

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



**“ESTUDIO DEL METABOLISMO MINERAL Y ENZIMAS  
ANTIOXIDANTES DURANTE LA EVOLUCIÓN DE LA ANEMIA  
FERROPÉNICA NUTRICIONAL”**


**TESIS DOCTORAL**

**MARÍA RODRÍGUEZ FERRER**

**2011**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: María Rodríguez Ferrer  
D.L.: GR 4515-2011  
ISBN: 978-84-694-6007-8



The seal of the University of Granada is a circular emblem. It features a central shield with a crown on top, flanked by two eagles with their wings spread. The shield is supported by two columns. The entire emblem is surrounded by a circular border containing Latin text: "UNIVERSITATIS GRANATENSIS CAROLVS RO IMP SEPT AVG HISPAN REX FVNDA TOR".

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



M<sup>a</sup> Inmaculada López Aliaga. Profesora Titular de la Universidad de Granada.

M<sup>a</sup> José Muñoz Alférez. Profesora Titular de la Universidad de Granada.

Javier Díaz Castro. Profesor Sustituto Interino de la Universidad de Granada

**CERTIFICAN:**

Que los trabajos de investigación que se exponen en la Memoria de Tesis Doctoral: **“Estudio del metabolismo y enzimas antioxidantes durante la evolución de la anemia ferropénica nutricional”**, han sido realizados bajo nuestra dirección por la Licenciada María Rodríguez Ferrer 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 veinte de Mayo de dos mil once.





**MEMORIA QUE PRESENTA LA LDA. MARÍA RODRÍGUEZ FERRER PARA  
ASPIRAR AL GRADO DE DOCTOR POR LA UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**ESTA TESIS DOCTORAL HA SIDO REALIZADA BAJO LA DIRECCIÓN DE:**

Prof. Dra. M<sup>a</sup> Inmaculada López Aliaga.

Prof. Dra. M<sup>a</sup> José Muñoz Alférez

Prof. Dr. Javier Díaz Castro

Lda. D. María Rodríguez Ferrer

Granada, 2011







# Agradecimientos



Al acabar esta etapa de mi vida me gustaría dar las gracias a todas aquellas personas que lo han hecho posible:

- A la Profesora D<sup>a</sup> Margarita Sánchez Campos, por darme la oportunidad de llevar a cabo este trabajo, de conocer el mundo de la investigación, por su confianza y sus sabios consejos.
- A mi directora, la Profesora D<sup>a</sup> María Inmaculada López Aliaga, por su comprensión, por ser tan detallista y tener siempre la frase perfecta.
- A mi directora, la Profesora D<sup>a</sup> María José Muñoz Alférez, por animarme a seguir adelante y ver siempre el lado positivo.
- A mi director, el Profesor D. Javier Díaz Castro, por implicarse en mi tesis con tanta ilusión como si fuera la suya, gracias por tu ayuda desinteresada y lo más importante por tu amistad. He aprendido mucho de ti.
- 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<sup>a</sup> 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 eficiencia solucionando los temas administrativos, por su sonrisa constante y por su ánimo.
  
- A Mercedes y Silvia gracias por los buenos y malos ratos que hemos pasado juntas en el laboratorio, a Montse por esos desayunos al sol. Gracias por vuestro compañerismo.
  
- A mis amigas Andrea y Rocío por vuestros ánimos para seguir con este trabajo en los peores momentos. A Kika, María del Mar, Alicia y Estefanía gracias por ser tan buenas amigas a pesar de la distancia.
  
- Un agradecimiento muy especial a mi familia por su apoyo y cariño.

**“Dedicado a mis padres”**



---

1. OBJETO .....	1
2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	
2.1. El hierro en la nutrición.....	3
2.1.1. Introducción .....	3
2.1.2. Fuentes alimentarias de hierro .....	3
2.1.3. Interacciones con otros nutrientes .....	5
2.1.4. Funciones del hierro.....	8
2.1.5. Utilización nutritiva de hierro .....	10
2.1.5.1. Requerimientos .....	10
2.1.5.2. Absorción.....	13
2.1.5.3. Distribución y captación celular .....	18
2.1.5.4. Metabolización.....	20
2.1.5.5. Depósitos de hierro en el organismo .....	21
2.1.5.6. Eliminación .....	24
2.1.5.7. Regulación homeostática del balance de hierro .....	24
2.1.6. Importancia del hierro en la etapa de crecimiento .....	26
2.1.7. Deficiencia de hierro.....	27
2.1.7.1. Causas de la anemia ferropénica .....	28
2.1.7.2. Consecuencias de la ferrodeficiencia .....	29
2.1.7.3. Tratamiento de la anemia ferropénica .....	31
2.2. El calcio en la nutrición.....	34
2.2.1. Introducción .....	34
2.2.2. Fuentes alimentarias de calcio .....	34
2.2.3. Interacciones con otros nutrientes.....	36
2.2.4. Funciones del calcio.....	39
2.2.5. Utilización nutritiva de calcio .....	41
2.2.5.1. Requerimientos .....	41
2.2.5.2. Absorción.....	42



2.2.5.3. Distribución y captación celular .....	45
2.2.5.4. Depósitos de calcio en el organismo .....	46
2.2.5.5. Eliminación .....	47
2.2.5.6. Regulación homeostática del calcio.....	49
2.3. El fósforo en la nutrición.....	51
2.3.1. Introducción .....	51
2.3.2. Fuentes alimentarias de fósforo .....	52
2.3.3. Interacción con otros nutrientes .....	53
2.3.4. Funciones del fósforo.....	54
2.3.5. Utilización nutritiva de fósforo .....	57
2.3.5.1. Requerimientos .....	57
2.3.5.2. Absorción .....	58
2.3.5.3. Distribución y captación celular .....	59
2.3.5.4. Depósitos de fósforo en el organismo .....	60
2.3.5.5. Eliminación .....	61
2.3.5.6. Regulación homeostática del balance de fósforo .....	61
2.4. El magnesio en la nutrición.....	67
2.4.1. Introducción .....	67
2.4.2. Fuentes alimentarias de magnesio .....	67
2.4.3. Interacción con otros nutrientes .....	68
2.4.4. Funciones del magnesio.....	69
2.4.5. Utilización nutritiva de magnesio.....	71
2.4.5.1. Requerimientos .....	71
2.4.5.2. Absorción .....	72
2.4.5.3. Distribución y captación celular .....	75
2.4.5.4. Depósitos de magnesio en el organismo.....	75
2.4.5.5. Eliminación .....	76
2.4.5.6. Regulación homeostática del balance de magnesio .....	77

---

2.5. El cobre en la nutrición .....	77
2.5.1. Introducción .....	77
2.5.2. Fuentes alimentarias de cobre.....	78
2.5.3. Interacción con otros nutrientes.....	79
2.5.4. Funciones del cobre .....	76
2.5.5. Utilización nutritiva de cobre .....	79
2.5.5.1. Requerimientos .....	81
2.5.5.2. Absorción.....	82
2.5.5.3. Distribución y captación celular .....	83
2.5.5.4. Depósitos de cobre en el organismo .....	83
2.5.5.5. Eliminación .....	83
2.5.5.6. Regulación homeostática del balance de cobre .....	83
2.6. El cinc en la nutrición.....	84
2.6.1. Introducción .....	84
2.6.2. Fuentes alimentarias de cinc .....	84
2.6.3. Interacción con otros nutrientes.....	86
2.6.4. Funciones del cinc.....	86
2.6.5. Utilización nutritiva de cinc .....	89
2.6.5.1. Requerimientos .....	89
2.6.5.2. Absorción.....	89
2.6.5.3. Distribución y captación celular .....	90
2.6.5.4. Depósitos de cinc en el organismo .....	90
2.6.5.5. Eliminación .....	91
2.6.5.6. Regulación homeostática del balance de cinc .....	91
2.7. Radicales libres y sistemas de defensa antioxidante.....	92
2.7.1. Radicales libres .....	92
2.7.1.1. Introducción .....	92

2.7.1.2. Tipos de radicales libres y especies reactivas del oxígeno .....	93
2.7.1.2.1. Anión superóxido .....	94
2.7.1.2.2. Peróxido de hidrógeno .....	95
2.7.1.2.3. Radical hidroxilo .....	96
2.7.1.3. Daños celulares producidos por los radicales libres .....	97
2.7.1.3.1. Implicaciones fisiológicas y patológicas de los radicales libres.....	97
2.7.1.3.2. Radicales libres y envejecimiento .....	99
2.7.1.3.3. Efectos sobre los lípidos. Peroxidación lipídica .....	100
2.7.2. Sistema de defensa antioxidante.....	104
2.7.2.1. Introducción .....	104
2.7.2.2. Estrés oxidativo y metabolismo del hierro .....	106
2.7.2.3. Mecanismos de defensa antioxidante .....	107
2.7.2.3.1. Antioxidantes enzimáticos .....	107
2.7.2.3.1.1. Superóxido dismutasa.....	108
2.7.2.3.1.2. Catalasa.....	109
2.7.2.3.1.3. Glutathion peroxidasa.....	110
2.7.2.3.2. Antioxidantes no enzimáticos .....	112

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Diseño experimental.....	115
3.2. Dietas utilizadas .....	118
3.3. Técnicas analíticas.....	121
3.3.1. Materia seca .....	121
3.3.2. Materia grasa.....	121
3.3.3. Contenido en nitrógeno y composición de aminoácidos.....	121
3.3.4. Minerales totales .....	121

---

3.3.4.1. Hierro, calcio, magnesio, cobre y cinc.....	122
3.3.4.2. Fósforo.....	122
3.3.5. Parámetros hematológicos.....	123
3.3.6. Ferritina sérica.....	123
3.3.7. Hierro sérico, TIBC (capacidad total de unión al hierro) y porcentaje de saturación de la transferrina .....	124
3.3.8. Obtención de muestras de citosol eritrocitario, hepático y cerebral.....	124
3.3.9. Determinación de proteínas .....	126
3.3.10. Determinación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	127
3.3.11. Enzimas antioxidantes .....	128
3.3.11.1. Determinación de la actividad catalasa (CAT).....	128
3.3.11.2. Determinación de la actividad glutathion peroxidasa (GPx).....	130
3.3.11.3. Determinación de la actividad superóxido dismutasa (SOD).....	132
3.4. Índices biológicos.....	134
3.5. Control de calidad .....	135
3.6. Tratamiento estadístico .....	136
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>137</b>
4.1. Tablas .....	137
4.2. Cambios ponderales e ingesta de alimento en ratas controles y anémicas.....	147
4.3. Parámetros hematológicos .....	148
4.4. Utilización nutritiva.....	150
4.4.1. Utilización nutritiva de hierro .....	150
4.4.2. Utilización nutritiva de calcio, cobre y zinc .....	151
4.4.3. Utilización nutritiva de fósforo y magnesio .....	153
4.5. Mecanismos enzimáticos de defensa antioxidante y peroxidación lipídica...	154

5. RESUMEN Y CONCLUSIONES .....	159
6. BIBLIOGRAFÍA.....	163
7. APÉNDICE DE FIGURAS .....	199



# Objeto



## 1. OBJETO

La deficiencia de hierro es la más frecuente de las deficiencias nutricionales en el mundo con importante incidencia tanto en países desarrollados como los que se encuentran en vías de desarrollo. La anemia por deficiencia de hierro ha sido reconocida como uno de los mayores problemas sanitarios que afecta a una elevada proporción de la población mundial a todas las edades, siendo sobre todo los niños y adolescentes quienes presentan un riesgo especial por sus requerimientos aumentados, y también las embarazadas y madres en lactancia son un grupo vulnerable por el aumento de las demandas que se registran en esta etapa de sus vidas.

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

Los minerales son de los nutrientes mejor estudiados en cuanto a las interacciones que provocan otros componentes de la dieta sobre ellos y su efecto final en la biodisponibilidad mineral; el efecto negativo de la interacción entre minerales se debe, en general, a que compiten por los transportadores de membrana de los enterocitos, modifican el estado de oxidación o interfieren en el metabolismo del hierro.

Diversos estudios de absorción mineral han puesto de manifiesto que la deficiencia de hierro en la luz intestinal reduce el suministro de oxígeno a las células del organismo y por tanto la formación de ATP se encuentra limitada, situación que se ve agravada por la depleción de enzimas dependientes de hierro afectando posteriormente la absorción por mecanismo activo de otros minerales presentes en la dieta.

Por otra parte, existe controversia acerca de la susceptibilidad celular a la peroxidación lipídica en situación de ferrodéficiencia. Algunos autores afirman que no hay aumento en la peroxidación lipídica por efecto de la anemia, mientras que otros estudios muestran que existe un desequilibrio entre la producción de sustancias oxidantes y antioxidantes y como resultado se produce un estrés oxidativo. Asimismo en la bibliografía hay cierta ambigüedad en el estado enzimático antioxidante en situación de deficiencia de



hierro.

A pesar de que el hierro es uno de los nutrientes más investigados y mejor conocidos y la deficiencia de hierro ha sido ampliamente estudiada, todavía no son bien conocidas las interacciones de la ferrodeficiencia con el metabolismo de otros minerales, ni tampoco se conoce bien el estado de los procesos de estrés oxidativo y de los mecanismos de defensa antioxidante durante el desarrollo de una anemia ferropénica nutricional en las fases tempranas de la vida.

La alta prevalencia de la anemia ferropénica y la diversidad de población a la que afecta requiere un estudio en profundidad, no sólo cuando la deficiencia nutricional de hierro está instaurada, sino que es de extraordinario interés estudiar la evolución de la misma hasta su instauración. Así, esta investigación se centra en estudiar durante el desarrollo de una anemia ferropénica nutricional en ratas en período de crecimiento, la biodisponibilidad de hierro, con objeto de conocer como cambia el estatus de hierro durante la inducción de la ferrodeficiencia, así como las repercusiones sobre el metabolismo de otros minerales tales como Ca, P, Mg, Cu, y Zn, dado que existen interacciones entre ellos y que si son dilucidadas y el grado en que afectan el metabolismo mineral en el organismo se podrían paliar con un adecuado tratamiento. Así mismo, también se estudian los principales mecanismos enzimáticos de defensa antioxidante (catalasa, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa) en tejidos tales como hígado y cerebro, ya que en la anemia ferropénica nutricional el metabolismo del hierro está seriamente comprometido y es conocida la relación existente entre hierro y procesos de oxidación a nivel celular.



# Antecedentes Bibliográficos



## **2.1. EL HIERRO EN LA NUTRICIÓN**

### **2.1.1. INTRODUCCIÓN**

El hierro es uno de los nutrientes más investigados y mejor conocidos. Este interés viene determinado porque su deficiencia nutricional es la más común en todo el mundo.

La carencia de hierro es, con diferencia, la principal causa de anemia nutricional. La anemia por deficiencia de hierro ha sido reconocida como uno de los mayores problemas sanitarios que afecta a una elevada proporción de la población mundial a todas las edades. Los grupos de población más afectados son las mujeres en edad fértil, especialmente las embarazadas y los niños (Stephenson y col., 2000).

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

Las principales funciones del hierro son participar en los procesos redox que se dan en las reacciones de transferencia de electrones en la cadena respiratoria, facilitando la fosforilación oxidativa que permite convertir el ADP a ATP y el transporte de oxígeno.

### **2.1.2. FUENTES ALIMENTARIAS DE HIERRO**

El hierro se encuentra en un número limitado de alimentos animales y vegetales. Por ahora, la mejor fuente alimentaria de hierro es el hígado, seguido de pescados y ostras, riñones, corazón y carnes magras. Las judías secas son la mejor fuente vegetal de este elemento. Otras fuentes que aportan una buena cantidad de hierro son: la yema de huevo, frutos secos, melazas de fruta, pasta integral, vino y cereales. La leche y productos lácteos están prácticamente desprovistos de hierro. El maíz es un alimento altamente pobre en hierro, por eso ciertas culturas

cuyas dietas están basadas principalmente en este alimento, tienen tasas elevadas de anemia. La biodisponibilidad del hierro presente en la dieta es importante a la hora de considerar las fuentes alimentarias de dicho elemento. Por ejemplo, solo el 50% o menos del hierro presente en los cereales y algunos vegetales está disponible en una forma útil para el organismo. La fortificación con hierro de los cereales, harinas y pastas ha aumentado de forma significativa la ingesta total de hierro en ciertos países. Los cereales enriquecidos con hierro se han convertido en una fuente de hierro sustancial para niños, así como para adolescentes y adultos (Whittaker y col., 2001).

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

El hierro está en dos formas en la dieta: hierro hemo o hierro no hemo. La primera forma está presente en la carne como hemoglobina, mioglobina y ferritina, y el hierro no hemo está presente como hidróxidos de hierro y otras sales, que pueden ser endógenamente almacenadas en alimentos o adicionadas exógenamente durante la fortificación (por ejemplo de la harina) o como consecuencia de la contaminación. De las dos formas, el hierro hemo es el más disponible, la absorción media a partir de una comida que contiene hierro hemo es de un 25%. En una dieta occidental típica, el hemo debería probablemente constituir entre un 5 y un 10% de la ingesta de hierro diaria (Hallberg y col., 1979).

TABLA I. Contenido en Fe de distintos alimentos (Mataix y col., 1998)

<b>Alimento</b>	<b>Cantidad (mg/100g)</b>
<b>CARNES</b>	<b>1-3</b>
Hígado	13.0
Carne magra	1.3
Jamón serrano	2.3
<b>PESCADOS Y MARISCOS</b>	<b>0.4-2.7</b>
Pescado blanco	1.0
Pescado azul	1.1
Mariscos	2.5
<b>HUEVOS</b>	<b>2.2</b>
<b>LÁCTEOS</b>	<b>0.04-0.9</b>
Yogur natural	0.1
Queso	0.6
Leche entera	0.04
<b>LEGUMBRES</b>	<b>5.5-8.2</b>
Lentejas	8.2
Garbanzos	6.8
<b>FRUTOS SECOS</b>	<b>5-7.9</b>
Pistacho	7.2
<b>CEREALES</b>	<b>0.8-2.1</b>
Pan	1.6
Espaguetis	2.1
<b>VERDURAS Y HORTALIZAS</b>	<b>0.3-3</b>
Tomate	0.7
Patata	0.8
Acelga y espinaca	3.0
<b>FRUTAS</b>	<b>0.1-0.7</b>
Plátano	0.6
Naranja	0.5
Fresa y fresón	0.7

### 2.1.3. INTERACCIONES CON OTROS NUTRIENTES

La absorción de hierro hemo no está afectada por otros componentes de la dieta, con la posible excepción del calcio (Hallberg y col., 1991, 1992), pero el cocinado prolongado puede conducir a la degradación de la estructura porfirínica y la “conversión” a hierro no hemo (Lombardi-Boccia y col., 2002). Es de resaltar, que la presencia de carne en una comida no solo proporciona una fuente de hierro hemo sino también estimula la absorción

intestinal de hierro no hemo (Glahn y col., 1996, 1998; Swain y col., 2002) a través de un “factor carne” cuya naturaleza sigue sin estar completamente dilucidada. Parece ser que los aminoácidos de origen cárnico son los que aumentan la absorción de hierro no hemo, especialmente los aminoácidos ricos en histidinas y enlaces sulfidrilos. Por lo tanto, las carnes con alto contenido en actina y mucina, son las que aumentan la biodisponibilidad de hierro no hemo (Mulvihill y col, 1998).

La absorción de hierro puede ser inhibida en diferente magnitud por un número de factores que quelan el hierro, incluyendo carbonatos, oxalatos, fosfatos y fitatos. También ciertos factores presentes en la fibra vegetal pueden inhibir la absorción de hierro no hemo. El hecho de tomar en las comidas te o café puede reducir la absorción de hierro en un 50% debido a la formación de complejos de hierro insolubles con los taninos. El hierro de la yema de huevo se absorbe muy poco debido a la presencia de fosvitina (Stopler y col., 1999).

#### **-Potenciadores de la absorción del hierro no hemo:**

- Vitamina C:

La vitamina C potencia fuertemente la absorción de hierro no hemo, al reducir el hierro férrico de la dieta ( $Fe^{3+}$ ) a hierro ferroso ( $Fe^{2+}$ ) y mantener la solubilidad a un pH alto formando un complejo absorbible hierro-ácido ascórbico.

- Ácidos orgánicos:

Cítrico, málico, tartárico y láctico tienen efecto potenciador sobre la absorción de hierro no hemo.

- Carne, pescado y aves:

Aparte de proporcionar hierro hemo altamente absorbible, también potencian la absorción de hierro no hemo. El mecanismo para favorecer la absorción de hierro no está aún claro (Lynch, 1997; Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, 2004).

**-Inhibidores de la absorción del hierro no hemo:**

- **Ácido Fítico:**

Está presente en las legumbres y el arroz y actúa como inhibidor de la absorción de hierro no hemo. Pequeñas cantidades de ácido fítico (de 5 a 10mg) pueden reducir la absorción de hierro no hemo en un 50%. (Fairbanks, 1999; Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, 2004).

- **Polifenoles:**

Estos compuestos presentes en ciertas frutas, verduras, café, té y especias, pueden inhibir de forma notable la absorción de hierro no hemo. Este efecto se reduce en presencia de la vitamina C (Fairbanks, 1999; Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, 2004).

- **Proteínas de la soja:**

Las proteínas de la soja, como las que se encuentran en el tofu, tienen un efecto inhibidor en la absorción de hierro, que depende del contenido en ácido fítico (Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, 2004).

- **Minerales:**

La absorción del hierro no hemo se ve afectada por distintos minerales con propiedades fisicoquímicas similares en cierta medida al hierro, entre los que se encuentran el cinc, manganeso, cobre y calcio (Reddy y Cook, 1997). Sin embargo, en relación al calcio, Alférez y col. (2006) estudiaron la influencia de la leche de cabra y vaca sobre la utilización digestiva y metabólica de hierro en ratas adultas sanas y con anemia ferropénica nutricional inducida y demostraron el efecto beneficioso de la leche de cabra, la cual favorece la utilización de hierro y minimiza la interacción entre estos dos minerales.



#### **2.1.4. FUNCIONES DEL HIERRO**

El hierro 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 hierro 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 hierro debe estar unido fuertemente a proteínas para evitar estos potenciales efectos perjudiciales sobre las células.

Las funciones principales del hierro son:

##### **-Transporte y almacenamiento de oxígeno:**

El grupo hemo es un compuesto que contiene hierro y se encuentra en varias moléculas biológicamente activas. La hemoglobina y la mioglobina son proteínas que contienen el grupo hemo y están implicadas en el transporte y almacenamiento de oxígeno. La hemoglobina es la principal proteína de las células rojas de la sangre y representa aproximadamente dos tercios de todo el hierro 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. Las funciones de la mioglobina en el transporte y almacén de oxígeno a corto plazo en las células musculares, ayuda a cubrir su demanda por parte de los músculos que están trabajando (Beard, 2001).

##### **-Sensibilización al oxígeno:**

Un aporte inadecuado de oxígeno, por ejemplo como 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, 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 hierro-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  $\alpha$  de los recién sintetizados factores inducibles por la hipoxia, son modificados por la enzima prolil-hidroxilasa en un proceso dependiente de hierro 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  $\alpha$  para su degradación, lo que permite que esta subunidad  $\alpha$  se una a la subunidad  $\beta$  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:**

En la producción de ATP mitocondrial participan multitud de enzimas que contienen hierro hemo y no hemo. Los citocromos 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 alternas de oxidación y reducción (redox) del hierro. Numerosos xenobióticos insolubles en agua y moléculas orgánicas tóxicas son transformadas por el sistema del citocromo P<sub>450</sub> 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 de la acumulación de peróxido de hidrógeno, una especie reactiva del oxígeno altamente perjudicial, convirtiéndola en agua y oxígeno. Formando parte de la respuesta inmune, algunas células blancas de la sangre engloban a bacterias patógenas y las exponen a especies reactivas del oxígeno, consiguiendo así eliminar al agente patógeno. La síntesis de ácido hipocloroso (una

especie reactiva del oxígeno) de los neutrófilos es catalizada por la enzima mieloperoxidasa, que contiene el grupo hemo (Brody, 1999).

#### **-Síntesis del ADN:**

La ribonucleótido reductasa es una enzima dependiente de hierro requerida para la síntesis del ADN, de hecho, esta enzima tiene un papel limitante en la síntesis del ácido desoxirribonucleico (Beard, 2001).

### **2.1.5. UTILIZACIÓN NUTRITIVA DE HIERRO**

#### **2.1.5.1. REQUERIMIENTOS**

Los requerimientos de hierro en cada etapa de la vida están determinados por los cambios fisiológicos a los que se enfrenta el organismo durante su desarrollo.

Al nacer, el niño sustituye el suministro seguro de hierro aportado por la placenta por otro más variable y con frecuencia insuficiente, proveniente de los alimentos. Durante el primer año de vida, el niño crece rápidamente, como resultado de lo cual, al cumplir el primer año habrá triplicado su peso y duplicado su hierro corporal (Dallman y col., 1993). En este periodo se estima que las necesidades de hierro oscilan en un rango de entre 0.6 y 1.0 mg/Kg/día (11mg/día) (Bothwell, 1995; Food and Nutrition Board, 2004).

Durante esta etapa de vida, pueden distinguirse tres períodos característicos, en dependencia del estado nutricional del hierro. El primer período comprende las primeras 6-8 semanas, durante las cuales se produce un descenso progresivo de los niveles de hemoglobina, de 170g/L al nacer a 110g/L, como consecuencia de la disminución de la eritropoyesis. El hierro liberado producto de la destrucción de los hematíes es insuficiente para cubrir las necesidades durante este periodo y el que no se utiliza, se almacena para satisfacer las demandas de las siguientes etapas de desarrollo. Durante estas semanas, la cantidad de hierro 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 hierro almacenado como producto de la destrucción de los hematíes en la etapa anterior, que se traduce en un incremento de los niveles de hemoglobina.

El tercer periodo comienza alrededor del cuarto mes y se caracteriza por un aumento progresivo de la dependencia de hierro alimentario para garantizar una eritropoyesis eficiente. Esto hace que sea necesario asegurar al lactante una dieta rica en hierro, que garantice un suministro adecuado de este metal para cubrir sus requerimientos (Dallman y col., 1993).

En el caso de los 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 hierro exógeno antes del cuarto mes de vida.

Lönnerdal y Dewey (1995) afirman que durante la infancia, las necesidades de hierro para el crecimiento son menores, alrededor de 10mg/día, pero continúan siendo elevadas en términos de ingesta relativa, cuando se comparan 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 hierro o alteran su biodisponibilidad.

En la adolescencia se produce un nuevo incremento de las demandas de hierro, como consecuencia del crecimiento acelerado. Durante el desarrollo puberal, un adolescente aumenta unos 10Kg de peso, que debe acompañarse de un incremento de 300mg de su hierro corporal para lograr mantener constante su hemoglobina, que en este periodo aumenta a razón de 50-100g/L/año. En consecuencia, un adolescente varón requiere alrededor de 350mg de hierro por año durante el pico de crecimiento de la pubertad (Uzel y Conrad, 1998).

Las necesidades de hierro en mujeres son superiores, pues aunque la velocidad de crecimiento es menor, se adicionan las pérdidas menstruales (Lönnerdal y Dewey, 1995). El

aumento de unos 9Kg de peso de una adolescente durante la pubertad, implica un aporte de unos 280mg de hierro para mantener la concentración de hemoglobina en niveles adecuados. Un sangrado menstrual promedio de unos 30ml de sangre implica la pérdida de unos 75mg de hierro. En consecuencia, una adolescente en pleno pico de crecimiento requiere unos 455mg de hierro por 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).

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

**TABLA II.** Ingestas diarias recomendadas (RDA) de hierro (modificado de Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, 2004):

<b>Etapa de la Vida</b>	<b>Edad</b>	<b>Hombres (mg/día)</b>	<b>Mujeres (mg/día)</b>
<b>Lactantes</b>	0-6 meses	0.27	0.27
<b>Lactantes</b>	7-12 meses	11	11
<b>Niños</b>	1-3 años	7	7
<b>Niños</b>	4-8 años	10	10
<b>Niños</b>	9-13 años	8	8
<b>Adolescentes</b>	14-18 años	11	15
<b>Adultos</b>	19-50 años	8	18
<b>Adultos</b>	51 años en adelante	8	8
<b>Embarazo</b>	Todas las edades	-	27
<b>Lactancia materna</b>	18 años o menos	-	10
<b>Lactancia materna</b>	19 años en adelante	-	9

### 2.1.5.2. ABSORCIÓN

La mayor parte del hierro no hemo de la dieta entra en el tracto gastrointestinal en la forma férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Este es esencialmente no biodisponible y primero debe ser convertido a ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) (FIGURA I). Hay numerosos componentes dietarios capaces de reducir el  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  incluyendo el ácido ascórbico (Han y col., 1995; Wienk y col., 1999)  $\beta$ -caroteno (Layrisse y col., 1997; García-Casal y col., 2000) y aminoácidos tales como la cisteína (Glahn y van Campen, 1997) y la histidina (Swain y col., 2002). Además, los enterocitos poseen actividad reductora endógena gracias a la recientemente caracterizada reductasa férrica Dcytb (McKie y col., 2001) (Dcytb: citocromo duodenal b) que se expresa en la membrana del borde en cepillo de los enterocitos duodenales, el principal sitio para la absorción del hierro de la dieta. Se ha demostrado que una elevación de los anticuerpos frente al Dcytb, bloquea la actividad de la reductasa férrica endógena de la membrana del borde en cepillo duodenal. Además, el RNAm del Dcytb y la expresión proteica están reguladas al alza por los estimuladores de la absorción de hierro, sugiriendo un papel principal en la captación de hierro (McKie y col., 2001).

Una vez formado, el  $\text{Fe}^{2+}$  llega a ser un sustrato para el transportador metal divalente (DMT1) conocido también como transportador catión divalente DCT1 (Gunshin y col., 1997) y proteína macrófago asociada a la resistencia natural, Nramp2 (Fleming y col., 1997). El pH relativamente bajo del duodeno proximal junto con el microclima ácido presente en la membrana del borde en cepillo (Lucas y col., 1978; McEwan y col., 1990) estabiliza al hierro ferroso. Además, este medio proporciona una fuente rica de protones que son esenciales para el cotransporte con el hierro vía DMT1 (Gunshin y col., 1997; Tandy y col., 2000). El papel de este transportador en la homeostasis de hierro intestinal es puesto de relieve por dos modelos de roedores, el ratón *mk/mk* (Fleming y col., 1997) y la rata Belgrade (b) (Fleming y col., 1998). Ambos modelos de animales poseen la misma mutación (G185R) en el gen DMT1 que conduce al defecto en la captación intestinal de hierro y a la anemia microcítica.

También se ha propuesto que el  $\text{Fe}^{3+}$  puede ser absorbido por los enterocitos intestinales a través de un mecanismo que es distinto al del DMT1 (Conrad y Umbreit, 2000). En este modelo, cuando el hierro es movilizado a partir del alimento en el medio ácido del estómago, es quelado por las mucinas, las cuales mantienen el hierro en estado férrico. El  $\text{Fe}^{3+}$  entra en el enterocito a través de la membrana apical por interacción con la integrina  $\beta$ -3 y mobilferrina (una homóloga de la calreticulina). En el citosol, este complejo se combina con la flavina monooxigenasa y la microglobulina  $\beta$ -2 para formar un conglomerado más grande conocido como paraferitina, resultando en la conversión del  $\text{Fe}^{3+}$  absorbido a  $\text{Fe}^{2+}$ .

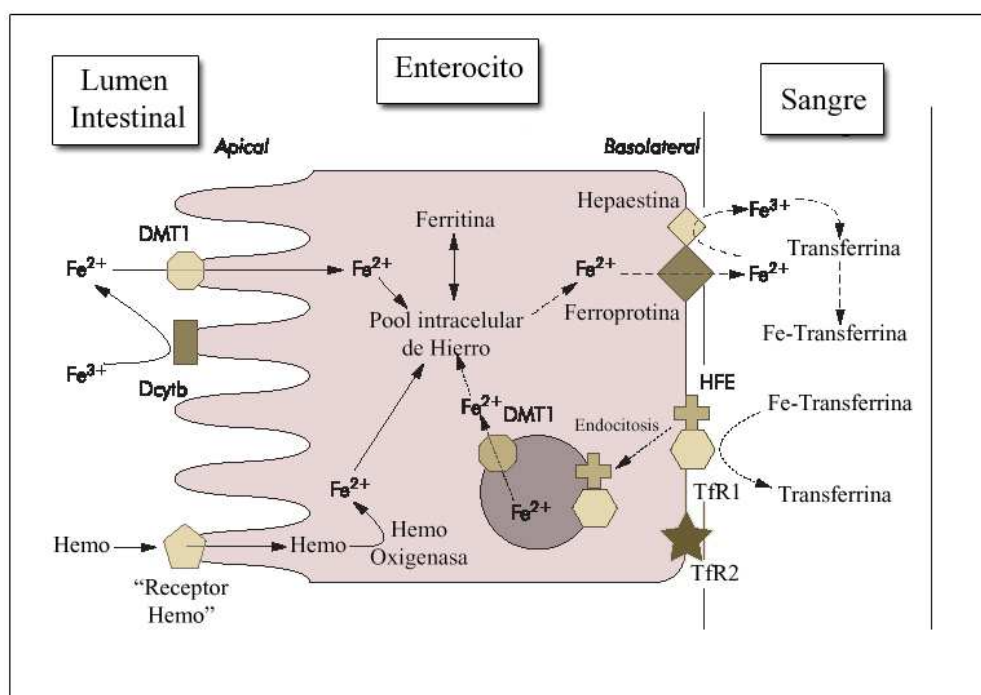
Los mecanismos involucrados en la captación del hemo no se conocen claramente. La captación tiene lugar a través de un mecanismo independiente del no hemo que puede involucrar un mecanismo mediado por receptor (Grasbeck y col., 1979, 1982). La evidencia funcional para un supuesto transportador/receptor hemo ha sido recientemente comprobada en las células intestinales Caco-2 (Worthington y col., 2001), pero su localización y función en los tejidos intestinales nativos tienen que ser determinadas.

Dentro del enterocito, el hierro contenido en el anillo porfirínico hemo es escindido por acción de la hemo oxigenasa (Raffin y col., 1974) y entra en un pool común, junto con el hierro no hemo, dentro de los enterocitos duodenales. En esta fase, el hierro absorbido tiene dos destinos, dependiendo de los requerimientos del organismo. Si los depósitos corporales (principalmente en el hígado) están repletos, el hierro será almacenado en los enterocitos como ferritina y eliminado del lumen intestinal, ya que las células viejas son desprendidas en el ápice de la vellosidad. Sin embargo, si hay unos requerimientos para reponer los depósitos o una demanda metabólica incrementada, el hierro absorbido pasa a formar parte del pool de hierro lábil, desde donde es procesado para la salida de la célula.

El flujo basolateral es llevado a cabo por medio de la acción coordinada de una proteína transportadora IREG1 (McKie y col., 2000)- también conocida como ferroportina 1 (Donovan y col., 2000) y MTP1 (Abboud y Haile, 2000)- y una oxidasa férrica, la hephaestina (Vulpe y col., 1999). El IREG1 actúa como una proteína de eflujo de hierro cuando se

expresa en los oocitos de *Xenopus laevis*, pero esta función requiere la presencia de ceruloplasmina, una proteína de unión con átomos de cobre que actúa como una ferroxidasa, además de la transferrina para unirse al hierro liberado recientemente (McKie y col., 2000). Esto sugiere que el eflujo de hierro por medio de la IREG1 ocurre como  $\text{Fe}^{2+}$  pero debe ser oxidado a  $\text{Fe}^{3+}$  para facilitar su carga sobre la transferrina, favoreciendo así el posterior transporte en el plasma. En el intestino, la oxidación del hierro es llevada a cabo por un homólogo de la ceruloplasmina, la hefaestina, la cual como la ceruloplasmina es una ferroxidasa multicobre. El papel de la hefaestina en el eflujo de hierro fue demostrado en la anemia vinculada al sexo de este modelo animal, donde la captación de hierro a partir de la dieta es normal, pero la liberación a través de la membrana basolateral está enormemente alterada. En estos animales, el gen de la hefaestina es defectuoso conduciendo a una forma de proteína truncada no funcional (Vulpe y col., 1999).

**FIGURA I.** Modelo de las rutas de absorción de hierro en el enterocito. La figura muestra el hierro iónico y el hierro hemo del lumen intestinal y su transferencia a la sangre. DMT1: Transportador de metales divalentes 1. HFE: proteína de la hemocromatosis. TfR1: Receptor de la transferrina 1. TfR2: Receptor de la transferrina 2. (Trinder y col., 2002):





### **-Regulación del transporte intestinal de hierro:**

La regulación de la absorción intestinal de hierro es un hecho complejo y reside en señales generadas en los principales sitios de almacén de hierro (hígado) y utilización (médula ósea) que indican el estado de hierro corporal. Estas señales son a menudo llamadas el “regulador de los almacenes” y el “regulador eritroide” respectivamente y juntos coordinan la captación intestinal con los requerimientos corporales.

El sitio de acción de estos reguladores es todavía controvertido. La hipótesis actual concerniente al control de la absorción intestinal de hierro contempla las células producidas recientemente en las criptas duodenales de Lieberkühn y los “sensores” de hierro intestinal que gobiernan la expresión de las proteínas involucradas en la homeostasis de hierro en el intestino.

Las células de las criptas solo expresan el HFE en el duodeno (Parkkila y col., 1997a; Waheed y col., 1999), una proteína que muta en más del 80% de los pacientes con hemocromatosis (Feder y col., 1996). El HFE es una molécula MHC de clase 1 que necesita estar asociada con la microglobulina  $\beta_2$  para el procesamiento intracelular normal y la expresión en la superficie celular (Feder y col., 1997; Waheed y col., 1997, 2002). La microglobulina  $\beta_2$  juega un papel esencial en el metabolismo del hierro, ya que la supresión de este gen conduce a una sobrecarga progresiva de hierro similar a la que aparece en los pacientes con hemocromatosis (Rothenberg y Voland, 1996; Santos y col., 1996).

Además del HFE y la microglobulina  $\beta_2$ , las células duodenales de la cripta también expresan receptores a la transferrina (TfR) en su superficie basolateral. Se cree que el HFE unido a TfR regula la velocidad a la cual la transferrina unida al hierro puede entrar en la célula (Parkkila y col., 1997b; Feder y col., 1998). Normalmente, la captación de hierro por el duodeno a partir del plasma es directamente proporcional a la concentración plasmática de dicho elemento. Sin embargo, en los ratones knockout *nfe* la captación duodenal de hierro a partir de la transferrina plasmática es significativamente menor que en los ratones controles, confirmando la hipótesis de que el HFE juega un papel crucial en la regulación de la

captación del hierro unido a transferrina (Trinder y col., 2002). Se pensó que la concentración celular de hierro establecida como el resultado de la interacción HFE/TfR determina, en último lugar, el nivel de expresión de las proteínas involucradas en la absorción de hierro en las células absortivas maduras en el tercio superior de las vellosidades. Esto esencialmente significa que los niveles de proteína transportadora son pre-programados en las células que dejan la cripta y que la re-programación en respuesta a cambios en el estado corporal de hierro necesita 2-3 días más para ser establecida (por ejemplo, el tiempo necesario para que se produzca la división de las células de la base de la cripta duodenal y lleguen a convertirse en enterocitos maduros en la punta de la vellosidad).

Se piensa que el control de la expresión de los genes reguladores de hierro, ocurre por medio de un mecanismo post-transcripcional que implica interacciones entre las proteínas reguladoras de hierro citosólico (IRP) y los elementos sensibles al hierro (IRE), estructuras de tronco curvo en ambas regiones no translocadas 5' y 3' de varias especies de RNAm, incluyendo los transportadores de hierro (Lee y col., 1998). Tradicionalmente, la interacción IRP/IRE en el 3'UTR (por ejemplo en el receptor de la transferrina) se sospecha que induce la estabilidad del RNAm (Casey y col., 1988; Müllner y Kühn, 1988; Hentze y Kühn, 1996).

La regulación de la expresión del transportador IREG1 es una cuestión compleja y la evidencia sugiere que la respuesta a cambios en el estado de hierro es específica de los tejidos. El RNAm IREG1 contiene un solo IRE en el 5'UTR (Abboud y Haile, 2000; McKie y col., 2000). Se ha demostrado que la expresión de otros genes que poseen 5'IREs, tales como la ferritina, está incrementada por el hierro elevado en los enterocitos duodenales (Oates y Morgan, 1997). De acuerdo con estos efectos previsibles, la expresión del IREG1 en el hígado (Abboud y Haile, 2000) y pulmón (Yang y col., 2002) es regulada por el hierro elevado. Sin embargo, el papel del IRE en la regulación de la transcripción del IREG1 intestinal es controvertido.

### 2.1.5.3. DISTRIBUCIÓN Y CAPTACIÓN CELULAR

#### **-Circulación sanguínea:**

La mayoría del hierro en la sangre forma parte de la hemoglobina de las células rojas, lo cual representa una cantidad de entre 400 y 600mg/L. La menor cantidad de este elemento presente en el plasma (2-20mg/L) está casi completamente unida a transferrina. La ferroxidasa (ceruloplasmina) oxida el  $\text{Fe}^{2+}$  circulante a  $\text{Fe}^{3+}$ . El  $\text{Fe}^{3+}$  puede fijarse a dos sitios de la transferrina, pero menos de la mitad de los sitios disponibles son ocupados en individuos sanos. La concentración de hierro libre (no unido a transferrina) es normalmente inferior a  $10^{-8}$  mol/l. El mantenimiento de una concentración muy baja de hierro libre limita la generación de radicales libres y evita la proliferación de bacterias dependientes de hierro en la sangre y tejidos. Incluso un leve incremento, típico en individuos con variantes heterocigóticas del gen de la hemocromatosis HFE, aumenta el riesgo de sufrir una septicemia mortal (Gerhard y col., 2001).

Los receptores de transferrina en las fosas recubiertas de clatrina de la superficie de muchas células portan transferrina diférrica (que tiene dos átomos de hierro) con cientos de pliegues preferentes comparado con la apotransferrina (que no porta hierro) y ejerce como mediador de la captación a través de la ruta de la endocitosis. La invaginación de las fosas conduce a la formación de vesículas endosómicas que comienzan la acidificación por la acción de una ATPasa transportadora de protones (Levy y col., 1999). La bomba de protones DMT1 bombea hierro desde la vesícula ácida (rica en protones) hasta el citoplasma donde se une a mobilferrina (Conrad y col., 1996).

Existen dos receptores de transferrina con una distribución tisular característica. El receptor de transferrina 1 (TfR1) se expresa principalmente en los enterocitos y los precursores de muchas células rojas. El receptor de transferrina 2 (TfR2) se expresa en las células hepáticas y monocitos circulantes. Más de cuatro residuos de ácido neuramínico residen en la transferrina sanguínea de la mayoría de individuos sanos. Al receptor de transferrina se une transferrina sin ácido neuramínico (asialotransferrina) en menor cantidad que la sialotransferrina normal. La asialotransferrina es preferentemente aclarada en el hígado vía receptor de la asialoglicoproteína

(Potter y col, 1992). Una ingesta muy elevada de alcohol incrementa el porcentaje de asialotransferrina en sangre (Walter y col., 2001).

#### **-Barrera hematoencefálica:**

Los mecanismos de transferencia de hierro desde la sangre al cerebro son de particular interés, porque un aporte inadecuado durante la infancia obstaculiza un óptimo desarrollo cognitivo e intelectual y porque la acumulación de hierro en el cerebro es una de las causas más comunes de enfermedades neurodegenerativas durante la tercera edad. El hierro puede alcanzar el cerebro por dos vías: atravesando la capa endotelial de los capilares cerebrales y por filtración al fluido cerebroespinal y consecuente captación mediada por receptor de las neuronas (Moos y Morgan, 2000). Tanto el hierro libre como el unido a proteínas también pueden cruzar directamente de la circulación sanguínea al cerebro a través de sitios sin barrera hematoencefálica.

El principal mecanismo para entrar a las células endoteliales de la barrera hematoencefálica es la endocitosis mediada por receptor del hierro unido a transferrina. El DMT1 transporta hierro fuera de las vesículas endocíticas (Burdo y col., 2001). La salida de hierro se realiza usando apotransferrina de los astrositos, que es captada vía receptores de transferrina, cargada con hierro y retornada al espacio extracelular. Otra ruta transepitelial capta hierro unido a lactoferrina, gracias a una proteína relacionada con el receptor LDL (Gross y Weindl, 1987). El transporte axonal puede aportar hierro a las neuronas fuera del cerebro a distancia considerable. La proteína transportadora de metales 1 (MTP1) promueve la salida de hierro del cerebro (Burdo y col., 2001).

#### **-Transferencia materno-fetal:**

La transferrina diférrica de la sangre materna atraviesa la capa sincitiotrofoblástica por endocitosis mediada por receptores de transferrina (Georgieff y col., 2000). El hierro es transportado fuera de los endosomas por la DMT1 y movido a la membrana basal. La salida de hierro del sincitiotrofoblasto hasta la sangre fetal es un proceso complejo y no completamente conocido, que implica la oxidación por una cobre-oxidasa de la placenta, de forma similar a la

acción de la ceruloplasmina (Danzeisen y col., 2000) y transferencia a través de la membrana basal por la ferroportina 1 (Gambling y col., 2001).

Al final de un embarazo a término, una madre ha proporcionado unos 245mg de hierro al feto y 75mg son usados para la placenta y el cordón umbilical (Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, 2004). Este hecho no tiene en cuenta la expansión de la masa de hemoglobina materna durante el embarazo (unos 500mg). Una ferodeficiencia materna incrementa la eficiencia de la transferencia de hierro al feto, parcialmente debida a la expresión incrementada de la cobre-oxidasa y el receptor de transferrina (Gambling y col., 2001). Esto significa que la transferencia de hierro al feto tiene preferencia sobre las necesidades de la madre y la deficiencia materna puede empeorar si la ingesta no es adecuada. La pérdida de sangre durante el alumbramiento implica una pérdida de otros 150mg de los depósitos maternos.

