

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA  
INSTITUTO DE NUTRICIÓN Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS "JOSÉ MATAIX"**



**"EFECTO DEL SUPLEMENTO DE ÁCIDO FÓLICO EN LECHE  
(CABRA O VACA) SOBRE EL DAÑO OXIDATIVO A  
BIOMOLÉCULAS EN LA RECUPERACIÓN DE LA ANEMIA  
FERROPÉNICA".**

**TESIS DOCTORAL**

**ANA SÁNCHEZ ALCOVER**

**2014**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Ana Sánchez Alcover  
D.L.: GR 2039-2014  
ISBN: 978-84-9083-224-0



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 spread wings. The shield is supported by two columns. The entire emblem is surrounded by a circular border containing Latin text. The text is arranged in two rows: the top row reads "UNIVERSITATIS GRANATENSIS CAROLVS RO IMP SEMPER AVG HISPAN REX FVNDA TOR" and the bottom row reads "ANATENSIS CAROLVS RO IMP SEMPER AVG HISPAN REX FVNDA TOR".

*Esta memoria de Tesis Doctoral forma parte del Proyecto de  
Investigación del Ministerio de Ciencia e Innovación,  
PT\_2011\_10, Proyecto Campus de Excelencia Internacional  
(GREIB).*



D. Javier Díaz Castro. Profesor Titular de Fisiología de la  
Universidad de Granada.

D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> Inmaculada López Aliaga. Catedrática de Fisiología de la  
Universidad de Granada.

**INFORMAN:**

Que el trabajo de investigación que se expone en la Memoria de Tesis Doctoral: **"Efecto del suplemento de ácido fólico en leche (cabra o vaca) sobre el daño oxidativo a biomoléculas en la recuperación de la anemia ferropénica"** ha sido realizado bajo nuestra dirección por la Diplomada D<sup>a</sup> Ana Sánchez Alcover, con los Títulos de los Máster Oficiales de Nutrición Humana y Antropología Física y Forense y emitimos un **INFORME FAVORABLE** y **AUTORIZAMOS** su **PRESENTACIÓN** para aspirar al Grado de Doctor por la Universidad de Granada ante el Tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, extendemos el presente informe en Granada, a 21 de Abril de dos mil catorce.



**JAVIER DÍAZ CASTRO, PROFESOR TITULAR DE FISIOLÓGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA Y TUTOR DE LA DOCTORANDA D<sup>a</sup> ANA SÁNCHEZ ALCOVER,**

**INFORMA:**

Que la Diplomada D<sup>a</sup> Ana Sánchez Alcover ha realizado el Máster Oficial de “Nutrición Humana” y el Máster Oficial de "Antropología Física y Forense", obteniendo en todos los cursos y en los TFM de ambos máster la máxima calificación de SOBRESALIENTE. Asimismo, ha realizado eficientemente las acciones formativas adecuadas para enriquecer su formación.

Por otra parte, ha llevado a cabo un importante y actual trabajo de investigación, titulado “Efecto del suplemento de ácido fólico en leche (cabra o vaca) sobre el daño oxidativo a biomoléculas en la recuperación de la anemia ferropénica” demostrando una excelente capacidad científica en la búsqueda de antecedentes bibliográficos, en el desarrollo metodológico de los experimentos, ha procesado estadísticamente los resultados y posteriormente los ha discutido, lo cual le ha permitido obtener conclusiones interesantes.

En todo momento la Diplomada Sánchez Alcover ha demostrado unas excelentes cualidades humanas de superación.

Todo lo anterior me lleva a emitir un INFORME MUY FAVORABLE de la labor realizada por la Doctoranda D<sup>a</sup> Ana Sánchez Alcover.

Granada a 21 de Abril de 2014







**MEMORIA QUE PRESENTA ANA SÁNCHEZ ALCOVER PARA ASPIRAR AL  
GRADO DE DOCTOR POR LA UNIVERSIDAD DE GRANADA**

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

Prof. Dr.D. Javier Díaz Castro

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

Ana Sánchez Alcover

Granada, 2014



La doctoranda ANA SÁNCHEZ ALCOVER y los directores de la tesis Dra., M<sup>a</sup> INMACULADA LÓPEZ ALIAGA y Dr. JAVIER DÍAZ CASTRO, garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por la doctoranda bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza. En la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 21 de Abril de 2014

Director/es de la Tesis

Doctoranda

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

Fdo.: Ana Sánchez Alcover

Fdo.: Javier Díaz Castro







Quiero mostrar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible esta Tesis.

En primer lugar a mis dos directores:

A la Profesora M<sup>a</sup> Inmaculada López Aliaga, por la atención, horas de dedicación pero sobre todo por el cariño que me ha demostrado siempre.

Y al Profesor Javier Díaz Castro, a quien siempre estaré profundamente agradecida, por su comprensión, su ayuda, su enorme esfuerzo y la ilusión que ha puesto en la realización de este proyecto. Por ser un gran profesor y un gran amigo.

Al Grupo de Investigación, y especialmente a M<sup>a</sup>José Muñoz Alferez y Silvia Hijano Fernández, que han sido parte fundamental en el desarrollo de las determinaciones experimentales de la Tesis.

A la Directora del Departamento de Fisiología y coordinadora del Programa de Doctorado de Nutrición y Ciencias de los Alimentos, María López-Jurado Romero de la Cruz, que ha facilitado los trámites burocráticos y ha mostrado un especial interés por el correcto desarrollo de la Tesis.

