, T. «Polyamines in goat's colostrum and milk». *Comp. Biochem. Physiol.*, 118B:45-52, (1997).
- PONNUSWAMY, P. and GROMIHA, M. «On the conformational stability of oligonucleotide duplexes and tRNA molecules». *J. Theor. Biol.*, 169(4):419-432, (1994).

- POSATI, L.P. and ORR, M.L. «Composition of foods, dairy and eggs products». Agriculture Handbook No. 8-1. USDA-ARS, Consumer and Food Economics Institute Publishers, Washington, DC, pp: 77-109, (1976).
- PUNNONEN, K.; IRJALA, K. and RAJAMAKI, A. «Serum transferrin receptor and its ratio to serum ferritin in the diagnosis of iron deficiency». Blood, 9:1052-1057, (1997).
- QUIDT, G.Y.; TRIVERI, M.G.; KHAPER, N.; LIU, P.P. and BLACKX, P.H. «Role of L-type Ca²⁺ channels in iron transport and iron-overload cardiomyopathy». J. Mol. Med., 84:349-364, (2006).
- RAJA, K.B.; SIMPSON, R.J.; PIPPARD, M.J. and PETERS, T.J. «In vivo studies on the relationship between intestinal iron (Fe³⁺) absorption, hypoxia and erythropoiesis in the mouse». Br. J. Haematol., 68(3):373-378, (1988).
- RAJA, K.B.; SIMPSON, R.J. and PETERS, T.J. «Intestinal iron absorption studies in mouse models of iron-overload». Br. J. Haematol. 86:156-162, (1994).
- RAMM, G.A. and RUDDLELL R.G. «Hepatotoxicity of iron overload: Mechanisms of ironinduced hepatic fibrogenesis». Semin. Liver Dis., 25:433-449, (2005).
- REDDY, M.B. and COOK, J.D. «Effect of calcium intake on nonheme iron absorption from a complete diet». Am. J. Clin. Nutr., 65:1820-1825, (1997).
- REEVES, P.; NIELSEN, F. and 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., 123:1939-1951, (1993).

- ROSSANDER-HULTEN, L.; BRUNE, M.; SANDSTROM, B.; LONNERDAL, B., and HALLBERG, L. «Competitive inhibition of iron absorption by manganese and zinc in humans». *Am. J. Clin. Nutr.*, 54(1):152-156, (1991).
- ROUAULT, T.A. «The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease». *Nat. Chem. Biol.*, 2:406-414, (2006).
- ROUGHEAD, Z.K.; ZITO, C.A. and 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.*, 82(3):589-597, (2005).
- 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. and HOUSEKNECHT, K. L. «Isomer-specific antidiabetic properties of conjugated linoleic acid». *Diabetes*, 50:1149-1157, (2001).
- SANZ CEBALLOS, L.; RAMOS MORALES, E.; DE LA TORRE ADARVE G.; DÍAZ CASTRO, J., PÉREZ MARTÍNEZ, L. and SANZ SAMPELAYO, M.R. «Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology». *J. Food Comp. Anal.*, 22:322-329, (2009).
- SANDBERG, A.S.; BRUNE, M.; CARLSSON, N.G.; HALLBERG, L.; SKOGLUND, E. and ROSSANDER-HULTHEN, L. «Inositol phosphates with different numbers of phosphate groups influence iron absorption in humans». *Am. J. Clin. Nutr.*, 70(2):240-246, (1999).

- SANDERSON, P. «A New method of analysis of feeding stuffs for the determination of crude oils and fat». In: HARESING, W. and COLE, D.J.A. «Recent advances in animal nutrition». London: Butter Worths, pp: 77-86, (1986).
- SANDSTROM, B. «Micronutrient interactions: effects on absorption and bioavailability». Br. J. Nutr. 85(2):S181-S185, (2001).
- SANTANA, M.A.; PIHAKASKI-MAUNSBACH, K.; SANDAL, N.; MARCKER, K.A. and SMITH, A.G. «Evidence that the plant host synthesizes the heme moiety of leghemoglobin in root nodules». Plant. Physiol., 116(4):1259-1269, (1998).
- 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 SAMPELAYO, M.R.; MARTÍN, A.J.; PÉREZ, L.; GIL EXTREMERA, F. and BOZA, J. «Dietary supplements for lactating goats by polyunsaturated fatty acid-rich protected fat. Effects after supplement withdrawal». J. Dairy Sci., 87:1796-1802, (2004).
- SHARP, P. «The molecular basis of copper and iron interactions». Proc. Nutr. Soc., 63(4):563-569, (2004).
- SIEGA-RIZ, A.M.; HARTZEMA, AG.; TURNBULL, C.; THORP, J.; MCDONALD, T. and 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., 194: 512-519, (2006).

- SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R. and SCHNEIDER, E.L. «A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells». *Exp. Cell Res.* 175:184-191, (1988).
- SIPE, D.M. and MURPHY, R.F. «Binding to cellular receptors results in increased iron release from transferrin at mildly acidic pH». *J. Biol. Chem.*, 266:8002-8007, (1991).
- SMITH, S.R.; COOPERMAN, S.; LAVAUTE, T.; TRESSER, N.; GHOSH, M.; MEYRON-HOLTZ, E. LAND, W.; OLLIVIERRE, H. , JORTNER, B.; SWITZER, R.R.D.; MESSING, A. and ROUAULT, T.A. «Severity of neurodegeneration correlates with compromise of iron metabolism in mice with iron regulatory protein deficiencies». *Ann. NY Acad. Sci.*, 1012: 65-83, (2004).
- STEPHENSON, L.S.; LATHAN, M.C. and OTTESEN, E.A. «Global malnutrition». *Parasitology*, 121:S15-S22, (2000).
- STEWART, W.B.; YULE, C.L.; CLAIBORNE, H.A.; SNOWMAN, R.T. and WHIPPLE, G.H. «Radioiron absorption in anemic dogs: fluctuations in the mucosal block and evidence for a gradient of absorption in the gastrointestinal tract». *J. Exp. Med.*, 92:75-82, (1950).
- STOLTZFUS, R.J. «Iron-deficiency anemia: reexamining the nature and magnitude of the public health problem». *J. Nutr.*, 131(2):697S-701S, (2001).
- ST-ONGE, M.P. and JONES, P. «Physiological effects of medium chain triglycerides: potential agents in the prevention of obesity». *J. Nutr.*, 132:329-332, (2002).

- SULLIVAN, L.W.; LUHBY, L.A. and STREIFF, L.W. «Studies on the daily requirement for folic acid in infants and the etiology of folate deficiency in goat's milk megaloblastic anemia». *Am. J. Clin. Nutr.*, 18:311-317, (1966).
- 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.*, 137:620-627, (2007).
- SWAIN, R.A.; KAPLAN, B. and MONTGOMERY, E. «Iron deficiency anemia: When is parenteral therapy warranted?». *J. Postgrad. Med.*, 100:181-193, (1996).
- SWAISGOOD, H.E. «Características de los fluidos líquidos de origen animal: leche». In: ACRIBIA, O.R. «Química de los Alimentos». Ed. Fonema, pp: 889-930, (1992).
- TAPPENDEN, K.A.; THOMSON, A.B.; WILD, G.E. and Mc BURNEY, M.I. «Short-chain fatty acid-supplemented total parenteral nutrition enhances functional adaptation to intestinal resection in rats». *Gastroenterology*, 112:792-802, (1997).
- TEUCHER, B.; OLIVARES, M. and CORI, H. «Enhancers of iron absorption: ascorbic acid and other organic acids». *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 74(6):403-419, (2004).
- THEIL, E.C. «Iron, ferritin and nutrition». *Ann. Rev. Nutr.* 24:327-343, (2004).
- THEURL, I.; AIGNER, E.; THEURL, M.; NAIRZ, M.; SEIFERT, M.; SCHROLL, A.; SONNWEBER, T.; EBERWEIN, L.; WITCHER, D.R.; MURPHY, A.T.; WROBLEWSKI, V.J.; WURZ, E.; DATZ, C.; WEISS, G. «Regulation of iron homeostasis in anemia of chronic disease and iron deficiency

- anemia: diagnostic and therapeutic implications». *Blood*. 113:5277-5286, (2009).
- TORTI, F.M. and TORTI, S.V. «Regulation of ferritin genes and protein». *Blood*, 99:3505-3516, (2002).
- U.S.D.A. DEPARTMENT OF AGRICULTURE, AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE; NUTRIENT DATA LABORATORY. USDA National Nutrient Database for Standard Reference. 17^aEd. pp: 106, (2004).
- UCHIDA, T.; AKITSUKI, T.; KIMURA, H.; TANAK, T.; MATSUDA, S. and KARIYONE, S. «Relationship among plasma iron, plasma iron turnover, and reticuloendothelial iron release». *Blood*, 61:799-802, (1983).
- UZEL, C. and CONRAD, M.E. «Absorption of heme iron». *Semin. Hermatol.*, 35:27-34, (1998).
- VAGHEFI, N.; NEDJAOUM, F; GUILLOCHON, D.; BUREAU, F.; ARHAN, P. and BOUGLÉ, D. «Iron absorption from concentrated haemoglobin hydrolysate by rat». *J. Nutr. Biochem.*, 16:347-352, (2005).
- VALERIE, K.; and POVIRK, L. «Regulation and mechanisms of mammalian double-strand breakrepair». *Oncogene*, 22(37):5792-5812, (2003).
- VAN CAMPEN, D.R. «Enhancement of iron absorption from ligated segments of rat intestine by histidine, cysteine and lysine. Effects of removing ionizing groups and of stereoisomerism». *J. Nutr.*, 103:139-142, (1973).
- VAN DEN BROEK, N.R. and LETSKY, E.A. «Etiology of anemia in pregnancy in south Malawi». *Am. J. Clin. Nutr.*, 72:247S-256S, (2000).
- VAN ZYL, C.G.; LAMBERT, E.V.; HAWLEY, J.A.; NOAKES, T.D., DENNIS, S.C. «Effects of medium-chain triglyceride ingestion on fuel metabolism and cycling performance». *J. Appl. Physiol.*, 80:2217-2225, (1996).