#### **2.1.5.4. METABOLIZACIÓN**

##### **-Recuperación de hierro hemo:**

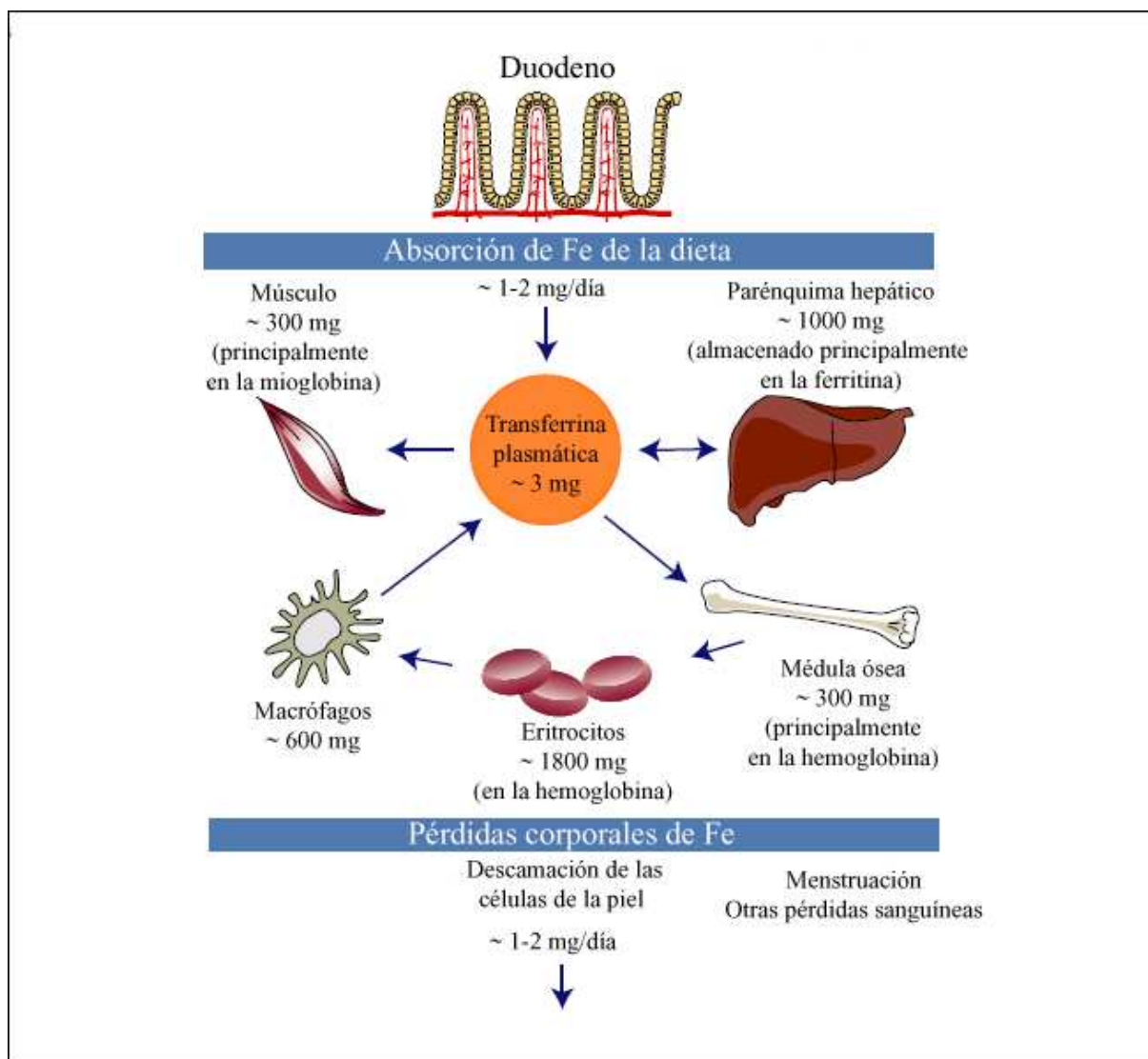
La hemo oxigenasa escinde el grupo  $\alpha$ -metileno del hemo, genera biliverdina y libera  $\text{Fe}^{3+}$ . La NADH-ferrihemoprotein reductasa es necesaria para producir en una reacción NADH-dependiente tres moléculas de ferricitocromo por cada grupo hemo escindido.

La isoforma 1 de la hemo oxigenasa es inducida por el grupo hemo, la presencia de metales pesados, agentes oxidantes y endotoxinas, mientras que la hemo oxigenasa 2 no es inducible. Las células rojas senescentes de la sangre (las que han cumplido su ciclo de vida medio de unos 120 días) son eliminadas de la circulación principalmente por el bazo y el hígado. La hemo oxigenasa microsomal del bazo y muchos otros tejidos también provoca la escisión del grupo hemo de la mioglobina, citocromos y enzimas con el grupo hemo. La biliverdina entonces puede ser metabolizada por la biliverdin-reductasa y es convertida en bilirrubina. Alrededor de un 40% del hierro de las células rojas fagocitadas es usada para la síntesis de hemoglobina; el resto va a almacenarse en los depósitos de hierro (Cassanelli y Moulis, 2001).

### 2.1.5.5. DEPÓSITOS DE HIERRO EN EL ORGANISMO

El contenido total de Fe en los hombres es de unos 50mg/Kg, mientras que las mujeres tienen una proporción ligeramente inferior y se distribuye como se ilustra en la FIGURA II. La mayoría del Fe del organismo (60-70%) forma parte de la hemoglobina de las células rojas (Papanikolau y Pantopoulos, 2004).

**FIGURA II.** Distribución del hierro en el organismo (Papanikolau y Pantopoulos, 2004):



El exceso de hierro se deposita intracelularmente como ferritina y hemosiderina, fundamentalmente en el sistema reticuloendotelial, el hígado y la médula ósea. Cada molécula de ferritina puede contener hasta 4500 átomos de Fe, aunque en condiciones normales tiene alrededor de 2500, almacenados como cristales de hidróxido fosfato férrico (Dallman y col., 1993; Wick y col., 1996; Cassanelli y Moulis, 2001).

La molécula de apoferritina es un heteropolímero formado por 24 subunidades de 2 tipos diferentes: L y H, con un peso molecular de 20 kDa cada una, constituidas por 4 cadenas helicoidales. Las variaciones en el contenido de subunidades que componen la molécula determinan la existencia de diferentes isoferritinas, las cuales se dividen en dos grandes grupos: isoferritinas ácidas (ricas en cadenas H) localizadas en el corazón, los glóbulos rojos, los linfocitos y los monocitos, y las isoferritinas básicas (ricas en cadenas L) predominantes en el hígado, bazo, placenta y granulocitos (Worwood, 1995; Cassanelli y Moulis, 2001).

Las subunidades se organizan entre sí de tal manera que forman una estructura esférica que rodea a los cristales de hierro. Esta cubierta proteica posee en su entramado 6 poros de carácter hidrofílico con un tamaño suficiente para permitir el paso de flavinmononucleótidos, ácido ascórbico o desferroxamina. Se plantea que estos poros tienen una función catalizadora para la síntesis de los cristales de hierro y su incorporación al interior de la molécula de ferritina (Dallman y col., 1993).

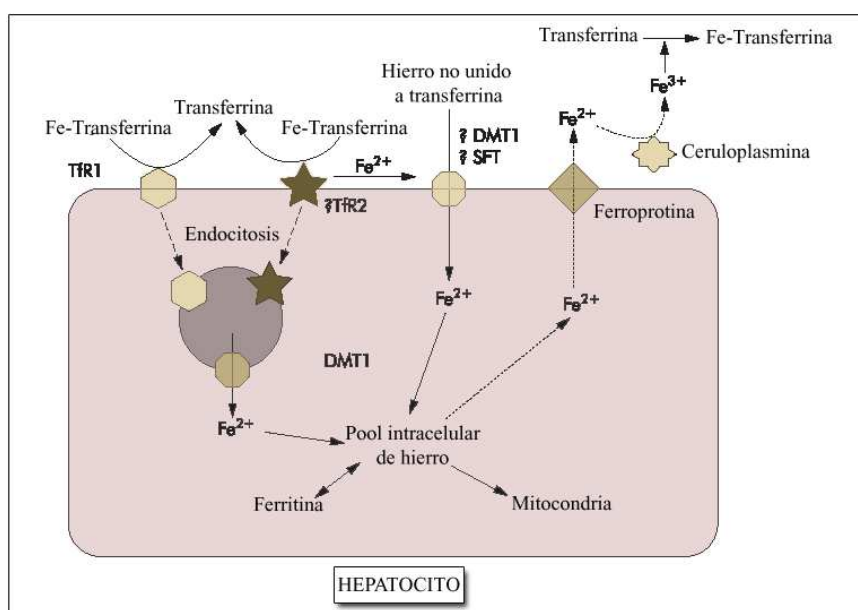
La función fundamental de la ferritina es garantizar el depósito intracelular de hierro para su posterior utilización en la síntesis de proteínas y enzimas (FIGURA III). Este proceso implica la unión del hierro a los canales de la cubierta proteica, seguido por la entrada y formación de un núcleo de hierro en el centro de la molécula. Una vez formado un pequeño núcleo sobre su superficie, puede ocurrir la oxidación de los restantes átomos del metal a medida que se van incorporando (Andrews y col. 1992).

Se han observado diferencias entre la velocidad de captación de hierro por las diferentes isoferritinas; así las isoferritinas ricas en cadenas H tienen mayor velocidad de captación y se ha

demostrado que ésta es precisamente la función de este tipo de subunidad. No obstante, las cadenas H y L cooperan en la captación del hierro, las subunidades H promueven la oxidación del hierro y las L, la formación del núcleo (Levi y col., 1992). Tanto el depósito de hierro como su liberación a la circulación son muy rápidos, e intervienen en este último proceso el flavinmononucleótido. El hierro es liberado en forma ferrosa y convertido en férrico por la ceruloplasmina plasmática para que sea captado por la transferrina que lo transporta y distribuye al resto del organismo.

La hemosiderina está químicamente emparentada con la ferritina, de la que se diferencia por su insolubilidad en agua. Aunque ambas proteínas son inmunológicamente idénticas, la hemosiderina contiene un porcentaje mayor de hierro (30%) y al microscopio se observa como agregados de moléculas de ferritina con una conformación diferente de los cristales de hierro (Cassanelli y Moulis, 2001).

**FIGURA III.** Representación esquemática de las rutas de absorción de hierro por los hepatocitos. DMT1: Transportador de metales divalentes 1. TfR1: Receptor de la transferrina1. TfR2: Receptor de la transferrina 2. STF: Estimulador del transporte de hierro. (Trinder y col. 2002):





### **2.1.5.6. ELIMINACIÓN**

El hierro se pierde inevitablemente a través de la bilis ( $84\mu\text{g}/\text{Kg}$ ), la piel ( $42\mu\text{g}/\text{Kg}$ ), y la orina ( $14\mu\text{g}/\text{Kg}$ ). Una pérdida menstrual típica supone 30ml por ciclo. La contracepción hormonal está asociada con menores pérdidas. El contenido de hierro de la hemoglobina es  $3.46\text{mg}/\text{g}$ . Con una concentración de hemoglobina en sangre de  $130\text{g}/\text{l}$ , la pérdida de 1ml de sangre equivale a  $0.45\text{mg}$  de hierro. Pérdidas escasas de sangre, usualmente de unos mililitros por día del tracto digestivo, es una causa común de deficiencia severa de hierro, especialmente en la tercera edad.

La lactancia materna supone unas pérdidas de hierro para la mujer de  $0.3\text{-}0.6\text{mg}/\text{día}$ , debido a la transferencia a la leche (Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, 2004).

Las pérdidas de hierro por la orina son relativamente escasas, porque muchas proteínas que contienen hierro 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 hierro 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 hierro notablemente.

### **2.1.5.7. REGULACIÓN HOMEOSTÁTICA DEL BALANCE DE HIERRO**

Los niveles de hierro son regulados principalmente a nivel de la absorción intestinal, pero otros sitios incluyendo los riñones, también desempeñan un papel primordial en la regulación homeostática del hierro (Ferguson y col., 2001).

La función de la transferrina en el intestino delgado puede ser el enlace entre la concentración intracelular de hierro y los niveles de hierro sistémicos (la absorción de hierro es alta y no responde a los niveles de hierro sistémico en ausencia de transferrina). Con un estado

de hierro idóneo, mayor cantidad de hierro va de los enterocitos a la sangre y la concentración intracelular de hierro se mantiene más alta que en condiciones de ferodeficiencia. Por tanto, individuos con los depósitos de hierro repletos absorben una mayor cantidad de hierro de la dieta, que aquellos que se encuentran en un estado de depleción.

La absorción intestinal de hierro está regulada en varios puntos. Uno de ellos es el ajuste de la captación mediada por la DMT1 (Divalent Metal Transporter). Una alta concentración de hierro en los enterocitos, tal como la que se puede producir con una comida rica en hierro, inmediatamente conduce a la redistribución de DMT1 desde el borde en cepillo de los enterocitos hasta el citosol e inmediatamente después a una disminución de los niveles de DMT1 y de la expresión del gen HFE (el gen responsable de la hemocromatosis) (Sharp y col., 2002). Un segundo mecanismo es el incremento de captación por la ferritina del enterocito en respuesta a una alta concentración de hierro intracelular. El complejo hierro-ferritina es bloqueado en su avance fuera de la célula y excretado en las heces cuando se produce la eliminación de la célula absorbente al final de su periodo de dos o tres días de vida (Conrad y Umbreit, 2000). El gen HFE que se parece a las moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), juega un papel importante en la regulación de la absorción de hierro, puesto que personas con este gen defectuoso absorben más cantidad de hierro y muestran un fenotipo clínico de hemocromatosis (Pietrangelo, 2002).

La enzima dependiente de hierro aconitato-hidratasa y una proteína relacionada sin actividad aconitasa actúan como proteínas reguladoras de hierro (IRP) que detectan la concentración citosólica de hierro disponible y lo unen a elementos de respuesta específicos para el hierro (IRE) en varios genes. La unión de las IRPs repletas de hierro a las IRE de la ferritina incrementa su expresión y por tanto, disminuye la absorción intestinal y promueve el depósito en el hígado y los tejidos hematopoyéticos. La unión de las IRPs repletas de hierro al receptor de transferrina RNAm acelera su degradación y ralentiza la transferencia del hierro del intestino y los tejidos de reserva de hierro. Análogas interacciones también regulan la expresión de la ferroportina 1 y DMT1 (Pietrangelo, 2002).

### 2.1.6. IMPORTANCIA DEL HIERRO EN LA ETAPA DE CRECIMIENTO

El Fe es un micronutriente esencial, requerido para una adecuada función eritropoyética y metabolismo oxidativo (respiración aeróbica), hecho que adquiere gran importancia durante las etapas de crecimiento, donde las demandas tisulares de oxígeno para satisfacer la elevada síntesis de ATP están incrementadas. El papel vital que desempeña la hemoglobina en el transporte de oxígeno desde los pulmones al resto del organismo se deriva de su capacidad para captar oxígeno rápidamente y liberar posteriormente este oxígeno a través de su circulación por los distintos tejidos. Las funciones de la mioglobina en el transporte y almacén de oxígeno a corto plazo en las células musculares, ayuda a cubrir su demanda por parte de los músculos que están trabajando o en periodo de desarrollo (Beard, 2001).

El Fe es un cofactor esencial para la prolil y lisil hidroxilasa en la síntesis y maduración de colágeno, por tanto juega un papel fundamental en la matriz orgánica del hueso (Tunderman y col., 1977), además la conversión de vitamina D<sub>3</sub> a 1,25-(OH)<sub>2</sub> Vitamina D<sub>3</sub> requiere dos pasos de hidroxilación en el hígado y en el riñón. La hidroxilación final de la vitamina D es Fe-dependiente, ya que requiere un sistema de tres componentes que implica una flavoproteína, una proteína sulfoférrica y un citocromo P-450 (De Luca, 1976). Por tanto, el Fe juega un papel esencial en el desarrollo de los huesos en crecimiento.

Además el Fe también es fundamental para satisfacer la alta demanda respiratoria y la síntesis de mielina y neurotransmisores (serotonina, dopamina, norepinefrina y ácido  $\gamma$ -aminobutírico) en el cerebro, favoreciendo por tanto el desarrollo motor y cognitivo del individuo desde edades tempranas (Moos y Morgan, 2004).

Por otra parte, la ribonucleótido reductasa es una enzima ferroddependiente requerida para la síntesis del ADN, presentando un papel limitante en la síntesis del ácido desoxirribonucleico (Beard, 2001), por tanto dada la elevada proliferación celular en las etapas de crecimiento rápido, es fundamental un aporte adecuado de Fe para evitar errores de replicación en el material genético.

### 2.1.7. DEFICIENCIA DE HIERRO

La deficiencia de hierro es la más común de todas las enfermedades por deficiencia de nutrientes en el mundo. La anemia ferropénica es una enfermedad con una alta prevalencia, especialmente en niños y mujeres en edad de gestación. Los grupos que se consideran 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 ferrodeficiencia, debido a sus pobres hábitos alimentarios y su continuo crecimiento. Mujeres en edad fértil que sufren ferrodeficiencia pueden beneficiarse de dietas ricas en hierro o suplementos (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).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la anemia se define como un nivel de hemoglobina inferior a 130g/L en hombres y menos de 120g/L en mujeres (Ania y col., 1997). La secreción de eritropoyetina aumenta cuando los niveles de hemoglobina descienden por debajo de 120g/L, indicando que esos niveles de hemoglobina son necesarios para una oxigenación óptima de los tejidos (Gabilove, 2000).

La anemia por deficiencia de hierro se caracteriza por la reducción o ausencia de depósitos de hierro, baja concentración de hierro sérico, baja saturación de transferrina, una concentración de hemoglobina baja y una reducción del hematocrito. Inicialmente, los depósitos corporales de hierro, la ferritina y la hemosiderina decrecen, mientras que el hematocrito y la hemoglobina permanecen normales. Después de esto, disminuye el nivel de hierro sérico y de forma concomitante aumenta la capacidad de fijación de hierro, 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 hierro sin anemia”. La anemia por deficiencia de hierro es un estado más avanzado de hiposiderosis, caracterizado por baja concentración de hemoglobina y descenso de hematocrito, con cambios en la morfología del

eritrocito, los cuales dan lugar a hematíes microcíticos e hipocrómicos, además de una disfunción del transporte de oxígeno (Hercberg y Galan, 1992).

### **2.1.2.1. CAUSAS DE LA ANEMIA FERROPÉNICA**

La cantidad de hierro en el organismo se deriva del balance entre las demandas fisiológicas y la cantidad ingerida. Hay determinados períodos de la vida en los que este balance es negativo y el organismo debe recurrir al hierro de depósito para poder mantener una eritropoyesis adecuada. Por lo tanto, durante dichas etapas una dieta con insuficiente cantidad o baja biodisponibilidad de hierro agrava el riesgo de desarrollar una anemia ferropénica.

La anemia ferropénica puede deberse a:

-Disminución del hierro disponible, no pudiendo satisfacer los requerimientos normales. En la mayoría de casos, la menor ingesta de hierro se produce en países pobres, donde la dieta en general es insuficiente y el menor aporte de hierro es una deficiencia nutricional más. En los países socioeconómicamente desarrollados, el aporte insuficiente se produce por dietas inadecuadas, desequilibradas o insuficientes.

-Elevados requerimientos de hierro, como ocurre durante los primeros años de vida, adolescencia, embarazo y lactancia.

-Pérdidas sanguíneas, bien por pérdidas menstruales excesivas o por hemorragias diversas, como ocurre en el caso de tumores intestinales o uterinos.

-Por último, también puede deberse a infestaciones parasitarias como sucede en la anquilostomiasis, a síndromes de malabsorción, pacientes con aclorhidria o gastrectomía extensiva (Scanlon y Yip, 1996).

### **2.1.2.2. CONSECUENCIAS DE LA FERODEFICIENCIA**

El hierro se encuentra formando parte de distintas moléculas de gran responsabilidad biológica, lo que conlleva alteraciones amplias y en ocasiones de gran severidad al establecimiento de anemia ferropénica. Las principales alteraciones que se producen en esta patología son:

#### **- Reducción de la capacidad física para realizar esfuerzos:**

La incapacidad de un adecuado aporte de oxígeno a la célula, así como la deficiencia de la cadena de transporte electrónico impiden una adecuada obtención de energía que explica entre otros efectos, la sensación de fatiga, apatía, mareos, debilidad, irritabilidad, anorexia, mialgias e incluso parestesias de pies y manos.

#### **-Disminución de la proliferación celular:**

Los epitelios mucosos disminuyen su grado de proliferación ante la falta de hierro, afectando en mayor grado a aquellos de mayor capacidad proliferativa. Así ocurre a nivel de la mucosa digestiva, donde puede llegar a producir atrofia gástrica con hipoclorhidia. Otras consecuencias de esta disminución de la proliferación celular son: lengua lisa y brillante, estomatitis angular, uñas quebradizas y deformes, pelo quebradizo, etc.

#### **-Palidez de piel y mucosas:**

Se debe a la disminución del pigmento hemático y la palidez cutánea a una vasoconstricción local, ya que como mecanismo homeostático circulatorio, se produce una desviación de la sangre desde la piel y riñón a los órganos vitales.

#### **-Manifestaciones circulatorias:**

Salvo en la piel y el riñón, hay vasodilatación con aumento del gasto cardiaco, lo cual, unido a una sangre más fluida, justifica la taquicardia, palpitaciones, aumento de la presión diferencial y por tanto la amplitud del pulso y los soplos cardiacos.

**-Disnea:**

Posiblemente se produce como consecuencia de una acidosis láctica hipóxica, que obliga a aumentar la ventilación, así como por una fatiga precoz de los músculos respiratorios.

**-Afectación cerebral:**

Se pueden afectar determinadas estructuras cerebrales que requieren un contenido relativamente elevado de hierro, 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 la deficiencia de hierro conduce a una disminución del receptor D2 de la dopamina. Esto, a su vez, se asocia con una alteración del catabolismo de las aminas biógenas como la serotonina, así como el de opiopéptidos endógenos. La sintomatología de la afectación nerviosa puede ser muy variada, pudiendo llegar a afectarse la atención, la memoria y el aprendizaje.

Con respecto a las manifestaciones de la patología en el sistema nervioso, hay que tener en cuenta que al nacimiento solo existe en el encéfalo un 10% del hierro presente en la edad adulta, aumentando el contenido neuronal hasta el 50% a los 10 años, alcanzando el nivel máximo entre los 20 y los 30 años. Lo más relevante observado en animales de experimentación es, que si no se alcanzan los niveles de hierro, sobre todo durante la época de crecimiento, no se pueden conseguir posteriormente, a pesar de un importante suministro de hierro, lo que conlleva un riesgo de afectación neuronal (Hallterman y col., 2001).

**- Disminución de las defensas frente a agentes infecciosos:**

Se produce una disminución de la respuesta inmune mediada por células (linfocitos T), ya que disminuye la actividad de la enzima ribonucleótido reductasa, dependiente de hierro. Además hay una reducción de la capacidad fagocítica de los neutrófilos, por una menor producción de radicales libres, al disminuir la NADH dependiente de hierro. Igualmente, también se ve afectada la mieloperoxidasa, implicada en el mecanismo de defensa.

**-Alteraciones metabólicas hepáticas:**

El hígado es uno de los órganos fundamentales en el metabolismo del hierro, ya que además de almacenar y reciclar las reservas de este elemento, sintetiza diversas enzimas dependientes de hierro. Así en situación de anemia, disminuyen diversas ferroproteínas hepáticas como la citocromo C oxidasa, succinato deshidrogenasa, aconitasa, xantina oxidasa y mioglobina.

**-Alteraciones hemáticas:**

- a) Hematíes: microcíticos (volumen corpuscular medio, VCM<80 fl). Además también son hipocrómicos, porque la síntesis de hemoglobina es insuficiente.
- b) Hemoglobina: inferior a 130g/L en el hombre y 120g/L en la mujer.
- c) Hierro sérico: inferior a 11mmoles/L.
- d) Capacidad de fijación de hierro: superior a 70mmoles/L.
- e) Índice de saturación de transferrina: inferior al 16%.
- f) Ferritina: inferior a 40mmoles/L.
- g) Sideroblastos (tinción de Perls): no existe hierro teñible en aspirado de médula.
- h) Otros datos hemáticos: los núcleos de los neutrófilos son hiperpigmentados y las plaquetas están aumentadas.

**2.1.2.3. TRATAMIENTO DE LA ANEMIA FERROPÉNICA**

El tratamiento de la anemia ferropénica requiere conocer y tratar la causa que origina la ferropenia, además de seguir una alimentación adecuada y de tomar los suplementos de hierro correspondientes. Esto es así porque una dieta equilibrada, rica en carne y pescado que son una importante fuente de hierro, resulta insuficiente cuando el déficit de este mineral es moderado o severo, por lo que hay que actuar con preparados comerciales de hierro.

Los aspectos más sobresalientes del tratamiento de la anemia ferropénica son los siguientes:



### **Suplementos de hierro**

- El tratamiento de elección es la administración de sales ferrosas por vía oral, ya que el ión ferroso se absorbe mejor que el férrico y además la relación absorción/precio es la más ventajosa.
- El aporte de hierro debe variar entre 50 y 100mg por dosis, ya que cantidades mayores aumentan los efectos secundarios. Los más frecuentes son gastrointestinales, como dispepsia, náuseas, diarrea, estreñimientos. Se pueden minimizar empezando con dosis bajas de hierro, para posteriormente llegar a una dosis terapéutica.
- La administración de hierro puede ser diaria o intermitente. En este sentido, un cierto número de trabajos experimentales recientes sugieren la posibilidad de obtener una eficacia biológica equivalente a la obtenida con la dosis tradicional antes descrita, espaciando la administración de hierro.

Los estudios realizados por Viteri y Cross (1993) utilizando una dosis suplementaria cada tres días, demuestran que de esta manera se obtienen mejores resultados que cuando se administran dosis diarias, al permitir el turnover de la mucosa intestinal, y evitar de esta manera la acumulación de hierro a nivel de dicha mucosa o a nivel hepático, que impediría su absorción.

Por tanto, el tratamiento intermitente de hierro (cada tres días) puede ser eficaz, sin el riesgo de efectos secundarios y con un coste considerablemente reducido en relación con el suplemento diario. Si estos resultados experimentalmente se comprobaran, se podrían diseñar programas de prevención más fácilmente aplicables, más simples, más económicos y mejor adaptados a la sociedad y con la posibilidad de cobertura más allá de las estructuras del sistema de salud.

### **Fortificación de alimentos**

Otra estrategia en el tratamiento de la anemia ferropénica, ante la magnitud del problema, es la fortificación de alimentos, aumentando la cantidad de hierro en alimentos básicos como la harina, la sal, el azúcar, alimentos infantiles, etc., que sin modificar las

calidades organolépticas del alimento, aumenten el aporte del mineral dentro de un patrón alimentario normal.

El tratamiento preferido, antes de la identificación de la fuente de pérdida de hierro, es la administración oral de suplementos de hierro. Las sales de hierro ferroso son las más utilizadas, debido a su mayor solubilidad y disponibilidad al pH del duodeno y el yeyuno. La terapia estándar para la anemia por deficiencia de hierro en adultos consiste en la administración oral de una tableta de 300 mg de sulfato ferroso (60 mg de hierro elemental), tres o cuatro veces al día. Mientras la absorción está potenciada por la administración del hierro con el estómago vacío, es común que aparezca dolor epigástrico cuando se ingiere el suplemento de hierro en ayunas, por eso debe ser ingerido con las comidas. Otros efectos adversos que pueden aparecer con este tipo de preparados son pirosis, náuseas, vómitos y diarreas. Estos síntomas se reducen administrando las tabletas con las comidas, disminuyendo la dosis de hierro o administrando oralmente hierro-carbonilo. Las preparaciones pediátricas líquidas de hierro pueden ser usadas, modificando la dosis, para evitar efectos adversos. 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 2-3 meses después de la corrección de la anemia para reponer los depósitos del hierro del organismo.

El hierro para administración intramuscular o intravenosa, estaba disponible en forma de hierro-dextrano, pero ha tenido una alta tasa de toxicidad y ahora rara vez es prescrito. Por el contrario, el polímero hierro-sacarosa resulta ser bastante más seguro. Otras preparaciones parenterales, tales como gluconato férrico y citrato férrico ceden el hierro a muchas proteínas aparte de las proteínas transportadoras de hierro, con lo cual pueden ser depositadas en el parénquima hepático y causar necrosis (Geisser y col., 1992). Los productos orales de hierro 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).

## **2.2. EL CALCIO EN LA NUTRICIÓN**

### **2.2.1. INTRODUCCIÓN**

El calcio es el mineral más común en el organismo humano y representa entre un 1.5 y un 2% del peso total del cuerpo. Alrededor del 99% se encuentra en los huesos y dientes, mientras que el 1% restante se encuentra en el líquido extracelular y tejidos blandos. Los niveles en la sangre y fluidos extracelulares deben ser mantenidos en unos rangos muy estrictos de concentración para asegurar un funcionamiento fisiológico normal del organismo. Las funciones fisiológicas del calcio son tan vitales, que el organismo recurre a la desmineralización ósea para mantener los niveles adecuados de éste en sangre cuando la ingesta no es adecuada. Puesto que el hueso contiene la mayor proporción de este mineral, su desarrollo y mantenimiento es el mayor determinante de las necesidades de dicho elemento. Los requerimientos varían en las distintas etapas de la vida, siendo mayores en los periodos de crecimiento rápido, en el embarazo y lactación y durante la tercera edad (Weaver y Heaney, 1999).

el embarazo y lactación y durante la tercera edad (Weaver y Heaney, 1999).

### **2.2.2. FUENTES ALIMENTARIAS DE CALCIO**

Las fuentes de calcio más importantes son la coliflor, repollo, nabo y el brócoli (de estos alimentos puede absorberse hasta el 50%). También son una fuente importante de este mineral: la raspa de la sardina y el salmón ahumado (se puede absorber hasta un 30% del calcio que contienen), las almejas y las ostras. El ácido oxálico limita bastante la biodisponibilidad en el ruibarbo, espinacas, y remolacha. Los zumos de naranja enriquecidos pueden llegar a contener tanto calcio como la leche. La soja también contiene una importante cantidad, el tofu preparado por precipitación de calcio es una excelente fuente. El pan y otros productos de repostería

preparados con calcio, tienen una cantidad aceptable de éste. Por otra parte, la leche y derivados lácteos también proporcionan un buen aporte de calcio y con una elevada biodisponibilidad (de la leche puede absorberse más del 30%), si tenemos en cuenta un consumo de dos o tres vasos de leche al día, que es una recomendación alimentaria bastante general, la cantidad de calcio aportado cubre una gran parte de la ingesta recomendada.

**TABLA III.** Contenido en calcio de distintos alimentos (Mataix y col., 1998):

<b>Alimento</b>	<b>Cantidad (mg/100g)</b>
<b>CARNES</b>	<b>6-46</b>
Pollo	22.8
Sesos de cerdo	10.0
Carne magra	8.0
Jamón serrano	12.7
<b>PESCADO AZUL</b>	<b>16-50</b>
Sardina	50.4
Atún	38.0
<b>PESCADO BLANCO</b>	<b>30-900</b>
Lenguado	30.0
Merluza	33.1
<b>MARISCOS</b>	<b>105.0</b>
<b>HUEVOS</b>	<b>56.2</b>
<b>LÁCTEOS</b>	<b>120-1200</b>
Yogur natural	142.0
Queso	636
Leche entera	120
<b>LEGUMBRES</b>	<b>70-143</b>
Garbanzos	143.0
<b>FRUTOS SECOS</b>	<b>180-270</b>
Almendras	270
<b>CEREALES</b>	<b>10-58</b>
Pan	56
Macarrones	25
<b>FRUTAS</b>	<b>4-41</b>
Mandarinas	36
Naranjas	41
Fresas y fresones	30
<b>VERDURAS Y HORTALIZAS</b>	<b>7-126</b>
Puerros	60
Escarolas	67
Espinacas	126

### 2.2.3. INTERACCIONES CON OTROS NUTRIENTES

Existen multitud de factores que afectan la biodisponibilidad del calcio. Algunos de estos factores ayudan a lograr un correcto estado de calcio para una correcta mineralización ósea. Se ha sugerido que ciertos iones disminuyen la absorción intestinal de calcio. Asimismo, se ha indicado la existencia de sustancias quelantes capaces de precipitar el mineral, disminuyendo la proporción de calcio disponible para ser absorbido, entre las cuales se encuentran los oxalatos y fitatos.

#### **- Proteína:**

Conforme aumenta la ingesta proteica, también se incrementa la excreción urinaria de calcio. Weaver y col. (1999) calcularon que cada gramo de proteína adicional ingerido con respecto a las recomendaciones, tiene la consecuencia de una pérdida adicional de calcio de 1.75mg por día. Puesto que solo el 30% del calcio de la dieta es absorbido, cada gramo de incremento en la ingesta proteica diaria, requiere 5.8mg de calcio adicionales para compensar la pérdida del mineral.

La biodisponibilidad del calcio en la leche es alta debido a su alto contenido en dicho mineral y que éste se encuentra asociado a caseínas. La caseína forma micelas, lo cual favorece la absorción de calcio, siendo más importante que el efecto de la proteína sobre la absorción del mineral. Además los caseinofosfopéptidos formados durante la digestión de la caseína mejoran la absorción del calcio, a través de su unión con el mineral, manteniendo así el catión en una forma soluble, que lo hace biodisponible e inhibe su precipitación en el intestino en forma de fosfato cálcico (Erba y Col., 2001).

#### **-Fósforo:**

El fósforo, que es típico de dietas ricas en proteína, tiende a disminuir la excreción de calcio en orina. Sin embargo, los alimentos ricos en fósforo también tienden a incrementar el contenido de calcio en las secreciones digestivas, dando como resultado un aumento de la pérdida de calcio en heces. Así pues, el fósforo no compensa la pérdida neta de calcio asociada a

la elevada ingesta proteica (Weaver y col., 1999). El incremento en la ingesta de fosfatos, debido a los aditivos alimentarios o ciertas bebidas, han causado preocupación en ciertos investigadores con respecto a la correcta mineralización ósea.

**-Sodio:**

Una ingesta elevada de sodio produce un aumento de las pérdidas de calcio en la orina, debido posiblemente a la competencia entre sodio y calcio por la reabsorción renal o por un efecto del sodio en la secreción de PTH.

Ciertos estudios en animales han revelado que la pérdida de masa ósea es mayor con elevada ingesta de sal y además, estudios clínicos han llevado a confirmar la relación entre ingesta de sal y pérdida de masa ósea en humanos (Weaver y Heaney, 1999; Calvo, 2000).

**-Carbohidratos:**

Los distintos tipos de carbohidratos (lactosa, sacarosa, polímeros de glucosa, maltodextrinas, etc.) afectan a la biodisponibilidad del calcio de formas diferentes (Moya y col., 1992). Se han observado porcentajes más elevados de absorción de calcio en niños alimentados con dietas que contenían lactosa (Bertolo y col., 2001). Sin embargo, su papel es controvertido pues parece que es cierto en lactantes, pero deja de favorecer la absorción de calcio, o al menos con importancia significativa, en edades mayores y adultos.

Los efectos de la lactosa en la absorción de minerales pueden ser atribuidos a los disacáridos, porque la glucosa y la galactosa no incrementan la absorción de minerales. Sin embargo, el mecanismo de acción aún no está claro.

**-Ácido fítico y fructooligosacáridos:**

La reducción de la biodisponibilidad del mineral por el ácido fítico está ampliamente reconocida y se basa en el hecho de que es una molécula cargada con seis grupos fosfato, que muestran una gran afinidad para unir cationes como el calcio en el tracto gastrointestinal, evitando así su absorción y también la posterior reabsorción del calcio excretado

endógenamente. Sin embargo, el efecto inhibitor del ácido fítico en la absorción mineral puede ser prevenido adicionando fructooligosacáridos a la dieta, los cuales no sólo incrementan la absorción del calcio y otros minerales sino que también inhiben los efectos negativos del ácido fítico en la absorción mineral.

Este efecto puede explicarse por el hecho de que los fructooligosacáridos no pueden ser degradados por las enzimas presentes en el intestino delgado y, por tanto, llegan prácticamente intactos al colon donde son fermentados por la flora bacteriana autóctona, produciendo gases, lactosa y ácidos orgánicos tales como acetato, propionato y butirato, que disminuyen el pH y hacen al calcio más soluble, favoreciendo su absorción (López y col., 2001).

#### **-Cafeína:**

La cafeína en grandes cantidades incrementa la excreción urinaria de calcio durante un limitado periodo de tiempo. Sin embargo, ingestas de cafeína de 400mg por día no cambian significativamente la excreción urinaria del mineral en mujeres premenopáusicas, comparado con el placebo (Barger-Lux y col., 1990). Aunque un estudio observacional encontró una pérdida de masa ósea acelerada en mujeres que consumieron menos de 744mg de calcio por día y bebían de 2 a 3 tazas de café al día (Harris y Dawson-Hughes, 1994).

#### **-Ciertos medicamentos:**

Algunos medicamentos como los antibióticos, anticonvulsivantes y corticosteroides interfieren con la absorción del calcio. Dentro de los antibióticos se encuentra la tetraciclina, un compuesto que forma quelatos con minerales, provocando que tanto el principio activo como el mineral no sean disponibles (Utermohlen, 2000). Los anticonvulsivantes tales como la fenitoína y fenobarbital, pueden causar hipocalcemia por tres mecanismos diferentes: (a) disminuyen la absorción de calcio, posiblemente a través de la inhibición de proteína transportadora de calcio, (b) estimulan el catabolismo del colecalciferol (vitamina D<sub>3</sub>) y (c) incrementan el catabolismo de la vitamina K, con la consiguiente reducción de la formación de proteínas dependientes de esta vitamina implicadas en el manejo del calcio por parte de los osteoblastos. Los corticosteroides administrados durante largos periodos incrementan la necesidad de vitamina B<sub>6</sub>, calcio y

vitamina D. El uso crónico de anticonvulsivantes y corticosteroides son factores clave en el desarrollo de osteoporosis secundaria en mujeres jóvenes (Utermohlen, 2000).

**-Edad:**

La edad puede influenciar la absorción de calcio. Las mujeres ancianas pueden tener una absorción de calcio defectuosa, debido a la falta de respuesta intestinal a la 1,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> (Pattanaungkul y col., 2000). Con la edad también decrece la cantidad de ácido producido en el estómago que incrementa el pH del estómago, debido a lo cual el calcio no puede disociarse completamente de las sales, provocando una disminución de la absorción. Según Weaver y Heaney (2001) la aclorhidia no debería suponer un problema si el calcio se ingiere con las comidas.

**-Estilo de vida:**

El estilo de vida puede afectar a la absorción de calcio. Need y col. (2002) demostraron en mujeres postmenopáusicas que fumar estaba asociado a una reducción de la eficacia de absorción de calcio, debido a la supresión del eje PTH-calcitriol. Hasta hace relativamente poco tiempo, se pensaba que el consumo de elevadas cantidades de alcohol durante largos periodos tenía un efecto adverso que afectaba a las hormonas reguladoras del calcio. Un estudio reciente (Wolf y col., 2000) determinó que incluso moderadas cantidades de alcohol en mujeres perimenopáusicas podrían tener un efecto negativo en la absorción de calcio.

## 2.2.4. FUNCIONES DEL CALCIO

**-Función estructural:**

El calcio es el principal elemento estructural en los huesos y los dientes. El componente mineral del hueso consiste principalmente en cristales de hidroxiapatita  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ , que contienen una gran cantidad de calcio y fósforo (aproximadamente un 40% de calcio y un 60% de fósforo) (Heaney, 2000). El hueso es un tejido dinámico que está sometido a una constante remodelación a lo largo de la vida. Durante un crecimiento normal, la formación ósea supera a la resorción. En las etapas de la vida en las que no hay crecimiento existe un equilibrio entre los



procesos de formación y resorción. La osteoporosis puede aparecer como resultado de un equilibrio negativo de ambos procesos, a favor de la resorción (Weaver y Heaney, 1999).

**-Mensajero intracelular:**

El radio iónico del calcio y su capacidad para formar enlaces de coordinación (reversibles) con hasta doce átomos de oxígeno, le permite localizarse en los pliegues de cadenas peptídicas, interactuando con ellas y haciendo posible la expresión de funciones específicas de las correspondientes proteínas, las cuales no se producen cuando el catión reversiblemente deja de estar unido a ellas.

El calcio juega un papel importante como mediador en la contracción y relajación de los vasos sanguíneos (vasoconstricción y vasodilatación), transmisión del impulso nervioso, contracción muscular y en la secreción de hormonas tales como la insulina. Las células excitables, como las del músculo esquelético y neuronas, contienen canales de calcio voltaje-dependientes en sus membranas celulares, lo cual permite cambios rápidos en las concentraciones de calcio (Weaver y Heaney, 1999).

**-Cofactor para enzimas y proteínas:**

El calcio es necesario para estabilizar o permitir la actividad óptima de un elevado número de proteínas y enzimas. La unión de iones de calcio es requerida para la activación de siete factores de coagulación dependientes de la vitamina K en la cascada de reacciones de la coagulación. El término de cascada de reacciones de la coagulación se refiere a una serie de eventos, dependientes todos entre sí, que frena el sangrado a través de la formación de agregados plaquetarios (Brody, 1999).

**-Liberación de neurotransmisor:**

El calcio juega un papel fundamental en la liberación de neurotransmisor desde las vesículas en las terminales sinápticas de las células nerviosas, pero muchos detalles acerca de estos mecanismos todavía no son bien conocidos (Agustine, 2001). Los canales de calcio voltaje-dependientes permiten un influjo rápido de calcio a las neuronas en respuesta a la

despolarización y esto inicia la liberación de neurotransmisor. La liberación de neurotransmisor y la excitabilidad de la neurona también está regulada a través de canales de potasio (Gribkoff y col., 2001).

**-Crecimiento y proliferación celular:**

El calcio está implicado en la iniciación de la síntesis de ADN, en la agrupación de los cromosomas, regulación de la división y proliferación celular. La estimulación de receptores sensibles al calcio, por ejemplo, promueve la diferenciación de células tales como los queratinocitos (Bikle y col., 2001).

**-Sistema vestibular:**

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

## **2.2.5. UTILIZACIÓN NUTRITIVA DE CALCIO**

### **2.2.5.1. REQUERIMIENTOS**

Las ingestas adecuadas estimadas por el Food and Nutrition Board (2004) están basadas en determinar los requerimientos de ambos géneros durante las distintas etapas de la vida. Durante varios periodos del ciclo de vida femenino, la ingesta de calcio es crítica: pubertad, adolescencia, postmenopausia, embarazo y lactancia. En un estudio en adolescentes, 1300 mg de calcio o incluso más fueron necesarios para obtener una máxima retención ósea (Yates, 1998). Los hombres también necesitan cantidades adecuadas de calcio durante su ciclo vital, pero se conoce menos acerca de sus requerimientos.

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

**TABLA IV.** Ingestas diarias recomendadas (RDA) de calcio (modificado de Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, 2004):

<b>Etapas de la Vida</b>	<b>Edad</b>	<b>Hombres (mg/día)</b>	<b>Mujeres (mg/día)</b>
<b>Lactantes</b>	0-6 meses	210	210
<b>Lactantes</b>	7-12 meses	270	270
<b>Niños</b>	1-3 años	500	500
<b>Niños</b>	4-8 años	800	800
<b>Niños</b>	9-13 años	1300	1300
<b>Adolescentes</b>	14-18 años	1300	1300
<b>Adultos</b>	19-30 años	1000	1000
<b>Adultos</b>	31-50 años	1000	1000
<b>Adultos</b>	51-70 años	1200	1200
<b>Adultos</b>	Más de 70 años	1200	1200
<b>Embarazo</b>	Menos de 18 años	-	1300
<b>Embarazo</b>	19-30 años	-	1000
<b>Embarazo</b>	31-50 años	-	1000
<b>Lactancia</b>	Menos de 18 años	-	1300
<b>Lactancia</b>	19-30 años	-	1000
<b>Lactancia</b>	Más de 30 años	-	1000

### 2.2.5.2. ABSORCIÓN

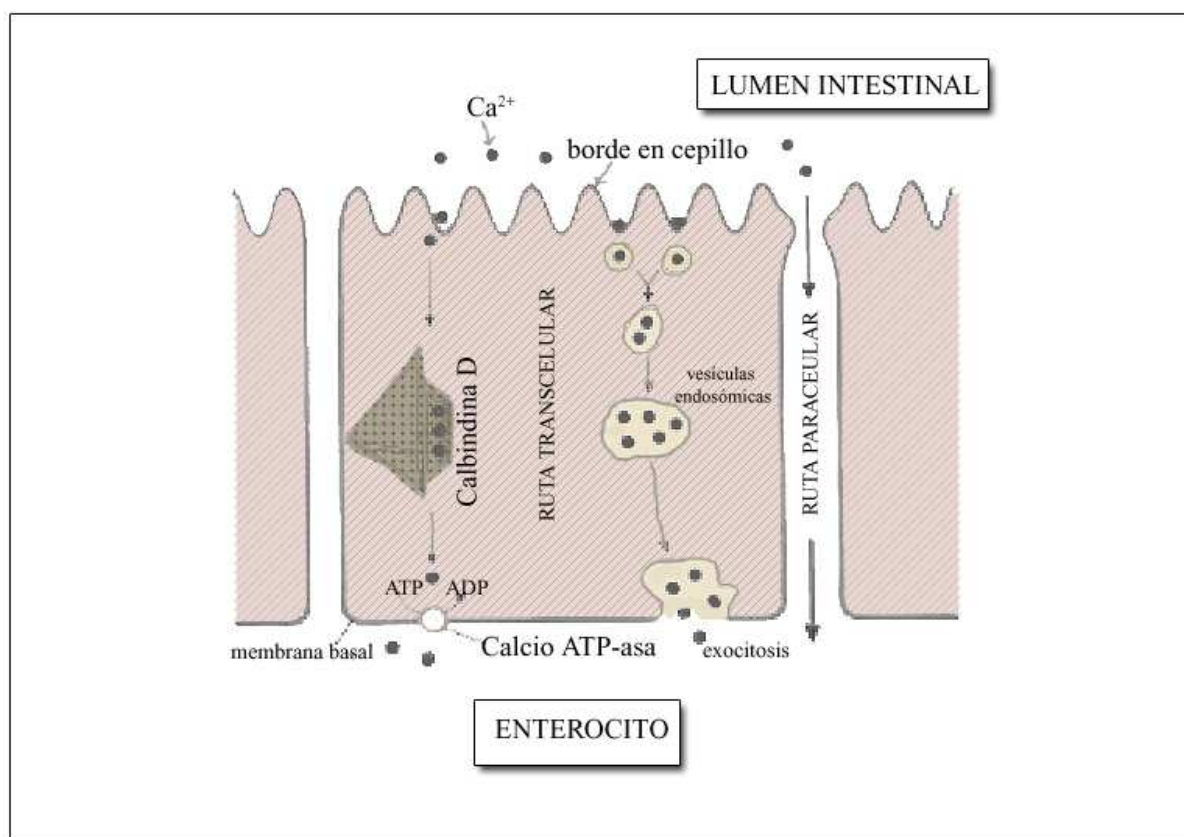
El calcio está presente en los alimentos y suplementos de la dieta como sales relativamente insolubles. Puesto que el calcio solo puede ser absorbido en su forma ionizada ( $\text{Ca}^{2+}$ ), debe ser liberado de estas sales antes de absorberse. Este proceso ocurre a pH ligeramente ácido, de manera que las sales cálcicas se solubilizan en una hora aproximadamente. Sin embargo, el calcio puede formar complejos con otros minerales o constituyentes de la dieta bajo condiciones de alcalinidad, como en el intestino delgado, limitando la biodisponibilidad del calcio ingerido (Groff y Gropper, 2000).