Al Director del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Jesús Rodríguez Huertas.

A Encarna Rebollo por sus muestras de cariño.

A mis padres, a mi hermana Elisa y a Óscar, por brindarme su apoyo y confianza, respetando siempre mis decisiones, guiarme con sus buenos consejos y fomentar en mí el deseo de superación.

A todos mis tíos y primos por lo querida que me he sentido siempre por ellos.



A mi tía Margarita, de la que cada día aprendo tanto. También por su cariño, apoyo incondicional y gran ayuda en mi formación. Gracias por transmitirme la ilusión por la investigación.

A Marga y Miguel por el entusiasmo con el que viven todos los momentos de mi vida.

A Jose, por estar a mi lado, por su comprensión, motivación y apoyo para lograr mis propósitos, por el entusiasmo con que me anima a perseguir mis sueños y enseñarme que con esfuerzo y trabajo se puede alcanzar cualquier meta.

Al Departamento de Fisiología de la Facultad de Farmacia.

Y a todos los que ocupan un lugar especial en mi vida. A todos, muchas gracias.

**A mis padres, por enseñarme lo que han  
recogido a su paso por la vida y hacer de  
mi lo que hoy soy.**



“Nunca una noche ha vencido al amanecer, y  
nunca un problema ha vencido la esperanza”.

**Bern Williams**







|   |    |
|---|----|
| 1. OBJETO.....  | 1  |
| 2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS  |    |
| 2.1. El hierro en la nutrición .....  | 3  |
| 2.1.1. Introducción.....  | 3  |
| 2.1.2. Deficiencia de hierro. ...   | 4  |
| 2.1.3. Manifestaciones clínicas de la anemia ferropénica nutricional .....  | 6  |
| 2.1.4. Tratamiento de la ferropénica. Sobrecarga oral de hierro .....       | 10 |
| 2.1.5. Patologías relacionadas con la sobrecarga de hierro .....            | 13 |
| 2.1.5.1. Causas de la sobrecarga de hierro.....                             | 13 |
| 2.1.5.2. Hemocromatosis hereditaria .....                                   | 14 |
| 2.1.5.3. Mecanismos de toxicidad del hierro.....                            | 19 |
| 2.1.6. Funciones del hierro .....   | 21 |
| 2.2. Fuentes alimentarias de hierro y biodisponibilidad.....                | 24 |
| 2.2.1. Requerimientos.....  | 32 |
| 2.2.2. Absorción intestinal y transporte de hierro .....                    | 35 |
| 2.2.3. Mecanismos homeostáticos del hierro .....                            | 39 |
| 2.3. Radicales libres y mecanismos de defensa antioxidante.....             | 44 |
| 2.3.1. Introducción.....  | 44 |
| 2.3.2. Tipos de radicales libres y especies reactivas del oxígeno (EROs) .. | 45 |
| 2.3.2.1. Anión superóxido.....  | 47 |
| 2.3.2.2. Peróxido de hidrógeno.....   | 48 |
| 2.3.2.3. Radical hidroxilo.....   | 48 |
| 2.3.3. Daños celulares provocados por radicales libres .....                | 51 |
| 2.3.3.1. Efectos sobre los lípidos. Peroxidación lipídica (PL).....         | 51 |
| 2.3.3.2. Efectos sobre las proteínas .....                                  | 56 |
| 2.3.3.3. Efectos sobre el material genético .....                           | 57 |
| 2.3.4. Fuentes de radicales libres y relacion con diversas patologías.....  | 58 |
| 2.4. El ácido fólico en la nutrición .....                                  | 61 |
| 2.4.1. Introducción.....  | 61 |
| 2.4.2. Estructura y características bioquímicas del ácido fólico.....       | 62 |



|   |     |
|---|-----|
| 2.4.3. Biodisponibilidad del ácido fólico .....                         | 70  |
| 2.4.3.1. Absorción de ácido fólico .....                                | 70  |
| 2.4.3.2. Transporte de ácido fólico.....                                | 72  |
| 2.4.3.3. Excreción de ácido fólico.....                                 | 73  |
| 2.4.4. Suplementación de alimentos con ácido fólico .....               | 74  |
| 2.4.5. Patologías relacionadas con la deficiencia de ácido fólico ..... | 76  |
| 2.5. Características nutricionales de la leche de cabra.....            | 87  |
| 2.5.1. Características organolépticas.....                              | 89  |
| 2.5.2. Composición de la leche de cabra .....                           | 90  |
| 2.5.2.1. Proteínas y aminoácidos .....                                  | 92  |
| 2.5.2.2. Hidratos de carbono.....                                       | 96  |
| 2.5.2.3. Lipídeos.....  | 97  |
| 2.5.2.4. Minerales .....  | 100 |
| 2.5.2.5. Vitaminas .....  | 103 |
| 2.5.2.6. Factores bioactivos .....                                      | 105 |