- VELÁZQUEZ, O.C.; SETO, R.W. and ROMBEAU, J.L. «The scientific rationale and clinical application of short-chain fatty acids and medium-chain triglycerides». *Proceedings of the Nutrition Society*, 55:49-78, (1996).
- VIVES CORRONS J.L.; MIGUEL-GARCIA, A.; PUJADES, M.A.; MIGUEL-SOSA, A.; CAMBIAZZO, S.; LINARES, M.; DIBARRART, M. and CALVO, M.A. «Increased susceptibility of microcytic red blood cells to in vitro oxidative stress». *Eur. J. Haematol.*, 55:327-331, (1995).
- VULPE, C.D.; KUO, Y.M.; MURPHY, T.L.; COWLEY, L.; ASKWITH, C.; LIBINA, N.; GITSCHIER, J. and ANDERSON, G.J. «Hepaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse». *Nat. Genet.*, 21(2):195-199, (1999).
- WATSON, J. and CRICK, F. «Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid». *Nature*, 171(4356):737-738, (1953).
- WATSON, J. D.; BAKER, T. A.; BELL, S. P.; GANN, A.; LEVINE, M. and LOSICK, R. «Las estructuras del DNA y el RNA». Madrid: Médica Panamericana., (2006).
- WEINSTEIN, D.A.; ROY, C.N.; FLEMING, M.D.; LODA, M.F.; WOLFSDORF, J.I. and ANDREWS, N.C. «Inappropriate expression of hepcidin is associated with iron refractory anemia: implications for the anemia of chronic disease». *Blood*, 100:3776-3781, (2002).
- WHITTAKER, P. «Iron and zinc interactions in humans». *Am. J. Clin. Nutr.*, 68(2):442S-446S, (1998).
- WHO and FAO. «Guidelines on Food Fortification with Micronutrients». Genova, (2006).

- WHO. «Iron supplementation of young children in regions where malaria transmission is intense and infectious disease highly prevalent», (2007).
- WHO. «Surgical care at the district hospital». Geneva, World Health Organization, (2003).
- WHO/FAO «Requirements of vitamin A, iron, folate and vitamin B12». Food and Nutrition Series, Rome: FAO. 23:33-50, (2004).
- WHO/UNICEF/UNU. «Iron deficiency anaemia: assessment, prevention, and control. A guide for programme managers». Geneva, World Health Organization, (2001).
- WIENK, K.J.; MARX, J.J. and BEYNEN, A.C. «The concept of iron bioavailability and its assessment». *Eur. J. Nutr.*, 38(2):51-75, (1999).
- WILKINS, M.H.F.; STOKES, A.R. and WILSON, H.R. «Molecular Structure of Deoxypentose Nucleic Acids». *Nature*, 171:738-740, (1953).
- WRIGH, W.; TESMER, V.; HUFFMAN, K.; LEVENE, S. and SHAY, J. «Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end». *Genes Dev.*, 11(21):2801-2809, (1997).
- YIP, R. «Significance of an abnormality low or high haemoglobin concentration during pregnancy. Special consideration of iron nutrition». *Am. J. Clin. Nutr.*, 72:272S-279S, (2000).
- ZAGO, M.P. and OTEIZA, P.I. «The antioxidant properties of zinc: interactions with iron and antioxidants». *Free Radic. Biol. Med.*, 31:266-274, (2001).
- ZLOTKIN, S. «Treatment of anemia with microencapsulated ferrous fumarate plus ascorbic acid supplied as sprinkles to complementary (weaning) foods». *Am. J. Clin. Nutr.*, 74:791-795, (2001).

ZOPPI, S.T.; BERRA, B. and ENNE, O. Goat milk products in the diet therapy of arteriopathic patients and/or in geriatric age. *Rev. Ita. Sostanze Grasse*, 72:67-71, (1995).