La mayoría del calcio es absorbido en el intestino delgado, específicamente en el íleon, debido al prolongado espacio de tiempo que los alimentos permanecen en esta región intestinal (Groff y Gropper, 2000). La eficiencia de la absorción de calcio está basada en el estado actual del calcio en el organismo. Durante las etapas de crecimiento, embarazo, lactancia y adolescencia donde se produce el pico máximo de acumulación de masa ósea, se puede llegar a absorber hasta un 75% del calcio presente en la dieta. Se ha sugerido que el calcio es un nutriente umbral (Heaney, 1999). La ingesta de calcio por encima del umbral no produce necesariamente un aumento de masa ósea a largo plazo. El aumento de masa ósea puede ser determinado por otros factores, incluyendo factores genéticos y el nivel de ejercicio (estrés mecánico). Puesto que el valor del umbral depende de la edad, existen variaciones en los requerimientos según la edad. Sin embargo, existe mucha controversia acerca de los niveles adecuados de ingesta en hombres y mujeres en función de su edad.

Existen dos procesos principales de transporte responsables de la absorción del calcio. El primer proceso es la denominada ruta transcelular, que tiene lugar en el duodeno y en el yeyuno proximal. Es una transferencia activa que requiere energía y una proteína de unión llamada calbindina (Groff y Gropper, 2000). Este proceso está regulado por el calcitriol o vitamina D,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (Weaver y Heaney, 1999). La ingestión de pequeñas cantidades de calcio estimula el sistema de transporte calcitriol-dependiente, particularmente con ingestas inferiores a 400mg y también bajo condiciones de mayor necesidad como son el embarazo, la lactancia y adolescencia. Conforme disminuyen los niveles de calcio sérico, aumentan los niveles de PTH, causando la liberación de calcitriol. La absorción inducida por calcitriol implica cambios en la membrana lipídica del enterocito e inicia la síntesis de calbindina, una proteína transportadora que actúa como lanzadera de calcio desde el citoplasma del enterocito a la membrana basal. Cuando llega a la membrana basal, el calcio debe ser transportado fuera de la célula al líquido extracelular. Este proceso de extrusión requiere energía en forma de adenosín trifosfato (ATP) y una enzima regulada por la vitamina D (Ca-Mg ATP-asa) que hidroliza el ATP y libera energía para bombear el calcio fuera de la célula, mientras el magnesio y el sodio son bombeados al interior de la célula (Groff y Gropper, 2000; Weaver, 2001). La absorción regulada por calcitriol

decrece con la edad, particularmente en la menopausia. La producción renal de calcitriol se vuelve menos eficiente en respuesta a la PTH, hecho que también se exagera con la edad.

**FIGURA IV.** Modelo de transporte de calcio intestinal (Stipanuk, 2000):



El calcio atraviesa el intestino por dos posibles rutas. Una de ellas está caracterizada por un transporte paracelular no saturable, dependiente de la concentración y requiere energía, teniendo lugar probablemente entre los enterocitos y no está regulado hormonalmente. El segundo proceso consiste en un transporte transcelular saturable dependiente de energía, que tiene una capacidad de transporte limitada y está regulado principalmente por la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  a través de un mecanismo que estimula la producción de calbindina D. La calbindina D es una proteína citosólica que actúa como un transportador intracelular para el calcio a través del compartimento citosólico acuoso. Parte del calcio también puede ser transportado en la célula por vesículas endosómicas y lisosómicas y salir de la célula a través de un proceso de exocitosis.

El segundo proceso por el que se produce la absorción de calcio, llamado difusión paracelular, implica la difusión pasiva del calcio entre las células en el yeyuno e íleon. La absorción de calcio por este proceso se incrementa cuando la ingesta de calcio es elevada y tiene lugar en un sistema de intercambio Na-Ca, en donde tres moléculas de  $\text{Na}^+$  se intercambian por una de  $\text{Ca}^{2+}$  (McCance y Hueter, 1998; Groff y Gropper, 2000). Una vez en la sangre, el calcio es transportado en una de estas tres formas: unido a proteínas (aproximadamente el 40%), formando complejos con fosfato, sulfato o citrato (aproximadamente el 10%) y libre o ionizado (el 50% restante) (Groff y Gropper, 2000).

El duodeno y yeyuno proximal son las regiones anatómicas más eficientes para la absorción activa del calcio, debido al pH ligeramente ácido (6.0) y la presencia de calbindina. Sin embargo, la mayoría de calcio se absorbe en el íleon debido al largo periodo de tiempo que el quimo permanece allí (Weaver y Heaney, 1999). Hay que tener en cuenta que el intestino delgado no es el único sitio donde se absorbe el calcio. Frecuentemente, el calcio se une a otros minerales y especialmente a la fibra. En muchos casos, esto impide la absorción del calcio, pero el intestino grueso contiene bacterias que pueden actuar en algunas fibras (como la pectina), fermentándolas y liberando así el calcio unido a ellas. Entre 5 y 8mg pueden ser absorbidos diariamente en el colon (Groff y Gropper, 2000).

### **2.2.5.3. DISTRIBUCIÓN Y CAPTACIÓN CELULAR**

#### **-Circulación sanguínea:**

La concentración normal de calcio en sangre oscila entre 2.20 y 2.65 mmol/L. Alrededor del 40% del calcio en sangre está unido a albúmina, 10% unido a citrato, bicarbonato o fosfato y el 50% restante está en forma ionizada. La afinidad del calcio por la albúmina y otras proteínas disminuye conforme desciende el pH (acidosis).

La concentración intracelular (citosólica) de calcio libre es una mínima fracción (alrededor de 0.0001 mmol/L) de la concentración en el fluido extracelular y la sangre. Varias ATPasas transportadoras de calcio bombean calcio al exterior de la célula para mantener este

elevado gradiente. Además, los endosomas, lisosomas y otros compartimentos intracelulares retiran calcio con alta especificidad, bajo una estrecha regulación.

**-Barrera hematoencefálica:**

La concentración de calcio es menor en el cerebro que en la sangre. La ATPasa transportadora de calcio en la luz del endotelio capilar cerebral mantiene este gradiente bombeando calcio a la sangre (Manoonkitiwongsa y col., 2000).

**-Transferencia materno-fetal:**

El enorme tamaño del feto en relación al estrecho canal del parto requiere cierta flexibilidad del cráneo. Este hecho podría explicar la razón por la cual la mineralización del esqueleto fetal es relativamente débil. Sin embargo, deben transferirse alrededor de 140mg/día de calcio de la madre al feto durante el tercer trimestre y un total de 30g de calcio durante toda la gestación. La información acerca de las rutas de transferencia de calcio a través de la placenta está aún incompleta. Parece claro que el calcio difunde desde la madre al sincitiotrofoblasto a través de canales de calcio por difusión pasiva, ya que la concentración de calcio en la sangre materna es mucho mayor que en el feto (Lafond y col., 2001).

#### **2.2.5.4. DEPÓSITOS DE CALCIO EN EL ORGANISMO**

El calcio es el mineral más abundante del cuerpo humano y es necesario en muchas reacciones fundamentales para el organismo. El calcio como ión es capaz de unirse a 12 moléculas de oxígeno, permitiéndole fácilmente unirse a proteínas. En el cuerpo humano, el 99% del calcio está en el esqueleto (Weaver, 2001). En el hueso está en forma de hidroxapatita  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ , permitiendo esta forma de calcio almacenado ser rápidamente liberado en caso de necesidad, cuando la ingesta es inadecuada.

El calcio no solo está localizado en el hueso, sino también distribuido en los líquidos intracelulares y extracelulares. Las concentraciones de calcio en sangre y fluido extracelular son mantenidas bajo estrecha regulación, a 2.5 mmol/L, con aproximadamente la mitad del calcio

existente como una molécula cargada positivamente, o una forma ionizada ( $\text{Ca}^{2+}$ ) en el plasma y en el resto unida o complejada con otras sustancias (Weaver, 2001). El calcio extracelular es la principal fuente de calcio para el desarrollo de los huesos. Intracelularmente, el calcio activa un amplio rango de respuestas fisiológicas, incluida la contracción muscular, liberación hormonal, liberación de neurotransmisor, metabolismo del glicógeno, visión y diferenciación celular (Weaver y Heaney, 1999).

#### **2.2.5.5. ELIMINACIÓN**

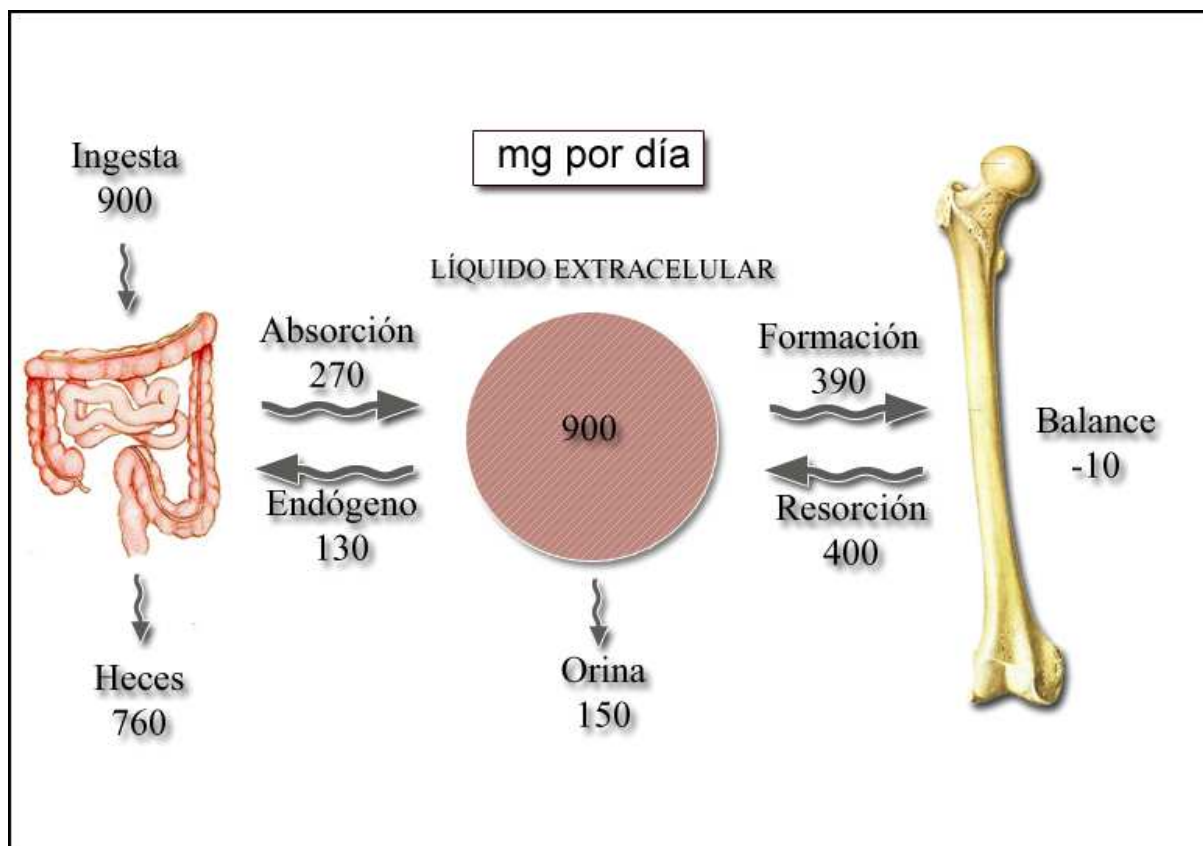
El exceso de calcio que no puede ser absorbido es excretado en las heces, orina y sudor. El balance de calcio en adultos es cero, de manera que el calcio absorbido es excretado por estas rutas, posiblemente después de haber sido incorporado y posteriormente liberado del hueso. Casi todo el calcio reabsorbido por el tracto intestinal proviene de secreciones como la bilis, y el calcio endógeno excretado en las heces es la fracción que no es reabsorbida.

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

La FIGURA V muestra las principales rutas del calcio en humanos adultos. Los adultos pierden aproximadamente un 0.3% de su masa ósea al año. Esto significa que su balance de calcio es ligeramente negativo y pierden unos 10mg de calcio cada año. Esta pérdida de masa ósea puede ser hasta 10 veces superior en mujeres postmenopáusicas.



**FIGURAV.** Rutas principales del calcio en adultos. (Guéguen y Pointillart, 2000):



El objetivo final de toda la regulación hormonal de la absorción, resorción ósea y reabsorción tubular del calcio es mantener la concentración plasmática de calcio constante, particularmente el 50% del mismo en forma iónica. La PTH y el calcitriol son las hormonas más importantes implicadas en la homeostasis del calcio. Este complejo mecanismo de control también regula el calcio extracelular (unos 900mg en el organismo humano). El fluido extracelular contiene unos  $10^{-3}M$  de  $Ca^{2+}$ , mientras que la concentración en el citosol es más de 1000 veces menor.

**-Factores de la dieta que afectan la excreción de calcio en orina:**

Excepto la ingesta simultánea de fósforo, que puede ser confundido con el efecto de la comida (casi todos los alimentos son ricos en fósforo), y ciertos constituyentes que elevan el pH (bicarbonatos, sales de potasio), todos los demás factores de la dieta tienen un efecto a nivel

renal que provocan un aumento de las pérdidas urinarias de calcio, generalmente por la reducción de la reabsorción tubular del mismo (Lemann, 1993).

El fósforo puede tener un efecto directo, incrementando la reabsorción de calcio en la parte distal de la nefrona, o un efecto indirecto, estimulando la secreción de PTH o favoreciendo el depósito de calcio en el hueso. La absorción simultánea de calcio y fósforo incrementa la captación de calcio por el hueso, por tanto, disminuye su excreción en orina.

Un exceso de proteína conduce generalmente a un incremento de la pérdida urinaria de calcio, que puede estar enmascarada por el efecto opuesto del exceso de fósforo (de componentes en la dieta ricos en proteína y fósforo). Este efecto es especialmente acusado en proteínas con alto contenido en aminoácidos con grupos sulfuro (cisteína, metionina), ya que la ruptura de estos grupos provoca la liberación de sulfato, causando una moderada acidosis e incrementando la eliminación de calcio en orina (Whiting y col., 1997). Los iones sulfato también se unen al calcio, impidiendo su reabsorción tubular e incluso su incorporación al hueso. Por tanto, no es de extrañar que un exceso de proteínas ricas en aminoácidos con grupo sulfuro u otras fuentes de sulfato (como ciertas aguas minerales), provoquen un aumento de las pérdidas urinarias de calcio que otros alimentos, tales como los típicos de dietas vegetarianas o con bicarbonatos, no suelen causar (Massey, 1998).

La acidosis crónica metabólica debido a excesiva ingesta de sulfato y aniones cloruro conduce a unas mayores pérdidas de calcio en orina. La alcalosis resultante de la ingestión de bicarbonato o citrato potásico tiene el efecto contrario (Massey, 1998).

#### **2.2.5.6. REGULACIÓN HOMEOSTÁTICA DEL CALCIO**

##### **-Sensor de calcio:**

Una red de hormonas y otros efectores regulan cuidadosamente la concentración de calcio en sangre. La proteína G asociada al receptor de calcio responde a las concentraciones extracelulares de calcio en varios puntos clave para la regulación (paratiroides, riñones, células

epiteliales intestinales, células óseas, queratinocitos, otros tejidos) y promueve la liberación de varios mediadores y hormonas implicadas en la homeostasis del calcio (Brown y col., 2001). El efecto depende del tipo de célula donde esté localizado el receptor. La estimulación del receptor por una alta concentración iónica de calcio, provoca una disminución de la secreción de PTH por parte de las células de la glándula paratiroidea, aumenta la secreción de calcitonina por las células C del tiroides, promueve la reabsorción renal de calcio o regula los canales de cloruro intestinales (Shimizu y col., 2000).

### **-Hormona paratiroidea (PTH):**

Las glándulas paratiroideas están situadas a los lados de la glándula tiroides. Estas glándulas secretan PTH en una respuesta muy rápida (segundos) a la disminución de la concentración de calcio ionizado en sangre. La PTH promueve la movilización de calcio desde el hueso, la reabsorción renal de calcio, la síntesis de 1,25-dihidroxi-vitamina D y otras actividades que no están relacionadas directamente con la disposición de calcio. La proteína relacionada con la PTH (PTHrP) es un importante regulador de calcio producido por el feto, placenta y a bajo nivel por algunos tejidos no relacionados con el embarazo en adultos. Esta hormona peptídica también tiene influencia en el transporte de calcio a través de la placenta, desarrollo óseo y funciones como estimulador paracrino de la diferenciación y el crecimiento celular. Las células secretoras de PTH pueden adaptarse muy rápido a diferentes concentraciones extracelulares de calcio, cambiando la degradación intracelular de PTH cuando está a punto de ser liberada. Si la síntesis de PTH es superior a la cantidad apropiada para la concentración de calcio circulante, un mayor porcentaje es secretado como fragmentos carboxi-terminales inactivos.

### **-Calcitonina:**

Esta hormona peptídica reguladora del calcio es secretada en las células C de la glándula tiroides, células pituitarias y unas pocas células neuroendocrinas ampliamente dispersadas. La unión de la calcitonina a su receptor inhibe la acción de los osteoclastos, e indirectamente la liberación de calcio.

**-Vitamina D:**

El complejo de la 25-hidroxi-vitamina D y la vitamina D unida a proteínas, filtran en el riñón y son captadas del lumen tubular renal a través del receptor endocítico de la mesalina. La producción de 1,25 dihidroxi-vitamina D tiene lugar en las células epiteliales del túbulo renal, bajo la regulación de la PTH. Las acciones de la vitamina D como hormona incluyen la regulación de la expresión de calcio-ATPasa en el intestino delgado y en los túbulos renales distales.

**2.3. EL FÓSFORO EN LA NUTRICIÓN****2.3.1. INTRODUCCIÓN**

El fósforo inorgánico (Pi) es el sexto elemento más abundante en el cuerpo humano, representando el 1% (500-700g) del peso corporal. Aproximadamente el 85% el Pi está en los huesos y dientes, el 15% en tejidos blandos y el resto (<1%) en los fluidos extracelulares.

Es fundamental para el correcto funcionamiento celular y la mineralización ósea. El Pi es suficientemente abundante en una dieta normal y es poco probable desarrollar una deficiencia, excepto bajo condiciones de extrema inanición o como consecuencia de la administración de ciertos agentes terapéuticos que captan el Pi. La ingesta normal de fósforo del humano adulto es de 800 a 1600mg/día. El Pi existe en el plasma en dos formas: una forma orgánica que consiste principalmente en fosfolípidos y ésteres de fosfato y una forma inorgánica. Aproximadamente el 29% del total de la concentración plasmática de Pi está en forma inorgánica y sólo esta forma es determinada en los análisis clínicos de rutina. De esta fracción, entre un 10 y un 15% está unido a proteínas y el resto, que es filtrado fácilmente por el glomérulo renal, existe como iones libres de Pi o como iones complejados con  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Mg}^{2+}$ .

En la medida del Pi plasmático, hay que tener en cuenta que existe una variación diurna con un mínimo entre las 9:30-10:00h y un máximo a las 4:00h. Esta variación en la concentración plasmática puede ser de hasta 1mg/dl, lo que representa del 25 al 35% de la

concentración plasmática. La concentración de Pi también varía en función de la edad, encontrándose los mayores niveles durante los tres primeros meses de vida. Las ratas tienen un valor normal de Pi algo superior a los humanos, debido a las diferencias en el metabolismo basal, que es superior en los roedores (Tenenhouse, 2005).

### **2.3.2. FUENTES ALIMENTARIAS DE FÓSFORO**

Es importante reconocer que los alimentos poseen tres tipos muy diferentes de compuestos de fósforo. Los primeros dos tipos, sales inorgánicas de fósforo y organofosfatos incluyendo los fosfolípidos, son fácilmente absorbidos y tienen un profundo impacto en el metabolismo humano. En contraposición a este hecho, los inositoles polifosfato son difícilmente absorbidos, no comparten ninguna de las características de las sales de fósforo o de otros organofosfatos y tienen propiedades características. Las tablas alimentarias actuales y otras fuentes de composición de alimentos proporcionan solo un valor único para el fósforo total y pierden por completo su utilidad en el caso de legumbres, frutas y verduras. Muchos de estos alimentos tienen una biodisponibilidad relativamente baja de fósforo, sin embargo esta información está disponible en las tablas de composición de alimentos más usadas (ADA, 1998).

El contenido en fósforo de alimentos derivados de vegetales es mucho más difícil de establecer, puesto que una gran cantidad de este nutriente está unido a inositol como fitato (inositol hexafosfato, pentafosfato o tetrafosfato). Este hecho debe ser tenido en cuenta, especialmente en grupos con dietas presumiblemente saludables (ricas en cereales, legumbres, frutas y verduras), en los cuales no es relevante la medida de la ingesta total de fósforo (Calvo y Park, 1996).

TABLA V. Contenido en fósforo de algunos alimentos (Mataix y col., 1998).

Alimento	Cantidad (mg/100g)
<b>CARNES</b>	<b>157-400</b>
Sesos	400
Lomo	170
<b>PESCADO AZUL</b>	<b>200-258</b>
Sardina	258
<b>PESCADO BLANCO</b>	<b>190-260</b>
Lenguado	260
<b>MARISCOS</b>	<b>221-300</b>
Langostinos, gambas y camarones	300
<b>HUEVOS</b>	<b>200</b>
<b>LÁCTEOS</b>	<b>90-810</b>
Yogur natural	90
Queso de burgos	600
Leche entera	100
<b>LEGUMBRES</b>	<b>240-540</b>
Judía blanca, pinta, etc.	400
<b>FRUTOS SECOS</b>	<b>304-510</b>
Almendras	510
<b>CEREALES</b>	<b>91-300</b>
Pan	91
Arroz integral	300
<b>VERDURAS Y HORTALIZAS</b>	<b>25-130</b>
Patata	50
Alcachofa	130
<b>FRUTAS</b>	<b>9-35</b>
Plátano	28
Kiwi	35

### 2.3.3. INTERACCIÓN CON OTROS NUTRIENTES

#### -Fructosa:

Un estudio (Milne y Nielsen, 2000) concluyó que una dieta rica en fructosa (20% del total de calorías) provocaba un incremento de las pérdidas urinarias de fósforo y un balance negativo (las pérdidas superaban la ingesta diaria). Este efecto era más pronunciado si la dieta también era deficiente en magnesio. Un mecanismo potencial para este efecto es la falta de inhibición por retroalimentación negativa de la conversión de fructosa en fructosa-1-fosfato en el hígado. En otras palabras, la acumulación incrementada de fructosa-1-fosfato en la célula no

inhibe la enzima que fosforila la fructosa, consumiendo grandes cantidades de fosfato. Este fenómeno es conocido como “captura de fosfato”. Este hallazgo es relevante porque el consumo de fructosa en los países industrializados se ha incrementado mucho en los últimos años, debido al elevado consumo de alimentos bajos en calorías que contienen este hidrato de carbono (Milne y Nielsen, 2000).

#### **-Calcio y Vitamina D:**

El fósforo de la dieta es rápidamente absorbido en el intestino delgado y el exceso de fósforo absorbido es excretado por vía renal. La regulación de los niveles plasmáticos de calcio y fósforo está vinculada a las acciones de la hormona paratiroidea (PTH) y la vitamina D. Un leve descenso en los niveles de calcio sanguíneo, estimula las glándulas paratiroideas aumentando por tanto la secreción de PTH. La PTH estimula la conversión de Vitamina D a su forma activa (calcitriol) en los riñones. Los niveles aumentados de calcitriol conducen a un aumento de la absorción intestinal de calcio y fósforo. La PTH y la vitamina D estimulan la resorción ósea, provocando la liberación de calcio y fósforo del hueso hacia la sangre. Aunque la estimulación de la producción de PTH produce una disminución de las pérdidas urinarias de calcio, también produce un aumento de la excreción urinaria de fósforo. Este incremento en las pérdidas renales de fósforo es una ventaja para elevar los niveles de calcio hacia el rango fisiológico, porque los altos niveles sanguíneos de fosfato inhiben la conversión de vitamina D en los riñones (Bringham y col., 1998).

#### **2.3.4. FUNCIONES DEL FÓSFORO**

El fósforo es uno de los principales constituyentes del hueso en forma de sales de fosfato cálcico denominado hidroxapatita. Los fosfolípidos son los principales constituyentes de las membranas celulares. Toda la producción y almacenamiento de la energía es dependiente de compuestos fosforilados como el adenosín trifosfato (ATP) y creatin-fosfato (CP). Los ácidos nucleicos, responsables del almacenaje y transmisión de la información genética son largas cadenas de moléculas que contiene grupos fosfato. Un número elevado de enzimas, hormonas y mensajeros celulares, dependen de la fosforilación para su activación. El fósforo también ayuda

a mantener un balance ácido-base adecuado (pH), siendo uno de los tampones más importantes del organismo. El 2,3-difosfoglicerato se une a la hemoglobina en las células rojas sanguíneas y afecta a la liberación de oxígeno en los distintos tejidos (Knochel, 1999).

**-Ésteres de fosfato ricos en energía:**

Muchas de las reacciones de transferencia de energía química en el organismo implican la intervención de ésteres de fosfato. Esto es especialmente cierto para el ATP, que es la principal “moneda energética” de gran parte de reacciones metabólicas, pero también se puede aplicar a más formas especializadas como el GTP, creatinin-fosfato y arginin-fosfato. Estos y otros nucleótidos adicionales son también las bases para la síntesis del ADN y ARN. Varios nucleótidos como el AMPc también son fundamentales, debido a la función que desempeñan como mensajeros celulares (Kohlmeier, 2003).

**-Organofosfatos:**

Un largo espectro de compuestos sintetizados endógenamente contiene uno o más grupos fosfato formando parte de su estructura. Son necesarias grandes cantidades de varios tipos de fosfolípidos para la formación de membranas celulares, vainas de mielina neuronales, transporte de lípidos con lipoproteínas y facilitar la absorción de lípidos a nivel intestinal, entre otras funciones (Kohlmeier, 2003).

**-Activación de ésteres de fosfato:**

El metabolismo de muchos nutrientes transcurre a través de la vía ésteres de fosfato en algún punto, para proporcionar la reacción energética necesaria. En este grupo se incluyen los fosfatos de glucosa, fructosa, galactosa y glicerol entre otros. La lista de vitaminas que son activas sólo como ésteres de fosfato incluye: tiamina, riboflavina, piridoxina, niacina y pantotenato. La fosforilación también puede servir para prevenir la salida de dichos nutrientes de la célula y favorecer la absorción por difusión pasiva. Un ejemplo típico de este hecho es la absorción intestinal de vitamina B<sub>6</sub>. La vitamina B<sub>6</sub> libre difunde a través del borde en cepillo del enterocito, participando unos transportadores aún desconocidos y es inmediatamente fosforilada por la piridoxal-quinasa. Puesto que la forma fosforilada no puede retornar y la



concentración intracelular de formas libres es muy baja, la difusión hacia el enterocito continúa mientras existan cantidades significativas en el lumen intestinal (Kohlmeier, 2003).

**-Fosforilación de proteínas:**

La actividad de muchas proteínas es regulada a través de la fosforilación y defosforilación. El efecto de un grupo fosfato añadido depende de la proteína en particular. Por ejemplo, la fosforilación inactiva la glicógeno-sintasa y la defosforilación reactiva el enzima (Kohlmeier, 2003).

**-Capacidad tampón:**

Las soluciones acuosas a pH fisiológico (alrededor de 7.4) contienen aproximadamente cuatro quintos del fosfato inorgánico como ión hidrogenofosfato ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) y casi un quinto como ión dihidrogenofosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ). Esto significa que la cantidad significativa de fosfato inorgánico en las células, fluido extracelular y sangre actúa como un buffer efectivo, que estabiliza y amortigua los cambios de pH (Kohlmeier, 2003).

**-Polifosfatos:**

Algunos tipos de osteoblastos contienen cantidades significativas de polifosfatos (Leyhausen y col., 1998). Estos polifosfatos pueden contener miles de grupos fosfato unidos a la cadena. La función de estas estructuras no es bien conocida. Se sugiere que podrían actuar almacenando fosfato, inhibiendo la mineralización ósea, quelando iones dibásicos y aminoácidos básicos, en la apoptosis, regulando el pH o protegiendo contra el estrés osmótico, por ejemplo. Las exopolifosfatasas y en algunos casos las pirofosfatasas liberan iones fosfato de las cadenas de polifosfato (Kohlmeier, 2003).

## **2.3.5. UTILIZACIÓN NUTRITIVA DE FÓSFORO**

### **2.3.5.1. REQUERIMIENTOS**

El fósforo se encuentra ampliamente distribuido en los alimentos, especialmente en los que son fuente de proteínas de origen animal (carnes, pescados, huevos, lácteos), en legumbres y frutos secos. Por ello, su deficiencia dietética es prácticamente desconocida. Además, se añaden aditivos ricos en fosfatos a muchos alimentos procesados. Las dietas con una adecuada cantidad de energía y proteína, aportan también cantidades suficientes de fósforo (Calvo y Park, 1996).

Las ingestas diarias recomendadas para el fósforo están basadas en el mantenimiento de un nivel normal de fosfato en el adulto, el cual cubre las necesidades celulares y la formación ósea.

La ingesta media de fósforo de un adulto en países industrializados es de 1300 mg/día para el hombre y 1000 mg/día para la mujer. La mayoría del fósforo (alrededor del 60%) proviene de la leche, carne, aves, pescado y huevos. Los cereales y las legumbres proporcionan otro 20% y menos del 10% proviene de frutas y zumos. Otras fuentes son té, café y aceites vegetales. La cantidad estimada que proporcionan los aditivos alimentarios es 10% (Calvo y Park, 1996).

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

**TABLA VI.** Ingestas diarias recomendadas (RDA) de fósforo (modificado de Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, 2004):

<b>Etapas de la Vida</b>	<b>Edad</b>	<b>Hombres (mg/día)</b>	<b>Mujeres (mg/día)</b>
<b>Lactantes</b>	0-6 meses	100	100
<b>Lactantes</b>	7-12 meses	275	275
<b>Niños</b>	1-3 años	460	460
<b>Niños</b>	4-8 años	500	500
<b>Niños</b>	9-13 años	1250	1250
<b>Adolescentes</b>	14-18 años	1250	1250
<b>Adultos</b>	19-30 años	700	700
<b>Adultos</b>	31-50 años	700	700
<b>Adultos</b>	51-70 años	700	700
<b>Adultos</b>	Más de 70 años	700	700
<b>Embarazo</b>	Menos de 18 años	-	1250
<b>Embarazo</b>	19-30 años	-	700
<b>Embarazo</b>	31-50 años	-	700
<b>Lactancia</b>	Menos de 18 años	-	1250
<b>Lactancia</b>	19-30 años	-	700
<b>Lactancia</b>	Más de 30 años	-	700

### 2.3.5.2. ABSORCIÓN

Existen varias formas de fósforo en la dieta, incluyendo sales de fosfato, nucleótidos y fosfolípidos que son absorbidos con una alta eficiencia (60-70%) en el intestino delgado. Muchas moléculas de organofosfatos son escindidas como paso previo a la absorción del ión fosfato. La fosfatasa alcalina del borde en cepillo de la membrana del enterocito, por ejemplo, escinde la creatina-fosfato. Tanto la fosfatasa inorgánica como la fosfatasa alcalina pueden hidrolizar el pirofosfato.

Los cotransportadores de Na/Pi tipo I y IIb movilizan el Pi y tres iones  $\text{Na}^+$  a través del borde en cepillo (Murer y col., 2001). El transporte debido al transportador tipo I es constante, mientras que la expresión y el transporte del transportador tipo IIb depende de la ingesta de fosfato y la cantidad de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . También existe la posibilidad de que un transportador adicional  $\text{Na}^+$ -independiente opere en la membrana del borde en cepillo.

Se cree que los cotransportadores de sodio tipo III proporcionan un flujo de Pi desde la membrana basolateral para cubrir las propias necesidades del enterocito (Tenenhouse y col., 1998). En relación a los fosfolípidos consumidos con los alimentos, es un hecho conocido que grandes cantidades son secretadas con la bilis y forman micelas con los ácidos biliares, ácidos grasos, colesterol y otro tipo de lípidos. Los fosfolípidos son hidrolizados por la fosfolipasa A2 del páncreas y la molécula resultante (lisolecitina) es captada desde la micela a través del borde en cepillo de la membrana enterocítica.

En el hígado, una proteína específica transportadora de ácidos grasos (L-FABP) colabora para movilizar los lisofosfolípidos a los compartimentos intracelulares. Un ácido graso se une a múltiples lisofosfolípidos y el fosfolípido es exportado con los quilomicrones. Alternativamente, la lisofosfolipasa puede hidrolizar la lisofosfatidilcolina a 3-fosforilcolina, que es exportada y llega al hígado a través de la circulación portal (Murer y col., 2001).

### 2.3.5.3. DISTRIBUCIÓN Y CAPTACIÓN CELULAR

#### **-Circulación sanguínea:**

La mayoría del fosfato circulante está contenido en los fosfolípidos de las lipoproteínas y las membranas de las células sanguíneas. Una menor cantidad circula como ión inorgánico (Pi). La concentración plasmática de fosfato inorgánico es de alrededor de 1 mmol/L si la ingesta es adecuada. El fosfato entra en las células a través del cotransportador de  $\text{Na}^+$ , principalmente a través de los ubicuos cotransportadores de  $\text{Na}^+$  tipo III. Una pequeña diferencia se observa a nivel óseo, donde el cotransportador de  $\text{Na}^+$ /Pi tipo III bombea fosfato a la matriz extracelular

durante la mineralización ósea en las primeras etapas de la vida. El cotransportador de  $\text{Na}^+/\text{Pi}$  tipo III también desempeña un papel importante en la calcificación vascular y de tejidos blandos, que se produce en respuesta a la hiperfosfatemia (Giachelli y col., 2001).

La mayoría del ATP es usado fuera de la mitocondria (por ejemplo proporciona la energía para bombear iones), pero necesita ser reconstituido de nuevo por la fosforilación oxidativa mitocondrial. El transportador de fosfato mitocondrial y los translocadores de adenina son los precursores para la síntesis de ATP en la mitocondria (Giachelli y col., 2001).

#### **-Barrera hematoencefálica:**

El transporte de fosfato a través de la barrera hematoencefálica no es un hecho bien conocido. Es probable que la mayor parte de la transferencia se realice a través de un transporte tipo antiporte que intercambia fosfato por bicarbonato (Lajeunesse y Brunnete, 1988).

#### **-Transferencia materno-fetal:**

El fosfato, que tiene que ser suministrado en grandes cantidades al feto para el crecimiento de sus tejidos y mineralización ósea cruza la placenta a través de un cotransportador de  $\text{Na}^+$  (Lajeunesse y Brunnete, 1988).

### **2.3.5.4. DEPÓSITOS DE FÓSFORO EN EL ORGANISMO**

El organismo humano adulto contiene entre 0.6 y 1.1% de fósforo (Arunabh y col., 2002), del cual, el 85% se encuentra en el hueso. Los osteoblastos depositan fosfato en la matriz ósea en forma de cristales de hidroxapatita. Los cotransportadores  $\text{Na}/\text{Pi}$  tipo III están implicados en la movilización de fosfato a los sitios diana de mineralización extracelulares (Palmer y col., 1999). La liberación de iones fosfato de la fosfoetanolamina y otros ésteres de fosfato por una forma de fosfatasa alcalina tisular no específica (localizada en hígado, riñón y tejido óseo), es un evento muy importante en la mineralización ósea, aunque el mecanismo por el cual se produce no está aún bien dilucidado.

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

### **2.3.5.5. ELIMINACIÓN**

Aunque por las heces (descamación de la mucosa intestinal) se pierde un 30% de los fosfatos ingeridos la mayoría del fosfato se excreta con la orina y pequeñas cantidades se pierden por la piel. Una filtración glomerular disminuida debido a un fallo renal causa retención de fosfato, por la incapacidad de eliminar el exceso.

De los 16g de fosfato que aproximadamente se filtran por el riñón cada día, la mayoría son reabsorbidos. Las pérdidas renales dependen de la cantidad filtrada y de los niveles séricos de Pi. El umbral máximo para el fosfato es una medida de la cantidad máxima de fosfato que puede ser reabsorbida. Todo el fosfato filtrado que sobrepase este umbral es excretado en la orina (Murer y col., 2001).

El cotransportador Na/Pi tipo IIa en las células del túbulo proximal renal es el principal responsable de la reabsorción del fosfato. Cantidades mucho menores de fosfato son recuperadas gracias al cotransportador Na/Pi tipo I en el túbulo distal (Murer y col., 2001).

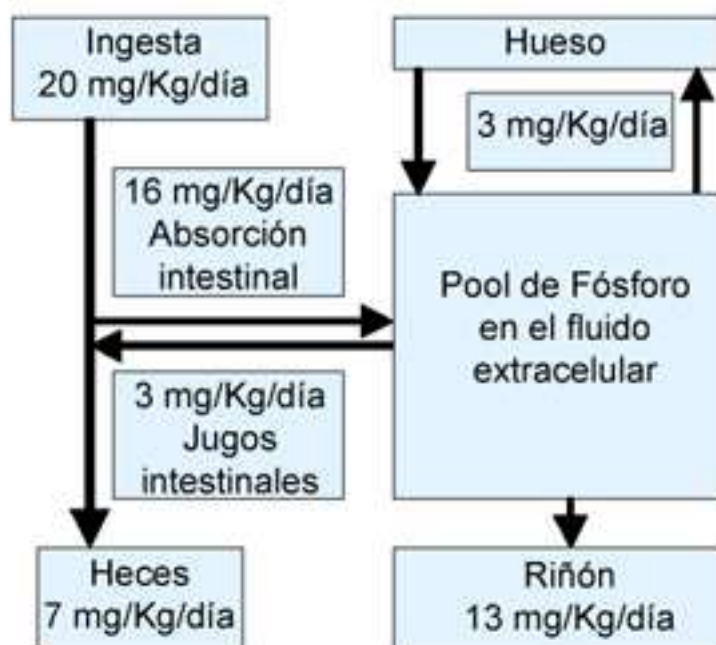
### **2.3.5.6. REGULACIÓN HOMEOSTÁTICA DEL BALANCE DE FÓSFORO**

El control de las concentraciones de fósforo a través de la absorción intestinal y la conservación renal es crítico para varios procesos biológicos, que incluyen el metabolismo

mineral, desarrollo óseo, transferencia de energía, señales celulares y regulación de la función proteica.

La concentración circulante de fosfato depende de la ingesta de Pi procedente de la dieta, la absorción intestinal, la filtración y reabsorción renal y del intercambio intracelular y reservorio óseo (Murer y col., 2001).

**FIGURA VI.** Metabolismo del fósforo en humanos (Schiavi y Kumar, 2004):

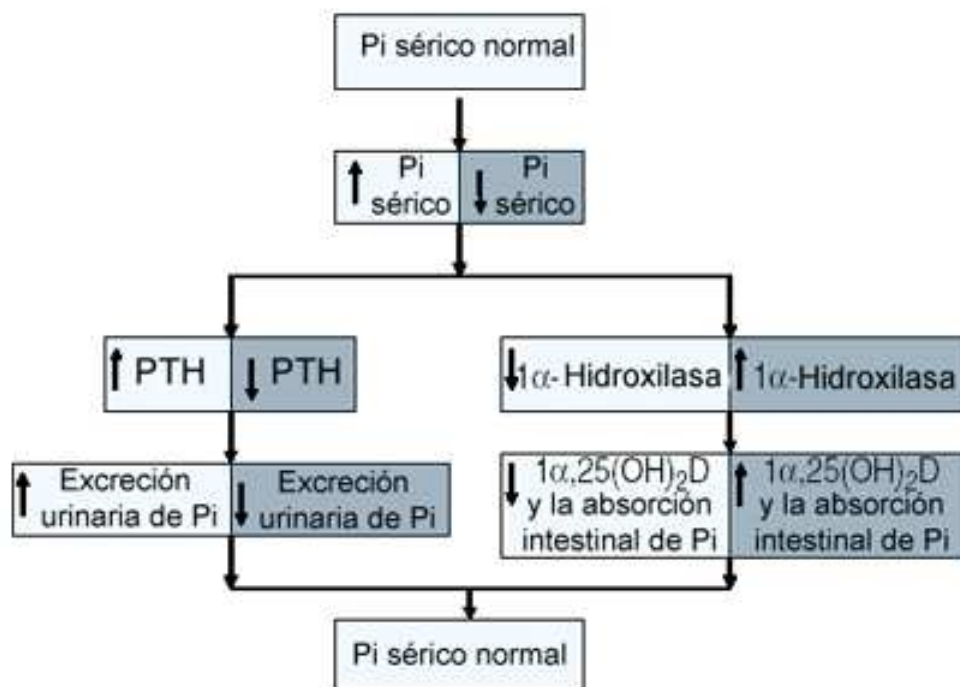


Un adulto normal ingiere aproximadamente entre 1.5 y 2.0g de Pi por día (20mg/Kg/día). De esta cantidad, entre 1.0 y 1.2g (16mg/Kg/día) es absorbido en el intestino proximal y unos 200mg (3mg/kg/día) son secretados al lumen intestinal, resultando una absorción neta de aproximadamente 1.0g (13mg/Kg/día). El fósforo absorbido pasa al fluido extracelular y varía según las necesidades del hueso (3mg/Kg/día). Aproximadamente 1.0g se excreta por los riñones, de manera que las cantidades absorbidas y eliminadas son equivalentes. Por tanto, bajo condiciones fisiológicas, la función intestinal y renal actúan manteniendo una

homeostasis normal de fósforo y unas concentraciones plasmáticas normales de Pi (entre 2.5 y 4.5mg/dl).

Las principales hormonas que regulan el metabolismo del fósforo son la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y la PTH (Murer y col., 2001). La PTH inhibe la reabsorción renal de de fosfato y de manera indirecta incrementa la absorción intestinal de fósforo, estimulando la síntesis de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . El fósforo tiene un efecto estimulador directo en la secreción de PTH y parece ser que un nivel elevado de Pi en suero es un factor importante que contribuye al hiperparatiroidismo asociado con largos periodos de enfermedad renal crónica (FIGURA VII).

**FIGURA VII.** Influencia del fosfato en la síntesis y actividad de la PTH y la vitamina D (Schiavi y Kumar, 2004):



La  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  incrementa la absorción intestinal y la reabsorción renal de Pi (Kumar, 2002). La generación de la forma activa de la vitamina  $\text{D}_3$ ,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  es regulada por el Pi de la dieta, concentraciones séricas de Pi y la PTH. El Pi extracelular regula la actividad y síntesis de la  $25(\text{OH})\text{D}_3$   $1\alpha$ -hidroxilasa, de manera que bajas concentraciones de Pi incrementan su



síntesis y actividad y altas concentraciones de Pi producen el efecto contrario en la 25(OH)D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -hidroxilasa.

**TABLA VII.** La regulación de la homeostasis del fosfato en el riñón ocurre principalmente en el túbulo proximal y es controlada por varios factores que pueden incrementar o disminuir la reabsorción de Pi (Murer y col., 2001):

<b><i>Factores que disminuyen la reabsorción de Pi</i></b>	<b><i>Factores que aumentan la reabsorción de Pi</i></b>
Sobrecarga de Pi	Depleción de Pi
Hormona paratiroidea/cAMP	Extirpación del paratiroides
Expansión del volumen	Contracción del volumen
Hipercalcemia	Hipocalcemia
Inhibidores de la anhidrasa carbónica	1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>
Glucosa y Alanina	Hormona del crecimiento (GH)
Desequilibrios ácido-base	
Incrementos de bicarbonato	
Hipercapnia	
Inhibidores metabólicos	

El Pi plasmático filtra libremente en el glomérulo. Aproximadamente el 80% del fosfato filtrado es reabsorbido junto con el sodio a través de cotransportadores específicos Na-Pi IIa, localizados en el túbulo proximal.

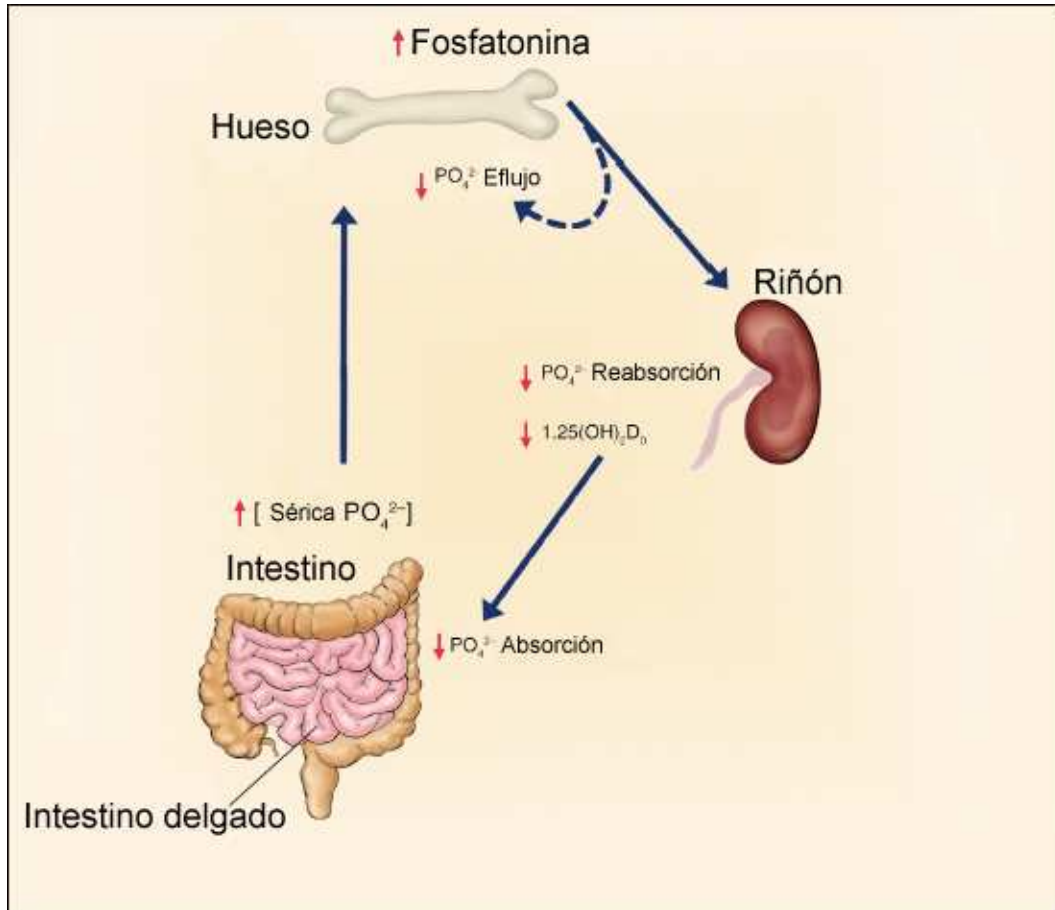
La regulación de la reabsorción de fosfato en el riñón es llevada a cabo controlando el número de cotransportadores Na-Pi IIa, presentes en la superficie del borde en cepillo de las membranas proximales de los enterocitos. Estudios actuales evidencian que un descenso agudo de Pi presente en la dieta, conduce a un reclutamiento de cotransportadores Na-Pi IIa de un pool intracelular (Levi y col., 1996), mientras que cambios crónicos en el Pi ingerido regulan los

cotransportadores Na-Pi Ila a través de mecanismos de transcripción (Miyamoto e Itho, 2001). La administración crónica de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y PTH también modula la expresión génica de Na-Pi Ila (Friedlander y col., 2001). Una elevación de los niveles de PTH reduce rápidamente el número de transportadores Na-Pi Ila, retirándolos de la superficie celular y degradando los lisosomas resultantes (Hernando y col., 2001).