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

|  |     |
|--|-----|
| 3.1. Diseño experimental .....   | 107 |
| 3.2. Dietas ensayadas .....  | 110 |
| 3.3. Técnicas analíticas .....   | 112 |
| 3.3.1. Materia seca.....   | 112 |
| 3.3.2. Materia grasa .....   | 112 |
| 3.3.3. Contenido proteico .....  | 113 |
| 3.3.4. Mineralización por vía húmeda .....   | 113 |
| 3.3.4.1. Determinación de hierro .....   | 113 |
| 3.3.5. Recuento de hematíes, hemoglobina, hematocrito, volumen<br>corpuscular medio y plaquetas.....                   | 114 |
| 3.3.6. Ferritina sérica .....  | 115 |
| 3.3.7. Hierro sérico, TIBC (Capacidad total de unión al hierro) y porcentaje<br>de saturación de la transferrina ..... | 115 |
| 3.3.8. Daño oxidativo al material genético. Electroforesis en gel de células<br>aisladas (ensayo comet alcalino) ..... | 116 |

|  |            |
|--|------------|
| 3. 3.9. Obtención de muestras de citosol eritrocitario, hepático, cerebral, duodenal y determinación del contenido proteico .....  | 121        |
| 3. 3.10. Daño oxidativo a los lípidos. Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) .....  | 122        |
| 3. 3.11. Daño oxidativo a las proteínas. Determinación de grupos carbonilo .....   | 123        |
| 3.3.12. Tratamiento estadístico.....   | 124        |
| <br>   |            |
| <b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>   |            |
| 4.1. Parámetros hematológicos en situación de anemia ferropénica nutricional .....   | 127        |
| 4.2. Daño oxidativo al material genético, lípidos y proteínas en la recuperación de la anemia ferropénica nutricional con dietas basadas en leche con contenido normal o sobrecarga de hierro y suplementadas o no en ácido fólico.....    | 128        |
| 4.2.1. Daño oxidativo al material genético .....   | 128        |
| 4.2.2. Daño oxidativo a los lípidos .....  | 131        |
| 4.2.3. Daño oxidativo a proteínas .....  | 135        |
| 4.3. Discusión.....  | 135        |
| 4.3.1. Parámetros hematológicos en situación de anemia ferropénica nutricional.....  | 135        |
| 4.3.2. Daño oxidativo al material genético, lípidos y proteínas en la recuperación de la anemia ferropénica nutricional con dietas basadas en leche con contenido normal o sobrecarga de hierro y suplementadas o no en ácido fólico ..... | 136        |
| <br>   |            |
| <b>5. RESUMEN Y CONCLUSIONES .....</b>   | <b>145</b> |
| <br>   |            |
| <b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>  | <b>151</b> |
| <br>   |            |
| <b>7. APÉNDICE DE FIGURAS .....</b>  | <b>199</b> |





# OBJETO



## 1. OBJETO

Cuando la ingesta de hierro es insuficiente para satisfacer las demandas del organismo se produce anemia ferropénica nutricional, que constituye uno de los más importantes problemas de Salud Pública según la Organización Mundial de la Salud y, en el otro extremo, cuando la ingesta es muy elevada, como puede ocurrir en el transcurso de la repleción crónica con hierro, el tratamiento más frecuente para paliar esta prevalente deficiencia nutricional, se produce sobrecarga.

La tendencia actual en los países desarrollados es la prescripción de suplementos orales de hierro, basados en sobrecarga del mineral, incluso cuando existen deficiencias subclínicas de hierro, causando una amplia variedad de trastornos en el metabolismo celular. El hierro tiene la capacidad de ceder o donar electrones fácilmente y puede catalizar reacciones que dan lugar a la producción de especies reactivas altamente perjudiciales para las funciones celulares, causando un daño a las biomoléculas y teniendo como consecuencia una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos que provocan un deterioro para la célula.

Por otra parte, el Grupo de Investigación “Alimentación, Nutrición y Absorción” (AGR- 206) ha demostrado que la leche de cabra tiene efectos beneficiosos en la defensa enzimática antioxidante, incluso en situación de sobrecarga de hierro, además, mejora la utilización nutritiva de proteína, grasa y minerales en situación de ferropénica. Sin embargo, la leche de cabra es deficitaria en ácido fólico, una vitamina hidrosoluble esencial en la diferenciación y crecimiento celular, regulación del

proceso apoptótico, síntesis y reparación del ADN, además de poseer actividad antioxidante *per se*, dado su papel como *scavenger* de radicales libres.

Estos antecedentes nos han llevado a aprovechar la experiencia de nuestro grupo de investigación en situación de anemia ferropénica y estrés oxidativo y profundizar algo más en los mecanismos fisiológicos que tienen lugar durante la recuperación de dicha patología, estudiando los cambios hematológicos y el daño oxidativo a las principales biomoléculas (ADN, lípidos y proteínas), tras el consumo de dietas basadas en leche de cabra o vaca durante la repleción crónica con niveles normales o sobrecarga de Fe y con un contenido normal o con suplemento de ácido fólico.



ANTECEDENTES  
BIBLIOGRÁFICOS





## **2.1. EL HIERRO EN LA NUTRICIÓN**

### **2.1.1. INTRODUCCIÓN**

La carencia de Fe es en términos de Salud Pública, la principal causa de anemia nutricional. La anemia es un proceso patológico en el cual, la concentración de hemoglobina (Hb) en las células rojas es anormalmente baja. No hay duda de que la deficiencia de Fe es la causa de la gran mayoría de anemias. La anemia por deficiencia de Fe o anemia ferropénica nutricional (AFN) se caracteriza por la reducción o ausencia de depósitos de Fe, bajos niveles de Fe sérico y Hb, reducción del hematocrito y niveles de plaquetas incrementados (Campos y col., 1998), bajo porcentaje de saturación de transferrina, disminución de ferritina sérica y un drástico incremento en la capacidad total de fijación al Fe o “total iron binding capacity” (TIBC).

Por otra parte, debido a sus efectos en el desarrollo y crecimiento, resistencia a las infecciones y asociación con la mortalidad de niños menores de dos años, se considera el mayor problema de salud pública y la deficiencia nutricional más común en el mundo. Además, la deficiencia de Fe tiene efectos negativos en la capacidad de trabajo y desarrollo motor y mental de niños, adolescentes, mujeres fértiles, embarazadas y ancianos (Stephenson y col., 2000; Grantham-McGregor y Ani, 2001; Haas y Brownlie, 2001).

La anemia ferropénica se produce cuando las pérdidas de Fe o los requerimientos del mismo superan el aporte que proporciona la dieta, con lo cual se agotan las reservas del organismo, disminuye la síntesis de enzimas ferropendientes, desciende la eritropoyesis y por último, disminuye la concentración de hemoglobina (Haas y Brownlie, 2001).

### **2.1.2. DEFICIENCIA DE HIERRO**

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

La anemia ferropénica es una enfermedad con una alta prevalencia, especialmente en niños y mujeres en edad de gestación. Los grupos que tienen un mayor riesgo de sufrir anemia ferropénica son: niños menores de 2 años, chicas adolescentes, embarazadas y la tercera edad. Las embarazadas adolescentes tienen un riesgo muy elevado 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 Fe o suplementos orales (Patterson, 2001). Se ha observado que en países poco desarrollados, la prevalencia de la anemia ferropénica en mujeres supera normalmente el 20%, mientras que en hombres (5-6%), es similar a la observada en mujeres de países desarrollados (McPhail y Bothwell, 1992).

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

Las consecuencias negativas de la anemia ferropénica en el desarrollo cognoscitivo y físico de los niños y la productividad laboral de los adultos son motivo de gran preocupación (Stoltzfus, 2001). Así, la alta prevalencia de anemia en los

pacientes quirúrgicos puede aumentar el riesgo de morbilidad y mortalidad postoperatoria (WHO, 2003).

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

La anemia por deficiencia de Fe se caracteriza por la reducción o ausencia de depósitos de Fe, baja concentración de Fe sérico, baja saturación de transferrina, una concentración de hemoglobina baja y una reducción del hematocrito. Inicialmente, los depósitos corporales de Fe, la ferritina y la hemosiderina decrecen, mientras que el hematocrito y la hemoglobina permanecen normales. Después de esto, disminuye el nivel de Fe sérico y de forma paralela aumenta la capacidad de fijación de Fe, reduciéndose el porcentaje de saturación de la transferrina. Consecuentemente, hay una rápida reducción de las células rojas en la circulación. Este estado se conoce como “deficiencia de Fe sin anemia”. La anemia por deficiencia de Fe es un estado más avanzado de hiposiderosis, caracterizado por baja concentración de hemoglobina y descenso de hematocrito, con cambios en la citología y morfología del eritrocito, los cuales dan lugar a hematíes microcíticos e hipocrómicos, además de una disfunción del transporte de oxígeno (Hercberg y Galan, 1992).

Una insuficiente ingesta de Fe biodisponible con la dieta es una causa importante de la deficiencia de Fe y en todo el mundo se están realizando intervenciones orientadas a proporcionar suplementos de Fe a sectores especialmente vulnerables de la población, en particular a las mujeres embarazadas. Los enfoques basados en la alimentación para aumentar el aporte de Fe mediante la fortificación de

alimentos y diversificación nutricional son estrategias sostenibles para prevenir la carencia de este mineral y la anemia ferropénica en la población en general (WHO, 2003).

### **2.1.3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA ANEMIA FERROPÉNICA NUTRICIONAL**

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

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

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

El bazo se encuentra discretamente aumentado en sujetos con anemia severa y de larga duración. La esplenomegalia es debida al incremento en el proceso de

destrucción de los glóbulos rojos, por disminución de la supervivencia eritrocitaria y aumento de la captación de Cr por el bazo (Lee, 1993).

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

Entre otros hallazgos que pueden presentarse en los pacientes con deficiencia de Fe merecen mención especial los siguientes: los niños con anemia ferropénica de larga duración, experimentan cambios en el esqueleto muy semejantes a los observados en la anemia hemolítica, debido a la expansión de la medula ósea, pudiendo observarse disminución del espesor de los huesos planos y aumento de tejido esponjoso; el sistema neuromuscular está por lo general poco afectado, pero se pueden presentar dolores neurálgicos, trastornos vasomotores y sensación de frío; por otra parte se puede afectar también el funcionamiento en aquellos tejidos de bajo recambio celular, por lo que estos niños con deficiencia de Fe , con edad inferior a 4 años pueden presentar estados apáticos o de irritabilidad, así como también trastornos para el aprendizaje (Osiki, 1993).

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

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

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

La biopsia de estómago practicada en anemia por deficiencia de Fe ha demostrado que en el 75% de los casos se presentan diversos grados de gastritis,

acompañada de disminución de la secreción gástrica, además se ha observado en los niños, pero no en adultos, malabsorción intestinal (Oski, 1993).