La absorción intestinal de fosfato ocurre a través de dos mecanismos: transporte pasivo no regulado y mecanismos de transporte activo regulados. El cotransportador Na-Pi Iib, localizado principalmente en el yeyuno, actúa como mediador en el transporte activo intestinal de fosfato y parece que está regulado a nivel transcripcional por la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (Hernando y col., 2000). Sin embargo, este hecho no conlleva la retirada de cotransportadores en respuesta a la PTH. Los mecanismos que controlan la liberación de calcio y fosfato de los pools intracelular y óseo no están todavía bien dilucidados.

Además de estos mecanismos bien conocidos, en la actualidad existe una clase nueva de proteínas reguladoras de fosfato, que son las denominadas “fosfatoninas” (Jan de Beur y Levine, 2002). La fosfatonina desempeña un papel importante, modulando la reabsorción renal de fósforo y la producción de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .

**FIGURA VIII.** Regulación de la reabsorción renal de fósforo y la mineralización ósea a través de la fosfatonina (Quarles, 2003).



La fosfatonina (una hormona fosfática) estimula la excreción renal de fosfato. Se cree que los osteoblastos son las células encargadas de producir la fosfatonina. Un incremento en la liberación de fosfatonina conduce a un efecto autocrino para regular la mineralización ósea y una serie de efectos sistémicos que producen fosfaturia.

## **2.4. EL MAGNESIO EN LA NUTRICIÓN**

### **2.4.1. INTRODUCCIÓN**

El magnesio es un mineral esencial en los humanos, con múltiples funciones bioquímicas y fisiológicas como la activación de enzimas, implicación en múltiples rutas metabólicas, regulación de los canales de membrana y contracción muscular (Schweigel y Martens, 2000).

El magnesio se encuentra ampliamente distribuido en el organismo, existiendo aproximadamente una cantidad total de 20 a 28g. Se almacena principalmente en el hueso (60-65%) y músculos (27%). Menos del 1% del magnesio total del organismo está circulando en sangre, se puede encontrar libre (55%), acomplejado (13%) o unido a proteínas (32%). En sujetos normales, los niveles séricos se mantienen en un rango estrecho de concentración (0.7-1.1mmol/L). La homeostasis del magnesio depende del balance entre la absorción intestinal y la excreción renal (Kerstan y Quamme, 2002).

### **2.4.2. FUENTES ALIMENTARIAS DE MAGNESIO**

Puesto que el magnesio es parte de la clorofila (el pigmento verde de las plantas), los vegetales con hojas verdes son ricos en dicho elemento. Los granos sin refinar (integrales), los frutos secos, la levadura de cerveza, el chocolate en polvo y las legumbres también tienen un elevado contenido de magnesio. La carne, la leche y los derivados lácteos tienen un contenido intermedio y los alimentos refinados tienen un contenido muy bajo. El agua potable es una fuente variable de este elemento. Las “aguas duras” (con elevado contenido de calcio) usualmente tienen una concentración más elevada de magnesio que las “blandas” (Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, 2004).

**TABLA VIII.** Contenido en magnesio de algunos alimentos (Mataix y col., 1998):

<b>Alimento</b>	<b>Cantidad (mg/100g)</b>
<b>CARNES</b>	<b>1.6-3.6</b>
Hígado	21.0
Carne magra	22.0
<b>PESCADO AZUL</b>	<b>23-31</b>
Sardina	25.1
Atún	28
<b>PESCADO BLANCO</b>	<b>20-42.1</b>
Lenguado	25.1
Merluza	29
<b>MARISCOS</b>	<b>23-42</b>
Mejillones	23
Gambas	42
<b>HUEVO</b>	<b>12</b>
<b>LÁCTEOS</b>	<b>11.6-46</b>
Yogur natural	14.3
Queso manchego	29
Leche entera	11.6
<b>LEGUMBRES</b>	<b>75-190</b>
Garbanzos	122
<b>FRUTOS SECOS</b>	<b>122-358</b>
Nueces	358
<b>CEREALES</b>	<b>28-132</b>
Pan	25.1
Macarrones	53
<b>VERDURAS Y HORTALIZAS</b>	<b>7-126</b>
Patata	19.9
Espinacas	58
<b>FRUTAS</b>	<b>4-36</b>
Plátano	36
Naranja	15.2

### 2.4.3. INTERACCIÓN CON OTROS NUTRIENTES

#### -Cinc:

Dosis elevadas de cinc en forma de suplementos, parecen interferir con la absorción de magnesio. Un suplemento de cinc de 142mg/día en hombres adultos sanos disminuye la absorción y balance de magnesio de forma significativa (Spencer y col., 1994).

**-Fibra:**

Incrementos elevados en la ingesta de fibra, disminuyen la utilización nutritiva de magnesio, como queda demostrado en numerosos estudios experimentales. Sin embargo, no es un hecho claro la magnitud en la cual la fibra de la dieta afecta al status nutricional del magnesio en individuos con una dieta variada (Shils, 1999).

**-Proteína:**

La cantidad de proteína en la dieta puede afectar a la absorción de magnesio. Un estudio reveló que la absorción fue menor cuando la ingesta proteica era inferior a 30g/día. Ingestas proteicas más elevadas (93g/día) se asociaron con una mejor absorción de magnesio en adolescentes (Shils, 1999).

**-Vitamina D y calcio:**

La forma activa de la vitamina D (calcitriol) puede incrementar ligeramente la absorción de magnesio en duodeno, yeyuno y colon proximal (Lisbona y col., 1994). Sin embargo, la absorción de este elemento parece que no depende del calcitriol como en el caso del calcio y el fosfato. Elevadas ingestas de calcio no afectan a la utilización nutritiva de magnesio, como revelan varios estudios de balance. Unos niveles plasmáticos inadecuados de magnesio se traducen en bajos niveles de calcio plasmáticos, resistencia a la PTH y resistencia a algunos efectos de la vitamina D (Shils, 1999).

#### **2.4.4. FUNCIONES DEL MAGNESIO**

El magnesio está involucrado en más de 300 reacciones metabólicas esenciales para el correcto funcionamiento celular (Shils, 1999). A través de su efecto sobre el ATP, interviene prácticamente sobre todas las etapas del metabolismo intermediario.

**-Producción de energía:**

El metabolismo de los carbohidratos y grasas para producir energía requiere numerosas reacciones químicas dependientes de magnesio. El magnesio se requiere para la síntesis proteica

mitocondrial. El ATP, la molécula que proporciona energía para casi todos los procesos metabólicos, existe de forma primaria como un complejo con magnesio (MgATP) (Higdon, 2003).

**-Síntesis de biomoléculas esenciales:**

El magnesio se requiere en una serie de reacciones durante la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas. Un elevado número de enzimas implicadas en la síntesis de carbohidratos y lípidos requieren la presencia de este elemento como cofactor. El glutatión, un importante antioxidante, también requiere magnesio para su síntesis (Higdon, 2003).

**-Función estructural:**

El magnesio desempeña un importante papel estructural en el hueso, la membrana celular y los cromosomas. También es necesario para el transporte activo de iones como el  $K^+$  y el  $Ca^{2+}$  a través de las membranas celulares. Debido a su papel en el transporte iónico, el magnesio afecta a la conducción nerviosa, la contracción muscular y la frecuencia cardíaca (Higdon, 2003).

**-Mensajero celular:**

El MgATP es requerido para la fosforilación de proteínas y la formación de mensajeros celulares como el AMPc. El AMPc está implicado en muchos procesos, incluyendo la secreción de la PTH por las glándulas paratiroides (Higdon, 2003).

**-Migración celular:**

Los niveles de calcio y magnesio en el líquido extracelular afectan a la migración de ciertos tipos de células. Este efecto en la migración celular puede afectar al proceso de cicatrización de heridas (Higdon, 2003).

## 2.4.5. UTILIZACIÓN NUTRITIVA DE MAGNESIO

### 2.4.5.1. REQUERIMIENTOS

Los requerimientos de magnesio están basados en la cantidad de mineral necesaria para prevenir la deficiencia y mantener un estado de salud óptimo.

Los requerimientos de magnesio para la rata son 513mg/Kg de dieta, en fase de crecimiento y 511mg/Kg de dieta en fase adulta (Reeves y col., 1993).

**TABLA IX.** Ingestas diarias recomendadas (RDA) de magnesio (modificado de Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, 2004):

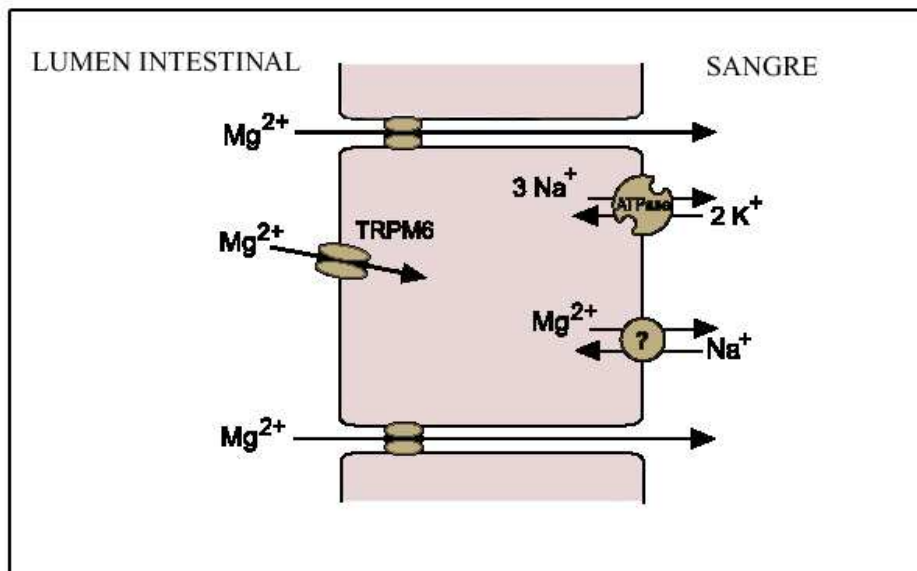
<b>Etapas de la Vida</b>	<b>Edad</b>	<b>Hombres (mg/día)</b>	<b>Mujeres (mg/día)</b>
<b>Lactantes</b>	0-6 meses	30	30
<b>Lactantes</b>	7-12 meses	75	75
<b>Niños</b>	1-3 años	80	80
<b>Niños</b>	4-8 años	130	130
<b>Niños</b>	9-13 años	240	240
<b>Adolescentes</b>	14-18 años	410	360
<b>Adultos</b>	19-30 años	400	310
<b>Adultos</b>	Más de 30 años	420	320
<b>Embarazo</b>	Menos de 18 años	-	400
<b>Embarazo</b>	19-30 años	-	350
<b>Embarazo</b>	Más de 30 años	-	360
<b>Lactancia</b>	Menos de 18 años	-	360
<b>Lactancia</b>	19-30 años	-	310
<b>Lactancia</b>	Más de 30 años	-	320



### 2.4.5.2. ABSORCIÓN

El principal lugar de absorción de magnesio es el intestino delgado, en particular el íleon. Cantidades menores de magnesio también se absorben en el colon. La absorción intestinal de magnesio ocurre a través de dos rutas principales: un transporte activo transcelular saturable y un transporte pasivo paracelular no saturable (FIGURA IX) (Kerstan y Quanme, 2002; López-Aliaga y col., 2003).

FIGURA IX. Modelo de absorción intestinal de magnesio (Konrad y col., 2004):



#### -Transporte transcelular saturable:

El movimiento neto de un ión en ausencia de gradientes electroquímicos y su dependencia de la energía metabólica evidencia la presencia de un mecanismo de transporte activo, presumiblemente celular. De acuerdo con este criterio, el transporte de magnesio en dirección a las membranas mucosa y serosa es parcialmente celular en el íleon y colon, mientras que el flujo en dirección inversa es puramente difusivo (Jüttner y Ebel, 1998).

El transporte transcelular intestinal de magnesio se puede considerar como un proceso en tres pasos, consistente en: (a) entrada a la célula epitelial desde el lumen, (b) tránsito a través del citosol y (c) extrusión desde la célula a través de la membrana basolateral.

La entrada de magnesio a la célula intestinal a través del borde en cepillo o membrana apical no requiere energía metabólica, puesto que dicho elemento se mueve gracias al gradiente electroquímico.

La concentración de magnesio en el lumen intestinal es variable, pero se mantiene en un rango de entre 0,5 y 2mM durante el ayuno y aumenta hasta 45mM tras ingerir alimentos. Aunque el magnesio celular total es relativamente alto (3-6mM/mg de peso fresco), la concentración de magnesio intracelular libre se mantiene entre 0,4 y 1mM. Debido a estas diferencias de concentración, se crea una diferencia de potencial negativa entre el exterior y el interior de la célula (Schweigel y col., 1999).

En la actualidad no hay datos concluyentes acerca de la extrusión de magnesio a través de la membrana basolateral. Probablemente no exista (o si lo hay es mínimo) un gradiente químico para el magnesio a través de esta membrana. El gradiente eléctrico ascendente para la salida de un catión tal como el magnesio sugeriría la participación de un transporte activo primario (bombeo de  $Mg^{2+}$ ) o secundario (intercambio  $Mg^{2+}/Na^+$ ) (Schweigel y Martens, 2000).

La cinética de saturación del sistema de transporte transcelular se explica por la capacidad limitada del transporte activo. A bajas concentraciones intraluminales, el magnesio es absorbido principalmente a través de la ruta transcelular y a concentraciones superiores, se absorbe básicamente a través de la ruta paracelular (Konrad y col., 2004).

#### **-Transporte paracelular no saturable:**

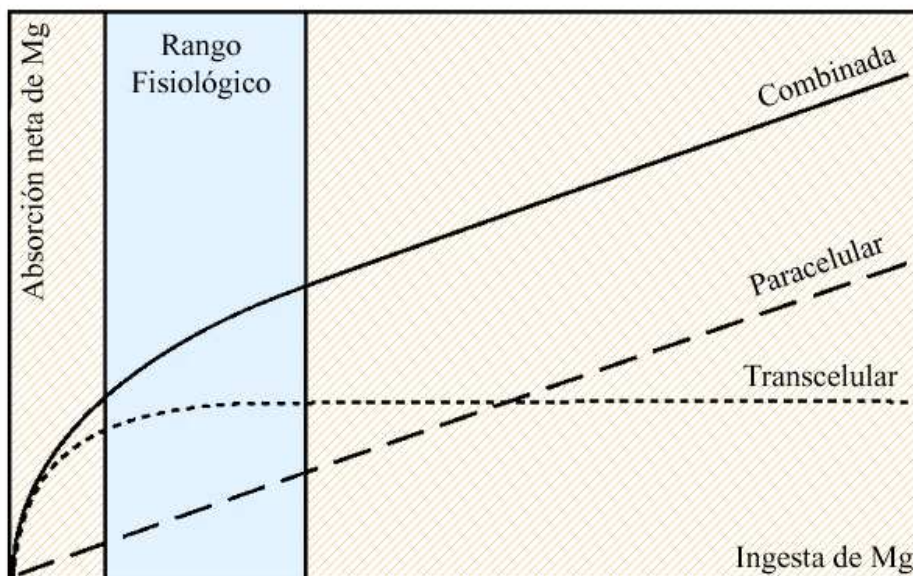
El movimiento pasivo de magnesio es más efectivo en el epitelio de los segmentos proximales del tracto gastrointestinal (intestino delgado), donde solo una pequeña fracción de la conductividad total del tejido puede ser atribuida al flujo transcelular del ión a través de las

membranas mucosa y serosa. El resto (al menos el 85%), es una consecuencia del movimiento de iones, principalmente  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  gracias a la alta conductividad y baja resistencia de las rutas extracelulares.

El aumento paralelo de la absorción neta de magnesio con el contenido de dicho elemento en la dieta, sugiere que la absorción de magnesio se realiza principalmente a través de un proceso de difusión pasiva (Hardwick y col., 1990).

El flujo y dirección del transporte pasivo de magnesio a través de la ruta paracelular está exclusivamente determinado por gradientes electroquímicos. Sin embargo, esto no implica que el flujo pasivo de magnesio a través de la ruta paracelular no esté completamente regulado. Existen evidencias de que la absorción de magnesio está relacionada con la concentración luminal del mismo a través de una función curvilínea (FIGURA X) (Konrad y col., 2004)

**FIGURA X.** Absorción intestinal de magnesio frente a ingesta. La función curvilínea resulta de la combinación del transporte paracelular y transcelular (Konrad y col., 2004):



### **2.4.5.3. DISTRIBUCIÓN Y CAPTACIÓN CELULAR**

#### **-Circulación sanguínea:**

El 55% del magnesio en plasma (entre 0,7-1,1mmol/l) está en forma ionizada. Una fracción más pequeña (33%) se encuentra unida a proteínas y el resto (12%) formando complejos con distintos aniones. Las células captan el magnesio a través de un transportador que intercambia sodio. Los nucleótidos forman complejos con la mayoría del magnesio intracelular, manteniendo las concentraciones de magnesio libre ionizado por debajo de 1mmol/L (Romani y col., 1993).

#### **-Barrera hematoencefálica:**

Las concentraciones de magnesio en el fluido cerebroespinal y cerebro parecen estar reguladas de forma independiente y no están relacionadas con la concentración sanguínea. Los mecanismos de transporte a través de la barrera hematoencefálica no están aún bien estudiados (Gee y col., 2001).

#### **-Transferencia materno-fetal:**

Proporcionalmente pasa mucho menos magnesio de la madre al feto que con otros cationes divalentes similares como el calcio, lo cual indica que los mecanismos de transporte no son compartidos. La manera exacta en la que el magnesio atraviesa la barrera placentaria no está aún bien dilucidada (Gee y col., 2001).

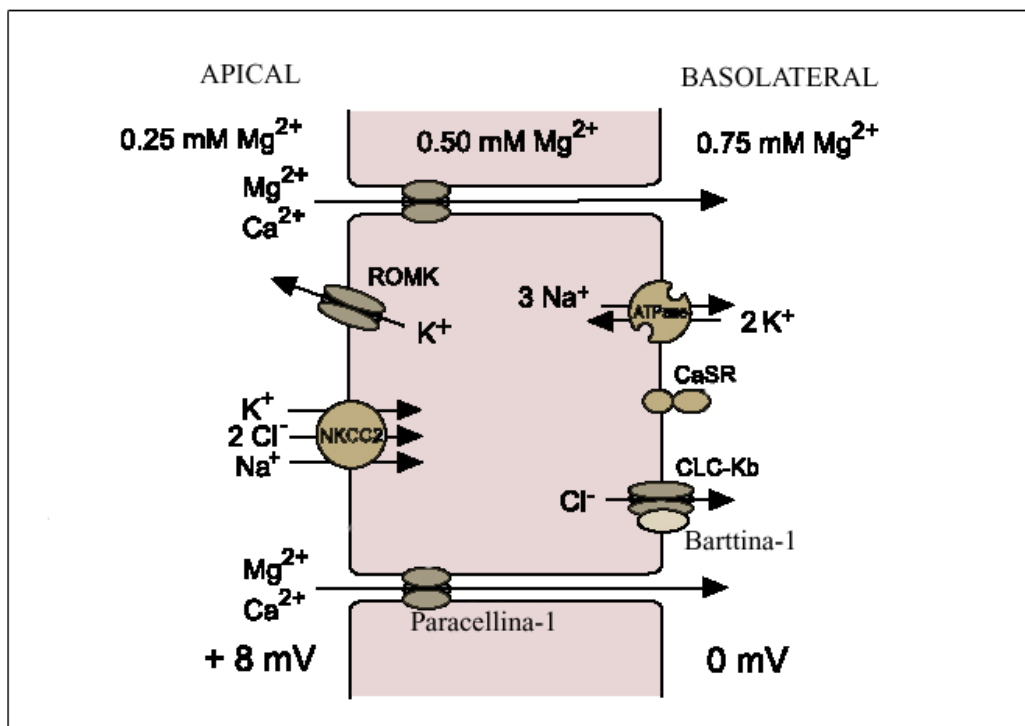
### **2.4.5.4. DEPÓSITOS DE MAGNESIO EN EL ORGANISMO**

El organismo de un adulto contiene unos 20-28g de magnesio, almacenado principalmente en el hueso y los compartimentos intracelulares de los tejidos blandos. Menos del 1% del total del organismo está circulando en sangre. En sujetos normales, los niveles séricos se mantienen en un rango estrecho de concentración (0,7-1,1mmol/L) (Kerstan y Quamme, 2002).

### 2.4.5.5. ELIMINACIÓN

El magnesio libre ionizado ( $Mg^{2+}$ ) y el magnesio complejoado con pequeños iones, que constituyen la mayoría (80%) del magnesio circulante son filtrados fácilmente en el glomérulo renal (en condiciones normales más de 2g/día). Los individuos sanos pierden menos del 5% del magnesio filtrado en la orina. Una parte del magnesio luminal es recuperado de los túbulos proximales, una mayor proporción (70%) del asa de Henle ascendente y otra pequeña proporción del túbulo distal (Cole y Quanme, 2000). La reabsorción de magnesio ocurre en una considerable proporción debido al movimiento del elemento entre las células epiteliales. Existen ciertas proteínas complejas que sellan estos espacios intercelulares, como la claudina 16 (paracellina 1), una proteína que controla el paso del magnesio a través de la ruta paracelular (Weber y col., 2001).

**FIGURA XI.** Reabsorción de magnesio en el Asa de Henle (Konrad y col., 2004):



#### **2.4.5.6. REGULACIÓN HOMEOSTÁTICA DEL BALANCE DE MAGNESIO**

La reabsorción renal del filtrado primario es el principal mecanismo de control del contenido de magnesio en el organismo. Las pérdidas urinarias se relacionan estrechamente con las concentraciones sanguíneas de calcio y magnesio, así como con la cantidad de magnesio presente en la dieta. La 1,25-dihidroxitamina D estimula la reabsorción de magnesio en el túbulo distal, posiblemente porque la inducción de la calbindina 9K promueve el transporte transcelular (Ritchie y col., 2001). El receptor extracelular de calcio/magnesio (Casr) en la superficie externa de la membrana basolateral responde a la concentración de iones divalentes, modulando la permeabilidad de las uniones intercelulares y el voltaje transepitelial. Puesto que las concentraciones iónicas de calcio y magnesio disminuyen en el espacio pericapilar adyacente a la membrana basolateral (y en el lumen capilar), se incrementa la absorción de ambos iones (Cole y Quamme, 2000).

La PTH, calcitonina, hormona antidiurética y el glucagon también pueden disminuir las pérdidas renales, pero su importancia en el mantenimiento de la homeostasis del magnesio parece ser menor y no está aún bien estudiada. La PTH también puede promover el transporte activo de la absorción intestinal (Rude, 2000).

### **2.5. EL COBRE EN LA NUTRICIÓN**

#### **2.5.1. INTRODUCCIÓN**

El cobre es un metal de transición ampliamente distribuido en la naturaleza. La esencialidad nutricional del cobre se demostró al encontrarse que era requerido junto con el hierro para la prevención de la anemia en las ratas. Posteriormente, mediante la realización de estudios de deficiencia nutricional, se ha puesto de manifiesto el gran número de funciones catalíticas en las que participa este catión y que permiten un funcionamiento correcto del organismo.

## 2.5.2 FUENTES ALIMENTARIAS DE COBRE

Se encuentra en altas concentraciones en las semillas de los cereales integrales. Otras buenas fuentes de cobre son los frutos secos, leguminosas, hígado, crustáceos y moluscos. El hecho de que su presencia esté tan repartida es por lo que apenas se describe deficiencia.

**TABLA X.** Contenido en cobre de distintos alimentos (Mataix y col., 1998).

<b>Alimento</b>	<b>Cantidad (mg/100g)</b>
<b>CARNES</b>	<b>0.2-1.1</b>
Lomo de cerdo	0.4
Pollo	0.2
<b>MARISCOS</b>	<b>0.3-13.7</b>
Almejas	0.3
<b>LÁCTEOS</b>	<b>0.02-0.4</b>
Leche entera	0.02
Leche desnatada	0.2
<b>LEGUMBRES</b>	<b>0.14-1.2</b>
Guisantes	1.2
Lentejas	0.1
<b>FRUTOS SECOS</b>	<b>0.8-2.4</b>
Almendra	1.4
Cacahuete	0.8
Nuez	1.3
<b>CEREALES</b>	<b>0.02-0.4</b>
Pan blanco	0.02
Pan de centeno	0.1
Trigo entero	0.2
<b>VERDURAS Y HORTALIZAS</b>	<b>0.04-0.3</b>
Zanahoria	0.3
Espárrago	0.04
Berza	0.1
<b>FRUTAS</b>	<b>0.07-0.14</b>
Plátano	0.1
Manzana	0.1
<b>ACEITES Y GRASAS</b>	<b>0.1-0.3</b>
Aceite de oliva	0.3
Manteca	0.3
Mantequilla	0.4
<b>CONDIMENTOS</b>	<b>0.3-2.4</b>
Ajo	0.3
Pimentón	0.6

### 2.5.3. INTERACCIONES CON OTROS NUTRIENTES

#### - Hierro:

La absorción aparente de cobre y la excreción biliar de cobre se encuentran reducidas con altas ingestas de hierro.

#### - Cinc:

Algunos estudios han mostrado que altos niveles de cinc pueden inhibir la absorción intestinal de cobre. Las altas ingestas de cinc estimulan la producción de metalotioneínas (MT), lo que ocasiona una reducción de la absorción de cobre por bloqueo del transporte transcelular. Sin embargo, altas ingestas de cobre no reducen la absorción de cinc.

#### - Calcio:

En un trabajo reciente en ratas ferodeficientes realizado por nuestro grupo de investigación (Díaz-Castro y col., 2010) hemos encontrado que la suplementación de la dieta con el doble de los requerimientos de calcio presenta un efecto negativo en cuanto a utilización digestiva y metabólica cuando a los animales se les suministra una dieta elaborada con leche de vaca en cambio cuando la dieta contienen leche de cabra el suplemento de calcio no afecta a la utilización nutritiva de cobre.

### 2.5.4. FUNCIONES DEL COBRE

El cobre es un mineral involucrado en la formación de eritrocitos. Es por esto interesante su estudio en caso de anemia por ferodeficiencia. El cobre es un componente importante del sistema de enzimas antioxidantes endógeno: metaloenzimas tales como glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa [intracelular Cu/Zn SOD (SOD<sub>1</sub>), extracelular SOD (SOD<sub>2</sub>)] y catalasa (Johnson, Fischer y Kays, 1992). De acuerdo con Johnson (Johnson y Lukaski, 2005), la actividad de la SOD<sub>2</sub> es un indicador del estado de cobre en la rata, mientras que la actividad de SOD<sub>1</sub> es un indicador del estado de cobre en humanos (Milne, 1998). Además, el cobre es un nutriente esencial para la integridad del tejido conectivo y los



vasos sanguíneos, la formación de la piel y sus pigmentos, la producción de neurotransmisores y hormonas. Es además el cobre importante en el metabolismo del hierro por su papel en la síntesis de hierro hemo (ceruloplasmina) y el transporte de hierro desde el hígado y el intestino (Gutteridge, 1985).

La principal función es formar parte de distintas enzimas que se caracterizan por participar en reacciones en las cuales el oxígeno molecular o especies similares son producidos, formándose normalmente agua o peróxido de hidrógeno como producto de la reacción.

Entre las enzimas dependientes de cobre destacan:

- Citocromo C oxidasa que cataliza la reacción terminal en la fosforilación oxidativa mitocondrial.
- Tirosinasa, importante en la formación de la melanina.
- Lisiloxidasa, que participa en la formación de enlaces cruzados entre colágeno y elastina, esenciales para que el tejido conectivo y los vasos sanguíneos mantengan la consistencia necesaria.
- Ferroxidasa I (ceruloplasmina) y ferroxidasa II, capaces de catalizar la oxidación del ion ferroso a férrico, permitiendo de este modo, en la forma oxidada, su unión a transferrina, la cual transporta el ion a los distintos órganos.
- Dopamina-beta-hidroxilasa, que interviene en la biosíntesis de catecolaminas.
- Además, el cobre también forma parte de otro grupo de enzimas que participan en la mielinización durante el desarrollo del sistema nervioso y en la síntesis de cerebrósidos.

### 2.5.5. REQUERIMIENTOS DE COBRE

La mejor manera de obtener los requerimientos diarios es consumir una dieta balanceada que contenga una variedad de alimentos de la pirámide de los grupos básicos de alimentos.

Las recomendaciones específicas dependen de la edad, el sexo y otros factores (como el embarazo). Las mujeres embarazadas o que estén produciendo leche materna (lactantes) necesitan cantidades mayores.

Los requerimientos de cobre para la rata son 6 mg/Kg de dieta tanto en fase de crecimiento como en fase adulta (Reeves y col., 1993).

**TABLA XI.** Ingestas diarias recomendadas (RDA) de cobre (modificado de Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, 2004).

<b>Etapa de la Vida</b>	<b>Edad</b>	<b>Hombres (mcg/día)</b>	<b>Mujeres (mcg/día)</b>
<b>Lactantes</b>	0-6 meses	200	200
<b>Lactantes</b>	7-12 meses	220	220
<b>Niños</b>	1-3 años	340	340
<b>Niños</b>	4-8 años	440	440
<b>Niños</b>	9-13 años	700	700
<b>Adolescentes</b>	14-18 años	890	890
<b>Adultos</b>	19-50 años	900	900
<b>Adultos</b>	51 años en adelante	900	900
<b>Embarazo</b>	Todas las edades	-	1000
<b>Lactancia materna</b>	Todas las edades	-	1300

### 2.5.5.2. ABSORCIÓN

La absorción del cobre se produce fundamentalmente en el duodeno (Sternlier y col., 1961; Sternlieb y Janowitz, 1964) y potencialmente también en el estómago (Turnlund, 1999). La absorción aparente oscila del 50 al 75%.

La captación del cobre por las células intestinales se produce en dos etapas: paso del borde en cepillo y transferencia a la sangre a través de la membrana basolateral para su distribución. El paso a las células mucosales parece mediante difusión facilitada mediante captación del Cu por dos transportadores: el DMT1 (transportador de metales divalentes) que transporta, entre otros,  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  y el transportador de cobre Ctr1, que transporta  $\text{Cu}^+$ . Una vez en el interior de la célula el Cu puede ser quelado por las metalotioneínas y/o unirse a las chaperonas que transportan Cu a las cuproenzimas o a un transportador saturable dependiente de energía del tipo P-ATPasa (ATP7A) que lo transporta a través de la membrana basolateral para su transferencia a la sangre (Wijmenga y Klomp, 2004).

Los transportadores de la membrana basolateral para otros iones metálicos (fundamentalmente cinc y cadmio) podrían también participar en la absorción de cobre, lo que explicaría los antagonismos entre estos iones en situaciones límite de ingesta. Así, la absorción de cobre disminuye cuando el cinc o el cadmio se ingieren en grandes cantidades.

La absorción aparente y la excreción biliar de cobre se encuentran reducidas con altas ingestas de hierro. Algunos aminoácidos y el citrato incrementan la absorción de cobre, mientras que la fibra, fitato y ácido ascórbico, en determinadas condiciones, pueden disminuirla. El cobre cúprico y el ascorbato pueden reducir  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Ca}^+$ .

### **2.5.5.3. DISTRIBUCIÓN Y CAPTACIÓN CELULAR**

La entrada en las células mucosales no garantiza su transferencia a la sangre ya que cantidades variables del metal pueden ser retenidas por proteínas de estas células, fundamentalmente metalotioneínas.

### **2.5.5.4. DEPÓSITOS DE COBRE EN EL ORGANISMO**

En el adulto el contenido corporal total de cobre oscila entre 50 y 120mg. En muchos animales la mayor concentración se encuentra en el hígado seguida del cerebro. Sin embargo, en el hombre el hígado contiene un 13% y el cerebro un 9%, mientras que el contenido muscular se aproxima a 40%. El hígado y el bazo son los órganos que parecen actuar como almacén, aunque la capacidad del organismo para almacenar es pequeña.

### **2.5.5.5. ELIMINACIÓN**

El cobre se excreta fundamentalmente por el tracto gastrointestinal, siendo la bilis la secreción que contribuye en mayor proporción a través de una P-ATPasa (ATP7B). El cobre procedente de la bilis se absorbe poco, siendo poco importante la circulación enterohepática. Sin embargo, el cobre de las secreciones salivales, gástricas e intestinales es reabsorbido en mayor proporción. Sólo una pequeña proporción del ion es excretado por vía urinaria (menos del 3%).

### **2.5.5.6. REGULACIÓN HOMEOSTÁTICA DEL BALANCE DE COBRE**

La concentración de transportadores en el lado basolateral puede variar con la situación fisiológica y con el estatus corporal del cobre. La fuerte correlación entre el cobre sérico y los niveles de ceruloplasmina hace que la ceruloplasmina sea un marcador efectivo del estatus de cobre.

## **2.6. EL CINC EN LA NUTRICIÓN**

### **2.6.1. INTRODUCCIÓN**

El cinc es el oligoelemento intracelular más abundante en el organismo y con un papel crucial a nivel biológico (Murakami y col., 2008). En el individuo adulto oscila entre 1.5 y 2.5g.

Posee numerosas y variadas funciones biológicas: es cofactor de enzimas implicadas en el metabolismo intermediario, colabora en el buen funcionamiento del sistema inmunológico, es necesario para la cicatrización de las heridas, interviene en las percepciones del gusto y el olfato y en la síntesis del ADN y juega un papel estructural a través de las metaloproteínas (Lee y col., 2008).

### **2.6.2. FUENTES ALIMENTARIAS DE CINC**

El contenido de cinc en los alimentos difiere ampliamente, destacando la riqueza de las ostras, y en menor proporción los crustáceos, moluscos, carnes rojas y leguminosas. Por el contrario las grasas, pescados y dulces son relativamente bajos.

Las frutas y las verduras no son una buena fuente, porque el cinc en las proteínas vegetales no está tan disponible para el consumo humano como el cinc en las proteínas animales (Hamrick y Counts, 2008).

**TABLA XII.** Contenido en cinc de distintos alimentos (Mataix y col., 1998). Tabla de composición de alimentos españoles. Ed. Universidad de Granada, 1998.

<b>Alimento</b>	<b>Cantidad (mg/100g)</b>
<b>CARNES</b>	<b>0.4-7</b>
Hígado	6.9
Pollo, pechuga	1.4
Carne magra	2.3
Jamón serrano	3
<b>PESCADO AZUL</b>	<b>0.4-1</b>
Sardina	0.9
Atún, bonito	1.1
<b>PESCADO BLANCO</b>	<b>0.4</b>
<b>MARISCOS</b>	<b>1.8-3.6</b>
Mejillones	1.8
Langostinos, gambas y camarones	3.6
<b>HUEVOS</b>	<b>1.5</b>
<b>LÁCTEOS</b>	<b>0.4-4</b>
Yogur natural	0.6
Queso	3
Leche entera	0.4
<b>LEGUMBRES</b>	<b>1-3.7</b>
Judías blancas, pintas, etc.	3.5
Lentejas	3.7
<b>FRUTOS SECOS</b>	<b>1-7.3</b>
Almendra	7.3
<b>CEREALES</b>	<b>0.6-1.6</b>
Pan	0.6
Macarrones	1.5
Arroz	1.3
<b>VERDURAS Y HORTALIZAS</b>	<b>Tr-0.5</b>
Tomate	0.2
Patata	0.3
Acelga y espinaca	0.5
<b>FRUTAS</b>	<b>Tr-0.3</b>
Mandarina	0.1
Melocotón	0.1

### **2.6.3. INTERACCIONES CON OTROS NUTRIENTES**

#### **- Cobre:**

La interferencia con el cobre parece ser el principal efecto tóxico dando lugar a anemia por deficiencia de cobre.

#### **- Calcio:**

Los suplementos de calcio pueden incrementar las pérdidas intestinales.

#### **- Hierro:**

Se ha observado que algunos preparados suplementados con hierro y no suplementados con cinc han dado lugar a retrasos en el crecimiento. Además, la suplementación con altas dosis de hierro durante el embarazo puede modificar los niveles plasmáticos de cinc.

#### **- EDTA:**

Mejora la utilización del cinc en algunas especies.

#### **- Fibra y fitatos:**

Forman complejos insolubles que no son absorbidos en el tracto gastrointestinal.

### **2.6.4. FUNCIONES DEL CINC**

Son numerosas y variadas, destacando las siguientes:

#### **- Actividad de enzimas del metabolismo intermediario:**

Actualmente se conoce que este elemento es necesario para el funcionamiento normal de más de ciento veinte enzimas, implicadas en el metabolismo de los hidratos de carbono,

lípidos y proteínas, en los procesos de degradación y síntesis de ácidos nucleicos, en el transporte de dióxido de carbono y en muchas otras reacciones.

Asimismo, al formar parte de diferentes deshidrogenasas, actúa en los mecanismos de desintoxicación corporal de alcohol etílico a través de la enzima alcohol deshidrogenasa.

Por otro lado, el cinc también participa en la síntesis hepática de la proteína transportadora de retinal, y en el metabolismo de la vitamina A (posibilitando la conversión de retinol en retinal y viceversa).

#### **- Funciones de membrana celular:**

El cinc puede afectar a la unión de proteínas a las membranas, lo cual se acompaña de una redistribución celular del ión en los microsomas y citosol con incremento de la actividad de la proteincinasa C. Este papel bioquímico podría explicar muchas funciones fisiológicas del cinc.

También juega un papel importante en la estabilización de membranas celulares. El cinc participa en la supresión de radicales libres en células aisladas, una vez iniciada la formación de peróxidos, ya que se requiere junto con el cobre para que la enzima superóxido dismutasa actúe eficazmente eliminando los aniones superóxido. Además, la deficiencia de cinc incrementa el contenido celular de hierro ferroso, el cual, como es conocido, cataliza la producción de radicales libres.

#### **- Expresión génica:**

Actualmente existen evidencias de que las ARN polimerasa I, II y III son enzimas dependientes de cinc. Los efectos del ión sobre la síntesis proteica podrían ocurrir a través de cambios en la actividad de éstas enzimas.



La dependencia del cinc en el control de la transcripción genética también puede explicarse a través de los factores de transcripción dependientes del metal. En este sentido se ha puesto de manifiesto que las concentraciones nucleares de cinc reflejan la ingesta dietética.

**- Sistema inmune:**

El déficit de cinc eleva los niveles plasmáticos de glucocorticoides, lo cual puede tener importantes efectos adversos sobre los componentes del sistema inmune. Así, el aumento en los citados niveles de corticosterona originada por el déficit de cinc causa depleción de células B de la médula ósea y atrofia el timo. Como consecuencia de ello, se produce una disminución de la capacidad de respuesta mediada por células y anticuerpos.

**- Otros efectos:**

Una de las consecuencias más importantes de la deficiencia de cinc es la inhibición del crecimiento lineal (Iannotti y col., 2008), es reversible con suplementación de cinc. En parte puede ser explicada por la anorexia a que da lugar. Además, la deficiencia moderada de Zn causa un incremento en enfermedades respiratorias, digestivas y dermatológicas por disminuir la respuesta inmune, y existen evidencias que relacionan la deficiencia de Zn con alteraciones de las funciones cognitivas y motoras de los niños (Black, 2003a, b; Castillo Duran y Weisstaub, 2003). El metal se encuentra en la insulina y diversas enzimas con capacidad antioxidante como la superóxido dismutasa, participando en la supresión de radicales libres derivados del metabolismo celular.

La ceguera nocturna provocada por la deficiencia parece deberse a la depleción de las retinal y retinol deshidrogenasas, pero además se ha demostrado que el cinc participa en el mantenimiento de la integridad de la retina.

Además, es necesario para la cicatrización de las heridas, interviene en la percepción del gusto y el olfato y en la síntesis del ADN y juega un papel estructural a través de las

metaloproteínas, así como de la enzima citosólica CuZn superóxido-dismutasa (Cu/Zn SOD) (Hambidge y col., 1986).

## 2.6.5. UTILIZACIÓN NUTRITIVA DE CINC

### 2.6.5.1. REQUERIMIENTOS

Los requerimientos de cinc para la rata son 38 mg/Kg de dieta, en fase de crecimiento y 35 mg/Kg de dieta en fase adulta (Reeves y col., 1993).

**TABLA XII.** Ingestas diarias recomendadas (RDA) de cinc (modificado de Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, 2004):

<b>Etapa de la Vida</b>	<b>Edad</b>	<b>Hombres (mg/día)</b>	<b>Mujeres (mg/día)</b>
<b>Lactantes</b>	0-6 meses	2	2
<b>Lactantes</b>	7-12 meses	3	3
<b>Niños</b>	1-3 años	3	3
<b>Niños</b>	4-8 años	5	5
<b>Niños</b>	9-13 años	8	8
<b>Adolescentes</b>	14-18 años	11	9
<b>Adultos</b>	19 en adelante	11	8
<b>Embarazo</b>	Todas las edades	-	11-12
<b>Lactancia materna</b>	Todas las edades	-	12-13

### 2.6.5.2. ABSORCIÓN

El cinc de los alimentos se encuentra asociado fundamentalmente con proteínas y ácidos nucleicos, lo que requiere un proceso digestivo normal (gástrico y pancreático), para que liberado pueda estar disponible para absorberse.

El cinc se absorbe fundamentalmente en el intestino delgado, aunque no existe consenso sobre la contribución relativa de los diferentes segmentos en este proceso. La absorción aparente del cinc oscila del 20 al 50% según el tipo de dieta y tiende a disminuir con la edad.

### **2.6.5.3. DISTRIBUCIÓN Y CAPTACIÓN CELULAR**

En el hombre, se conocen al menos 14 transportadores de Zn que regulan la entrada y salida de este elemento en las células, agrupados en dos familias: ZnT y Zip. Estas proteínas parecen tener funciones opuestas: los transportadores ZnT reducen el cinc intracelular favoreciendo su salida de la célula o almacenándolo en vesículas intracelulares, mientras que las proteína Zip aumentan las concentraciones intracelulares promoviendo la entrada del cinc extracelular o su liberación desde las vesículas almacén (Baumgartner, 1993).

Una vez en el interior de la célula, el cinc se une a las metaloproteínas y otras proteínas del citoplasma celular. Mediante movimientos transcelulares, las metaloproteínas transportan el cinc hasta el extremo basolateral de las células enterohepáticas para su paso a la sangre. El paso a la sangre se realiza también mediante un mecanismo de transporte activo ya que las concentraciones de cinc plasmáticas son mayores que las concentraciones intracelulares. La cantidad de cinc que pasa a la sangre depende no solo de sus concentraciones intracelulares sino también de la albúmina disponible. La albúmina es la principal proteína transportadora del cinc, aunque también lo son en menor medida la transferrina y al  $\alpha$ 2-macroglobulina. Una parte importante del cinc de la sangre se localiza en los eritrocitos (Baumgartner, 1993).

### **2.6.5.4. DEPÓSITOS DE CINC EN EL ORGANISMO**

La cantidad total de cinc en el individuo adulto oscila entre 1,5 y 2,5g, y respecto a esto se pueden hacer las siguientes puntualizaciones:

- La concentración en los tejidos blandos como el músculo, cerebro, pulmón y corazón,

es relativamente estable e independiente de los niveles en la dieta dentro de un amplio rango. Por el contrario, el contenido en cinc en otros tejidos, especialmente hueso, testículos y sangre tiende a reflejar la ingesta del ion.

- El tejido muscular contiene el 60% del cinc corporal y junto con el hueso contabiliza el 90% del total corporal.
- Las concentraciones más altas de este catión se encuentran en la piel, cabellos, uñas, retina y tejidos gonadales del varón.
- Los niveles plasmáticos de cinc se encuentran próximos a 100µg/dl. La sangre total contiene aproximadamente diez veces más cinc que el plasma, debido a la presencia del catión en la enzima eritrocitaria anhidrasa carbónica.

#### **2.6.5.5. ELIMINACIÓN**

La excreción del cinc se realiza vía fecal a través de la secreción pancreática, biliar, mucosal y asimismo por células de la mucosa descamadas. Esta secreción endógena puede llegar a representar la mitad del contenido en el lumen, encontrándose una parte unido a distintas enzimas digestivas. Las pérdidas superficiales por descamación, crecimiento del cabello o sudor también contribuyen a la excreción del cinc. En condiciones normales la excreción urinaria es pequeña, aunque, puede incrementar de modo importante en las enfermedades que dan lugar a un excesivo catabolismo muscular o proteinuria por disfunción renal.

#### **2.6.5.6. REGULACIÓN HOMEOSTÁTICA DEL BALANCE DE CINC**

La absorción y excreción del Zn están controladas por mecanismos homeostáticos no muy bien conocidos. Sin embargo, se sabe que cuando la ingesta de Zn es pequeña la absorción intestinal aumenta notablemente, mientras que se reducen las pérdidas de este elemento por la orina y en el tracto intestinal (Baumgartner, 1993; Hunt A. V. y col., 2008).