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

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

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

**Figura 1.** Frotis de paciente anémico, con hematíes microcíticos e hipocrómicos.





#### **2.1.4. TRATAMIENTO DE LA FERRODEFICIENCIA. SOBRECARGA ORAL DE HIERRO**

El suplemento de Fe oral ha sido utilizado como tratamiento de elección en la ferropdeficiencia con preferencia sobre el tratamiento con Fe parenteral. La mayor dificultad que presenta el tratamiento con Fe oral (sobrecarga oral de Fe), es que puede causar náuseas y molestias epigástricas a corto plazo tras su ingestión. Estos síntomas varían en proporción a la concentración de Fe ionizable en la parte alta del tracto gastrointestinal y puede ser reducida si se acompaña de la ingesta de alimentos, como es comúnmente consumido (Cook, 2005). Las 3 principales estrategias para corregir la ferropdeficiencia en la población son:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## **2.1.5. PATOLOGÍAS RELACIONADAS CON LA SOBRECARGA DE HIERRO**

### **2.1.5.1. CAUSAS DE LA SOBRECARGA DE HIERRO**

El exceso de absorción intestinal de Fe, por lo general es el resultado de alteraciones hereditarias del metabolismo de dicho mineral, pero el Fe presente en ciertos preparados farmacológicos, también puede conducir a largo plazo a un exceso de Fe en el organismo. La fuente parenteral que conduce a la sobrecarga de Fe incluye transfusiones de sangre y en menor medida la terapia con Fe-dextrano. En algunas situaciones (por ejemplo en  $\beta$ -talasemia) pueden coexistir tanto la absorción elevada de Fe, como la carga de Fe por transfusión. La sobrecarga de Fe por estos trastornos puede ser clasificada como primaria o secundaria, dependiendo del mecanismo subyacente (Pietrangelo, 2006). A continuación, se muestran los principales trastornos clínicos de sobrecarga de Fe (Anderson, 2007):

Sobrecarga primaria:

- Hemocromatosis ligada al gen de HFE (Tipo 1).
- Hemocromatosis ligada al gen de Tfr2 (Tipo 3).
- Hemocromatosis ligada al gen de FPN (Tipo 4).
- Hemocromatosis juvenil (ligada al gen de HJV) (Tipo 2A).
- Hemocromatosis juvenil (ligada al gen de hepcidina) (Tipo 2B).

Sobrecarga secundaria:

- Eritropoyesis ineficaz (p.ej.  $\beta$ -talasemia, anemia asideroblástica).
- Anemia hemolítica crónica (déficit piruvato quinasa, anemia falciforme).
- Anemia hipoplásica (fallo renal crónico, anemia aplásica).

Otros tipos:

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

#### **2.1.5.2. HEMOCROMATOSIS HEREDITARIA**

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

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

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

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

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

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

como se hace evidente por los bajos niveles urinarios de hepcidina en estos pacientes (Kearney y col., 2007).

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

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

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

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

- El tipo 1 HH con trastorno de sobrecarga de Fe más común, que ocurre debido a mutaciones en el gen HFE. La proteína principal de histocompatibilidad transcrita por este gen forma un complejo con  $\beta$ -2-microglobina (Feder y col., 1996). Dos mutaciones predominantes en este gen (Feder, 1997) interfieren con su capacidad de unión al complejo con  $\beta$ -2-microglobina y también cambian la unión con TfR1. El papel y la participación de hepcidina en la regulación de este complejo no están bien dilucidados. En este tipo de hemocromatosis, la absorción aumentada de Fe y la eliminación de Fe en el hígado, corazón, páncreas y la piel, conduce tarde o temprano a cirrosis hepática, fibrosis y diabetes.

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

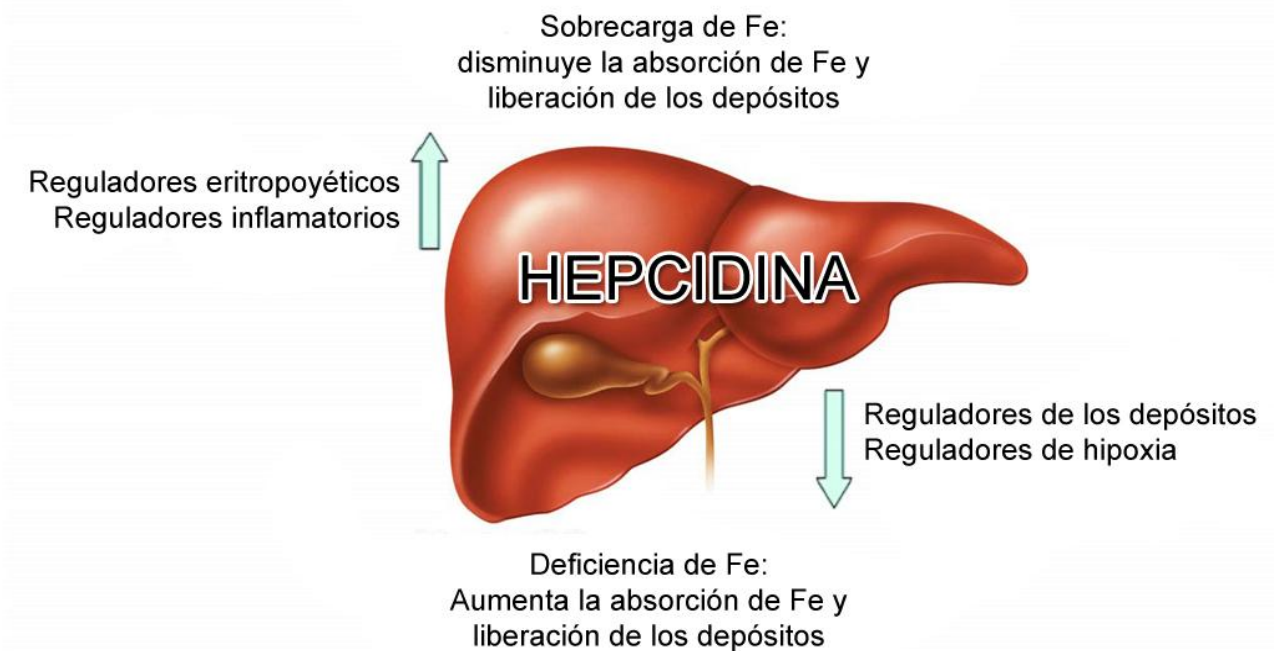
-El tipo 3 HH causada por mutaciones en TfR2, un homólogo de TfR1, con una distribución tisular limitada. La sobrecarga de Fe en esta enfermedad es lenta y no fatal. Los estudios sobre TfR2 apuntaron que mutaciones génicas en ratones parecen estar