## **2.7. RADICALES LIBRES Y SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE**

### **2.7.1. RADICALES LIBRES**

#### **2.7.1.1. INTRODUCCIÓN**

Los radicales libres son especies químicas con electrones desapareados que les confieren gran reactividad química, esto 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 (Cheeseman y Slater, 1993; Halliwell y Chirico, 1993; Liu y col., 2002).

Sin embargo, en nuestro organismo existe un sistema de defensa antioxidante para evitar el daño que puede llegar a producir un aumento de radicales libres. Debiendo existir un equilibrio entre los sistemas de defensa antioxidante y de producción de radicales, que se conoce como balance oxidativo (Halliwell y col., 1992; Halliwell y Chirico, 1993; Schon y col., 1996; Lee y cols., 1997; Lenaz, 1998; Sastre y col., 1999; Remmen y Richardson, 2001; Camougrand y Rigoulet, 2001; Melov, 2002; De la fuente, 2002), a causa de una excesiva producción de especies reactivas de oxígeno y/o por deficiencia en los mecanismos antioxidantes se produce un desequilibrio que da lugar al denominado estrés oxidativo, conduciendo al daño celular (Beaudeux y col., 2006).

Recientemente se considera cada vez más que los radicales libres forman parte de la maquinaria de señalización intracelular (Cadenas y cols., 2000; Navarro y cols., 2001; Annunziato y cols., 2003), ya que entre otras funciones, actúan como mensajeros intracelulares en la diferenciación y crecimiento celular, intervienen en la respuesta inmune y desempeñan un importante papel en la defensa frente a microorganismos (Matés y cols., 1999).

### 2.7.1.2. TIPOS DE RADICALES LIBRES Y ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO

El oxígeno es en las células de metabolismo aeróbico el principal responsable de la producción de especies oxidantes. Muchos autores utilizan el término genérico de especies reactivas derivadas del oxígeno (ERO), ya que ciertas moléculas como el peróxido de hidrógeno y el oxígeno singlete no son radicales.

En el hombre, la principal fuente de radicales libres producidos por el organismo proviene del metabolismo normal del oxígeno, ya que aproximadamente el 1-3% del oxígeno consumido por el organismo es transformado en radicales libres. Las causas endógenas son, por tanto, consecuencia de ser un organismo aerobio que obtiene y consume energía utilizando reacciones de oxidación que, en algún momento, producen radicales libres de forma natural. Así, el radical superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo, tres de las principales ERO, son productos normales del metabolismo generados continuamente por la mitocondria en las células en crecimiento. Otras fuentes intracelulares de ERO son el sistema enzimático citocromo P<sub>450</sub> microsomal, las flavoproteínas oxidasas y las enzimas del peroxisoma implicadas en el metabolismo de los ácidos grasos (Seifried y cols., 2007).

La actividad como agente prooxidante de un radical libre depende de su reactividad, especificidad, selectividad y difusibilidad (Cheeseman y Slater, 1993).

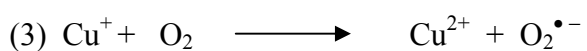
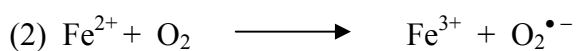
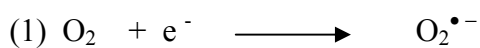
Las ERO son capaces de oxidar macromoléculas biológicas, tales como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Henle y col., 1999).

**TABLA XIV.** Compuestos reactivos derivados del oxígeno de interés

Radical	Nombre
HO •	Hidroxilo
RO•	R-oxilo
ROO•	R-peroxilo
ROOH	Hidroperóxido
L•	Linoleil
O <sub>2</sub> • <sup>-</sup>	Superóxido
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
NO•	Nitroxilo
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Singlete

### 2.7.1.2.1. ANIÓN SUPERÓXIDO

El anión superóxido se produce en la reducción de oxígeno por la transferencia de un electrón (1) o por autooxidación de metales de transición (2)(3) (Fridovich, 1983; Cheeseman y Slater, 1993).



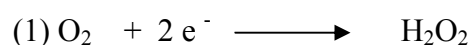
El anión superóxido, a pesar de no ser particularmente dañino, es importante como fuente de peróxido de hidrógeno y como reductor de metales de transición. La principal

fuelle de esta especie reactiva se produce en la mitocondria de forma accidental a nivel de los complejos I y III de la cadena de transporte electrónico, describiéndose que de 2-5% del oxígeno se reduce incompletamente hasta éste radical. Debido a que la formación de esta especie depende del flujo de la cadena de transporte de electrones, cualquier situación que aumente el consumo de O<sub>2</sub>, aumentará proporcionalmente la generación del anión superóxido (Lenaz, 1998; Finkel y Holbrook, 2000; Camougrand y Rigoulet, 2001).

Entre otras acciones, esta especie reactiva reacciona con el NO (factor de relajación derivado del endotelio), mostrando un efecto vaso constrictor, esto podría ser un mecanismo de regulación del tono vascular, aunque puede tener efectos adversos en algunas situaciones clínicas (Muggli, 1993; Saran y cols., 1993).

#### 2.7.1.2.2. PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

La génesis del peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) proviene de la reducción espontánea con dos electrones del oxígeno (1), pudiendo ser también generado en los sistemas biológicos por la reacción de dos moléculas de anión superóxido (2), catalizada por la superóxido dismutasa.



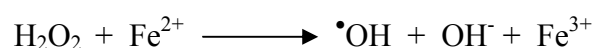
El peróxido de hidrógeno no es un radical libre pero está dentro de las especies reactivas derivadas del oxígeno y envuelto en la producción de otros radicales libres. En presencia de iones metálicos produce el más reactivo y dañino radical libres, el radical hidroxilo (Cheeseman y Slater, 1993).



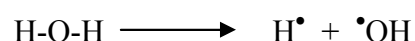
### 2.7.1.2.3. RADICAL HIDROXILO

El radical hidroxilo es extremadamente oxidante ya que reacciona con cualquier tipo de biomolécula (Halliwell y Gutteridge, 1989). No tiene gran poder de difusión y su vida media es corta, produciendo gran daño a moléculas alrededor del lugar de producción. Los mecanismos de generación de este radical son:

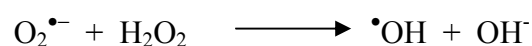
- Por la descomposición del peróxido de hidrógeno en presencia de metales de transición, principalmente hierro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) (Aust y cols., 1985; Minotti y Aust, 1987) y cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) (Auroma y cols., 1991). En el caso del hierro se trata de la denominada reacción de Fenton.



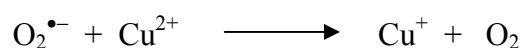
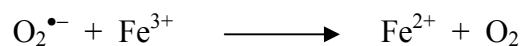
- Cuando se exponen los tejidos a radiaciones  $\gamma$ , la mayor parte de la energía captada es absorbida por el agua de las células. Se produce entonces la separación de una de las uniones covalentes entre el oxígeno y el hidrógeno del agua, dejando un único electrón en el hidrógeno, formando el radical  $\text{H}\cdot$ , y uno en el oxígeno, formando el radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ).



- En la reacción llamada de Haber-Weiss no catalizada por metales de transición o también en la denominada reacción de Fenton conducida por el  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ; el anión superóxido reacciona con el peróxido de hidrógeno (Halliwell y cols., 1992).

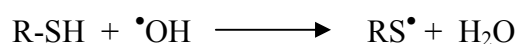


La reacción de Haber-Weiss, se podría entender como el resultado de la unión o colaboración de Fenton con la capacidad del ión superóxido para reducir metales iónicos de transición.



Los radicales hidroxilo son los más reactivos que se conocen en química, teniendo capacidad para reaccionar con las bases púricas y pirimidínicas del ADN (Auroma y cols., 1989; Bohr y Anson, 1999; Sastre y cols., 1999; Cadenas y cols., 2000; Remmen y Richardson, 2001).

En este tipo de reacciones, la hidroxilación y la eliminación de hidrógeno son las modificaciones más comunes que sufre el sustrato orgánico (RH) y se generan otros radicales libres orgánicos como los radicales peroxilo ( $\text{ROO}^\bullet$ ) que a su vez pueden reaccionar y generar radicales alcohilos ( $\text{RO}^\bullet$ ) y sulfoderivados como el radical tilo ( $\text{RS}^\bullet$ ), formado a partir de la oxidación del glutatión por ejemplo (Asmus, 1983).



### **2.7.1.3. DAÑOS CELULARES PRODUCIDOS POR LOS RADICALES LIBRES**

#### **2.7.1.3.1. IMPLICACIONES FISIOLÓGICAS Y PATOLÓGICAS DE LOS RADICALES LIBRES**

Los radicales libres, incluyendo las especies reactivas de oxígeno, se producen tanto en condiciones fisiológicas normales como en patológicas. En consecuencia las células desarrollan una serie de sistemas de defensa frente a su acción perniciosa.

Los radicales libres relacionados con las enfermedades humanas derivan de cuatro fuentes: los generados en los procesos biológicos intracelulares normales pero de forma exagerada e inadecuada, los liberados por células inflamatorias en su entorno y los secundarios a xenobióticos o a mecanismos fisiopatológicos que participan en el envejecimiento y enfermedades relacionadas con la edad (Freeman y Crapo, 1982; Jamieson, 1989; Halliwell y Gutteridge, 1986; 1999) como la arteriosclerosis, cataratas, diabetes, inflamaciones crónicas de tracto digestivo (Linnane y cols., 1990; Multhaup y Rupper, 1997), así como trastornos degenerativos del sistema nervioso ya que el tejido nervioso parece ser un blanco propicio para los compuestos prooxidantes, dadas sus características químicas, tales como alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados, altas concentraciones de hierro y bajo contenido en enzimas antioxidantes. Hay investigaciones que demuestran una clara intervención del estrés oxidativo en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica, entre otras enfermedades del sistema nervioso (Numonura y col., 2007).

**TABLA XV.** Procesos en los que intervienen los radicales libres

---

<b><i>Síndromes de isquemia/reperfusión</i></b>
Accidentes vasculares cerebrales, isquemia mesentérica, neuropatías postraumáticas y postisquémicas, transplantes y preservación de órganos, necrosis tubular aguda
<b><i>Procesos inflamatorios</i></b>
Colagenosis, quemaduras, infecciones, pancreatitis, bronquitis crónica, enfisema, distrés respiratorio del adulto, reacciones adversas a ciertos fármacos, fibrosis pulmonar, síndrome del aceite tóxico
<b><i>Procesos degenerativos</i></b>
Lesiones seniles oculares (cataratas), arteriosclerosis
<b><i>Envejecimiento</i></b>

---

### **2.7.1.3.2. RADICALES LIBRES Y ENVEJECIMIENTO**

Se ha encontrado asociación entre estrés oxidativo y envejecimiento (Barja, 2004), los procesos degenerativos durante el envejecimiento se deben al daño producido por los radicales libres (Harman, 2003).

Años después con el descubrimiento de la enzima superóxido dismutasa se dio un nuevo empuje al estudio de los radicales libres (McCord y Fridovich, 1968). Se descubrió la producción de peróxido de hidrógeno por la respiración mitocondrial (Loschen y cols., 1971), determinándose también el incremento con la edad del anión superóxido y del peróxido de hidrógeno de la respiración mitocondrial (Nohl y cols., 1978; Cavazzoni y cols., 1999).

Muchas investigaciones posteriores acreditan que el envejecimiento es debido a un desequilibrio entre la formación de prooxidantes y las defensas antioxidantes del sistema. Se basan en la medida de los radicales aislados de material biológico (Sohal y cols, 1990), acumulación de daños oxidativos en biomoléculas como fosfolípidos, ADN y proteínas (Lippman, 1980; Saul y Gee, 1987; Ames y cols., 1993), medida de la capacidad oxidante en función de la edad y la expectativa de vida media al administrar antioxidantes (Mehlhorn y Cole, 1985).

La acumulación de proteínas dañadas oxidativamente depende del tejido, pero se ha observado que esta acumulación se incrementa con la edad (Stadman, 1992). Muchas se acumulan en forma inactiva tras la acción de daño oxidativo en algunos de sus aminoácidos. Parece ser que aquellas proteínas que contienen metales de transición tienen un mayor riesgo a sufrir este tipo de daño (Stadman, 1990). Se ha estimado que en los tejidos de ratas de edad avanzada del 30 al 50% del total de proteínas celulares están oxidadas (Stadman, 1992). La acumulación de proteínas no funcionales puede provocar una disminución de la eficiencia del

metabolismo de las células (Tian y col., 1998).

Con respecto al ADN, el nivel de los productos de oxidación son unas 16 veces mayor en el ADN mitocondrial que en el ADN nuclear, pudiendo estar debido a la proximidad del ADN al lugar de producción de radicales libres (Saul y Gee, 1987).

La fluidez de las membranas celulares disminuye con la edad y esto en parte puede deberse a la oxidación de lípidos del plasma y de la membrana mitocondrial (Laganier y Yu, 1993) durante el envejecimiento se acumulan productos derivados de la peroxidación de las membranas (Lippman, 1980) y proteínas aberrantes (Gafni, 1990).

La función mitocondrial decae con la edad debido a la oxidación de proteínas, ADN y lípidos lo cual disminuye la actividad y afinidad por los sustratos de las enzimas, provocando daño neurodegenerativo incluido la pérdida de la capacidad cognitiva (Floyd y Hensley, 2002; Milgram y cols., 2002).

#### **2.7.1.3.3. EFECTOS SOBRE LOS LÍPIDOS. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA**

La peroxidación lipídica es la destrucción de los ácidos grasos poliinsaturados en una reacción autocatalítica e incontrolada donde se forman hidroperóxidos y productos secundarios (Sevaniam y Hochstein, 1985; Halliwell y Chirico, 1993). Las membranas biológicas y las lipoproteínas plasmáticas son susceptibles de peroxidación porque contienen los sustratos necesarios para ello, como el ácido linoleico, araquidónico y docosahexaenoico (Cheeseman y Slater, 1993).

En la peroxidación lipídica se produce la oxigenación de ácidos grasos poliinsaturados (con 18 o más átomos de carbono y con dos o más dobles enlaces conjugados

en cis tanto en la forma libre como esterificada) generándose peróxidos de ácidos grasos (Niki, 1987).

La peroxidación de los ácidos grasos modifica la estructura molecular de los lípidos que los contienen y provoca un cambio conformacional que será más importante cuando los lípidos sean integrantes de membranas y sobre todo en la membrana mitocondrial ya que el mal funcionamiento de la fosforilación oxidativa se asocia a destrucción de la membrana por alteraciones en la fluidez y la pérdida de AG (Muggli, 1993; Lenaz, 1998).

Clásicamente el proceso de peroxidación lipídica consta de tres etapas:

### **Iniciación:**

El mecanismo más frecuente tiene lugar a partir de los radicales hidroxilo, generados a través de la vía de Fenton (Soule y col., 2007; Wilcox y Pearlman, 2008). La PL comienza con la sustracción de un átomo de H de un ácido graso (LH) para formar un radical lipídico (L•). El radical iniciador debe ser una especie lo suficientemente oxidante para reaccionar con los AG poliinsaturados, por ejemplo el radical hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ) la mayoría de los radicales peroxilo ( $\text{ROO}\bullet$ ) y la mayoría de los alcoxilo ( $\text{RO}\bullet$ ). El radical anión superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), no es lo suficientemente oxidante, pero su forma protonada ( $\text{HO}_2\bullet$ ) es capaz de promover la iniciación, si bien a pH fisiológico está a bajas concentraciones. Algunos complejos metálicos también son capaces de iniciar la peroxidación (Halliwell y Chirico, 1993).

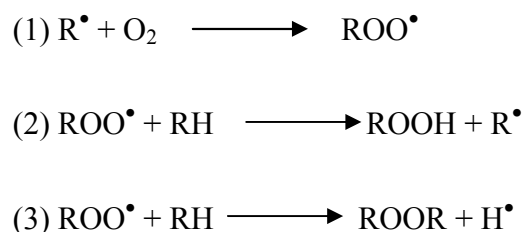
El producto de la reacción da rápidamente un dieno conjugado que reacciona rápidamente para formar un radical peroxilo ( $\text{LOO}\bullet$ ). Este radical puede reaccionar con otros e iniciar una nueva cadena, que formará un hidroperóxido lipídico ( $\text{LOOH}$ ) sobre el original

AG poliinsaturado, considerado el primer producto de peroxidación.

La peroxidación lipídica en membranas biológicas provoca desajustes en el funcionamiento de las mismas, cambios de la fluidez, inactivación de enzimas y receptores ligados a la membrana, así como un aumento no específico de la permeabilidad a iones tipo calcio (Yung-Suk y Akera, 1987; Halliwell y Chirico, 1993; Littarru y Battino, 1994).

### **Propagación:**

La propagación implica inicialmente la reacción del radical lipídico centrado en el átomo de carbono con oxígeno molecular para generar un radical peroxilo, altamente reactivo (Girotti, 1985; Kappus, 1985) (1).



El radical peroxilo formado va a atacar a cualquier material peroxidable que esté a su alcance. Puede actuar sobre una molécula lipídica, generando un nuevo radical centrado en el carbono, que iniciaría a su vez la cadena de propagación; también puede actuar adicionándose a un doble enlace (2, 3). Los hidroperóxidos poliinsaturados se oxidan generando gran número de productos de reacción monoméricos y poliméricos (Frankel, 1991; Cheeseman y Slater, 1993).

La magnitud de la cadena de propagación depende de muchos factores, entre ellos el índice de lípidos/proteínas de la membrana (a mayor cantidad de proteína mayor nivel de

reacción con ella), la composición en ácidos grasos, la concentración de oxígeno, así como la presencia de antioxidantes que rompen la cadena de reacciones de la peroxidación lipídica (Halliwell y Chirico, 1993).

Esta etapa tiene la capacidad aparente para consumir todos los ácidos grasos disponibles en un sistema, aunque esto no suele ocurrir, gracias a las reacciones de terminación. Es obvio por tanto el daño potencial de la peroxidación lipídica (Cheeseman y Slater, 1993).

### **Terminación:**

Las células tienen defensas contra los radicales libres como la eficiencia de la cadena de transporte de electrones, para evitar la escapada de éstos y la formación de  $O_2^{\bullet-}$ . El cual es eliminado por la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa.

Las defensas antioxidantes juegan un papel preventivo en la peroxidación lipídica (Burton y cols., 1983; Viña y cols., 1993). Las células vivas poseen una significativa defensa que es la glutatión peroxidasa selenio dependiente (Wendel, 1993) la cual reduce los hidroperóxidos lipídicos a ácidos grasos hidroxilados.

La transferrina y la ferritina secuestran metales, lo que hace inviable la rotura de hidroperóxidos (Halliwell y Gutteridge, 1986; Auroma y cols., 1991). La ceruloplasmina también juega un papel importante al unir cobre y oxida al hierro a su forma férrica que es menos reactiva (Halliwell y Gutteridge, 1984).

Una forma de parar la cadena es utilizando antioxidantes por ejemplo,  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -



tocopherol y ubiquinona. La vitamina E intercepta un radical peroxilo y se convierte en un radical libre fenoxilo. Éste radical puede interceptar otro igual y terminar la reacción y también puede regenerarse con ascorbato o glutatión (Burton, 1989; Kelso y cols., 2002; Lenaz y cols., 2002; Miyadera y cols., 2002).

El  $\alpha$ -tocopherol está presente en las membranas en proporción 1/100 AG poliinsaturados, siendo muy efectivo por varias razones, por su cola liposoluble que hace que se intercale en la membrana, por la estabilidad del radical que previene la iniciación y su capacidad para regenerar la membrana (Viña y cols., 1993).

La finalización de la serie de reacciones en cadena, puede producirse por el emparejamiento de dos radicales o por transferencia de un grupo entre ambos (Bast y Steeghs, 1986). Además, cabe la posibilidad de que la reacción de dos peróxidos lipídicos de lugar a la formación del singlete de oxígeno (Cheeseman y Slater, 1993; Halliwell y Chirico, 1993).

## **2.7.2. SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE**

### **2.7.2.1. INTRODUCCIÓN**

Una sustancia se define como antioxidante cuando es capaz de disminuir o inhibir el daño oxidativo sobre una molécula. Para la desintoxicación de ERO los organismos han desarrollado numerosos tipos de sistemas defensivos (Tabla XVI) de prevención, interceptación y reparación, formados por atrapadores y sustancias neutralizantes no enzimáticas, así como por sistemas enzimáticos entre los que están las superóxido dismutasas, glutatión peroxidasas y la catalasa, entre otras. También otros sistemas importantes son las reacciones de regeneración y el sistema del glutatión (Gutteridge y

Halliwell, 1994; Camougrand y Rigoulet, 2001; Navarro y cols., 2001).

**TABLA XVI.** Tipos de defensas antioxidantes

NO ENZIMÁTICAS	ENZIMÁTICAS
<b>Endógenos:</b>	
Glutation	Superóxido dismutasa (SOD):
NADPH	$2 O_2^{\cdot -} + 2 H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
Coenzima Q	
Albúmina	
Ceruloplasmina	Glutation peroxidasa (GPx):
	$H_2O_2 + 2 GSH \rightarrow GSSG + 2 H_2O$
<b>Exógenos:</b>	
Tocoferoles	
Betacarotenos	Catalasa (CAT):
Ácido ascórbico	$H_2O_2 \rightarrow H_2O + \frac{1}{2} O_2$
Licopeno	
N- acetilcisteína	

Como se ha mencionado anteriormente, en la célula se forman continuamente radicales libres frente a los cuales se debe actuar, por ejemplo: 1) formación de  $O_2^{\cdot -}$  en la cadena de transporte electrónico y citocromo  $P_{450}$ , por reacciones de autooxidación y por la acción de ciertas enzimas como la xantina-oxidasa, 2) formación de  $H_2O_2$  por dismutación del  $O_2^{\cdot -}$  y la acción de ciertas oxidasas, 3) formación de  $HO^{\cdot}$  por continua exposición a bajas

radiaciones (Lenaz, 1998).

Los sistemas defensivos pueden actuar capturando la mayor cantidad posible de metales como el hierro y cobre en proteínas almacenadoras o transportadoras (Auroma y Halliwell, 1987; Halliwell, 1988; Gutteridge y Halliwell, 1994; Halliwell y Gutteridge, 1999). Un ejemplo es la transferrina, que tiene capacidad de unirse al hierro plasmático de humanos (Halliwell y Gutteridge, 1986), la ceruloplasmina y la albúmina al cobre plasmático (Halliwell, 1988; Grootveld y cols., 1989; Gutteridge y Halliwell, 1994).

### **2.7.2.2. ESTRÉS OXIDATIVO Y METABOLISMO DEL HIERRO**

El hierro tiene la capacidad de aceptar y donar electrones fácilmente, por su conversión entre férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) y ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ). 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).

El hierro es un elemento que está presente en todas las células del organismo, formando parte de numerosas proteínas, algunas con actividad enzimática y otras que contribuyen al transporte de oxígeno o de electrones. El hierro también forma parte de agregados moleculares que contribuyen al depósito de este mineral en el organismo, o a su transporte plasmático.

Sin embargo, el hierro 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.

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

superóxido. Además, el estrés oxidativo crónico puede modular la absorción del hierro y su almacenamiento, lo que puede llevar a efectos citotóxicos y mutagénicos (Emerit y col., 2001).

Pero los organismos vivos se protegen del estrés oxidativo iniciado por el hierro mediante varios mecanismos. Uno de ellos es prevenir el ataque oxidativo mediante las proteínas secuestradoras de hierro, otra vía es aumentando su absorción y otro mecanismo es a través de los mecanismos enzimáticos.

### **2.7.2.3. MECANISMOS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE**

Un aumento de radicales libres en el organismo, produciría un desequilibrio entre las moléculas oxidantes y reductoras, originando un estado de estrés oxidativo. Sin embargo, los seres vivos y particularmente el ser humano, cuentan con múltiples y eficientes mecanismos de defensa antioxidante que actúan en función del tipo de especie dañina y del lugar donde esta se genera. Dentro de las células, el sistema antioxidante es principalmente de tipo enzimático y en el espacio extracelular, es decir, en los fluidos biológicos como el plasma, el sistema antioxidante es de tipo no enzimático. De este modo, contamos con antioxidantes específicos capaces de actuar oportunamente en distintos lugares.

#### **2.7.2.3.1 ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS**

Las enzimas antioxidantes son el principal sistema de defensa frente al daño oxidativo y se encargan de eliminar las especies reactivas del oxígeno, especialmente el radical superóxido y el peróxido de hidrógeno, para evitar que, a partir de estos, se generen otras especies más reactivas y peligrosas como el radical hidroxilo, el oxígeno singlete y el peroxinitrito.

### 2.7.2.3.1.1. SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD)

La enzima superóxido dismutasa (SOD) fue descubierta, en eritrocitos, por McCord y Fridovich en 1969, fue la primera enzima antioxidante descrita y constituye la primera fase de la defensa antioxidante. Esta enzima, que cataliza la reacción de destrucción de los radicales superóxido mediante su transformación en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular, actúa a valores de pH fisiológico, siendo su velocidad de catálisis máxima para valores de pH comprendidos entre 7 y 9 (Aydemir y Tarhan, 2001). Esta reacción se produce de forma espontánea aunque de manera menos eficiente, ya que depende fuertemente del pH.



Está presente en la mayoría de los organismos aeróbicos y contiene en su estructura metales esenciales para su función catalítica, según los cuales hay varios tipos que catalizan la misma reacción (Gutteridge y Halliwell, 1994).

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

En humanos, se diferencian tres formas de SOD que se clasifican según su localización: la citosólica (Cu/ZnSOD), la mitocondrial (MnSOD) y la extracelular (ECSOD) (Fattman y cols., 2003).

- La SOD citosólica posee dos subunidades idénticas que contienen Cu y Zn en su centro activo, siendo el cobre responsable de la transferencia de electrones, mientras que el Zn desempeña únicamente un papel estabilizador. La Cu/ZnSOD remueve el  $\text{O}_2^{\bullet -}$  de oxidadas

citosólicas y de las enzimas del citocromo P<sub>450</sub> presentes en el retículo endoplásmico de la célula. Algunas SOD-Cu,Zn pueden estar presentes en peroxisomas.

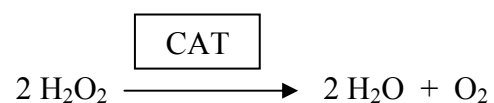
- La MnSOD mitocondrial elimina el O<sub>2</sub><sup>-</sup> producido por la cadena de transporte de electrones y por las oxidasas mitocondriales. Su contenido en tejidos es aproximadamente la mitad de la Cu/ZnSOD sin embargo, la expresión de MnSOD es esencial para la supervivencia y el desarrollo de resistencia celular a la toxicidad inducida por las ERO (Matés y cols., 1999).

- La forma extracelular, al igual que la citosólica, contiene cobre y cinc en su centro activo. Se localiza en el espacio intersticial de los tejidos y en fluidos extracelulares, siendo la forma de SOD mayoritaria en plasma, linfa y fluido sinovial (Matés y cols., 1999).

#### 2.7.2.3.1.2. CATALASA (CAT)

La catalasa es una enzima presente en la mayoría de los tejidos de mamíferos que se encuentra localizada en pequeños orgánulos llamados peroxisomas (80%) y en citosol (20%) (Nieto, 1993), aunque también en tejido cardíaco se halla en la mitocondria a baja concentración (Roberfroid y Buc-Calderon, 1995) donde ejerce un importante papel antioxidante (Radi y cols., 1993).

La catalasa es una hemoproteína que cataliza la dismutación del peróxido de hidrógeno rompiéndolo directamente hasta oxígeno molecular y agua (Mathews y cols., 2002).



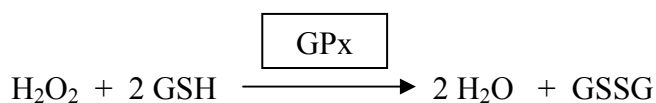
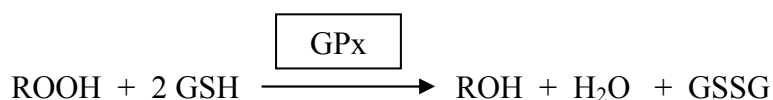
También tiene actividad peroxidante (Aeibi, 1984) produciendo la oxidación de donadores de hidrógeno como el etanol, metanol, ácido fórmico y fenoles con el consumo de un mol de peróxido.



La actividad predominante depende de la concentración del donador de hidrógeno y de la concentración o producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el sistema. La catalasa tiene enorme capacidad para destruir el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , es una de las enzimas más activas conocidas. De todas formas su afinidad por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  es también baja y necesita elevadas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  para actuar rápidamente (McCord, 1989; Cheeseman y Slater, 1993; Roberfroid y Buc-Calderon, 1995).

### 2.7.2.3.1.3. GLUTATION PEROXIDASA (GPx)

Se trata de una familia de enzimas que utilizan glutatión (GSH) como donador de hidrógeno y que pueden aceptar otros peróxidos orgánicos además del  $\text{H}_2\text{O}_2$  como sustratos (Flohé y Gunzler, 1984; Sjodin y cols., 1990; Wendel, 1993). El radical R puede ser un grupo alifático, un grupo orgánico aromático o simplemente H. Los productos de reacción son  $\text{H}_2\text{O}$  y un alcohol (ROH) o una segunda molécula de  $\text{H}_2\text{O}$ , cuando el sustrato es  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



Los tejidos humanos contienen glutathion peroxidasa, como la mayor enzima eliminadora de peróxidos. La regeneración del glutathion oxidado es efectuada por la enzima glutathion reductasa (GR).



Hay dos grandes grupos de glutathion peroxidasa, un primer grupo contiene selenocisteína en su centro activo, siendo una enzima activa frente a hidroperóxidos y a  $\text{H}_2\text{O}_2$ , el segundo grupo de enzimas no depende de Se para su catálisis y no es activa frente a  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Lawrence y Burk, 1976; Flohé y Gunzler, 1984; Sarma, 2008).

Flohé y Schlepel (1971) hallaron GPx en humanos, su localización subcelular es a nivel de citosol y de matriz mitocondrial para los dos tipos y aunque tiene mayor afinidad por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  que la catalasa (Roberfroid y Buc-Calderon, 1995), presenta menor actividad que ésta a elevadas concentraciones (Chance y cols., 1979). Esto podría implicar que la GPx está más adaptada a eliminar el  $\text{H}_2\text{O}_2$  que se produce en la cadena de transporte electrónico mitocondrial.

En mamíferos, se han encontrado cinco isoenzimas que se diferencian en su localización y en el substrato específico sobre el que actúan (Brigeliou-Flohé y cols., 2002): la citosólica (cGPx), la gastrointestinal (GI-GPx), la extracelular (eGPx), la de hidroperóxido de fosfolípidos (PHGPx) y la GPx-6.

La GPx citosólica es la más abundante y se localiza en numerosos tejidos, principalmente en eritrocitos, hígado y riñón. La PHGPx también presenta una amplia distribución y se expresa principalmente en el epitelio renal y en los testículos. La forma extracelular se encuentra mayoritariamente en plasma y en la mayoría de las secreciones



corporales y la GI-GPx, además de en tracto gastrointestinal, también está presente en hígado (Seiichiro y Nobumasa, 2000). La GPx-6 ha sido identificada recientemente, se expresa exclusivamente durante el desarrollo en el epitelio olfatorio (Schomburg y cols., 2004).

### **2.7.2.3.2. ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS**

Esta segunda defensa antioxidante está formada por distintos compuestos antioxidantes, endógenos y exógenos, que atrapan o neutralizan los radicales libres.

Tanto el GSH como otras moléculas que contienen tioles, tienen alto poder reductor y, por consiguiente, poseen propiedades antioxidantes, ya que pueden cederle un electrón a las ERO y/o ERN, disminuyendo de esta forma su reactividad. Se dice que este tipo de compuestos de bajo peso molecular actúan como “atrapantes” de radicales libres. Entre ellos podemos citar a la tiorredoxina (Trx) y a la vitamina C, E y A.

Los antioxidantes de origen endógeno, como glutatión, urato, ubiquinol y proteínas plasmáticas, son sintetizados por el organismo humano, de modo que, cuando son modificados, se ponen en funcionamiento mecanismos de síntesis para reemplazarlos.

Entre las defensas antioxidantes no enzimáticas, tiene un lugar predominante el glutatión en su forma reducida (GSH). Esta pequeña molécula protege a la célula contra diferentes especies oxidantes, es el antioxidante que se encuentra en mayores concentraciones intracelulares.

El GSH mantiene el balance redox en la célula y la protege del estrés oxidativo actuando como cofactor de la GPx en la eliminación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, reaccionando directamente con radicales libres como el anión superóxido, el óxido nítrico y el radical hidroxilo, y ayudando en la recuperación de las vitaminas C y E, otros antioxidantes que participan en la eliminación de radicales. También, participa en procesos de detoxificación de muchos compuestos xenobióticos, controla la permeabilidad de las membranas y el transporte de aminoácidos (especialmente la cisteína), y actúa como cofactor de diversas enzimas que

intervienen en el proceso de síntesis de proteínas, ADN y ARN (Martínez y cols., 2006). Además, interviene en el metabolismo de los leucotrienos y las prostaglandinas, la función inmunológica y la proliferación celular (Fulbert y Cals, 1992; Bray y Taylor, 1993).





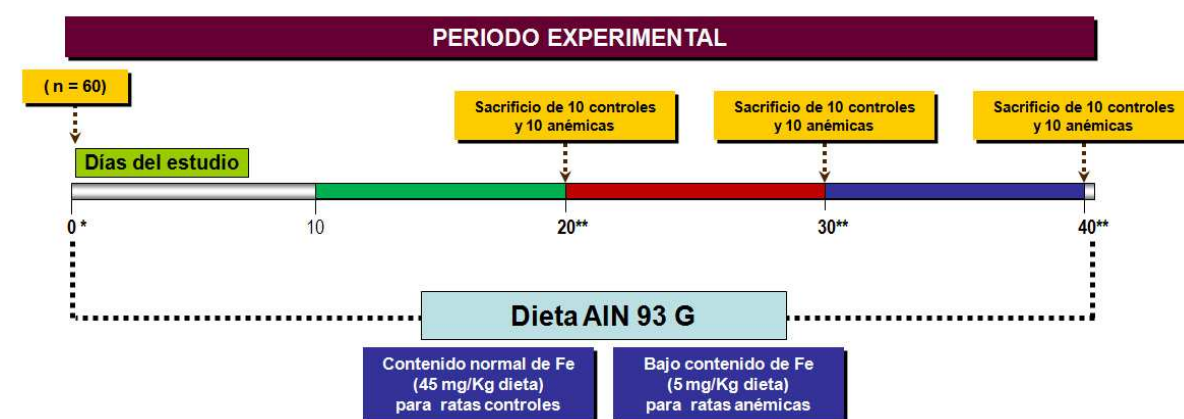
### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se han usado 60 ratas (*Ratus norvegicus*, raza Wistar albina) con un peso inicial aproximado de 45-50 g, procedentes del Servicio de Animales de Laboratorio de la Universidad de Granada. Los procedimientos de manejo y cuidado animal, así como los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de Granada, de acuerdo con las Directrices Comunitarias de la Unión Europea.

Las ratas son divididas al azar en seis grupos: tres grupos controles, que reciben la dieta AIN-93G (Reeves y col., 1993) con un nivel adecuado de Fe y tres grupos anémicos alimentados con la misma dieta, pero con bajo nivel de Fe (Pallarés y col., 1993), durante 20, 30 ó 40 días. La Figura XII Muestra el diseño experimental del estudio.

**FIGURA XII.** Diseño experimental del estudio:



■ ■ ■ Ensayos de balance: días 13 a 20, 23 a 30 y 33 a 40.

\* Sangre para determinación de parámetros hematológicos.

\*\* Sangre y fracciones citosólicas para determinación de enzimas antioxidantes y hematología.

Las ratas se alojan en células individuales de metabolismo 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 relativa. Los animales reciben agua bidestilada y dieta “*ad libitum*” durante todo el periodo experimental. La ferodeficiencia es inducida en uno de los grupos por la técnica desarrollada previamente por nuestro grupo de investigación (Pallarés y col., 1993), las ratas son alimentadas con 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).

Los últimos 7 días de cada periodo experimental (de los días 13 a 20, 23 a 30 y 33 a 40) se realizan estudios de balance (Thomas-Mitchell, 1923). Diariamente se controla la ingesta, además de recolectar por separado heces y orina. La orina se recolecta sobre una solución ácida de HCl y se conserva en el frigorífico a  $4 \pm 2^\circ\text{C}$  hasta su posterior análisis. Las heces se conservan en un congelador a  $-20 \pm 2^\circ\text{C}$  para su posterior análisis.

En los días 0, 20, 30 y 40 se toman muestras de sangre de la vena caudal en tubos que contienen EDTA como anticoagulante para el control hematológico de la anemia.

Tras el periodo principal, todos los animales son sacrificados los días 20, 30 ó 40 de la experiencia. Se anestesia el animal con pentobarbital sódico (SIGMA, St Louis, MI, USA) a una dosis de 5mg/100g de peso por vía intraperitoneal y se canula la aorta abdominal, obteniéndose una alícuota de sangre en tubos con anticoagulante (EDTA) para determinar: recuento de

hematíes, volumen corpuscular medio (VCM), Hemoglobina corpuscular media (HCM) hemoglobina (Hb), hematocrito y plaquetas. El resto de sangre se centrifuga a 3000 r.p.m. durante 10 minutos y se obtiene el plasma para analizar la actividad de especies reactivas al ácido tiobarbitúrcio (TBARS) y la superóxido dismutasa (SOD). Otra alícuota de sangre se recoge en tubos sin anticoagulante y se centrifuga a 3000 r.p.m. durante 10 minutos y con una pipeta pasteur se extrae el suero y se determinan niveles de Fe, ferritina y TIBC.

Además, serán extraídos hígado y cerebro para la obtención de homogenados que posteriormente serán procesados para obtener citosol de cada tipo celular. En la fracción citosólica de eritrocitos, hígado y cerebro se realizará el estudio de las enzimas antioxidantes catalasa (CAT) y glutatión-peroxidasa (GPx). La SOD y TBARS se determinan en plasma. Todas las muestras son conservadas a -80 °C hasta el análisis enzimático.

En cada uno de los experimentos se han llevado a cabo las siguientes determinaciones analíticas:

- Dietas: humedad, Ca, P, Mg, Fe, Zn y Cu
- Heces: humedad, Ca, P, Mg, Fe, Zn y Cu.
- Orina: Ca, P, Mg, Fe, Zn y Cu.
- Suero: Fe, transferrina, ferritina y TIBC
- Sangre periférica: determinación de hemoglobina, recuento de hematíes, hematocrito, VCM, HCM y plaquetas.
- Citosol de eritrocitos, hígado y cerebro: CAT y GPx

- Plasma: SOD y TBARS.

### 3.2. DIETAS UTILIZADAS

Las dietas semisintéticas están elaboradas de acuerdo con la siguiente composición:

<b>DIETAS CON CONTENIDO NORMAL O BAJO EN Fe</b>	
	<b>CANTIDAD (g/Kg dieta)</b>
Proteína	
<b>-Caseína</b>	200
Grasa	
<b>-Aceite de oliva</b>	70
Hidratos de Carbono	
<b>-Almidón de maíz</b>	501
<b>-Sacarosa</b>	100
Fibra	
<b>-Celulosa micronizada</b>	50
<b>Corrector Mineral*</b>	35
<b>Corrector Vitamínico</b>	10
<b>Cloruro de Colina</b>	2.5
<b>L-Cisteína</b>	1.5

\*Con o sin fuente de Fe (citrato férrico)

Los **correctores vitamínico y mineral** utilizados en las dietas han sido elaborados de acuerdo a las recomendaciones del IAN (1993).



<b>CORRECTOR VITAMÍNICO</b>	
	<b>g/Kg de corrector</b>
<i>Clorhidrato de tiamina</i>	0.600
<i>Riboflavina</i>	0.600
<i>Clorhidrato de piridoxina</i>	0.700
<i>Ácido nicotínico</i>	3.000
<i>Pantotenato cálcico</i>	1.600
<i>Ácido fólico</i>	0.200
<i>Biotina</i>	0.025
<i>Cianocobalamina</i>	0.002
<i>Vitamina A (acetato de retinol)</i>	0.800
<i>Vitamina D<sub>3</sub> (colecalfiferol)</i>	0.250
<i>Vitamina E (tocoferol)</i>	15.00
<i>Vitamina K (menadiona)</i>	0.075
<i>Sacarosa finamente dividida c.s.p.</i>	1000

<b>CORRECTOR MINERAL</b>	
	<b>g/Kg de corrector</b>
<i>Carbonato cálcico anhidro (40.4% Ca)</i>	357.000
<i>Fosfato potásico monobásico (22.76% P; 28.73% K)</i>	250.000
<i>Cloruro Sódico (39.34% Na; 60.66% Cl)</i>	74.000
<i>Sulfato potásico (44.87% K; 18.39% S)</i>	46.600
<i>Citrato potásico monohidratado (36.16% K)</i>	28.000
<i>Óxido de Magnesio (60.32 % Mg)</i>	24.000
<i>Citrato férrico (16.5% Fe) *</i>	6.060*
<i>Carbonato de cinc (52.14% Zn)</i>	1.650
<i>Carbonato de manganeso (47.79% Mn)</i>	0.630
<i>Carbonato cúprico (57.47% Cu)</i>	0.300
<i>Ioduro potásico (59.3% I)</i>	0.010
<i>Selenito sódico anhidro (41.79% Se)</i>	0.010
<i>Paramolibdato de amonio tetrahidratado (54.34% Mo)</i>	0.008
<i>Sacarosa finamente dividida c.s.p.</i>	1000

\* La dieta con bajo contenido en Fe no lleva adicionado citrato férrico.

Los requerimientos de Ca, P, Mg, Fe, Zn y Cu para la rata son:

- Calcio: 5000 mg/Kg dieta
- Fósforo: 3000 mg/Kg dieta
- Magnesio: 513 mg/Kg dieta
- Hierro: 45 mg/Kg dieta
- Cinc: 35 mg/Kg dieta
- Cobre: 6 mg/Kg dieta

Se han determinado las concentraciones de Ca, P, Mg, Fe, Zn y Cu en las dos dietas ensayadas cuya riqueza en mg/Kg de dieta, queda reflejada en la siguiente tabla:

<b>DIETAS CON CONTENIDO NORMAL DE HIERRO (mg/Kg dieta)</b>					
<b>Ca</b>	<b>P</b>	<b>Mg</b>	<b>Fe</b>	<b>Zn</b>	<b>Cu</b>
<b>5250</b>	<b>3240</b>	<b>528</b>	<b>44.71</b>	<b>38.41</b>	<b>5.87</b>
<b>DIETAS CON BAJO CONTENIDO DE HIERRO (mg/Kg dieta)</b>					
<b>5155</b>	<b>3325</b>	<b>525</b>	<b>6.31</b>	<b>39.12</b>	<b>5.94</b>

### **3.3. TÉCNICAS ANÁLITICAS**

#### **3.3.1. MATERIA SECA**

Es determinada como la parte de sustancia que no desaparece al someter la muestra a una temperatura de  $105 \pm 2$  °C, hasta que alcance un peso constante. La materia seca se determina en la dieta y heces.

#### **3.3.2. MATERIA GRASA**

El contenido graso de la dieta fue determinado tras hidrólisis hidroclicórica por extracción con éter de petróleo (Sanderson, 1986).

#### **3.3.3. CONTENIDO EN NITRÓGENO**

El contenido en nitrógeno de la dieta se determinó por el método Kjeldahl usando un factor de conversión de 6.25 (Kjeldahl, 1883).

#### **3.3.4. MINERALES TOTALES**

Se determinan por mineralización total de la muestra por vía húmeda de un gramo de muestra (en el caso de la dieta y heces). La muestra se coloca en un vaso de precipitado, se añaden 10-12mL de ácido nítrico concentrado (riqueza del 69%) y se tapa con un vidrio de reloj.

Se coloca en un baño de arena (Selecta, Barcelona, España) a una temperatura de 70-80 °C y se espera la aparición de vapores rojizos/anaranjados de óxido nítrico. Se añaden 2mL de nítrico a la muestra, tantas veces como se necesario hasta la aparición de vapores blanquecinos. En este momento se comienza a añadir 10mL de mezcla nítrico/perclórico (4:1, v/v) 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), y se enrasa hasta un volumen final de 25 mL en un matraz aforado. Como resultado final obtenemos una solución transparente que emplearemos en la posterior determinación de minerales.

#### **3.3.4.1. HIERRO, CALCIO, MAGNESIO, COBRE Y CINC**

Las concentraciones de Fe, Ca, Mg, Cu y Zn en dieta, heces y orina, se determinan por espectrofotometría de absorción atómica (PERKIN ELMER 1100B, Norwalk, USA) a partir de una muestra adecuada, previamente mineralizada por vía húmeda y diluida convenientemente, comparándose frente a una serie de patrones de concentración conocida. En la espectroscopía atómica se consigue que los átomos individuales de una especie interactúen con la radiación electromagnética.

#### **3.3.4.2. FÓSFORO**

La concentración de P en la dieta, heces y orina se analiza por espectrofotometría visible mediante la técnica de Fiske-Subbarow (1925).

---

### **3.3.5. PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS**

La determinación de hemoglobina, hematocrito, recuento de hematíes, VCM, HCM y plaquetas es efectuada en los días 0, 20, 30 y 40 a partir de sangre periférica obtenida de la vena caudal y recogida en un tubo con EDTA. La determinación de la hematología se ha 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 el kit comercial Rat Ferritin ELISA (Biovendor GmbH, Heidelberg, Germany). Los patrones, calibradores, controles y muestras se mezclan con la solución de trabajo. Posteriormente, las muestras convenientemente diluidas se incuban en microplacas con pocillos recubiertos de anticuerpos altamente específicos contra la ferritina de rata, durante 2 h a temperatura ambiente, procediendo posteriormente a la aspiración y lavado de los pocillos. Tras este paso, se procede a la adición de la solución enzimática que se unirá selectivamente a los pocillos y tras un último lavado, el color se desarrolla usando un sustrato cromógeno (3,3',5, 5'-tetrametilbenzidina, TMB). La absorbancia de la reacción se monitoriza en un lector de microplacas a 450 nm, usando un lector de microplacas (Bio-rad Laboratories Inc., California, USA) en un plazo de 30 min. La intensidad de color desarrollada es inversamente proporcional a la concentración de ferritina sérica.

### **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 y los niveles de Fe sérico enzimáticamente, usando un kit comercial Iron and total iron-binding capacity (Sigma Diagnostics, St. Louis, MI, USA). El ensayo se adapta a microplacas, usando 50 µL de suero en 250 µL de tampón más 5µL de reactivo cromógeno. La absorbancia de la reacción se monitoriza en un lector de microplacas a 550 (Bio-rad Laboratories Inc., California, USA). El porcentaje de saturación de la transferrina se calcula 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. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE CITOSOL ERITROCITARIO, HEPÁTICO Y CEREBRAL**

Se llevaron a cabo distintas centrifugaciones diferenciales para separar las fracciones citosólicas de eritrocito, hígado y cerebro de acuerdo al procedimiento descrito previamente (DeSandro y col., 1991). Las muestras de hígado y cerebro son homogenizadas, tras la adición de 4 mL de tampón de sacarosa en el caso de los cerebros y tampón sacarosa-albumina para los hígados. Ambos órganos fueron fraccionados con una cuchilla automática (Polytron-Vertrieb GmbH, Langwiesenweg, Deutschland) y homogeneizados en un Potter con

pistón de teflón (Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Germany). Para la obtención de sobrenadantes y pelet se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos en una centrifuga J2-21 (Beckman, Brea, CA, USA) a una temperatura de 4 °C, los sobrenadantes obtenidos de ambos órganos fueron filtrados con gasa y ambos centrifugados a 8000 rpm durante 20 minutos. Los pellets obtenidos fueron guardados en hielo y oscuridad y los sobrenadantes fueron centrifugados a 10000 rpm durante 10 minutos de los cuales se obtuvieron los citosoles de cerebros e hígados. Los pellets obtenidos se unieron a los guardados y se resuspendieron en 25 mL de tampón de sacarosa y centrifugados a 12000 rpm durante 10 minutos. Los sobrenadantes obtenidos se desecharon dejando solamente los pellets para la obtención de membranas mitocondriales de ambos órganos, que fueron resuspendidos en 2 mL de tampón de sacarosa para luego ser homogeneizados y congelados en sus respectivos viales a -80 °C.

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

### 3.3.9. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

La analítica para la cuantificación del contenido proteico de las distintas fracciones celulares se realiza mediante el método de Lowry y col., (1951), se basa en dos reacciones complementarias: 1) los grupos  $\text{NH}_3$  de las proteínas dan coloración violeta al reaccionar con el reactivo de Biuret y 2) los grupos OH reductores (fenólicos) dan color azul con el reactivo de Folin. Se mide la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 640 nm.

Los reactivos utilizados son:

- Tampón sacarosa.
- Reactivo de Folin comercial, diluido a la mitad con agua bidestilada.
- Reactivo Biuret extemporáneo (compuesto por solución A:  $\text{CO}_3\text{NA}_2$  al 2 % en una solución de NaOH 0.1N y solución B:  $\text{SO}_4\text{Cu } 5\text{H}_2\text{O}$  al 5 % y tartrato sódico al 1 %, mezcladas ambas en proporción 50/1).

Para la realización de la técnica partimos de 15 $\mu\text{l}$  de muestra, completando hasta 1 mL con tampón sacarosa, seguidamente se añadieron 5mL de reactivo de Biuret, se agitó y se esperó 15 minutos en oscuridad, tras ésto se añadieron 0,5mL de reactivo de Folin diluido, se agitó y se espero 20 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente.



---

Se procedió a la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro a 640nm (Thermospectronic, Genesys 2). De cada muestra se hicieron dos determinaciones y se halló la media. Para el cálculo de la concentración proteica se realizó previamente una curva de calibrado a partir de una solución de proteína de albúmina sérica bovina (Sigma, St Louis, MO, USA) de 500 µg/mL haciendo diluciones con el tampón sacarosa. La concentración se determinó aplicando una regresión lineal a la curva de calibrado.

### **3.3.10. DETERMINACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS AL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)**

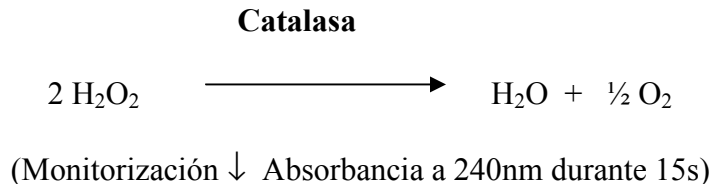
La peroxidación lipídica se evalúa en plasma determinando la concentración de TBARS, siguiendo el método descrito por Yagi (1976) y Ohkawa y col. (1979). 0.5 mL de plasma se mezclan con 1 mL de ácido tricloroacético al 15 % (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland) y se centrifuga a 80 g durante 10 min. 1 mL de sobrenadante se mezcla con 1 mL de reactivo TBA (0.67 %) y la mezcla fue mantenida en un baño a 100 °C durante 20 min. El producto de la reacción se extrae y se mide mediante análisis espectrofotométrico (Thermo Spectronic, Rochester, NY, USA) a 532 nm. El ensayo se calibra usando una curva de tetraetoxipropano (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland) como fuente de malondihaldehído.

### 3.3.11. ENZIMAS ANTIOXIDANTES

#### 3.3.11.1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CATALASA

Se ha determinado mediante la técnica descrita por Aebi (1984). La acción catalítica de esta enzima consiste en descomponer el  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{O}_2$ . Es un método espectrofotométrico que monitoriza el descenso de absorbancia a 240 nm (Thermospectronic, Rochester, USA), región del UV, durante 15 segundos, debido a la disminución en la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

El esquema de la reacción catalizada por esta enzima fue la siguiente:



Los reactivos utilizados fueron los siguientes:

- Tampón fosfato compuesto por  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50mM y  $\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  50mM en proporción 1:1,5 v/v a pH 7.
- Solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30 %.

---

La técnica consistió en mezclar en una cubeta de plástico 50  $\mu\text{l}$  de muestra tanto para citosol de hígado, cerebro como eritrocito, junto con 1950  $\mu\text{l}$  de tampón fosfato, se agitó y se pasó a una cubeta de cuarzo. Una vez en el espectrofotómetro se añadieron 1000  $\mu\text{l}$  de solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30 %, el volumen final en la cubeta fue de 3mL.

Para el cálculo de la actividad se tuvo en cuenta el volumen final y el volumen de muestra, así como la cantidad de proteínas por mL en la muestra, se calcula según la fórmula:

$$\text{mU/mg proteína} = [\Delta A(\text{min}) \cdot V_f / \epsilon \cdot d \cdot V_m \cdot C] \cdot D$$

Donde:

mU =  $\mu\text{mol}/\text{minuto}$

$\Delta A(\text{min})$  = incremento de absorbancia de la muestra por minuto, valor absoluto.

$V_f$  = volumen final en mL en la cubeta.

$\epsilon$  = coeficiente de extinción molar del  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\epsilon = 0,0394 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

$d$  = paso de luz de la cubeta, 1cm.

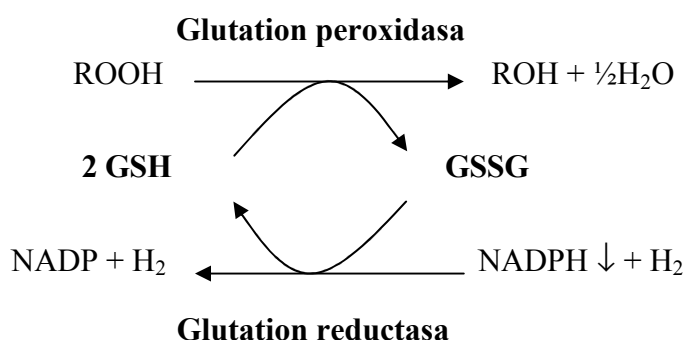
$V_m$  = volumen de muestra (homogeneizado diluido) en la cubeta (mL).

$C$  = concentración de proteínas de la muestra (mg proteína/mL).

$D$  = dilución del homogeneizado.

### 3.3.11.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD GLUTATION PEROXIDASA

La enzima glutatión peroxidada (GPx) cataliza la reducción de los peróxidos orgánicos y del peróxido de hidrógeno en una reacción en que interviene el glutatión. La determinación de la GPx se realiza a partir del método, ligeramente modificado, descrito por Flohé y Günzler (1984) que consiste en determinar el descenso enzimático dependiente e independiente de NADPH y el descenso no enzimático. El esquema de la reacción catalizada por esta enzima fue la siguiente:



Para ello se realiza una monitorización continua de formación de glutatión oxidado (GSSG). El GSSG formado durante la reacción catalizada por la glutatión peroxidasa es instantáneamente y continuamente reducido por un exceso de glutatión reductasa a un nivel constante de glutatión reducido (GSH). La oxidación asociada de NADPH es monitorizada fotométricamente.

Los reactivos utilizados son los siguientes:

- Buffer fosfato potásico 0.1 M, pH 7.0, conteniendo EDTA 1mM y azida sódica 1mM.

- Glutation reductasa 2.4 U/mL en tampón sin azida.
- Glutation reducido 10mM en tampón fosfato.
- NADPH 1.5 mM en tampón NaHCO<sub>3</sub> al 0.1%.
- Cumeno hidroperóxido (80%) 12mM.

*Determinación del descenso enzimático:*

En la placa falcon® se adiciona 127,5 µL de buffer fosfato, 25 µL de glutacion reductasa, 25 µL de GSH, 25 µL NADPH y 25 µL de muestra. Se incuba tres minutos a 37°C. A continuación se adiciona 25 µL de cumeno hidroperóxido, previamente precalentado a 37 °C. Al blanco se le adiciona 25 µL de buffer fosfato. Se monitoriza el descenso durante tres minutos del NADPH a 340nm en un lector de microplaca y en presencia de un blanco.

*Determinación del descenso no enzimático:*

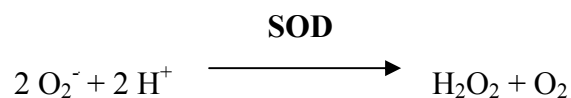
Para eliminar el descenso no enzimático, se procede de la misma manera pero se reemplaza la muestra por buffer y se lee frente a un blanco sin muestra, ni cumeno. El dato obtenido en esta determinación se resta al obtenido en la determinación anterior, obteniendo así el descenso enzimático dependiente de NADPH.

### 3.3.11.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD SUPERÓXIDO DISMUTASA

La actividad superóxido dismutasa (SOD) fue determinada de acuerdo al método de Crapo y col. (1978). Se basa en la inhibición producida por la SOD en la reducción del citocromo *c*, medida mediante espectrofotometría a 550 nm.

La enzima SOD está encargada de la formación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> a partir del radical superóxido.

La reacción catalizada por esta enzima es la siguiente:



Los reactivos utilizados fueron los siguientes:

- Tampón carbonato/bicarbonato de sodio 20 mM con un pH 10, conteniendo EDTA 1mM y azida sódica 10<sup>-5</sup> M.
- Una solución de xantina 0,5 mM en tampón.
- Solución de citocromo *c* de 0,1 M en tampón.
- Xantina-oxidasa de 0,2 U/mL en tampón.

En una cubeta se depositan 100  $\mu$ l de solución de citocromo *c*, 100  $\mu$ l de solución xantina, 650  $\mu$ l de tampón con azida y el volumen de muestra correspondiente a 100  $\mu$ g de proteína de citosol. A continuación, una vez agitada, se inicia la reacción agregando 100  $\mu$ l de xantina oxidasa, observándose durante 1 minuto la disminución de absorbancia a 550 nm por medio del Time Drive y a una temperatura de 25 °C.

Para medir la reducción neta del citocromo *c* (en ausencia de SOD), se realiza una medida de referencia que se procesa de la misma forma pero no contiene muestra, de forma que se producirá la reducción del citocromo *c* debida a la acción de los radicales superóxidos formados por el sistema xantina/xantina oxidasa.

Las muestras problemas se miden frente a su blanco, que se procesa de la misma forma pero la reacción no se inicia con la adición de xantina oxidasa.

Su interpretación se hizo considerando el descenso del citocromo *c* como el 100%, definiéndose una unidad de SOD como la cantidad de enzima que produce la inhibición de un 50 % de la reducción del citocromo *c*. Por lo tanto, el valor encontrado para el incremento en la reducción de la absorbancia del citocromo *c* (en un intervalo entre 0,025 y 0,05 U) corresponderá al 100 % de la actividad. Calculándose entonces el porcentaje correspondiente a la absorbancia encontrada para cada muestra, relacionadas con su equivalente en unidad.

### 3.4. ÍNDICES BIOLÓGICOS

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

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

$$1 \quad C.D.A. = \frac{A}{I} \times 100$$

$$A = I - F$$

\* **Balance (B):**

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

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

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

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

A = Absorbido

I = Ingerido

F = Excreción fecal

U = Excreción urinaria

B = Balance



### 3.5. CONTROL DE CALIDAD

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

- Ca:  $13.21 \pm 0.15$  mg/g (valor certificado:  $13.49 \pm 0.10$  mg/g).
- P:  $10.97 \pm 0.17$  mg/g (valor certificado:  $11.10 \pm 0.13$  mg/g).
- Mg:  $1.238 \pm 0.030$  mg/g (valor certificado:  $1.263 \pm 0.024$  mg/g).
- Fe:  $2.23 \pm 0.29$   $\mu$ g/g (valor certificado:  $2.32 \pm 0.23$   $\mu$ g/g).
- Zn:  $139 \pm 2$  mg/kg (valor certificado:  $143 \pm 4$  mg/kg).
- Cu:  $180 \pm 4$   $\mu$ g/g (valor certificado:  $187 \pm 3$   $\mu$ g/g).

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

### 3.6. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Todos los análisis se han efectuado con el paquete estadístico “Statistical Package for Social Sciences” (SPSS, versión 15.0, 2008; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Para comparar las diferencias entre grupos controles y anémicas se ha utilizado el test de la “*t de Student*”. El análisis de la varianza One-Way ANOVA ha sido utilizado para comparar los diferentes periodos (20, 30 y 40 días) en los dos grupos de animales controles y anémicos. Cuando los efectos principales y sus interacciones eran significativas, las medias individuales se compararon con el test de Tukey. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante Two-Way ANOVA para determinar los efectos de la ferrodeficiencia, el tiempo (20, 30 ó 40 días) y sus interacciones (ferrodeficiencia x tiempo). El nivel de significación se consideró significativo para todos los tratamientos estadísticos a un nivel de  $P < 0.05$ . Todos los datos son expresados como el valor medio con sus respectivos errores estándar.





## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. TABLAS

**Tabla 1.** Evolución de los cambios ponderales e ingesta de alimento en ratas controles (C) y anémicas (A)

	Efecto de la anemia (n= 60)															Efecto del tiempo	
	Día 20 (n= 20)					Día 30 (n= 20)					Día 40 (n= 20)						
	C (n= 10)		A (n= 10)			C (n= 10)		A (n= 10)			C (n= 10)		A (n= 10)			C (n= 30)	A (n= 30)
	Media	EEM	Media	EEM	P	Media	EEM	Media	EEM	P	Media	EEM	Media	EEM	P		
<b>Δ de peso (g/d)</b>	3.2	0.2 <sup>a</sup>	3.1	0.2	NS	5.2	0.3 <sup>b</sup>	3.3	0.3	0.01	5.4	0.2 <sup>b</sup>	2.6	0.3	0.001	0.01	NS
<b>Ingesta de alimento (g/d)</b>	14.9	0.6 <sup>a</sup>	13.4	0.3 <sup>A</sup>	0.05	17.6	0.8 <sup>b</sup>	15.4	0.7 <sup>B</sup>	0.05	17.0	0.6 <sup>b</sup>	14.9	0.4 <sup>B</sup>	0.01	0.01	0.01

Los resultados están expresados como valor medio y error estándar de la media.

<sup>a,b</sup> Para el efecto del tiempo, los valores medios de los grupos C dentro de una misma fila con letras superíndices distintas eran significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

<sup>A,B</sup> Para el efecto del tiempo, los valores medios de los grupos A dentro de una misma fila con letras superíndices distintas eran significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

NS, no significativo

**Tabla 2.** Evolución de los parámetros hematológicos en ratas controles (C) y anémicas (A)

	Efecto de la anemia (n= 60)															Efecto del tiempo	
	Día 20 (n= 20)					Día 30 (n= 20)					Día 40 (n= 20)						
	C (n= 10)		A (n= 10)		P	C (n= 10)		A (n= 10)		P	C (n= 10)		A (n= 10)		P	C (n= 30)	A (n= 30)
Media	EEM	Media	EEM	Media		EEM	Media	EEM	Media		EEM	Media	EEM	Media		EEM	
<b>Concentración Hb (g/l)</b>	123	6	99	3 <sup>A</sup>	0.001	116	7	85	4 <sup>B</sup>	0.001	126	4	72	2 <sup>C</sup>	0.001	NS	0.01
<b>Hematocrito (%)</b>	46.3	2.5	26.2	1.3	0.001	47.6	3.3	28.9	1.7	0.001	49.6	2.4	23.6	1.6	0.001	NS	NS
<b>Hematis (10<sup>12</sup>/L)</b>	6.5	0.4	5.3	0.3 <sup>AB</sup>	0.01	6.5	0.4	6.0	0.3 <sup>A</sup>	NS	7.7	0.3	5.1	0.2 <sup>B</sup>	0.001	NS	0.05
<b>VCM (fL)</b>	71.2	3.0	49.1	0.8	0.001	73.4	0.6	48.3	1.0	0.001	72.4	0.9	48.8	1.3	0.001	NS	NS
<b>HCM (pg)</b>	18.9	0.3	17.6	0.2 <sup>A</sup>	0.001	18.1	0.4	14.7	0.2 <sup>B</sup>	0.001	18.5	0.4	14.0	0.2 <sup>B</sup>	0.001	NS	0.001
<b>Plaquetas (10<sup>9</sup>/L)</b>	703	66 <sup>a</sup>	1224	25 <sup>A</sup>	0.001	694	60 <sup>a</sup>	1336	17 <sup>B</sup>	0.001	688	39 <sup>a</sup>	2026	13 <sup>C</sup>	0.001	NS	0.001
<b>Leucocitos (10<sup>9</sup>/L)</b>	6.8	0.5	6.8	0.6	NS	7.1	0.8	9.6	0.6	0.01	7.9	0.7	8.9	1.3	NS	NS	0.001
<b>Fe sérico (µg/l)</b>	1300	103 <sup>a</sup>	145	8	0.001	903	95 <sup>b</sup>	164	10	0.001	1200	99 <sup>a</sup>	181	18	0.002	0.01	NS
<b>TIBC (µg/L)</b>	4560	110 <sup>a</sup>	7450	104 <sup>A</sup>	0.001	3840	151 <sup>b</sup>	10780	204 <sup>B</sup>	0.001	3250	98 <sup>c</sup>	14500	305 <sup>C</sup>	0.001	0.001	0.001
<b>Transferrina (%)</b>	29.3	1.0 <sup>a</sup>	2.0	0.01 <sup>A</sup>	0.001	23.5	1.0 <sup>b</sup>	1.6	0.01 <sup>B</sup>	0.001	40.3	2.9 <sup>c</sup>	1.4	0.01 <sup>C</sup>	0.001	0.01	0.001
<b>Ferritina (µg/L)</b>	95.7	6.3 <sup>a</sup>	25.5	2.5 <sup>A</sup>	0.001	78.2	3.7 <sup>b</sup>	23.4	1.1 <sup>A</sup>	0.001	80.2	2.4 <sup>b</sup>	19.3	1.7 <sup>B</sup>	0.001	0.01	0.05

Los resultados están expresados como valor medio y error estándar de la media.

<sup>a,b,c</sup> Para el efecto del tiempo, los valores medios de los grupos C dentro de una misma fila con letras superíndices distintas eran significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

<sup>A,B,C</sup> Para el efecto del tiempo, los valores medios de los grupos A dentro de una misma fila con letras superíndices distintas eran significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

NS, no significativo

**Tabla 3.** Evolución de la utilización nutritiva de Fe en ratas controles (C) y anémicas (A)

	Efecto de la anemia (n= 60)															Efecto del tiempo	
	Día 20 (n= 20)					Día 30 (n= 20)					Día 40 (n= 20)						
	C (n= 10)		A (n= 10)			C (n= 10)		A (n= 10)			C (n= 10)		A (n= 10)			C (n= 30)	A (n= 30)
	Media	EEM	Media	EEM	P	Media	EEM	Media	EEM	P	Media	EEM	Media	EEM	P		
<b>Ingesta de Fe (µg/d)</b>	669	26 <sup>a</sup>	67	1 <sup>A</sup>	0.001	792	35 <sup>b</sup>	77	4 <sup>B</sup>	0.001	766	26 <sup>b</sup>	75	2 <sup>B</sup>	0.001	0.01	0.01
<b>Fe fecal (µg/d)</b>	491	34 <sup>a</sup>	46	0.6 <sup>A</sup>	0.001	563	21 <sup>b</sup>	50	1 <sup>B</sup>	0.001	557	7 <sup>b</sup>	46	1 <sup>A</sup>	0.001	0.05	0.01
<b>CDA (%)</b>	27	3	32	2 <sup>A</sup>	NS	29	1	35	2 <sup>AB</sup>	0.01	27	3	38	2 <sup>B</sup>	0.001	NS	0.05
<b>Fe urinario (µg/d)</b>	2.6	0.4	1.1	0.1 <sup>A</sup>	0.001	3.3	0.2	1.5	0.2 <sup>B</sup>	0.001	2.7	0.2	1.1	0.1 <sup>A</sup>	0.001	NS	0.001
<b>R/I (%)</b>	27	3	30	2 <sup>A</sup>	NS	28	1	33	2 <sup>AB</sup>	0.05	26	3	36	2 <sup>B</sup>	0.01	NS	0.01

Los resultados están expresados como valor medio y error estándar de la media.

<sup>a,b</sup> Para el efecto del tiempo, los valores medios de los grupos C dentro de una misma fila con letras superíndices distintas eran significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

<sup>A,B</sup> Para el efecto del tiempo, los valores medios de los grupos A dentro de una misma fila con letras superíndices distintas eran significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

NS, no significativo

**Tabla 4.** Evolución del contenido de Fe en hígado y cerebro de ratas controles (C) y anémicas (A)

	<b>Efecto de la anemia (n= 60)</b>															<b>Efecto del tiempo</b>	
	Día 20 (n= 20)					Día 30 (n= 20)					Día 40 (n= 20)						
	C (n= 10)		A (n= 10)			C (n= 10)		A (n= 10)			C (n= 10)		A (n= 10)			C (n= 30)	A (n= 30)
	Media	EEM	Media	EEM	P	Media	EEM	Media	EEM	P	Media	EEM	Media	EEM	P		
<b>Hígado (µg/g SS)</b>	423	65	107	8 <sup>A</sup>	0·001	380	19	114	7 <sup>A</sup>	0·001	405	46	149	7 <sup>B</sup>	0·001	NS	0·01
<b>Cerebro (µg/g SS)</b>	121	12	34	2 <sup>A</sup>	0·001	110	4	37	2 <sup>A</sup>	0·001	123	12	53	3 <sup>B</sup>	0·01	NS	0·01

Los resultados están expresados como valor medio y error estándar de la media.

<sup>A,B</sup>, Para el efecto del tiempo, los valores medios de los grupos A dentro de una misma fila con letras superíndices distintas eran significativamente diferentes ( $P \leq 0\cdot05$ ).

NS, no significativo



**Tabla 5.** Evolución en la utilización nutritiva de Ca en ratas controles (C) y anémicas (A)

	Efecto de la anemia (n= 60)															Efecto del tiempo	
	Día 20 (n= 20)					Día 30 (n= 20)					Día 40 (n= 20)						
	C (n= 10)		A (n= 10)		P	C (n= 10)		A (n= 10)		P	C (n= 10)		A (n= 10)		P	C (n= 30)	A (n= 30)
Media	EEM	Media	EEM	Media		EEM	Media	EEM	Media		EEM	Media	EEM				
<b>Ingesta de Ca (mg/d)</b>	74.3	2.9 <sup>a</sup>	66.9	1.3 <sup>A</sup>	NS	88.0	3.8 <sup>b</sup>	77.2	3.7 <sup>B</sup>	NS	85.1	2.9 <sup>b</sup>	74.5	2 <sup>B</sup>	NS	0.01	0.01
<b>Ca fecal (mg/d)</b>	18.3	0.9	20.2	2.6 <sup>A</sup>	NS	22.9	2.6	32.7	2 <sup>B</sup>	0.001	22.5	1.7	38.7	1.2 <sup>B</sup>	0.001	NS	0.01
<b>CDA (%)</b>	75.4	0.8	69.4	4.2 <sup>A</sup>	NS	74.4	2	57.8	1.1 <sup>B</sup>	0.001	73.7	1.3	47.9	1.4 <sup>C</sup>	0.001	NS	0.001
<b>Ca urinario (mg/d)</b>	4	1.2	3.1	0.3	NS	3.4	0.7	3.2	0.5	NS	3	0.7	2.9	0.5	NS	NS	NS
<b>R/I (%)</b>	70.1	1.5	64.7	4.2 <sup>A</sup>	NS	70.5	1.8	53.6	1.5 <sup>B</sup>	0.001	69.8	1.3	44.9	1.4 <sup>C</sup>	0.001	NS	0.001

Los resultados están expresados como valor medio y error estándar de la media.

<sup>a,b</sup> Para el efecto del tiempo, los valores medios de los grupos C dentro de una misma fila con letras superíndices distintas eran significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

<sup>A,B,C</sup> Para el efecto del tiempo, los valores medios de los grupos A dentro de una misma fila con letras superíndices distintas eran significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

NS, no significativo

**Tabla 6.** Evolución en la utilización nutritiva de Cu en ratas controles (C) y anémicas (A)

	Efecto de la anemia (n= 60)															Efecto del tiempo	
	Día 20 (n= 20)					Día 30 (n= 20)					Día 40 (n= 20)						
	C (n= 10)		A (n= 10)			C (n= 10)		A (n= 10)			C (n= 10)		A (n= 10)			C (n= 30)	A (n= 30)
	Media	EEM	Media	EEM	P	Media	EEM	Media	EEM	P	Media	EEM	Media	EEM	P		
<b>Ingesta de Cu (µg/d)</b>	89.2	3.4 <sup>a</sup>	80.3	1.6 <sup>A</sup>	NS	105.6 <sup>b</sup>	4.6	92.6	4.4 <sup>B</sup>	0.05	102.1	3.5 <sup>b</sup>	89.4	2.4 <sup>B</sup>	0.05	0.01	0.01
<b>Cu fecal (µg/d)</b>	56.3	1.6 <sup>a</sup>	55.1	2 <sup>A</sup>	NS	64.9	1.4 <sup>b</sup>	67.6	2.5 <sup>B</sup>	NS	67.4	2.9 <sup>b</sup>	63.3	0.8 <sup>B</sup>	NS	0.05	0.01
<b>CDA (%)</b>	36.4	2.5	31.1	3.2	NS	37.9	2.6	26.7	1.4	0.001	34	1.5	29	1.3	0.01	NS	NS
<b>Cu urinario (µg/d)</b>	5.7	0.8	4.3	0.3	NS	6.1	0.4	4.7	0.4	0.05	6.8	0.5	5	0.2	NS	NS	NS
<b>R/I (%)</b>	30.2	1.9	25.7	3.2	NS	32	2.8	21.6	1.4	0.001	27.3	1.4	23.4	1.4	0.001	NS	NS

Los resultados están expresados como valor medio y error estándar de la media.

<sup>a,b</sup> Para el efecto del tiempo, los valores medios de los grupos C dentro de una misma fila con letras superíndices distintas eran significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

<sup>A,B</sup> Para el efecto del tiempo, los valores medios de los grupos A dentro de una misma fila con letras superíndices distintas eran significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

NS, no significativo

**Tabla 7.** Evolución en la utilización nutritiva de Zn en ratas controles (C) y anémicas (A)

	Efecto de la anemia (n= 60)															Efecto del tiempo	
	Día 20 (n= 20)					Día 30 (n= 20)					Día 40 (n= 20)						
	C (n= 10)		A (n= 10)			C (n= 10)		A (n= 10)			C (n= 10)		A (n= 10)			C (n= 30)	A (n= 30)
	Media	EEM	Media	EEM	P	Media	EEM	Media	EEM	P	Media	EEM	Media	EEM	P		
<b>Ingesta de Zn (µg /d)</b>	520.4	20 <sup>a</sup>	468.1	9.1 <sup>A</sup>	NS	615.9	26.9 <sup>b</sup>	540.3	25.6 <sup>B</sup>	0.05	595.6	20.5 <sup>b</sup>	521.6	13.9 <sup>B</sup>	0.01	0.01	0.01
<b>Zn fecal (µg /d)</b>	329	12.3 <sup>a</sup>	309.3	6 <sup>A</sup>	NS	390.2	1.4 <sup>b</sup>	367.4	18.2 <sup>B</sup>	NS	378.6	2.9 <sup>b</sup>	366.4	6.7 <sup>B</sup>	NS	0.05	0.01
<b>CDA (%)</b>	36.6	1.8	33.9	0.9	NS	37	1.9	31.9	2.1	NS	36.2	1.4	29.5	1.7	0.001	NS	NS
<b>Zn urinario (µg /d)</b>	8.9	1.2	9.5	1	NS	9.6	0.9	8.9	0.8	NS	10.3	1.1	13.7	0.8	0.05	NS	NS
<b>R/I (%)</b>	34.9	1.8	31.9	0.9	NS	35.4	1.8	30.2	2.2	NS	34.5	1.4	26.9	1.7	0.001	NS	NS

Los resultados están expresados como valor medio y error estándar de la media.

<sup>a,b</sup> Para el efecto del tiempo, los valores medios de los grupos C dentro de una misma fila con letras superíndices distintas eran significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

<sup>A,B</sup> Para el efecto del tiempo, los valores medios de los grupos A dentro de una misma fila con letras superíndices distintas eran significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

NS, no significativo

**Tabla 8.** Evolución en la utilización nutritiva de P en ratas controles (C) y anémicas (A)

	Efecto de la anemia (n= 60)															Efecto del tiempo	
	Día 20 (n= 20)					Día 30 (n= 20)					Día 40 (n= 20)						
	C (n= 10)		A (n= 10)			C (n= 10)		A (n= 10)			C (n= 10)		A (n= 10)			C (n= 30)	A (n= 30)
	Media	EEM	Media	EEM	P	Media	EEM	Media	EEM	P	Media	EEM	Media	EEM	P		
<b>Ingesta de P (mg/d)</b>	44.6	1.7 <sup>a</sup>	40.1	0.8 <sup>A</sup>	NS	52.8 <sup>b</sup>	2.3	46.3	2.2 <sup>B</sup>	0.05	51	1.8 <sup>b</sup>	44.7	1.2 <sup>B</sup>	0.01	0.01	0.01
<b>P fecal (mg/d)</b>	10.9	0.6	8.5	0.9 <sup>A</sup>	NS	13.5	1.1	8.5	0.4 <sup>A</sup>	0.001	13.6	0.7	5.3	0.5 <sup>B</sup>	0.001	NS	0.01
<b>CDA (%)</b>	75.6	0.8	78.8	2.3 <sup>A</sup>	NS	74.5	1.2	81.7	0.4 <sup>A</sup>	0.001	73.1	2	88.4	0.9 <sup>B</sup>	0.001	NS	0.001
<b>P urinario (mg/d)</b>	4	0.7	4.4	0.3 <sup>A</sup>	NS	6.3	0.8	6.3	0.6 <sup>B</sup>	NS	4.8	0.6	6.6	0.4 <sup>B</sup>	0.05	NS	0.05
<b>R/I (%)</b>	67	1.4	67.8	2.6 <sup>A</sup>	NS	61.3	2.3	68.3	1 <sup>A</sup>	0.01	63.9	1.7	73.6	1.1 <sup>B</sup>	0.001	NS	0.001

Los resultados están expresados como valor medio y error estándar de la media.

<sup>a,b</sup>. Para el efecto del tiempo, los valores medios de los grupos C dentro de una misma fila con letras superíndices distintas eran significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

<sup>A,B</sup>. Para el efecto del tiempo, los valores medios de los grupos A dentro de una misma fila con letras superíndices distintas eran significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

NS, no significativo

**Tabla 9.** Evolución en la utilización nutritiva de Mg en ratas controles (C) y anémicas (A)

	Efecto de la anemia (n= 60)															Efecto del tiempo	
	Día 20 (n= 20)					Día 30 (n= 20)					Día 40 (n= 20)						
	C (n= 10)		A (n= 10)		P	C (n= 10)		A (n= 10)		P	C (n= 10)		A (n= 10)		P	C (n= 30)	A (n= 30)
Media	EEM	Media	EEM	Media		EEM	Media	EEM	Media		EEM	Media	EEM				
<b>Ingesta de Mg (mg/d)</b>	7.6	0.3 <sup>a</sup>	6.8	0.1 <sup>A</sup>	0.05	9.1 <sup>b</sup>	0.4	8.1	0.4 <sup>B</sup>	NS	8.7	0.3 <sup>b</sup>	7.6	0.2 <sup>B</sup>	0.01	0.01	0.01
<b>Mg fecal (mg/d)</b>	2.7	0.2 <sup>a</sup>	2.2	0.2 <sup>A</sup>	NS	3.4	0.3 <sup>b</sup>	2.4	0.2 <sup>A</sup>	0.01	2.5	0.2 <sup>a</sup>	1.7	0.1 <sup>B</sup>	0.01	0.01	0.01
<b>CDA (%)</b>	63.7	3.5	68	3.4 <sup>A</sup>	NS	63.9	2.3	71.2	1.7 <sup>A</sup>	0.01	65.6	2.4	77.7	1 <sup>B</sup>	0.001	NS	0.001
<b>Mg urinario (mg/d)</b>	1.2	0.3 <sup>a</sup>	0.9	0.1 <sup>A</sup>	NS	0.7	0.1 <sup>b</sup>	0.5	0.1 <sup>B</sup>	NS	0.5	0.1 <sup>b</sup>	0.4	0.1 <sup>B</sup>	0.05	0.01	0.05
<b>R/I (%)</b>	48	3.2 <sup>a</sup>	54.4	4.2 <sup>A</sup>	NS	56.6	2.2 <sup>b</sup>	65.5	2.3 <sup>B</sup>	0.01	64.6	1.4 <sup>c</sup>	72.3	2.7 <sup>C</sup>	0.05	0.01	0.001

Los resultados están expresados como valor medio y error estándar de la media.

<sup>a,b,c</sup> Para el efecto del tiempo, los valores medios de los grupos C dentro de una misma fila con letras superíndices distintas eran significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

<sup>A,B,C</sup> Para el efecto del tiempo, los valores medios de los grupos A dentro de una misma fila con letras superíndices distintas eran significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

NS, no significativo

**Tabla 10.** Evolución de la defensa antioxidante y producción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en ratas controles (C) y anémicas (A)

<b>Efecto de la anemia (n= 60)</b>												
	Día 20 (n= 20)				Día 30 (n= 20)				Día 40 (n= 20)			
	C (n= 10)		A (n= 10)		C (n= 10)		A (n= 10)		C (n= 10)		A (n= 10)	
	Media	EEM	Media	EEM	Media	EEM	Media	EEM	Media	EEM	Media	EEM
<b>SOD plasma (U/mg prot)</b>	2.49	0.08 <sup>a</sup>	2.14	0.10 <sup>b</sup>	2.35	0.25	2.02	0.06	2.62	0.23	2.36	0.25
<b>CAT hepática (K/ml citosol)</b>	0.40	0.02 <sup>a</sup>	0.25	0.02 <sup>b</sup>	0.38	0.02	0.29	0.04	0.33	0.03	0.27	0.04
<b>CAT cerebro (K/ml citosol)</b>	0.11	0.03	0.10	0.01	0.13	0.02	0.12	0.02	0.14	0.03	0.13	0.04
<b>CAT erythrocyte (K/ml cytosol)</b>	0.21	0.03	0.23	0.02	0.20	0.03	0.21	0.04	0.21	0.06	0.20	0.03
<b>GPx hepática (mmoles /mg proteína/ml)</b>	0.30	0.02 <sup>a</sup>	0.22	0.02 <sup>b</sup>	0.24	0.03	0.20	0.04	0.26	0.02	0.28	0.02
<b>GPx cerebro (mmoles /mg protein /ml)</b>	0.11	0.01	0.12	0.01	0.14	0.01	0.12	0.01	0.14	0.02	0.16	0.02
<b>GPx erythrocyte (mmoles /mg proteína/ml)</b>	0.26	0.02	0.30	0.02	0.30	0.04	0.32	0.03	0.26	0.01	0.30	0.03
<b>TBARS (nmol/mg proteína)</b>	3.92	0.35	4.39	0.34	4.02	0.43	4.00	0.15	4.32	0.58	4.40	0.49

Los resultados están expresados como valor medio y error estándar de la media.

<sup>a,b</sup> Los valores medios eran significativamente diferentes entre grupo C y grupo A. Para el efecto del tiempo, no se observaron diferencias significativas.

## 4.2. CAMBIOS PONDERALES E INGESTA DE ALIMENTO EN RATAS CONTROLES Y ANÉMICAS

Se ha llevado a cabo un control de peso en ratas controles y anémicas al inicio y tras 20, 30 y 40 días de evolución de la ferropdeficiencia. Al principio del experimento las ratas tenían un peso medio de  $43.8 \pm 3.5$  g, que corresponde al día 0 del estudio y coincide con el destete de los animales. Este peso medio inicial estaba dentro de los márgenes normales descritos en la bibliografía para esta especie (Campos y col., 1998; Krinke, 2000).

La Tabla 1 muestra la evolución de los cambios ponderales e ingesta de alimento en ratas controles y anémicas. Los resultados de nuestro estudio muestran que en el día 20 existe un paralelismo en la evolución ponderal de ambos grupos de animales, lo que indica que sus reservas de Fe durante el periodo fetal y de lactación son suficientes para cubrir las necesidades en su crecimiento. En el día 30 ya se observan diferencias significativas en el incremento de peso entre ambos grupos de animales, siendo menor en las ratas anémicas ( $P < 0.01$ ), diferencias que se acentúan a los 40 días de suministro de una dieta restrictiva en Fe, llegando a reducirse el incremento de peso en animales ferropdeficientes a la mitad ( $P < 0.001$ ), lo que coincide con resultados previos de nuestro grupo de investigación (Pallarés y col., 1996) y de otros autores (Schneider y col., 2008), quienes encontraron que en niños de 12-36 meses de edad es posible que la baja concentración de hemoglobina limitara la ganancia de peso, hecho que explica la asociación observada en el presente estudio. Además, esta menor ganancia de peso en animales anémicos, se relaciona también con la menor ingesta de alimento en todos los periodos estudiados, respecto a los animales controles, y especialmente en el día 40 (día 20 y 30:  $P < 0.05$ , día 40:  $P < 0.01$ ).

### 4.3. PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS

Como era de esperar, por el consumo de una dieta restrictiva en Fe durante un periodo prolongado, la anemia provoca una disminución de la hemoglobina y hematocrito en los tres periodos estudiados ( $P < 0.001$ ), siendo especialmente acentuado el descenso del hematocrito en el día 40, reduciéndose en un 52% con respecto a sus controles. La disminución de la hemoglobina se hace más acusada en ratas anémicas conforme avanza el grado de ferrodeficiencia, siendo significativa cuando se comparan los periodos 30 vs. 40 ( $P < 0.05$ ) y 20 vs. 40 ( $P < 0.001$ ), mientras que los niveles de hematocrito se mantienen bajos en los tres periodos estudiados, sin que se encuentren diferencias significativas entre ellos (Tabla 2).

Asimismo, el recuento de eritrocitos disminuye en los tres periodos durante la evolución de la anemia ferropénica nutricional, siendo significativo en el día 20 ( $P < 0.01$ ) y en el día 40 ( $P < 0.001$ ), con respecto a sus controles. Además en el transcurso de la evolución de la ferrodeficiencia, el recuento de eritrocitos más bajo corresponde al día 40 comparado con el 30 ( $P < 0.05$ ). En relación a los índices eritrocitarios VCM y HCM, ambos disminuyen por efecto de la anemia ( $P < 0.001$ ), en los tres periodos estudiados. Durante la instauración de la ferrodeficiencia, la HCM va disminuyendo progresivamente, siendo esta diferencia significativa, cuando se compara el día 20 con el 40 ( $P < 0.001$ ) (Tabla 2).

En ratas anémicas, el número de plaquetas se eleva en los tres periodos estudiados ( $P < 0.001$ ), llegándose a duplicar en los días 20 y 30 de suministro de dieta restrictiva en Fe y a triplicar en el día 40, con respecto a los animales que reciben una dieta con contenido normal en Fe. A medida que se va instaurando al anemia, se incrementa el recuento de plaquetas en ratas anémicas ( $P < 0.001$ ), llegando a alcanzar valores de  $2026 \pm 13$  ( $10^9/L$ ) en el día 40 (Tabla 2).

El recuento leucocitario se eleva en ratas ferrodeficientes en todos los periodos estudiados, siendo este aumento significativo en el día 30 ( $P < 0.01$ ), aunque se mantienen dentro de los límites normales descritos en la bibliografía para esta especie durante el periodo de crecimiento (Pallarés y col., 1993; Campos y col., 1998) (Tabla 2).



A la vista de los resultados anteriormente comentados se observa que al comienzo del estudio, todos los parámetros hematológicos estudiados estaban dentro de los límites normales descritos en la bibliografía para esta especie a esta edad (Campos y col., 1998). En el día 20, los parámetros hematológicos de ratas controles estaban dentro de los límites normales, excepto el Fe sérico, como consecuencia de las necesidades impuestas por el crecimiento (Olivares y col., 2000) y al aumento de las demandas de Fe para la síntesis de enzimas de Fe-dependiente (Brownlie y col., 2002).

En ratas ferodeficientes, la concentración de hemoglobina, el hematocrito, el recuento de hematíes, VCM, HCM, porcentaje de saturación de transferrina y ferritina sérica disminuyeron de manera notable, mientras que las plaquetas eran más altas. La ferodeficiencia se clasifica en 3 etapas según la severidad: depleción de las reservas, deficiencia marginal, y anemia. La depleción se caracteriza por los depósitos de Fe agotados, pero con una producción de proteínas Fe-dependiente normal y concentraciones normales de hemoglobina. La deficiencia marginal está caracterizada por depósitos de Fe deplecionados, con una producción de proteínas Fe-dependientes (ej. enzimas oxidativas) y concentraciones normales de hemoglobina. La anemia, es la forma más severa de la deficiencia, caracterizada por depósitos de Fe deplecionados y concentraciones reducidas de enzimas oxidativas Fe-dependientes (Brownlie y col., 2002).

La drástica disminución de Fe sérico, saturación de transferrina y ferritina sérica, en el día 20 puede deberse no sólo a las necesidades impuestas por el crecimiento, sino también al consumo de una dieta restrictiva en Fe. El período crítico en el desarrollo de la anemia por deficiencia de Fe nutricional ocurrió entre el día 30 y 40, observándose una reducción notable de la ganancia de peso y la concentración de hemoglobina, junto con un aumento marcado de las plaquetas, parámetros que son indicativos de la instauración de la anemia severa. La disminución marcada de niveles de hemoglobina y el resto de parámetros hematológicos, es

debido a que el organismo es incapaz de obtener Fe de las reservas sin comprometer los mecanismos enzimáticos Fe-dependientes (Brownlie y col., 2002; Zimmermann y col., 2005).

#### **4.4. UTILIZACIÓN NUTRITIVA**

##### **4.4.1. UTILIZACIÓN NUTRITIVA DE HIERRO**

A los 20 días de consumir una dieta con bajo contenido en Fe, las ratas anémicas presentan unos valores superiores de utilización digestiva (CDA) y retención (R/I) de este mineral con respecto a sus controles, aunque las diferencias no llegan a ser significativas. Esta misma tendencia se observa a los 30 y 40 días de evolución de la ferropatía, si bien, las diferencias se van haciendo cada vez más pronunciadas a medida que aumenta el tiempo de consumo de la dieta restrictiva en Fe: CDA ( $P < 0.01$  a los 30 días y  $P < 0.001$  a los 40 días) y R/I de Fe ( $P < 0.05$  a los 30 días y  $P < 0.01$  a los 40 días) (Tabla 3).

En el transcurso del estudio, la utilización nutritiva (CDA y R/I) de Fe en ratas controles no se modifica en ninguno de los periodos estudiados (20, 30 o 40 días). Sin embargo, en ratas anémicas, la utilización nutritiva de Fe aumenta de manera progresiva en todos los periodos estudiados, siendo esta diferencia significativa, si comparamos el día 40 con el 20 ( $P < 0.01$  para el CDA y  $P < 0.05$  para el R/I) (Tabla 3).

La utilización nutritiva de Fe encontrada en ratas ferropáticas aumentó conforme avanzaba la instauración de la patología y esto puede deberse a que se produce una depleción de las reservas corporales de Fe (Brownlie y col., 2002), que favorece la captación de este mineral por difusión simple a favor de gradiente de concentración (Gómez-Ayala y col., 1998). Además, en situación de ferropatía, la síntesis del transportador de metales divalente 1 (DMT1) aumenta (Yeh y col., 2000) así como la expresión de la ferroportina 1 (Morgan y Oates, 2002). Por tanto, estas proteínas favorecen la absorción intestinal de Fe en situación de deficiencia de este mineral (Forellat y col., 2000).

Según Brownlie y col. (2002) la ferropdeficiencia se caracteriza por unos depósitos de Fe deplecionados, sin embargo, en nuestro estudio había una recuperación leve del contenido de Fe en hígado y cerebro en el día 40 de la ferropdeficiencia a pesar de que estos niveles siguen siendo dos veces más bajos que aquellos encontrados en ratas controles ( $P < 0.001$  en hígado y  $P < 0.01$  en cerebro), lo que indica la importancia de este mineral durante la vida temprana en ambos órganos (Tabla 4). Los primeros años de vida son críticos para el desarrollo neurológico, el desarrollo neurológico en niños de 0-4 años es rápido, incluyendo los períodos críticos de formación de circuitos neuronales y mielinización en el cerebro. El Fe es requerido en los oligodendrocitos para una apropiada mielinización de las neuronas usadas en el sistema sensorial así como para el aprendizaje y el comportamiento social (Lozoff y Black, 2004).