asociadas con la producción disminuida de hepcidina y en consecuencia la sobrecarga de Fe (Domenico y col., 2008).

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

**Figura 2.** Mecanismo de acción de la hepcidina (modificado de Nadadur y col., 2008).



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

### **2.1.5.3. MECANISMOS DE TOXICIDAD DEL HIERRO**

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

Esposito y col. (2003) han definido el Fe lábil en plasma, como la forma no unida a transferrina que tiene actividad redox, es quelable, y capaz de entrar en los

órganos e inducir sobrecarga de Fe en los tejidos. Además, el Fe lábil intracelular puede proceder de la degradación de la transferrina.

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

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

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

### 2.1.6. FUNCIONES DEL HIERRO

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

-Transporte y almacenamiento de oxígeno en los tejidos: El grupo hemo forma parte de la hemoglobina y mioglobina y está compuesto por un átomo de Fe. Estas proteínas están implicadas en el transporte y almacenamiento de oxígeno en nuestro organismo. La hemoglobina es la principal proteína de las células rojas de la sangre y representa aproximadamente 2/3 de todo el Fe presente en el organismo. El papel vital que desempeña la hemoglobina en el transporte de oxígeno desde los pulmones al resto del organismo deriva de su capacidad única para captar oxígeno rápidamente, durante el corto intervalo de tiempo que está en contacto con los pulmones, y liberar posteriormente este oxígeno según las necesidades a través de su circulación por los distintos tejidos. La mioglobina juega un papel fundamental en el transporte y almacén de oxígeno a corto plazo en las células musculares, regulando el oxígeno de acuerdo a la demanda por parte de los músculos cuando entran en acción (Beard, 2001).

-Sensibilización al oxígeno: Un inadecuado aporte de oxígeno, (p. ej. el que experimentan las personas que viven a grandes altitudes, o los que sufren una enfermedad crónica de pulmón) induce una respuesta compensatoria fisiológica que incluye un aumento de la formación de células rojas, un aumento del crecimiento de

vasos sanguíneos (angiogénesis) y una mayor producción de enzimas utilizadas en el metabolismo anaerobio. Bajo condiciones de hipoxia, los factores de transcripción conocidos como factores inducibles por la hipoxia, se unen a elementos de respuesta en ciertos genes que codifican varias proteínas implicadas en la respuesta compensatoria a la falta de oxígeno e incrementan la síntesis de dichas proteínas. Recientes estudios revelan que la enzima prolil-hidroxilasa Fe-dependiente juega un papel crucial en la regulación de estos factores inducibles por la hipoxia y consecuentemente en la respuesta fisiológica a esta situación. Cuando la tensión celular es adecuada, las subunidades  $\alpha$  de los recién sintetizados factores inducibles por la hipoxia, son modificados por la enzima prolil-hidroxilasa en un proceso dependiente de Fe que las hacen muy sensibles a la degradación. Cuando la tensión celular de oxígeno cae por debajo de un umbral crítico, la prolil-hidroxilasa no puede modificar la subunidad  $\alpha$  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: El Fe interviene en el transporte de energía en todas las células, en la producción de ATP mitocondrial donde participan multitud de enzimas que contienen Fe hemo y no hemo. Los citocromos que tienen al grupo hemo en su composición, presentes en prácticamente todas las células, ejercen su función en la cadena de transporte electrónico mitocondrial, transfiriendo electrones y almacenando energía gracias a las reacciones de oxidación y reducción del Fe. Numerosos xenobióticos insolubles en agua y moléculas orgánicas tóxicas son transformadas por el sistema del

citocromo P-450 hepático, en otras moléculas mucho mas hidrosolubles que pueden ser excretadas por vía biliar (Beard, 2001).

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

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

-Síntesis del ADN: La ribonucleótido reductasa es una enzima dependiente de Fe requerida para la síntesis del ADN y división celular, de hecho, esta enzima tiene un papel limitante en la síntesis del ácido desoxirribonucleico (Beard, 2001). Se ha observado en ferodeficiencia un aumento en la eliminación urinaria de catecolaminas, un aumento de la fenilalanina en la sangre y de la adeniltirosina hidroxilasa con la disminución de la síntesis del ADN (Hillman y Ault, 1995).