#### 4.4.2. UTILIZACIÓN NUTRITIVA DE CALCIO, COBRE Y ZINC

A los 20 días de consumir una dieta con bajo contenido en Fe, las ratas anémicas presentan unos valores de utilización digestiva (CDA) y retención (R/I) de Ca, Cu y Zn similares a sus controles, índices que disminuyen en los días 30 y 40 para el Ca y Cu ( $P < 0.001$  para CDA y R/I), mientras que el descenso en la utilización digestiva y metabólica del Zn sólo es significativa en el día 40 ( $P < 0.001$ ). En ratas controles y para los tres periodos de tiempo estudiados, la utilización digestiva y metabólica de Ca, Cu y Zn no presenta diferencias significativas, mientras que en ratas anémicas ambos índices (CDA y R/I) disminuyen progresivamente para el Ca (30 vs. 20: CDA,  $P < 0.01$ ; 40 vs. 30: CDA,  $P < 0.001$  y R/I,  $P < 0.01$ ; 40 vs. 20: CDA y R/I,  $P < 0.001$ ) y no se modifican para el Cu y Zn (Tablas 5, 6 y 7).

Estos tres minerales (Ca, Cu y Zn) son absorbidos preferentemente en la parte proximal del intestino delgado, donde el componente activo juega un papel importante en la captación celular de dichos elementos. Dado que en situación de anemia hay un menor aporte de oxígeno disponible para la célula, los procesos aeróbicos de producción de ATP se encuentran disminuidos, haciendo que los mecanismos de transporte activo se encuentren reducidos (Campos y col., 1998), esta situación se agrava por la depleción de enzimas ferropdependientes

(Alfárez y col., 2010), lo cual incide negativamente en el mecanismo activo de absorción de estos minerales.

El Ca atraviesa la membrana del enterocito principalmente a través de un transporte transcelular saturable dependiente de energía (ATP), que tiene una capacidad de transporte limitada y está regulado principalmente por la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  a través de un mecanismo que estimula la producción de calbindina D, proteína citosólica que actúa como un transportador intracelular para el Ca través del compartimento citosólico (Groff y Gropper, 2000; Akther y col., 2007; Khanal y Nemere, 2008).

Los altos valores de utilización digestiva (CDA) de Ca en animales controles durante los periodos estudiados (20, 30 y 40 días), se pueden deber a que las ratas se encuentran en un periodo de crecimiento activo (Sisk y Zehr, 2005; McCutcheon y Marinelli, 2009). En situación de anemia, se ha descrito que se producen cambios hormonales, tales como el incremento de los niveles de cortisol (Campos y col., 1998), hormona que disminuye la absorción intestinal de Ca y consecuentemente su retención.

Durante la evolución de la ferropatía, descende progresivamente el aporte de oxígeno, lo cual hace que los sistemas de transporte activo descritos estén disminuidos, efecto que se va haciendo más patente en el transcurso de dicha patología, como lo revelan las bajas concentraciones de hemoglobina y el descenso de la utilización digestiva y metabólica de Ca (en un 31% y un 25% respectivamente). Esta misma tendencia se observa para el aprovechamiento nutritivo de Cu y Zn, si bien las diferencias no llegan a ser significativas.

La absorción del Zn es similar a la del Ca y tiene lugar mediante dos mecanismos: un mecanismo saturable, mediado por transportadores, que funciona más eficientemente cuando las concentraciones de Zn en la luz intestinal son bajas, y un mecanismo de difusión pasiva que depende de las concentraciones del metal. Como el Zn se encuentra por lo general unido a aminoácidos y pequeños péptidos, los iones tienen que ser liberados en las proximidades de las vellosidades para que puedan ser absorbidos (Hunt y col., 2008).

#### 4.4.3. UTILIZACIÓN NUTRITIVA DE FÓSFORO Y MAGNESIO

En situación de anemia ferropénica nutricional, el aprovechamiento digestivo y metabólico de P (CDA y R/I), se elevan significativamente en los días 30 y 40 de suministro de una dieta restrictiva en Fe (CDA:  $P < 0.001$  en ambos periodos y R/I:  $P < 0.01$  en el día 30 y  $P < 0.001$  en el día 40). La utilización nutritiva de P en ratas controles, no se modifica en ninguno de los periodos de tiempo estudiados. Sin embargo, en ratas anémicas, hay un mayor aprovechamiento de P tanto a nivel digestivo como metabólico (40 vs. 30:  $P < 0.001$  para el CDA y R/I, 40 vs. 20:  $P < 0.001$  para el CDA y  $P < 0.05$  para el R/I) (Tabla 8).

El cotransportador Na-Pi IIb, localizado principalmente en el yeyuno, actúa como mediador en el transporte activo intestinal de fosfato y parece que está regulado a nivel transcripcional por la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (Hernando y col., 2000). Este mecanismo de transporte activo en situación de ferrodeficiencia se encuentra disminuido, como consecuencia de un descenso del metabolismo oxidativo. En cambio, el mecanismo pasivo de absorción de P, opera principalmente en el yeyuno-íleon y es predominante en situación de anemia ferropénica nutricional.

Se ha descrito que la PTH está incrementada en situación de anemia (Campos y col., 1998), hormona que inhibe la reabsorción renal de P (aumentando la excreción urinaria del mismo) y de manera indirecta incrementa la absorción intestinal de P, estimulando la síntesis de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (Schiavi y Kumar, 2004). Ambos mecanismos pueden explicar el aumento encontrado en la utilización digestiva y metabólica de P en el presente estudio, efecto que se va haciendo más patente a medida que evoluciona la ferrodeficiencia.

La anemia incrementa la utilización nutritiva de Mg en el día 30 ( $P < 0.01$  para el CDA y  $P < 0.05$  para el R/I) y 40 del estudio ( $P < 0.001$  para CDA y  $P < 0.05$  para el R/I). En los tres periodos estudiados, el CDA de Mg en ratas controles presenta valores similares. En cambio, el

R/I de Mg se eleva significativamente (30 vs. 20:  $P < 0.05$ , 40 vs. 30:  $P < 0.01$ , 40 vs. 20:  $P < 0.001$ ). Estos resultados se pueden explicar por las menores pérdidas urinarias de este mineral hacia el final del estudio, cuando las ratas se acercan al estado adulto. En las anémicas, el CDA y R/I de Mg aumentan en los últimos periodos estudiados (40 vs. 30:  $P < 0.001$ , 40 vs. 20:  $P < 0.001$  para el CDA y 30 vs. 20:  $P < 0.001$ , 40 vs. 30:  $P < 0.05$ , 40 vs. 20:  $P < 0.01$  para el R/I) (Tabla 9).

La absorción mayoritaria de Mg a través del borde en cepillo o membrana apical del enterocito no requiere energía metabólica, puesto que dicho elemento se mueve gracias al gradiente electroquímico (Schweigel y col., 1999) y por arrastre de disolvente (Hardwick y col., 1990). El aumento de la absorción de Mg en ratas anémicas se puede explicar principalmente a través del incremento de dicho componente pasivo de la absorción de Mg en situación de ferrodeficiencia, ya que en esta patología, la energía metabólica está disminuida y por tanto el componente activo de la absorción se encuentra reducido considerablemente.

El proceso de excreción urinaria es el mecanismo regulador más importante para la homeostasis del Mg. En el día 40 del presente estudio, las pérdidas urinarias de Mg en ratas anémicas se reducen un 55% con respecto al día 20, dando lugar a un acusado incremento (33%) de la retención (R/I), como consecuencia de la evolución de la ferrodeficiencia.

#### **4.5. MECANISMOS ENZIMÁTICOS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE Y PEROXIDACIÓN LIPÍDICA**

Bajo nuestras condiciones experimentales, se observó una disminución de la actividad de la SOD en plasma ( $P < 0.01$ ), junto con la CAT ( $P < 0.001$ ) y GPx ( $P < 0.05$ ) en citosol hepático de ratas ferrodeficientes en el día 20 del estudio con respecto a sus controles, no existiendo diferencias significativas entre controles y anémicas en los otros dos periodos estudiados (30 y 40 días). Sin embargo, ni la peroxidación lipídica (TBARS), ni los mecanismos de defensa antioxidante (SOD en plasma y CAT y GPx en la fracción citosólica

de cerebro y eritrocito) se modifican por la ferrodeficiencia en ninguno de los tres períodos estudiados (Tabla 10).

Se observa una disminución de la CAT ( $P < 0.001$ ) y GPx ( $P < 0.05$ ) en hígado y de la SOD en plasma ( $P < 0.01$ ) en el día 20 de la evolución de la ferrodeficiencia, mientras que en el día 30 y 40 no se observan cambios. No se observan diferencias significativas por efecto del tiempo ni en ratas controles ni en ratas anémicas en los tres periodos estudiados.

Existe controversia sobre la sensibilidad de las células a la peroxidación durante la ferrodeficiencia: algunos autores argumentan que no hay ninguna diferencia en la peroxidación lipídica en pacientes anémicos comparados con controles (Acharya y col., 1991; Isler y col., 2002). Alexander y col. (2007) mostraron que una reducción de la cantidad de Fe que aporta la dieta, puede ser beneficioso, mejorando el daño producido a nivel hepático debido a las especies reactivas del oxígeno. Otros autores observaron que mientras la producción de especies reactivas aumenta, los mecanismos antioxidantes disminuyen y por consiguiente, el equilibrio de oxidativo/antioxidante se desequilibra hacia la zona oxidativa en pacientes con ferrodeficiencia (Kumerova y col., 1998; Aslan y col., 2006). Además, hay cierta ambigüedad en el estado enzimático antioxidante: algunos autores observaron que las enzimas antioxidantes están disminuidas (Yoo y col., 2009) y otros que las enzimas antioxidantes se encontraban aumentadas en situación de ferrodeficiencia. En nuestro estudio, dado que los niveles de Fe sérico disminuyeron drásticamente en el día 20 ( $P < 0.001$ , Tabla 2), manteniéndose estos niveles bajos durante la progresión de la anemia, es lógico pensar que la disminución del Fe sérico, se traduce en una menor producción de especies reactivas del oxígeno, que podría explicar la disminución de la SOD en el compartimento plasmático en el día 20. La producción de TBARS era similar en controles y anémicas (Tabla 10), sugiriendo una vez más que la capacidad de antioxidante total del organismo se adapta en el curso del desarrollo de la anemia, debido a las actividades adecuadas de las enzimas antioxidantes CAT, GPx y SOD que están implicadas en la reducción de los peróxidos, que

pueden atacar a los ácidos poliinsaturados grasos, por lo tanto evitan la peroxidación lipídica y la subsecuente formación de TBARS.

Las ratas en el momento del nacimiento tienen un nivel alto de Fe sérico, pero durante las primeras semanas de vida muchos eritrocitos sufren hemólisis, en un proceso fisiológico para normalizar el elevado recuento de hematíes encontrado en este punto. El Fe que es liberado se almacena principalmente en el hígado y el bazo. Ya que la leche materna es una fuente pobre de Fe, éste es usado durante los primeros días de vida para ayudar a sintetizar hemoglobina y aumentar el número de glóbulos rojos, hecho que se hace sumamente importante conforme el animal crece, para satisfacer las demandas de oxígeno y el metabolismo oxidativo. El depósito de Fe en un animal recién nacido, junto con la cantidad baja que suministra la leche materna es suficiente durante un período corto de tiempo, pero a partir de este momento es necesario que la dieta proporcione un nivel apropiado de Fe (Iannotti y col., 2006; Domellöf y col., 2009).

En este estudio, debido a que se ha inducido la ferropdeficiencia en ratas en crecimiento, el exceso de Fe sérico en el momento del nacimiento, no es almacenado, sino que es usado en un intento infructuoso de replecionar los depósitos agotados del organismo, disminuyendo por lo tanto el Fe almacenado, tratando de mantener los niveles en suero. Debido a que los animales ferropdeficientes tienen menor contenido de Fe hepático en todos los períodos estudiados con respecto a los animales controles, sobre todo en el día 20 de la ferropdeficiencia, esto puede explicar porqué se observa una disminución en las actividades de la CAT y GPx, ya que la ferropdeficiencia ejercería un efecto protector que evita la generación de especies reactivas del oxígeno (a través de las vías de Fenton y Haber-Weiss) (Tanaka y Kiyosawa, 2004). Sin embargo, a pesar del menor contenido de Fe en el cerebro de las ratas ferropdeficientes, 2-3 veces menor con respecto a los animales controles, sobre todo en el día 20 (Tabla 4), no se observaron cambios en la actividad de enzimas antioxidantes, CAT y GPx, por efecto de la ferropdeficiencia en ningunos de los períodos estudiados (Tabla 10). La CAT es una enzima férrica que contiene hemo. La ferropdeficiencia puede reducir la actividad de las enzimas ferropdependientes (Hess y col., 2002), sin embargo, en nuestras condiciones



experimentales, la actividad de CAT en la fracción citosólica de cerebro no presenta diferencias significativas entre ratas controles y ferodeficientes (Tabla 4).



# Resumen y Conclusiones



La investigación llevada a cabo estudia la utilización nutritiva de minerales, tales como calcio, fósforo, magnesio, hierro, cobre y cinc y los mecanismos de defensa enzimática antioxidante y procesos de peroxidación lipídica, en diversos intervalos de tiempo, durante el establecimiento de la anemia ferropénica nutricional en ratas en crecimiento.

Los animales son divididos al azar en seis grupos experimentales: tres grupos controles, que reciben la dieta AIN-93G con un nivel adecuado de Fe (45 mg/Kg dieta) y tres grupos anémicos alimentados con la misma dieta, pero con bajo nivel de Fe (5 mg/Kg dieta), durante 20, 30 ó 40 días. Las dietas empleadas 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 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 ferodeficiencia. Tras suministrar las dietas con contenido normal o bajo contenido en Fe, se determina la utilización digestiva y metabólica de Fe y otros minerales (Ca, P, Mg, Cu y Zn) en los tres periodos estudiados. Se sacrifican 10 animales por grupo en cada periodo para la extracción del hígado y el cerebro, y la determinación de contenido de Fe en estos órganos, y la extracción de sangre para la determinación en plasma de la enzima SOD, junto con las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) como marcador de peroxidación. Además se determinan las enzimas CAT y GPx en citosol de hígado, cerebro y eritrocito, realizando también un estudio hematológico en ambos grupos.

Tras la discusión de los resultados obtenidos se ha llegado a las siguientes CONCLUSIONES:

### **CONCLUSION PRIMERA**

La drástica disminución de hierro sérico, saturación de transferrina y ferritina sérica, en el día 20 puede deberse no sólo a las necesidades impuestas por el crecimiento, sino también al consumo de una dieta restrictiva en hierro. El período crítico en el desarrollo de la anemia ferropénica nutricional se sitúa entre los días 30 y 40, donde se observa una notable reducción de peso, concentración de hemoglobina y número de hematíes, junto con un marcado aumento de las plaquetas, parámetros indicativos del desarrollo de la anemia severa. La alteración de los parámetros hematológicos estudiados es debido a que el organismo es incapaz de obtener hierro de los depósitos sin comprometer la actividad de mecanismos enzimáticos ferrodependientes.

### **CONCLUSION SEGUNDA**

La utilización nutritiva de hierro aumenta conforme avanza la instauración de la ferrodeficiencia, debido a la depleción progresiva de los depósitos corporales, que favorece el transporte del mineral por difusión simple, junto con un incremento de la síntesis de los transportadores intestinales de hierro. Además, en ratas anémicas la utilización digestiva y metabólica disminuyen progresivamente para el calcio, se eleva significativamente para el fósforo y el magnesio, no sufriendo cambios para el cobre y cinc.

### **CONCLUSION TERCERA**

A pesar de los bajos niveles de hierro encontrados en hígado y cerebro de ratas ferrodeficientes, sólo se observó una disminución de la actividad antioxidante de las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa en hígado en el día 20. Estos resultados muestran que el cerebro es un tejido que parece no depender de los niveles de hierro para el mantenimiento de los mecanismos de defensa antioxidante en el transcurso de una deficiencia nutricional de hierro.

### **CONCLUSION CUARTA**

La producción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) es similar en ratas controles y anémicas en el transcurso de la ferrodeficiencia, sugiriendo que la capacidad antioxidante total del organismo se adapta durante la instauración de la ferrodeficiencia, debido a las actividades adecuadas de las enzimas antioxidantes catalasa, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa, implicadas en la reducción de los peróxidos, que evitan la peroxidación lipídica y la subsecuente formación de TBARS.

### **CONCLUSION GENERAL**

El período crítico en el desarrollo de la anemia ferropénica nutricional de animales en crecimiento se sitúa entre los días 30 y 40 donde los parámetros hematológicos se encuentran drásticamente alterados. La capacidad antioxidante total del organismo se adapta en el transcurso de la ferrodeficiencia y bajo nuestras condiciones experimentales la actividad de enzimas ferrodependientes, como la catalasa, no se encuentra alterada por la ferrodeficiencia.



# Bibliografía





**A**

- Abboud S and Haile DJ (2000). A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J. Biol. Chem.*, 265:19906-19912.
- Acharya J, Panchard NA, Taylor IA, Tompson RPH and Peason TC (1991). Red cell peroxidation and antioxidant enzymes in iron deficiency. *Eur. J. Haematol.*, 47:287-291.
- ADA. (1998). Pediatric Manual of Clinical Dietetics, En: Williams, C.P., (Editor). The American Dietetic Association, 385-387.
- Aebi H (1984). Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.*, 105:121-126.
- Agustine GJ (2001). How does calcium trigger neurotransmitter release?. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 11:320-326.
- Akhter S, Kutuzova GD, Christakos S, and Deluca HF (2007). Calbindin D9k is not required for 1,25-dihydroxyvitamin D3-mediated Ca<sup>2+</sup> absorption in small intestine. *Arch. Biochem. Biophys.* 460:227–232.
- Alexander J, Tung BY, Croghan A, and Kowdley KV (2007) Effect of iron depletion on serum markers of fibrogenesis, oxidative stress and serum liver enzymes in chronic hepatitis C: results of a pilot study. *Liver Int.*, 27, 268-273.
- Alfárez M J M, López-Aliaga I, Nestares T, Díaz-Castro J, Barrionuevo M, Ros PB, and Campos MS (2006). Dietary goat milk versus cow milk improves iron bioavailability in rats with induced ferropenic anaemia. *Int. Dairy J.* 16(7), 813–821.
- Alfárez MJ, Díaz-Castro J, López-Aliaga I, Rodríguez-Ferrer M, Pérez-Sánchez LJ, and Campos MS (2011). Development of nutritional iron deficiency in growing male rats:

- haematological parameters, iron bioavailability and oxidative defence. *Br. J. Nutr.* 105(4):517-525.
- Ames BN, Shigenaga MK, and Hagen TM (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:7915-7922.
- Andrews SC, Arosio P, and Bottke W (1992). Structure, function and evolution of functions of ferritins. *J. Inorg. Biochem.*, 47:161-174.
- Ania BJ, Suman VJ, and Fairbanks VF (1997). Incidence of anemia in older people: an epidemiologic study in a well defined population. *J. Am. Geriatr. Soc.*, 45:825-831.
- Annunziato L, Amoroso S, Pannaccione A, Cataldi M, Pignataro G, D'Alessio A, Sirabella R, Secondo A, Sibaud L, and Di Renzo GF (2003). Apoptosis induced in neuronal cells by oxidative stress: role played by caspases and intracellular calcium ions. *Toxicol. Lett.*, 139(2-3):125-133.
- Arunabh S, Feuerman M, Ma R, and Aloia JF (2002). Total body phosphorus in healthy women and ethnic variations. *Metab. Clin. Exp.*, 51:180-183.
- 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.* 2006; 601:144-9.
- Asmus KD (1990). Sulphur centered free radicals. *Methods Enzymol.*, 186:168-180.
- Auroma OI, and Halliwell B (1987). Superoxide-dependent and ascorbate-dependent formation of hydrogen peroxide in the presence of iron. Are lactoferrin promoters of hydroxyl radicals generation?. *Biochem. J.*, 241:273-278.
- Auroma OI, Halliwell B, Gajewski E, and Dizdaroglu M (1991). Copper ion dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem. J.*, 273:601-604.

---

Aust SD, Morehouse LA, and Thomas CE (1985). Role of metals in oxygen radical reactions.

*J. Free Rad. Biol. Med.*, 1:3-29.

Aydemir T, and Tarhan L (2001). Effects of Se, Cu and Se + vitamin E deficiency on the activities of CuZnSOD, GSH-Px, CAT and LPO levels in chicken erythrocytes. *Cell*

*Biochem. Function*, 19:153–157.

## **B**

Barger-Lux MJ, Heaney RP, and Stegman MR (1990).. Effects of moderate caffeine intake on the calcium economy of premenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.*, 52:722-725.

Barja G (2004). Aging in vertebrates and the effect of caloric restriction: a mitochondrial free radical production-DNA damage mechanism?. *Biological Rev.*, 79: 235-251.

Bast A, Steeghs MHM (1986). Hydroxyl radicals are not involved in NADPH dependent microsomal lipid peroxidation. *Experientia*, 42:555-556.

Beard JL (2001). Iron biology in immune function, muscle, metabolism, and neuronal functioning. *J. Nutr.*, 131:568-579.

Beaudeau JL, Peynet J, Bonnefont-Rousselot D, Therond P, Delattre J, and Legrand A (2006). Cellular sources of reactive oxygen and nitrogen species. Roles in signal transcription pathways. *Ann. Pharm. Fr.* 64:373-381.

Bertolo RFP, Bettger WJ, and Atkinson SA (2001). Divalent metals inhibit and lactosa stimulates zinc transport across brush border membrane vesicles from piglets. *J. Nutr. Biochem.*, 12:73-80.

Bikle DD, Ng, D, Tu CL, Oda Y, and Zie X (2001). Calcium- and vitamin D-regulated keratinocyte differentiation. *Mol. Cell Endocrinol.*, 177:161-171.

- Bohr VA, and Anson RM (1999). Mitochondrial DNA repair pathways. *J. Bioenerg. Biomemb.*, 31(4):391-398.
- Bothwell TH (1995). Overview and mechanism of iron regulation. *Nutr. Rev.*, 53:237-245.
- Bray TM, and Taylor CG (1993). Tissue glutathione, nutrition and oxidative stress. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 71: 746–775.
- Brigelius-Flohé R, Wingler K, and Müller C (2002). Estimation of individual types of glutathione peroxidases. *Meth. Enzymol.*, 347:101-112.
- Bringhurst FR, Demay MB, and Kronenberg HM (1998). Hormones and disorders of mineral metabolism. In: Wilson, J.D.; Foster, D.W.; Kronenberg, H.M. and Larsen, P.R. (Eds.). *William Textbook of Endocrinology*, 9<sup>th</sup> ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, pp: 1155-1210.
- Broadus AE (1993). Physiological functions of calcium, magnesium and phosphorus and mineral ion balance. In: Favus, M.J. (Ed.) *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. 2<sup>nd</sup> ed. New York. Raven Press, pp: 41-46.
- Brody T (1999). *Nutritional Biochemistry*, 2<sup>nd</sup> ed. San Diego: Academic Press.
- Brown EM, Macleod RJ, and O'Malley BW (2001). Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signalling. *Physiol. Rev.*, 81:239-297.
- Brownlie T, Utermohlen IV, Hinton PS, Giordano C, and Haas JD (2002). Marginal iron deficiency without anemia impairs aerobic adaptation among previously untrained women. *Am. J. Clin. Nutr.*, **75**, 734-742.
- Burdo JR, Menzies SL, Simpson IA, Garrick LM, Garrick MD, Dolan KG, Haile DJ, Beard JL, and Connor JR (2001). Distribution of divalent metal transporter 1 and metal transport protein 1 in the normal and Belgrade rat. *J. Neurosci. Res.*, 66:1198-1207.
- Burton GW (1989). Antioxidant action of carotenoids. *J. Nutr.*, 119(1):109-111.

---

Burton GW, Joyce A, and Ingold KU (1983). Is vitamin E the only lipid-soluble, chain breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes?. *Arch. Biochem. Biophys.*, 221:281-290.

## C

Cadenas E, Poderoso J, and Boveris A (2000). Mitochondrial oxidative stress. A self propagating process with implication for signaling cascades. En: VI Reunión del Grupo Español de Radicales Libres y II Reunión Ibero Americana. Navarro, A., Sánchez del Pino, M. (Eds.) Ed. Serv. Pub. Univ. Cádiz.

Calvo MS, and Park YK (1996). Changing phosphorus content of the U.S. diet: potential for adverse effects on bone. *J. Nutr.*, 126:1168S-1180S.

Calvo MS (2000). Dietary considerations to prevent loss of bone and renal function. *Nutrition* 16(7-8):564-566.

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

Campos MS, Barrionuevo M, Alférez MJM, Gómez-Ayala AE, Rodríguez-Matas MC, López-Aliaga I, and Lisbona F (1998). Interactions among iron, calcium, phosphorus and magnesium in nutritionally iron – deficient rats. *Exp. Physiol.*, 83:771-781.

Casey JL, Hentze MW, Koeeler DM, Caughman SW, Rouault TA, Klausner RD, and Harford JB (1988). Iron-responsive elements: regulatory RNA sequences that control mRNA levels and translation. *Science*, 240:924-928.

Cassanelli S, and Moullis J (2001). Sulfide is an efficient iron releasing agent from mammalian ferritins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1547:174-182.

- Cavazzoni M, Barogi S, Baracca A, Castelli GP, and Lenaz G (1999). The effect of aging and oxidative stress on peroxidative levels and the mitochondrial membrane potential in isolated rat hepatocytes. *FEBS Lett.*, 449(1):53-56.
- Chance B, Sies II, and Boveris A (1979). Hydroperoxide metabolism in mamalian org. *Physiol. Rev.*, 59:527-605.
- Cheeseman KH, and Slater TF (1993). Free radical in medicine. *British Council Bulletin*.
- Cole DEC, and Quamme GA (2000). Inherited disorders of renal magnesium handling. *J. Am. Soc. Nephrol.* 11:1937-1947.
- Conrad ME, and Umbreit JN (2000). Iron absorption and transport. *Am. J. Hematol.*, 64:287-298.
- Conrad ME, Umbreit JN, Moore EG, and Heidman D (1996). Mobilferrin is an intermediate in iron transport between transferrin and hemoglobin K562 cells. *J. Clin. Invest.*, 98:1449-1454.
- Crapo JD, McCord JM, and Fridovich I (1978). Preparation and assay of superoxide dismutases. *Methods Enzymol.*, 53:382-393.

## D

- Dallman PR, Yip R, and Oski FA (1993). Iron deficiency and related nutritional anemias. In: Natham and Oski's Hematology of infancy and childhood, 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: W.B. Saunders, pp: 413-450.
- Danzeisen R, Ponnambalam S, Lea RG, Page K, Gambling L, and Mcardle HJ (2000). The effect of ceruloplasmin on iron release from placental (BeWo) cells; evience for an endogenous Cu oxidase. *Placenta*, 21:805-812.
- De la Fuente M (2002). Effects of antioxidants on inmune system ageing. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 168

---

56(3):5-8.

- De Luca HF (1976). Metabolism of Vitamin D: current status. *Am J Clin Nutr.* 29: 1258-1270.
- DeSandro V, Chevrier M, Boddaert A, Melcion C, Cordier A, and Richiert L (1991). Comparison of the effects of propylthiouracil, diphenyl hydantoin, phenobarbital and 3 methylcholanthrene on hepatic and renal T4 metabolism and thyroid gland function in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 111:263–278.
- Díaz-Castro J, Alférez MJM, López-Aliaga I, Nestares T, and Campos MS (2010). Effect of calcium-fortified milk-rich diets (either goat's or cow's milk) on copper bioavailability in iron-deficient anemia. *Dairy Sci. Technol.* 91:203-212.
- Díaz-Castro J, Alférez MJM, López-Aliaga I, Nestares T, Granados S, Barrionuevo M, and Campos MS (1996). Effects of iron replenishment on iron, calcium, phosphorus and magnesium metabolism in iron-deficient rats. *Internat. J. Vitam. Nutr. Res.* 66, 158-165.
- Díaz-Castro J, Alférez MJM, López-Aliaga I, Nestares T, Granados S, Barrionuevo M, and Campos MS (2008). Influence of nutritional iron deficiency anaemia on DNA stability and lipid peroxidation in rats. *Nutrition* 24, 1167-1173.
- Domellöf M, Hernell O, Abrams SA, Chen Z, and Lonnerdal B (2009). Iron supplementation does not affect copper and zinc absorption in breastfed infants. *Am. J. Clin. Nutr.*, 89, 185-190.
- Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, Shepard J, Pratt SJ, Moynihan J, Paw BH, Drejer A, Barut B, Zapata A, Law TC, Brugnara C, Lux SE, Pinkus GS, Pinkus JL, Kingsley PD, Palis J, Fleming MD, Andrews NC, and Zon LI (2000). Positional cloning of

zebrafish ferroprotein1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature*, 403:777-781.

## E

Emerit J, Beamont C, and Trivin F (2001). Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. *Biomed. Pharmacol.* 55: 333-339.

Erba D, Ciapellauo S, and Testolin G (2001). Effect of caseinphosphopeptides on inhibition of calcium intestinal absorption due to phosphate. *Nutr. Res.*, 28:649-656.

## F

Fairbanks VF (1999). Iron in medicine and Nutrition. In: Shils, M.; Olson, J.A.; Shike, M.; Ross, A.C. (Eds.). *Nutrition in health and disease*, 9<sup>th</sup> ed. Baltimore: Williams & Wilkins, pp: 223-239.

Fattman CL, Schaefer LM, and Oury TD (2003). Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radic Biol Med.*, 35:236-256.

Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, Dormishian F, Domingo RJr, Ellis MC, Fullan A, Hinton LM, Jones NL, Kimmel BE, Kronmal GS, Lauer P, Lee VK, Loeb DB, Mapa FA, McClelland E, Meyer NC, Mintier GA, Moeller N, Moore T, Morikang E, Prass CE, Quintana L, Starnes SM, Schatzman RC, Brunke KJ, Drayna DT, Risch NJ, Bacon BR, and Wolff RK (1996). A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat. Genet.*, 13(4):399-408.



- Feder JN, Penny DM, Irrinki A, Lee VK, Lebron JA, Watson N, Tsuchihashi Z, Sigal E, Bjorkman PJ, and Schatzman RC (1998). The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:1472-1477.
- Feder JN, Tsuchihashi Z, Irrinki A, Lee VK, Mapa FA, Morikang E, Prass CE, Stranes SM, Wolff RK, Parkkila S, Sly WS, and Schatzman RC (1997). The hemochromatosis founder mutation in HLA-H disrupts  $\beta_2$ -microglobulin interaction and cell surface expression. *J. Biol. Chem.*, 272:10425-10428.
- Ferguson CJ, Wareing M, Ward DT, Green R, Smith CP, and Riccardi D (2001). Cellular localization of divalent metal transporter DMT-1 in rat kidney. *Am. J. Physiol.-Renal Physiol.*, 280:F803-F814.
- Finkel T, and Holbrook NJ (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809):239-247.
- Fleming MD, Romano MA, Su MA, Garrick LM, Garrick MD, and Andrews NC (1998). Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:1148-1153.
- Fleming MD, Trenor CC, Su MA, Foernzler D, Beier DR, Dietrich WF, and Andrews NC (1997). Microcytic anemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. *Nat. Genet.*, 16:383-386.
- Flohé L, and Gunzder WA (1984). Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 105: 114-121.
- Flohé L, and Schlegel W (1971). Glutathione peroxidase. IV. Intracellular distribution of the glutathione peroxidase system in the rat liver. *Physiol. Chem.*, 352:1401-1410.

- Floyd RA, and Hensley K (2002). Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiol. Aging*, 23(5):795-807.
- Food and Nutrition Board, Institute of Medicine (2004). Dietary reference intakes for Arsenic, Boron, Calcium, Chromium, Copper, Fluoride, Iodine, Iron, Magnesium, Manganese, Molybdenum, Nickel, Phosphorus, Selenium, Silicon, Vanadium and Zinc. Washington, D.C.: National Academy Press, pp:290-393.
- Forellat M, Gautier H, and Fernández N (2000). Metabolismo del hierro. *Rev. Cub. Hematol. Inmunol. Hemoter.*, 16:149-160.
- Frankel EN (1991). Recent advances in lipid oxidation. *J. Sci. Food Chem.*, 39:242-246.
- Freeman BA, and Crapo JA (1982). Biology of disease: Free radicals in tissue injury. *Lab. Invest.*, 47:412-426.
- Fridovich I (1974). Superoxide dismutase. *Ann. Rev. Biochem.*, 44: 47-159.
- Fridovich I (1983). Superoxide radical: and endogenous toxicant. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 23:239-257.
- Friedlander MM, Wald H, Dranitzki-Elhalel H, Zajicek HK, Levi M, and Popovtzer MM (2001). Vitamin D reduces renal NaPi-2 in PTH infused rats: complexity of vitamin D action on renal Pi handling. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 281:F428-F433.
- Fulbert JC, and Cals MJ (1992). Free radicals in clinical biology. Origin, pathogenic effect and defense mechanisms. *Pathol Biol.*, 40:66-77.

## G

- Gabrilove J (2000). Overview: erythropoiesis, anemia and the impact of erythropoietin. *Semin. Hematol.*, 37(supl. 6): 1-13.
- Gafni A (1990). Aletered protein metabolisn in aging. *Ann. Rev. Gerontol. Geriatr.*, 10:117-131.

- Gambling L, Danzeisen R, Gair S, Lea RG, Charania Z, Solanky N, Joory KD, Srai SK, and MCardle HJ (2001). Effect of iron deficiency on placental transfer of iron and expression of iron transport proteins in vivo and in vitro. *Biochem. J.*, 356:883-889.
- Garcia-Casal MN, Leets I, and Layrisse M (2000). Beta-carotene and inhibitors of iron absorption modify iron uptake by Caco-2 cells. *J. Nutr.*, 130:5-9.
- Gee JB, Corbett RJ, Perlman JM, and Lupton AR (2001). Hypermagnesemia does not increase brain intracellular magnesium in newborn swine. *Ped. Neurol.*, 25:304-308.
- Geisser P, Baer M, and Schaub E (1992). Structure/histotoxicity relationship of parenteral iron preparations. *Drug. Res.*, 42:1439-1452.
- Georgieff MK, Wobken JK, Welle J, Burdo JR, and Connor JR (2000). Identification and localization of divalent metal transporter 1 (DMT1) in term human placenta. *Placenta*, 21:799-804.
- Gerhard GS, Levin KA, Price Goldstein J, Wojnar MM, Chorney MJ, and Belchis DA (2001). *Vibrio vulnificus* septicaemia in a patient with the hemochromatosis HFE C282Y mutation. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 125:1107-1109.
- Giachelli CM, Jono S, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, and Morii H (2001). Vascular calcification and inorganic phosphate. *Am. J. Kidney. Dis.*, 38:S34-S37.
- Girotti AW (1985). Mechanism of lipid peroxidation. *Free. Radic. Biol. Med.*, 1:87-95.
- Glahn RP, and Van Campen DR (1997). Iron uptake is enhanced in Caco-2 cells monolayers by cysteine and reduced cysteinyl glycine. *J. Nutr.*, 127:642-647.
- Glahn RP, Lee OA, Yeung A, Goldman MI, and Miller DD (1998). Caco-2 cells ferritin formation predicts nonradiolabeled food iron availability in vitro digestion / Caco-2 cells culture model. *J. Nutr.*, 128:1555-1561.

- Glahn RP, Wien EM, Van Campen DR, and Miller DD (1996). Caco-2 cells iron uptake from meat and casein digest parallels in vivo studies use of a novel in vitro method for rapid estimation of iron bioavailability. *J. Nutr.*, 2126:332-339.
- Gómez-Ayala AE, Lisbona F, López-Aliaga I, Pallarés I, Barrionuevo M, Hartiti S, Rodríguez-Matas MC, and Campos MS (1998). The absorption of iron, calcium, phosphorus, magnesium, copper and zinc in the yeyunum-ileum of control and iron-deficient rats. *Lab. Anim.*, 32:72-79.
- Grasbeck R, Kouvonen I, Lundberg M, and Tenhunen R (1979). An intestinal receptor for heme. *Scand. J. Haematol.*, 23:5-9.
- Grasbeck R, Majuri R, Kouvonen I, and Tenhunen R (1982). Spectral and other studies on the intestinal haem receptor of the pig. *Biochim. Biophys. Acta*, 700:137-142.
- Gribkoff VK, Starret JE, and Dworetzky SI (2001). Maxi-K potassium channels: form, function and modulation of a class of endogenous regulators of intracellular calcium. *Neurosci.*, 7:166-177.
- Groff JL, and Gropper SS (2000). Advanced nutrition and human metabolism, 3<sup>rd</sup> ed. Belmont, CA:Wadsworth Thomson Learning.
- Grootveld M, Bell JD, and Halliwell B (1989). Non transferrin-bound iron in plasma or serum from patient idiopathic hemochromatosis. Characterization by high performance liquid chromatography and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Biol. Chem.*, 264:4417-4422.
- Gross PM, and Weindl A (1987). Peering through the windows of the brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 7:663-672.
- Gueguen L, and Pointillart A (2000). The bioavailability of dietary calcium. *J. Am. Coll. Nutr.*, 19(2):119S-136S.

---

Gunshin H, Mcenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL, and Hediger MA (1997). Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metalion transporter. *Nature*, 388:482-487.

Gutteridge JMC, and Halliwell B (1994). Antioxidants in nutrition, health, and disease. Oxford University Press, 4:63-81.

## H

Hallberg L, Bengtsson C, Garby L, Lennartsson J, Rossander L, and Tibblin E (1979). An analysis of factors leading to a reduction in iron deficiency in Swedish women. *Bulletin of the World Health Organization*, 57,947-954.

Hallberg L, Brune M, Erlandsson M, Sandberg AS, and Rossander-Hulten L (1991). Calcium: Effect of different amounts on nonheme-iron and heme-iron absorption in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, 53,112-119.

Hallberg L, Rossander-Hulten L, Brune M, and Gleerup A (1992). Calcium and iron absorption: mechanism of action and nutritional importance. *Eur. J. Clin Nutr.*, 46,317-327.

Halliwell B (1988). Albumin, an important extracellular antioxidant?. *Biochem. Pharmacol.*, 37:569-571.

Halliwell B, and Chirico S (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am. J. Clin. Nutr.*, 57(S):715-722.

Halliwell B, Gutteridge JM, and Cross CE (1992). Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now?. *J. Lab. Clin. Med.*, 119(6):598-620.

Halliwell B, and Gutteridge JMC (1984). Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. *Lancet*, 1:1396-1398.

- Halliwell B, and Gutteridge JMC (1986). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.*, 286:501-514.
- Halliwell B, and Gutteridge JMC (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*, (3<sup>rd</sup> ed) Oxford Science Publications, New York.
- Hallterman J S, Kaczorowski J M, Aligne C A, Auinger P, and Szilagyí P G (2001). Iron deficiency and cognitive achievement among schoolaged children and adolescents in the United States. *Pediatrics*, 107(6): 1381-1386.
- Hamrick I, and Counts SH (2008). Vitamin and mineral supplements. *Wellness and Prevention* 35(4);729-747.
- Han O, Failla ML, Hill AD, Morris ER, and Smith JC (1995). Reduction of Fe (III) is required for uptake of nonheme iron by Caco-2 cells. *J. Nutr.*, 125: 1291-1299.
- Hanahan DJ, and Ekholm JE (1974). The preparation of red cell ghost (membranes). *Methods Enzymol.*, 31:168-172 .
- Hardwick LL, Jones MR, Buddington RK, Clemens RA, and Lee DBN (1990). Comparison of calcium and magnesium absorption: in vivo and in vitro studies. *Am. J. Physiol.*, 259:G720-G726.
- Harman D (2003). The free radical theory of aging. *Antioxid Redox Signal.* 5: 557-561.
- Harris SS, and Dawson Hughes B (1994). Caffeine and bone loss in healthy postmenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.*, 60(4):573-578.
- Heaney RP (1999). Absorbing calcium. *Clin. Chem.*, 45:161-162.
- Heaney RP (2000). Calcium, dairy products and osteoporosis. *J. Am. Coll. Nutr.*, 19:83S-99S.
- Henle ES, and Linn S (1997). Formation, prevention, and repair of DNA damage by Iron/Hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 272. 19095-19098.

- Hentze MW, and Kühn LC (1996). Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.93:8175-8182.
- Hercberg S, and Galan P (1992). Nutritional anemias. *Bailleres Clin. Haematol.*, 5:143-168.
- Hernando N, Forster IC, Biber J, and Murer H (2000). Molecular characteristics of phosphate transporters and their regulation. *Exp. Nephrol.*, 8:366-375.
- Hernando N, Karim-Jiménez Z, Biber J, and Murer H (2001). Molecular determinants for apical expression and regulatory membrane retrieval of the type II Na/Pi cotransporter. *Kidney Int.*, 260:431-435.
- Hess SY, Zimmermann MB, Arnold M, Langhans W, and Hurrell RF (2002). Iron-deficiency anemia reduces thyroid peroxidase activity in rats. *J. Nutr.*, 132, 1951–1955.
- Higdon J (2003). Magnesium. In: Higdon, J. (Ed.). *An evidence-based approach to vitamins and minerals*. Theme Medical Publishers, Inc., pp: 148-156.

## I

- Iannotti LL, Tielsch JM, Black MM, and Black RE (2006). Iron supplementation in early childhood: health benefits and risks. *Am. J. Clin. Nutr.*, 84, 1261-1276.
- Isler M, Delibas N, Guclu M, Gultekin F, Sutcu R, Bahceci M, and Kosar A (2002). Superoxide dismutase and glutathione peroxidase in erythrocytes of patients with iron deficiency anemia: effects of different treatment modalities. *Coat. Med. J.*, 43:16-19.
- Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, and Kaelin WG Jr (2001). HIF $\alpha$  targeted for VHL-mediated destruction by proline hidroxilation: implications for oxigen sensing. *Science*, 292(5516):464-468.

## J

Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim AV, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, and Ratcliffe PJ (2001). Targeting of HIF-alpha to the Von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by oxygen regulated prolyl hidroxilation. *Science*, 292(5516):468-472.

Jamieson D (1989). Oxygen toxicity and reactive oxygen metabolites in mammals. *Free. Rad. Biol. Med.*, 7:87-108.

Jan De Beur SM, and Levine MA (2002). Molecular Pathogenesis of hypophosphatemic rickets. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 87:2467-2473.

Jüttner R, and Ebel H (1998). Characterization of Mg<sup>2+</sup> transport in brush border membrane vesicles of rabbit ileum studied with mag-fura 2. *Biochim. Biophys. Acta*, 1370:51-63.

## K

Kappus H (1985). Lipid peroxidation: mechanism, analysis, enzymology and biological relevance. En: Sies, H. (Ed.). *Oxidative Stress*. Ed. Academic Press, New York, pp: 273-310.

Kelso GF, Porteous CM, Hughes G, Ledgerwood EC, Gane AM, Smith RA, and Murphy MP (2002). Prevention of mitochondrial oxidative damage using targeted antioxidants. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 959:263-274.

Kerstan D, and Quamme G (2002). Physiology and pathophysiology of intestinal absorption of magnesium. In: Massry, S.G.; Morii, H. and Nishizawa, Y. (Eds.). *Calcium in Internal Medicine*. London:Springer-Verlag, pp: 171-183.



- Khanal RC, and Nemere I (2008). Regulation of intestinal calcium transport. *Annu. Rev. Nutr.*, 28:179-196.
- Knochel JP (1999). Phosphorus. In: Shils, M.; Olson, J.A.; Shike, M.; and Ross, A.C. (Eds.). *Nutrition in health and disease*, 9<sup>th</sup> ed. Baltimore: Williams & Wilkins, pp:157-167.
- Kohlmeier M (2003). Phosphorus. In: Kohlmeier, M. (Ed.). *Nutrient Metabolism*, New York Academic Press, pp:700-708.
- Konrad M, Schlingmann KP, and Gudermann T (2004). Insights into the molecular nature of magnesium homeostasis. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 286:F599-F605.
- Kozyraki R, Fyfe J, Verroust PJ, Jacobsen C, Dautry-Varsat A, Gburek J, Willnow TE, Christensen EI, and Moestrup SK (2001). Megalin-dependent cubilin-mediated endocytosis is a major pathway for the apical uptake of transferrin in polarized epithelia. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA.* 98:12491-12496.
- Krinke GJ (2000). History, strains and models. *The Laboratory Rat (Handbook of Experimental Animals)*. Gillian R. Bullock (series ed.), Tracie Bunton (ed.). Academic Press, pp: 3–16.
- Kumar R (2002). 1,25- dihydroxivitamin D<sub>3</sub>- not just a calciotropic hormone. *Nephron.*, 91:576-581.
- Kumerova, A.; Lece, A.; Skesters, Silova, A.; and Petuhovs., V. Anaemia and antioxidant defence of the red blood cells. *Mater. Med. Pol.*, 30:2–15, (1998).

## L

- Lafond J, Goyer- O'Reilly I, Laramee M, and Simoneau L (2001). Hormonal regulation and implication of cell signaling in calcium transfer by placenta. *Endocrin. J.*, 14:85-94.

- Laganriere S, and Yu BP (1993). Modulation of membrane phospholipid fatty acid composition by age and food restriction. *Gerontology*, 39:7-18.
- Lajeunesse D, and Brunnete MG (1988). Sodium gradient-dependent phosphate transport in placental brush border membrana vesicles. *Placenta*, 9:117-128.
- Lawrence RA, and Burk RF (1976). Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 71(4):952-958.
- Layrisse M, Garcia-Casal MN, Solano L, Baron MA, Aguello F, Llovera D, Ramirez J, Leets I, and Tropper E (1997). The role of vitamin A on the inhibitors of nonheme iron absorption. *J. Nutr. Biochem.*, 8:61-67.
- Lee MC, Weindruch R, and Aiken JM (1997). Age-associated alterations of the mitochondrial genome. *Free Rad. Biol. Med.*, 22(7):1259-1269.
- Lee PL, Gelbart T, West C, Halloran C, and Beutler E (1998). The human Nramp2 gene: characterization of the gene structure, alternative splicing promoter region and polymorphisms. *Blood Cells Mol. Dis.*, 24:199-215.
- Lee YH, Layman DK, and Bell RR (1981). Glutathione peroxidase activity in iron deficient rats. *J. Nutr.*, 111:194-200.
- Lee YM, and Lim C (2008). Physical basis of structural and catalytic Zn-binding sites in proteins. *J. Mol. Biol.*, 379(3):545-553.
- Lemann J Jr (1993). Urinary excretion of calcium, magnesium and phosphorus. In: Favus, M.J. (Ed.). Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. New York, Raven Press 2<sup>nd</sup> ed., pp: 50-54.
- Lenaz G (1998). Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochim. Biophys. Acta*, 1366:53-67.
- Lenaz G (1988). Role of mobility of redox components in the inner mitochondria membrane.

- 
- J. Membrane Biol.*, 104:193-209.
- Lenaz G, Bovina C, D'Aurelio M, Fato R, Formiggini G, Genova ML, Giuliano G, Pich MM, Paolucci U, Castelli GP, and Ventura B (2002). Role of mitochondria in oxidative stress and aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 959:199-213.
- Levi M, Kempson SA, Lotscher M, Biber J, and Murer H (1996). Molecular regulation of renal phosphate transport. *J. Membr. Biol.*, 154:1-9.
- Levi S, Yewdal SJ, and Harrison PM (1992). Evidence of H and L chains have to cooperative roles in the iron uptake mechanisms of human ferritin. *Biochem. J.*, 288:591-596.
- Levy JE, Jin O, Fujiwara Y, Kuo F, and Andrews NC (1999). Transferrin receptor is necessary for development of erythrocytes and the nervous system. *Nature Genet.*, 21:361-369.
- Leyhausen G, Lorenz B, Zhu H, Geurtsen W, Bohnensack R, Muller WE, and Schroder HC (1998). Inorganic polyphosphate in human osteoblast-like cells. *J. Bone Min. Res.*, 13:803-812.
- Linnane AW, Baumer A, Maxwell RJ, Preston H, Zhang C, Marzuki S, and Lippman RD (1980). Free radical-induced lipid peroxidation and aging. In: Miquel J, Quintanilla AT, and Weber H (Eds.). *Handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine*. Eds. C.R.C. Press, 1:187-197.
- Linnane AW, Baumer A, Maxwell RJ, Preston H, Zhang CF, and Marzuki S (1990). Mitochondrial gene mutation: the aging process and degenerative diseases. *Lancet*, 1:642-645.
- Lisbona F, Alférez MJM, Barrionuevo M, López-Aliaga I, Pallarés I, Hartiti S, and Campos MS (1994). Effects of type of dietary fat and vitamin D<sub>3</sub> on magnesium absorption in rats with intestinal resection. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, 64:294-302.
- Littarru GP, and Battino M (1994). Natural antioxidants and sports medicine. *Int. J. Sports*.

*Cardiol.*, 2:127-130.

Liu J, Atamna H, Kuratsune H, and Ames BN (2002). Delaying brain mitochondrial decay and aging with mitochondrial antioxidants and metabolites. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 959:133-166.

Lombardi-Boccia G, Martinez-Dominguez B, and Aguzzi A (2002). Total heme and non-heme iron in raw and cooked meats. *J. Food Sci.*, 67,1738-1741.

Lönnerdal B, and Dewey KG (1995). Epidemiología de la deficiencia de hierro en lactantes y niños. *An. Nestlé.* 53:12-19.

López HW, Coudray C, Levrat-Verny MA, Feillet-Coudray C, Demigné C, Rémes YC (2000). Fructooligosaccharides enhance mineral apparent absorption and counteract the deleterious effects of phytic acid on mineral homeostasis in rats. *J. Nutr. Biochem.* 11:500-508.

López-Aliaga I, Alférez MJM, Barrionuevo M, Nestares T, Sanz-Sampelayo MR, and Campos MS (2003). Study of nutritive utilization of protein and magnesium in rats with resection of the distal small intestine. Beneficial effect of goat milk. *J. Dairy Sci.*, 86:2958-2966.

Loschen G, Flohé L, and Chance B (1971). Respiratory chain linked H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in pigeon heart mitochondria. *FEBS Lett.*, 18:261-264.

Lozoff B, and Black MM (2004). Impact of micronutrient deficiencies on behavior and development. In: Pettifor J.M. and Zlotkin S. (Eds). *Micronutrient deficiencies during the weaning period and the first years of life*, Basel, Switzerland: Nestec Ltd, pp:19–35.

Lucas ML, Copper BT, Lei FH, Johnson IT, Holmnes GKT, Blair JA, and Cooke WT (1978). Acid microclimate en celiac and Crohn's disease: a model for folate malabsorption. *Gut.*, 19:735-742.

---

Lynch SR (1997). Interaction of iron with other nutrients. *Nutr. Rev.*, 55(4):102-110.

## M

MacDougall LG (1968). Red cell metabolism in iron deficiency anemia. *J. Pediatr.*, 72:303-328.

Manoonkitiwongsa PS, Whitter EF, Wareesangtip W, Mcmillan PJ, Nava PB, and Schultz RL (2000). Calcium-dependent ATPase unlike ecto-ATPase is located primarily on the luminal surface of brain endothelial cells. *Histochem. J.*, 32:313-324.

Martínez Sarrasague M, Barrado DA, Zubillaga M, Hager A, De Paoli T, Boccio J (2006). Conceptos actuales del metabolismo del glutati6n. Utilizaci6n de los is6topos estables para la evaluaci6n de su homeostasis. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.* 40 (1): 45-54.

Massey LK (1998). Does excess dietary protein adversely affect bone? Symposium overview. *J. Nutr.*, 128:1048-1050.

Mataix FJ, Mañas M, Llopis J, and Martínez de Victoria E (1988). Tabla de composici6n de alimentos espa±oles. 2ª Ed. Instituto de Nutrici6n y Tecnología de los Alimentos. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Granada.

Matés JM, and Sánchez-Jiménez F (1999). Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiological processes. *Front. Biosci.*, 15:339-345.

Mathews CK, Van Holde KE, and Ahern KG (2002). Bioquímica. 3º ed. Addison Wesley (Ed) Madrid.

McCance KL, and Hueter SE (1998). Pathophysiology: The biologic basis for disease in adults and children (3<sup>rd</sup> Ed.). St. Louis, MO: Mosby.

McCord JM (1989). Free radical and heart disease. In: Nutritional impact of food processing.

- 
- Eds. Somogy JC and Müller HR. *Bibli. Nutr. Dieta* Basel, Karger, Switzerland, 43:327-337.
- McCord JM, and Fridovich I (1968). Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte hemoglobin (Hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, 244:6049-6055.
- McCutcheon JE, and Marinelli M (2009). Age matters. *Eur. J. Neurosci.*, 29: 997-1014.
- McEwan GTA, Lucas ML, Denvir M, Raj M, MCColl KE, Russell RI, and Mathan VI (1990). A combined TDDA-PVC pH and reference electrode for use in the upper small intestine. *J. Med. Eng. Technol.*, 14:16-20.
- McKie AT, Barrow D, Latunde-Dada GO, Rolfs A, Sager G, Mudaly E, Mudaly M, Richardson C, Barlow D, Bomford A, Peters TJ, Raja KB, Sgirali S, Hediger MA, Farzaneh F, and Simpson RJ (2001). An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science*, 291:1755-1759.
- McKie AT, Marciani P, Rolfs A, Brennan K, Wher K, Barrow D, Miret S, Bomford A, Peters TJ, Farnazeh F, Hediger MA, Hentze MW, and Simpson RJ (2000). A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Molecular Cell.*, 5:299-309.
- McPhail AP, and Bothwell TH (1992). The prevalence and causes of nutritional iron deficiency anemia. In: Fomon, S.J. and Zlotkin, S. (Eds.). *Nutritional anemias*. Nestlé Nutrition Workshop Series, vol.30, Nestec Ltd., Vevey/Raven Press, Ltd., New York, pp:1-12.
- Mehlhorn RJ, and Cole G (1985). The free radical theory of aging: a critical review. *Adv. Free Radic. Biol. Med.*, 1:165-223.
- Meister A, and Anderson ME (1983). Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.* 52:711-760.
- Melov S (2002). Therapeutics against mitochondrial oxidative stress in animal models of aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 959:330-340.

- Milgram NW, Zicker SC, Head E, Muggenburg BA, Murphey H, Ikeda-Douglas CJ, and Cotman CW (2002). Dietary enrichment counteracts age-associated cognitive dysfunction in canines. *Neurobiol. Aging*, 23(5):737-745.
- Milne DB, and Nielsen FH (2000). The interaction between dietary fructose and magnesium adversely affects macromineral homeostasis in men. *J. Am. Coll. Nutr.*, 19(1):31-37.
- Minotti G, and Aust D (1987). The role of iron in the initiation of lipid peroxidation. *Chem. Phys. Lipids.*, 44:191-208.
- Miyadera H, Kano K, Miyoshi H, Ishii N, Hekimi S, and Kita K (2002). Quinones in long-lived clk-1 mutants of *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Lett.*, 512(1-3):33-37.
- Miyamoto KI, and Itho M (2001). Transcriptional regulation of the Npt2 gene by dietary phosphate. *Kidney Int.*, 60:412-425.
- Moos T, and Morgan EH (2000). Transferrin and transferrin receptor function in brain barrier systems. *Cell Mol. Neurobiol.*, 20:77-95.
- Moos T, and Morgan EH (2004). The metabolism of neuronal iron and its pathogenic role in neurological disease. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1012: 14-26.
- Morgan EH, and Oates PS (2002). Mechanisms and regulation of intestinal iron absorption. *Blood Cells Mol. Dis.*, 29:384-99.
- Moses MS, and Graig WJ (1983). Effects of dietary fat on the fatty acid composition of rat erythrocyte phospholipids. *Nutr. Rept. Int.*, 28:983-990.
- Moya M, Cortés E, Ballester MI, Vento MY, and Juste M (1992). Short term polyose substitution for lactose reduces calcium absorption in healthy term babies. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 14:57-61.
- Muggli R (1993). Free radicals tissue damage: the protective role of antioxidant nutrients. In:

- Coringiu F, Banm S, and Dessi MA (Eds.). Free radicals and antioxidants in nutrition. The Richelieu Press. Londres, pp: 189-194.
- Müllner EW, and Kühn LC (1988). A stem-loop in the 3'untranslated region mediates iron-dependent regulation of transferrin receptor mRNA stability in the cytoplasm. *Cell*, 53:815-825.
- Multhaup G, and Rupper T (1997). Reactive oxygen species and Alzheimer disease. *Biochem. Pharmacol.*, 54(5):533-559.
- Mulvihill B, Kirwan FM, Morrissey PA, and Flynn A (1998). Effect of myofibrillar muscle proteins on the in vitro bioavailability of non-haem iron. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 49(3):187-192.
- Murakami M, and Hirano T (2008). Intracellular zinc homeostasis and zinc signaling. *Cancer Sci.*, 99(8):1515-1522.
- Murer H, Hernando N, Forster L, and Biber J (2001). Molecular mechanisms in proximal tubular and small intestinal phosphate reabsorption. *Mol. Membr. Biol.*, 18:3-11.

## N

- Navarro A, López-Cepero JM, and Sanchez del Pino MJ (2001). Skeletal muscle and aging. *Frontiers in Bioscience*, 6:26-44.
- Need AG, Kemp A, Giles N, Morris HA, Horowitz M, and Nordin BE (2002). Relationships between intestinal calcium absorption, serum vitamin D metabolites and smoking in postmenopausal women. *Osteopor. Internat.*, 13:83-88.
- Nieto N (1993). Perfil lipídico y defensa antioxidante del corazón de ratas alimentadas con diferentes dietas lipídicas. Memorias de Licenciatura. Universidad de Granada. Facultad de Farmacia.



Niki E (1987). Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chem. Phys. Lipids*, 44:227-253.

Nissenson AR, Berns JS, Sakiewicz P, Ghaddar S, Moore GM, Schleicher RB, and Seligman PA (2003). Clinical evaluation of heme iron polypeptide: sustaining a response to rHuEPO in hemodialysis patients. *Am. J. Kidney Dis.*, 42:325-330.

Nohl H, and Herner D (1978). Do mitochondria produce oxygen radicals in vivo?. *Eur. J. Biochem*, 82:563-567.

Nunomura A, Moreira PI, Lee HG, Zhu X, Castellani RJ, Smith MA, and Perry G (2007). Neuronal death and survival under oxidative stress in Alzheimer and Parkinson diseases. *CNS Neurol. Disord. Drug Target*, 6:411-23.

## O

Oates PS, and Morgan EH (1997). Ferritin gene expression and transferrin receptor activity in intestine of rats with varying iron stores. *Am. J. Physiol.*, 273:G636-G646.

Ohkawa H, Ohishi N, and Yagi K (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.*, 95:351-358.

Olivares M, Walter T, Cook JD, Hertrampf E, and Pizarro F (2000). Usefulness of serum transferrin receptor and serum ferritin in diagnosis of iron deficiency in infancy. *Am. J. Clin. Nutr.* 72, 1191-1195.

## P

Pallarés I, López-Aliaga I, Lisbona F, Moratalla A, Gómez-Ayala AE, Barrionuevo M, Hartiti S, Alférez MJM, and Campos MS (1996). Effects of iron replenishment on

- 
- iron, calcium, phosphorus and magnesium metabolism in iron-deficient rats. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*,66:158-165.
- Pallarés I, Lisbona F, López-Aliaga I, Barrionuevo M, Alférez MJM, and Campos MS (1993). Effects of iron deficiency on the digestive utilization of iron, phosphorus, calcium and magnesium in rats. *Br. J. Nutr.*, 70: 609-620.
- Palmer G, Zao J, Bonjour J, Hofstetter W, and Caverzasio J (1999). In vivo expression of transcripts encoding the Glvr-1 phosphate transporter/retrovirus receptor during bone development. *Bone*, 24:1-7.
- Papanikolau G, and Pantopoulos K (2004). Iron metabolism and toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 202:199-211.
- Parkkila S, Waheed A, Britton RS, Bacon BR, Zhou XY, Tomatsu S, Fleming RE, and Sly WS (1997a). Immunohistochemistry of HLA-H, the protein defective in patients with hereditary hemochromatosis, reveals unique pattern of expression in gastrointestinal tract. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 94:2534-2539.
- Parkkila S, Waheed A, Britton RS, Bacon BR, Zhou XY, Tomatsu S, Fleming RE, and Sly WS (1997b). Association of the transferrin receptor in human placenta with HFE, the protein defective in patients with hereditary hemochromatosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 94:13198-13202.
- Pattanaungkul S, Riggs BL, Yergey AL, Viera NE, O'Fallon WM, and Khosla S (2000). Relationship of intestinal calcium absorption to 1,25-dihydroxyvitamin D in young versus elderly women: evidence for age related intestinal resistance to 1,25(OH)<sub>2</sub>D action. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 85:4023-4027.
- Patterson AJ (2001). Dietary treatment of iron deficiency in women of child-bearing age. *Am. J. Clin. Nutr.*, 74:650-656.

---

Pietrangelo A (2002). Physiology of iron transport and the hemochromatosis gene. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 282:403-414.

Potter BJ, MCHugh TA, and Beloqui O (1992). Iron uptake from transferrin and asialotransferrin by hepatocytes from chronically alcohol-fed rats. *Alcoholism: Clin. Exp. Res.*, 16:810-815.

## Q

Quarles LD (2003). Evidence for a bone-kidney axis regulating phosphate homeostasis. *J. Clin. Invest.*, 112:642-646.

## R

Radi R, Bush M, and Freeman BA (1993). The role of cytochrome c and mitochondrial catalase in hydroperoxide-induced heart mitochondrial lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1993; 300(1):409-415.

Raffin SB, Woo CH, Roost KT, Price DC, and Schmid R (1974). Intestinal absorption of haemoglobin iron-heme cleavage by mucosal heme oxygenase. *J. Clin. Invest.*, 54:1344-1352.

Reddy MB, and Cook JD (1997). Effect of calcium intake on nonheme iron absorption from a complete diet. *Am. J. Clin. Nutr.*, 65:1820-1825.

Reeves P, Nielsen F, and Fahey G (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.*, 123:1939-1951.

- Remmen HV, and Richardson A (2001). Oxidative damage to mitochondria and aging. *Exp. Gerontol.*, 36:957-968.
- Ritchie G, Kerstan D, Dai LJ, Kang HS, Canaff L, Hendy GN, and Quamme GA (2001).  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  stimulates  $\text{Mg}^{2+}$  uptake into MDCT cells: modulation by extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$ . *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 280:F868-F878.
- Roberfroid M., and Buc-Calderon P (1995). Free radical and oxidation phenomena in a biological system. Marce Dekker Inc., New York, USA.
- Romani A, Marfella C, and Scarpa A (1993). Cell magnesium transport and homeostasis: role of intracellular compartments. *Min. Electrolyte Metab.*, 19:282-289.
- Rothenberg BE, and Voland JR (1996).  $\beta_2$  knockout mice develop parenchymal iron overload : a putative role for class I genes of the major histocompatibility complex in iron metabolism. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA.*, 93:1529-1534.
- Rude RK (2000). Magnesium. In: Stipanuk, M.H. (Ed.). Biochemical and Physiological Aspects of Human Nutrition. W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp: 671-685.

## S

- Santos M, Schilham MW, Rademakers LH, Marx JJ, De Sousa M, and Clevers H (1996). Defective iron homeostasis in beta2-microglobulin knockout mice recapitulates hereditary hemochromatosis in man. *J. Exper. Med.*, 184:1975-1985.
- Saran M, Michael C, and Bors W (1988). Reaction of NO with  $\text{O}_2$  implications for the action of endothelium-derived relaxing factor. *Free Radic. Res. Com.* 83:1705-1715.

- Sarma BK, and Muges G (2008). Antioxidant activity of the anti-inflammatory compound Ebselen: A reversible cyclization pathway via selenenic and seleninic acid intermediates. *Chem. Eur. J.* 14:10603-10614.
- Sastre J, Pallardó FV, De La Asunción GJ, and Viña J (1999). Mitochondria, oxidative stress and aging. *Free Rad. Biol. Med.*, 32:189-198.
- Saul RL, and Gee P (1987). Free radicals, DNA damage, and aging. In: Warner HR, Buttler RN, Sprott RL, Schneider EL. (Ed.). *Modern biological theories of ageing*. N.Y., Raven Press, pp:113-129.
- Scanlon KS, and Yip R (1996). Nutritional anemias. In: Wolinsky I. and Klimis-Travantzis D, (Eds.). *Nutritional Concerns of Women*. Boca Ratón, F.L: CRC Press. 5:61-88.
- Schiavi SC, and Kumar R (2004). The phosphatonin pathway: new insights in phosphate homeostasis. *Kidney Internat.*, 65:1-14.
- Schomburg L, Schweizer U, Köhrle J (2004). Selenium and selenoproteins in mammals: extraordinary, essential, enigmatic. *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 1988–1995.
- Schon EA, Sciacco M, Pallotti F, Chen X, and Bonilla E (1996). Mitochondrial DNA mutation and aging. *Cellular aging and cell death.*, Ed., Wiley-Liss, Inc., pp:19-34.
- Schweigel M, and Martens H (2000). Magnesium transport in the gastrointestinal tract. *Front. Biosci.*, 5: 666-677.
- Schweigel M, Lang I, and Martens H (1999). Mg<sup>2+</sup> transport in sheep rumen epithelium: evidence for an electrodiffusive transport. *Am. J. Physiol., (Gastrointest. Liver Physiol.)* 277:G976-G982.

- Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA (2007). A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J. Nutr. Biochem.*, 18:567-79.
- Seiichiro H, and Nobumasa I (2000). New aspects of physiological and pharmacological roles of selenium. *J. Health Sci.*, 46(6):393-398.
- Sevaniam A, and Hoshstein D (1985). Mechanism and consequences of lipid peroxidation in biological system. *Ann. Rev. Nutr.*, 5:365-390.
- Sharp P, Tandy S, Yamaji S, Tennant J, Williams M, and Singh Srani SK (2002). Rapid regulation of divalent metal transporter (DMT1) protein, but not mRNA expression by non-haem iron in human intestinal Caco-2 cells. *FEBS Lett.*, 510:71-76.
- Shils ME (1999). Magnesium. In: Shils M, Olson JA, Shike M, and Ross AC (Eds.). *Nutrition in Health and Disease*, 9<sup>th</sup> ed. Baltimore: Williams & Wilkins, pp:169-192.
- Shimizu T, Morishima S, and Okada Y (2000). Ca<sup>2+</sup> sensing receptor-mediated regulation of volume-sensitive Cl<sup>-</sup> channels in human epithelial cells. *J. Physiol.*, 528:457-472.
- Sisk CL, and Zehr JL (2005). Pubertal hormones organize the adolescent brain and behaviour. *Front. Neuroendocrinol.*, 26: 163-174.
- Sjodin B, Hellsten A, Westing Y, and Apple FS (1990). Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. *Sport Med.*, 10:236-254.
- Schneider JM, Fujii ML, Lamp CL, Lönnerdal, B, Dewey KD, and Zidenberg-Cher S (2008). The use of multiple logistic regression to identify risk factors associated with anemia and iron deficiency in a convenience sample of 12–36-mo-old children from low-income families. *Am. J. Clin. Nutr.*, 87, 614-620.
- Sohal RS, Svensson L, and Brunk UT (1990). Hydrogen peroxide production by liver mitochondria in different species. *Mech. Ageing Dev.*, 49:129-135.

- Spencer H, Norris C, and Williams D (1994). Inhibitory effects of zinc on magnesium balance and magnesium absorption in man. *J. Am. Coll. Nutr.*, 13(5):479-484.
- Stadman ER (1990). Metal iron-catalysed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radic. Biol. Med.*, 9: 315-325.
- Stadman ER (1992). Protein oxidation and aging. *Science*, 257:1220-1224.
- Stephenson LS, Lathan MC, and Ottesen EA (2000). Global malnutrition. *Parasitology*, 121:S5-S22.
- Sternlieb I, and Janowitz HD (1964). Absorption of copper in malabsorption syndromes. *J. Clin. Invest.* 43(6):1049-1055.
- Sternlier I, Morell AG, Bauer CD, Combes B, De Bobes-Sternberg S, and Schein-Berg IH (1961). Detection of the heterozygous carrier of the Wilson's disease gene. *J. Clin. Invest.* 40(4):707-715.
- Stipanuk MH (2000). Biochemical and physiological aspects of human nutrition. PA: W.B. Saunders Company, Philadelphia , pp: 656.
- Stopler T, and Herbert V (1999). Nutrition E.T.C. for the millennium. Plainview, NY, Nutrition ETC.
- Swain JH, Tabatabai LB, and Reddy MB (2002). Histidine content of low molecular weight beef proteins influences nonheme iron bioavailability in Caco-2 cells. *J. Nutr.*, 135:245-251.

## T

- Tanaka N, and Kiyosawa K (2004). Phlebotomy: a promising treatment for chronic hepatitis. *C. J. Gastroenterol.* 39, 601-603.

Tandy S, Williams M, Legget A, López-Jimenez M, Dedes M, Ramesh B, Srani SK, and Sharp P.

(2000). Nramp2 expression is associated with pH-dependent iron uptake across the apical membrane of human intestinal Caco-2 cells. *J. Biol. Chem.*, 275:1023-1029.

Tenenhouse HS (2005). Regulation of phosphorus homeostasis by the Type IIa Na/phosphate cotransporter. *Ann.. Rev. Nutr.*, 25:197-214.

Tenenhouse HS, Roy S, Martel J, and Gauthier C (1998). Differential expression, abundance and regulation of Na<sup>+</sup>-Phosphate cotransporter genes in murine kidney. *Am. J. Physiol.*, 275:F527-534.

Tian L, Cai Q, and Wei H (1998). Alterations of antioxidants enzymes and oxidative damage to macromolecules different organs of rats during aging. *Gene* 209(1-2):23-30.

Trinder D, Fox C, Vautier G, and Olynik JK (2002). Molecular pathogenesis of iron overload. *Gut.*, 51:290-295.

Tunderman L, Myllyla R, and Kivirikko KI (1977). Mechanism of the prolyl hydroxylase reaction. Role of co-substrates. *Eur. J. Biochem.* 80: 341-348.

Turnlund JR (1999). Copper. In: Shils ME, Olson JA, Shike M, and Ross A.C. (Eds.). *Modern nutrition in health and disease*. 9<sup>th</sup> Ed; Baltimore: Williams & Wilkins, pp: 241-252.

## U

Utermohlen V (2000). Diet, nutrition and drug interactions. In: Shils ME, Olson JA, Shike M, and Ross AC (Eds.). *Modern nutrition in health and disease* 9<sup>th</sup> ed., Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, pp: 1619-1641.

Uzel C, and Conrad ME (1998). Absorption of heme iron. *Semin. Dermatol.*, 35:27-34.



**V**

Viña J, Sastre J, Anton V, Rivelles M, Bruseghini L, Esteras A, and Asensi M (1993). Role of antioxidants in aging prevention. *J. Clin. Nutr. Gastroent.*, 8(S):S30-S33.

Vives Corrons JL, Miguel-Garcia A, Pujades MA, Miguel-Sosa A, Cambiazzo S, Linares M, Dibarrart MT, and Calvo MA (1995). Increased susceptibility of microcytic red blood cells to in vitro oxidative stress. *Eur. J. Haematol.* 55:327–331.

Vulpe CD, Kuo YM, Murphy TL, Cowley L, Askwith C, Libina N, Gitschier J, and Anderson GJ (1999). Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nat. Genet.*, 21:195-199.

**W**

Waheed A, Grubb JH, Zhou XY, Tomatsu S, Fleming RE, Costaldi ME, Britton RS, Bacon BR, and Sly WS (1999). Regulation of transferrin-mediated iron uptake by HFE, the protein defective in hereditary hemochromatosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:1579-1584.

Waheed A, Parkkila S, Saarnio J, Fleming RE, Zhou XY, Tomatsu S, Britton RS, Bacon BR, and Sly WS (2002). Association of HFE protein with transferrin receptor in crypt enterocytes of human duodenum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 99:3117-3122.

Waheed A, Parkkila SXY, Tomatsu S, Tsuchihashi Z, Feder JN, Schatzman RC, Britton RS, Bacon BR, and Sly WS (1997). Hereditary hemochromatosis: effects on C282Y and H63D mutations on association with  $\beta_2$ -microglobulin intracellular processing, and cell surface expression of the HFE protein in COS-7 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 94:12384-12389.

- Walter H, Hertling I, Benda N, Konig B, Ramskogler K, Riegler A, Semler B, Zoghiami A, and Lesch OM (2001). Sensivity and specificity of carbohydrate-deficient transferrin in drinking experiments and different patients. *Alcohol*, 25:189-194.
- Weaver CM (2001). Calcium. In: Bowman BA and Russell RM, (Eds.). Present Knowledge in nutrition (8<sup>th</sup> ed.) Washington D.C. International Life Sciences Institute.
- Weaver CM, and Heaney RP (1999). Calcium. In: Shils M, Olson JA, Shike M, and Ross AC, (Eds.) Nutrition in Health and Disease, 9<sup>th</sup> ed. Baltimore, pp:141-155.
- Weaver CM, Prolux WR, and Heaney R (1999). Choices for achieving adequate dietary calcium with a vegetarian diet. *Am. J. Clin. Nutr.*, 70(3):543S-548S.
- Weber S, Schneider L, Peters M, Misselwitz J, Ronnerfarth G, Boswald M, Bonzei KE, Seeman T, Sulakova T, Kuwertz-Broking E, Gregoric A, Palcoux JB, Tasic V, Manz F, Scharer K, Seyberth HW, and Konrad M (2001). Novel paracellin-1 mutations in 25 families with familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *J. Am.. Soc. Nephrol.*, 12: 1872-1881.
- Wendel A (1993). Glutathione peroxidase. In: Cheeseman, K.H., and Slater, T.F. (Eds.). *Free Rad. Biol. Med., British Council Bulletin.*
- Whiting SJ, Anderson DJ, and Week SJ (1997). Calciuric effects of protein, and potassium bicarbonate but not of sodium chloride or phosphate can be detected acutely in adult women and men. *Am.. J. Clin. Nutr.*, 65:1465-1472.
- Whittaker P, Tufaro PR, and Rader JI (2001). Iron and folate in fortified cereals. *J. Am. Coll. Nutr.*, 20:247-254.
- Wick M, Koebe HG, and Schildberg FW (1996). Extracorporeal artificial liver: the influence of a second cell layer on the morphology and function of immobilized human hepatocytes. *Int J Artif Organs*, 19:415-421.

- Wienk KJ, Marx JJ, and Beynen AC (1999). The concept of iron bioavailability and its assessment. *Eur. J. Nutr.*, 38:51-75.
- Wolf RL, Cauley JA, Baker CE, Ferrell RE, Charron M, Caggiula AW, Salamone LM, Heaney RP, and Kuller LH (2000). Factors associated with calcium absorption efficiency in pre and perimenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.*, 72:466-471.
- Wortington MT, Cohn SM, Miller SK, Luo RK, and Berg CL (2001). Characterization of human plasma membrane heme transporter in intestinal and hepatocyte cell lines. *Am. J. Physiol.*, 280:G1172-G1177.
- Worwood M (1995). Regulación del metabolismo del hierro. *An. Nestlé.* 53:1-11.

## Y

- Yagi K (1976). A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem. Med.*, 15:212-216.
- Yang F, Wang X, Haile DJ, Piantadosi CA, and Ghio AJ (2002). Iron increases expression of iron-export protein MTP1 in lung cells. *Am. J. Clin. Physiol.*, 283:L932-L939.
- Yates AA (1998). Dietary reference intakes: the new basis for recommendations for calcium and related nutrients, B vitamins and choline. *J. Am. Diet Assoc.*, 98:699-706.
- Yeh KY, Yeh M, Watkins A, Rodríguez-Paris J, and Glass J (2000). Dietary iron induces rapid changes in rat intestinal divalent metal transporter expression. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 279:G1070-1079.
- Yoo JH, Maeng HY, Sun YK, Kim YA, Park DW, Park TS, Lee ST, and Choi JR (2009). Oxidative status in iron-deficiency anemia. *J. Clin. Lab. Anal.* 23, 319-323.
- Yung-Suk K, Akera T (1987). O<sub>2</sub> free radical: cause of ischemia-reperfusion injury to cardiac

Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase. *Am. J. Physiol.*, 252:H252-H257.

## Z

Zimmermann MB, Chaouki N, and Hurrell RF (2005). Iron deficiency due to consumption of a habitual diet low in bioavailable iron: a longitudinal cohort study in Moroccan children. *Am. J. Clin. Nutr.*, 81, 115-121.

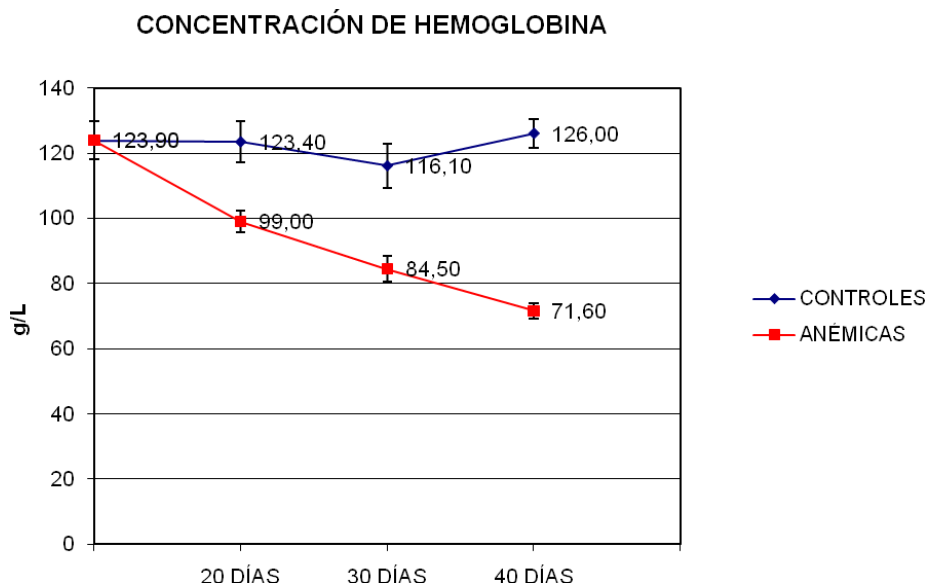
Zlotkin S (2001). Treatment of anemia with microencapsulated ferrous fumarate plus ascorbic acid supplied as sprinkles to complementary (weaning) foods. *Am. J. Clin. Nutr.*, 74:791-795.



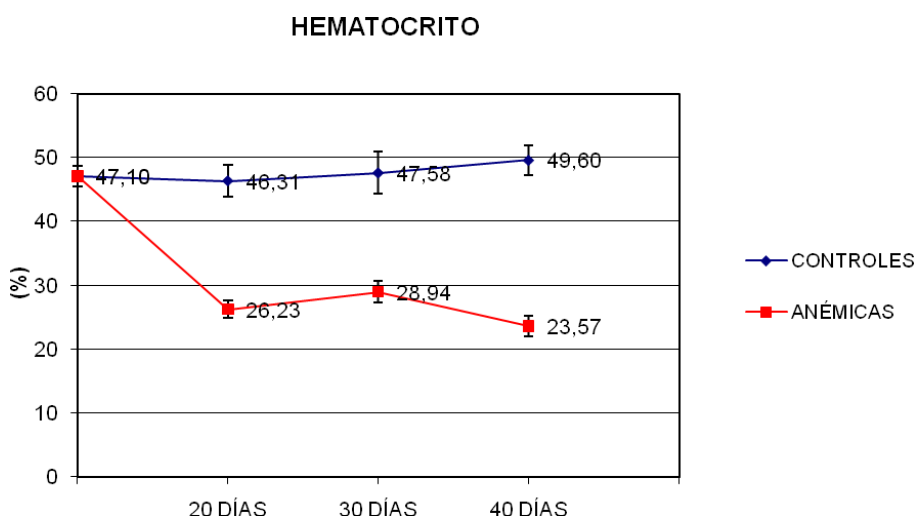
Apéndice de Figuras



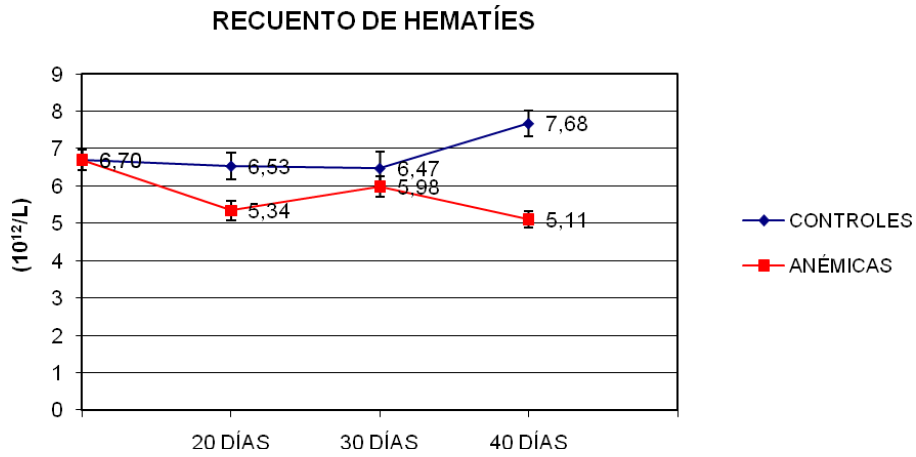
**Figura 1.** Concentración de hemoglobina (g/L) en ratas controles y anémicas durante la evolución de la anemia ferropénica nutricional.



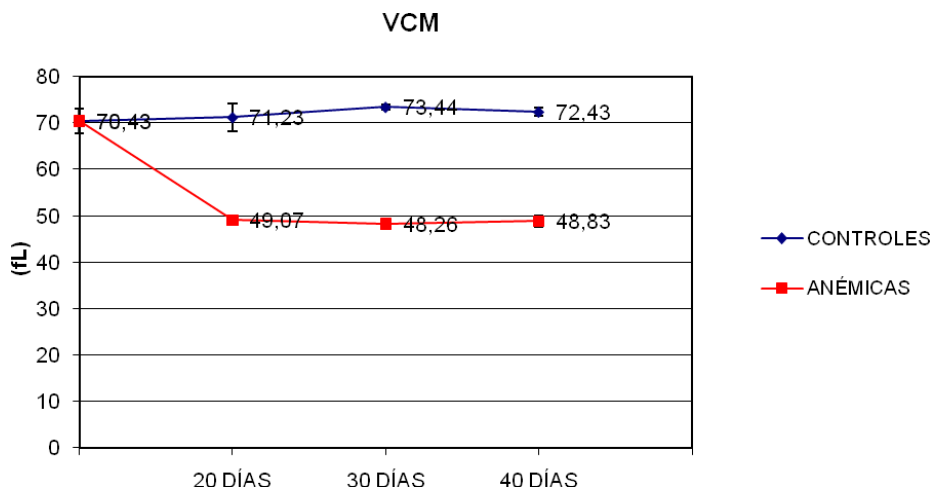
**Figura 2.** Hematocrito (%) en ratas controles y anémicas durante la evolución de la anemia ferropénica nutricional.



**Figura 3.** Recuento de hematíes ( $10^{12}/L$ ) en ratas controles y anémicas durante la evolución de la anemia ferropénica nutricional.

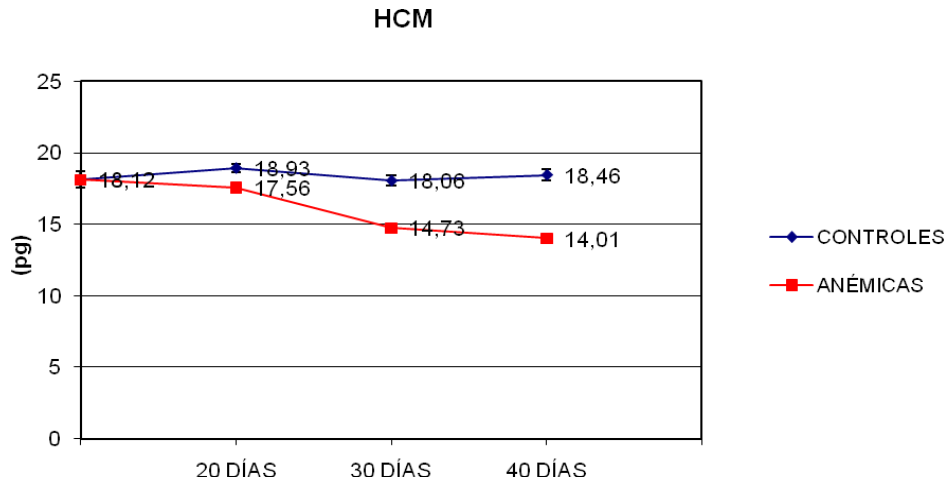


**Figura 4.** Volumen corpuscular medio (fL) en ratas controles y anémicas durante la evolución de la anemia ferropénica nutricional.

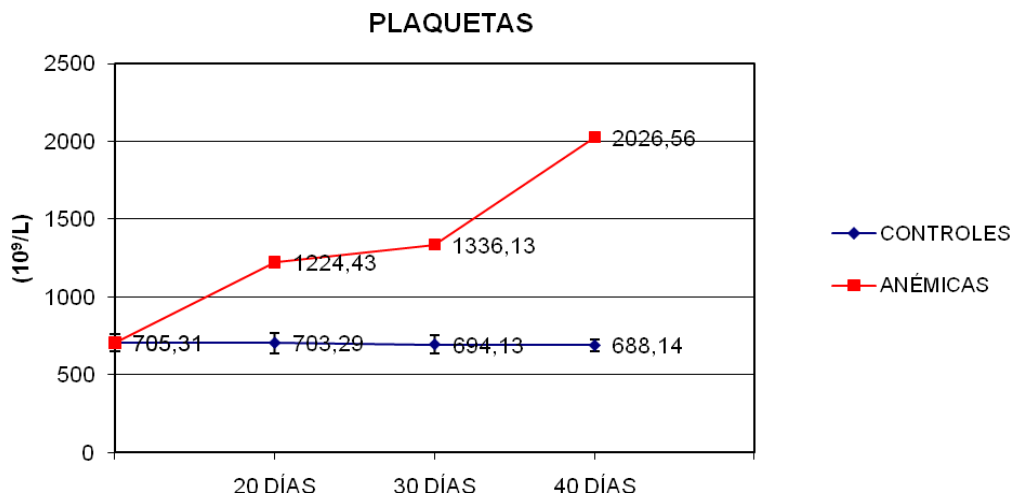




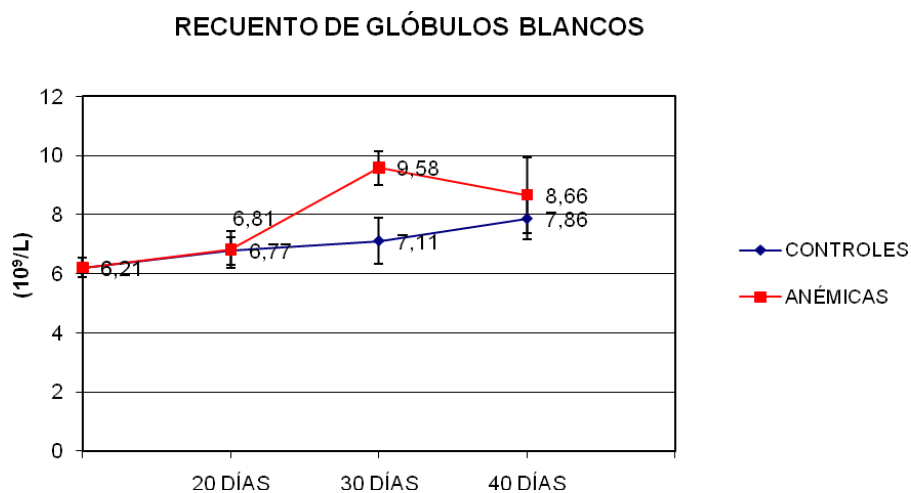
**Figura 5.** Hemoglobina corpuscular media (pg) en ratas controles y anémicas durante la evolución de la anemia ferropénica nutricional.



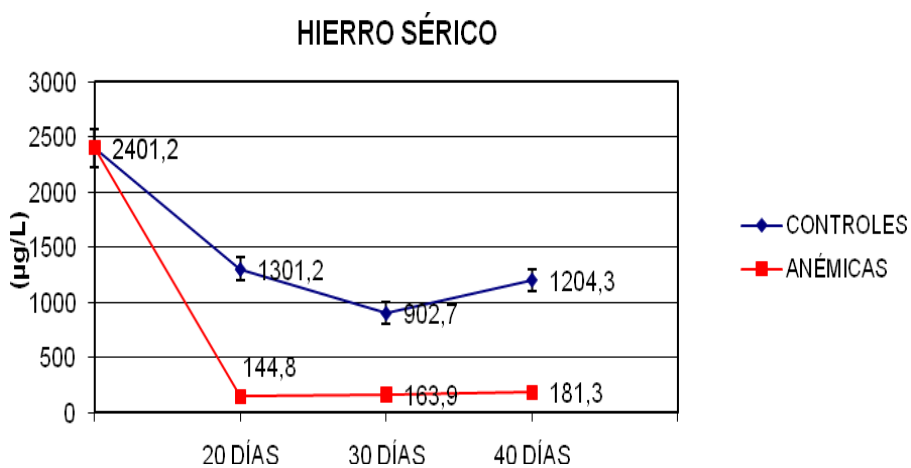
**Figura 6.** Recuento de plaquetas ( $10^9/L$ ) en ratas controles y anémicas durante la evolución de la anemia ferropénica nutricional.



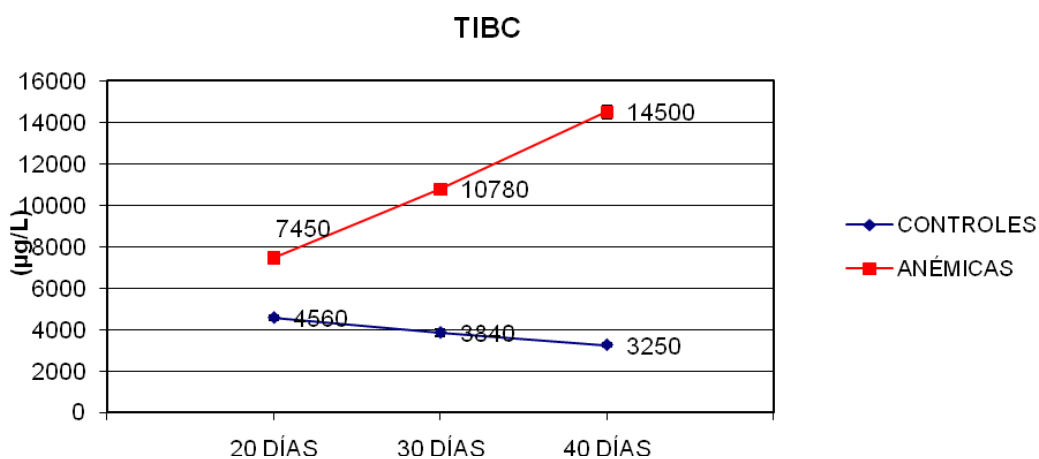
**Figura 7.** Recuento de glóbulos blancos ( $10^9/L$ ) en ratas controles y anémicas durante la evolución de la anemia ferropénica nutricional



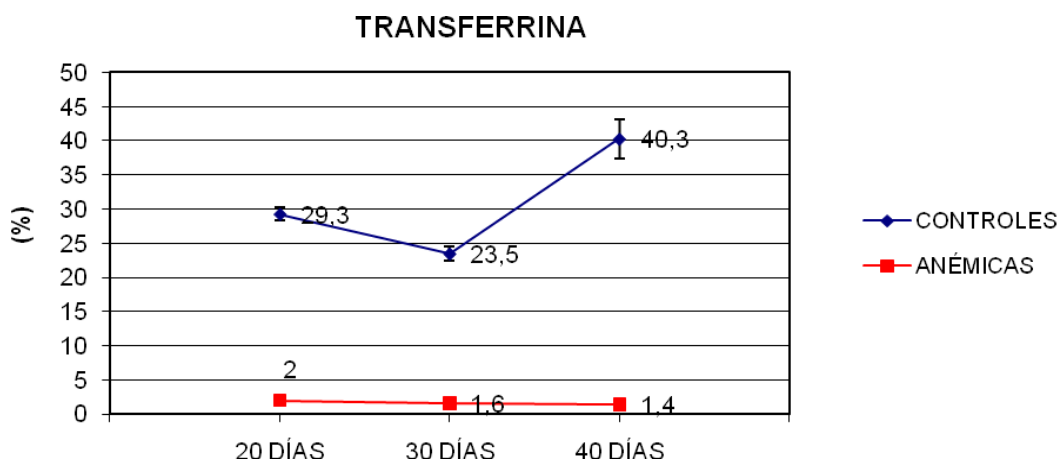
**Figura 8.** Fe sérico ( $\mu g/L$ ) en ratas controles y anémicas durante la evolución de la anemia ferropénica nutricional.



**Figura 9.** TIBC ( $\mu\text{g/L}$ ) en ratas controles y anémicas durante la evolución de la anemia ferropénica nutricional.



**Figura 10.** Porcentaje de saturación de transferrina (%) en ratas controles y anémicas durante la evolución de la anemia ferropénica nutricional.



**Figura 11.** Ferritina sérica ( $\mu\text{g/L}$ ) en ratas controles y anémicas durante la evolución de la anemia ferropénica nutricional.