-Sistema nervioso: El Fe tiene un papel importante en el sistema nervioso central ya que participa en la regulación de los mecanismos bioquímicos en el cerebro, en la producción de neurotransmisores y otras funciones encefálicas relacionadas con la atención, aprendizaje y la memoria como así también en ciertas funciones motoras y reguladoras de la temperatura. En ferodeficiencia, se pueden afectar determinadas estructuras cerebrales que requieren un contenido relativamente elevado de Fe, como demuestra el dato indirecto de las reservas hepáticas de dicho elemento. Las funciones

más afectadas son las relacionadas con el sistema dopaminérgico de neurotransmisión, posiblemente porque conduce a una disminución del receptor D2 de la dopamina, asociado con alteración del catabolismo de las aminas biógenas como la serotonina y el de opiopéptidos endógenos. En el nacimiento solo existe en el encéfalo un 10% del Fe presente en la edad adulta, aumentando el contenido neuronal hasta el 50% a los 10 años y alcanzando el nivel máximo entre los 20 y 30 años. Se ha observado en animales de experimentación, que si no se alcanzan los niveles de Fe, sobre todo durante la época de crecimiento, no se pueden conseguir posteriormente a pesar de un importante suministro, lo que conlleva un riesgo de afectación neuronal (Hallterman y col., 2001).

## **2.2. FUENTES ALIMENTARIAS DE HIERRO Y BIODISPONIBILIDAD**

La biodisponibilidad está definida como la eficiencia con la cual el Fe obtenido de la dieta es utilizado biológicamente (Wienk y col., 1999), depende del tipo de Fe que se suministre en los alimentos, de la cantidad del mismo, de la combinación de alimentos en una comida, el estado nutricional del Fe y de algunos eventos que requieran modificar la movilización de Fe entre los tejidos o la absorción del mismo como la eritropoyesis aumentada, la hipoxia y las infecciones (Hallberg, 1981; Raja y col., 1988; Lynch, 1997; Hallberg y col., 1998; Gaitán y col., 2006). La absorción de Fe se encuentra aumentada durante la deficiencia del metal, las anemias hemolíticas y en la hipoxia, mientras que en los procesos infecciosos o inflamatorios existe una reducción de la absorción del mismo.

Varios factores afectan la biodisponibilidad del Fe de la dieta. La tasa de absorción depende del estatus de Fe del individuo, es decir, del nivel de este nutriente en los depósitos del organismo. Una baja cantidad de Fe en los depósitos implica una

mayor tasa de absorción. Individuos con anemia ferropénica son capaces de absorber entre un 20 y un 30% del Fe presente en la dieta, mientras que un individuo sin anemia sólo absorbe un 5-10% del total ingerido (Zlotkin, 2001; Conrad y Umbreit, 2002).

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

El Fe es el único micronutriente cuya biodisponibilidad se puede determinar directamente, lo que se logra mediante técnicas que cuantifican la cantidad de una dosis de los isótopos radioactivos  $^{55}\text{Fe}$  o  $^{59}\text{Fe}$ , o bien de los isótopos estables  $^{57}\text{Fe}$  o  $^{58}\text{Fe}$ , que se incorpora a la hemoglobina. Se asume como constante que entre el 80-90% del metal absorbido se usa para la síntesis de hemoglobina. Debido a que no hay una vía específica de excreción, es posible utilizar indistintamente los términos de biodisponibilidad y absorción (Fairweather-Tait, 2001a).

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

El Fe no hemo es la mayor fuente del mineral en la dieta de las poblaciones de los países en vías de desarrollo. El Fe hemo se halla en las carnes (rojas y blancas) y la sangre, también existe un contenido muy bajo de Fe hemo en las semillas de las plantas, asociado a los anillos tetrapirrólicos de la clorofila, el sirohemo, la fitocromobilina e incluso al grupo Hemo (Santana y col., 1998). A pesar del alto contenido de Fe no hemo de los alimentos, su biodisponibilidad varía desde menos del 1% hasta un 20%, esto se debe a que otros nutrientes de la dieta pueden aumentar o disminuir la eficiencia con la



cual es solubilizado y/o reducido por el pH gástrico, compitiendo por el transportador DMT1 en la membrana apical del enterocito o afectando el metabolismo del metal. Sólo uno de estos efectos o la combinación de varios, hace que algunos compuestos tengan importancia como inhibidores o estimuladores de la biodisponibilidad del Fe (Hallberg, 1981; Lynch, 1997; Sandstrom, 2001; Miret y col., 2003).

Potenciadores de la absorción del Fe no hemo:

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

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

-El factor carne: En la década de los 60, Layrisse propuso que el consumo de carnes a parte de contener Fe hemo aumentan la biodisponibilidad del Fe no hemo (Layrisse y col., 1968). En base a este hallazgo se propuso que la proteína de origen animal estaba implicada en este proceso. Sin embargo, estudios posteriores encontraron que este efecto positivo no se observaba con la proteína animal contenida en la clara de huevo o en la leche, la cual tiene grandes cantidades de coalbúmina (proteína quelante del metal) y caseína (proteína que oxida el  $\text{Fe}^{2+}$ ) (Hurrell y col., 1988; Emery, 1992;

Gaitán y col., 2006) por lo tanto, al efecto de las proteínas sobre la absorción del Fe no hemo se le conoce como "factor cárnico". Las proteínas de la carne además de proveer Fe hemo (altamente absorbible) favorecen la absorción de Fe no hemo promoviendo la solubilidad del Fe ferroso. El mecanismo mediante el cual el factor cárnico aumenta la absorción del Fe no hemo se relaciona con el contenido de péptidos ricos en histidinas y en enlaces sulfhidrilos de la proteína ingerida, por esto, las carnes con alto contenido de actina y mucina son las que más aumentan la biodisponibilidad; estos enlaces, promueven la solubilidad del  $\text{Fe}^{2+}$  y además, facilitan la reducción del  $\text{Fe}^{3+}$  (Mulvihill y col., 1998).

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

-Vitamina A: Es usual que las deficiencias de vitamina A y Fe coexistan en los países en vías de desarrollo y está claramente establecido que las estrategias para mejorar el estado nutricional del Fe tengan mayor efectividad cuando se realiza suplementación del metal y de vitamina A. La combinación de vitamina A con Fe se usa para mejorar la anemia ferropénica. El mecanismo mediante el cual estos dos micronutrientes interaccionan no está dilucidado, sin embargo se ha postulado que esta vitamina es necesaria para la movilización de las reservas de Fe y para la reutilización del mismo durante la hematopoyesis (Bloem, 1995; Gaitán y col., 2006); por otro lado, es posible que la vitamina A y los  $\beta$ -carotenos contribuyan en mantener solubilización

del Fe no hemo contenido en alimentos ricos en algunos compuestos que lo fijan en el lumen e impiden su absorción, tal como ocurre con los fitatos y polifenoles (García-Casal y col., 1998; Gaitán y col., 2006).

Inhibidores de la absorción del Fe no hemo:

-Ácido Fítico: presente en las legumbres, el arroz y granos enteros, si bien en las legumbres y los cereales tienen un alto contenido de Fe no hemo, no se considera una buena fuente de Fe, ya que también son ricos en fitatos (mioinositol hexafosfato) (Hurrell, 2003). Este compuesto une eficientemente varios metales en el duodeno inhibiendo su absorción (Agte y col., 2005). Debido a que las dietas de los países en vías de desarrollo son pobres en carne y ricas en legumbres y cereales, se le ha atribuido al fitato una gran responsabilidad en la génesis de las anemias ferropénicas. El efecto inhibitorio del fitato sobre la absorción del Fe no hemo se relaciona proporcionalmente con la cantidad del compuesto que se encuentra en los alimentos (Hallberg y Hulthen, 2000). La pérdida de los grupos fosfato del mioinositol hexafosfato genera los derivados mioinositol pentafofato, tetrafofato, trifosfato, difosfato y monofosfato. Esta degradación es catalizada por fitasas o por las temperaturas de cocción de los alimentos que podrían favorecer la absorción del Fe no hemo, debido a que se ha comprobado que los compuestos con menos de 5 grupos fosfato tienen una capacidad muy reducida para interferir con la biodisponibilidad de los micronutrientes minerales (Sandberg y col., 1999; Hurrell, 2003). Dentro de los programas de fortificación encaminados a prevenir las deficiencias del Fe, se contempla la adición de ácido ascórbico, debido a que al promover la reducción del metal, disminuye la cantidad de  $Fe^{3+}$  que es la forma del metal que se fija al fitato. Actualmente la industria alimentaria intenta disminuir el contenido de fitatos utilizando fitasas (capaces de degradar el ácido fítico), además se

están manipulando genéticamente algunas plantas, con el fin de producir alimentos bajos en el compuesto y de este modo disminuir la incidencia de deficiencias de Fe (Gibson y col., 2003). Pequeñas cantidades de ácido fítico (de 5 a 10 mg) pueden reducir la absorción de Fe no hemo en un 50% (Fairbanks, 1999; Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, 2004).

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

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

-Algunos minerales: La absorción del Fe no hemo se ve afectada por distintos minerales con propiedades fisicoquímicas similares en cierta medida al Fe, entre los que se encuentran el Zn, Mn, Cu y Ca (Reddy y Cook, 1997). Se ha estudiado el efecto de estos minerales en la biodisponibilidad del Fe (Sharp, 2004). El efecto de estos minerales se debe a que compiten por los transportadores de membrana de los enterocitos, modifican el estado de oxidación o interfieren en el metabolismo del Fe (Sandstrom, 2001). La interacción del Ca y el Fe es de particular importancia, debido a que, además de afectar la biodisponibilidad del Fe no hemo, es el único micronutriente implicado en la disminución de la biodisponibilidad del Fe hemo. Es sabido que el efecto del Ca sobre la biodisponibilidad del Fe es dosis dependiente, no teniendo efectos a dosis menores a 40 mg de Ca y cuando es más de 300 mg de Ca la biodisponibilidad del Fe disminuye hasta en un 50% (Hallberg y col., 1991; Gaitán y col., 2006). El Ca y

el Fe no hemo compiten por el transportador DMT1, lo cual explica este efecto. Sin embargo, López-Aliaga y col. (2000), estudiaron la influencia de la leche de cabra y vaca sobre la utilización digestiva y metabólica de Fe y Ca en ratas adultas. Este estudio demostró el efecto beneficioso de la leche de cabra, que favorece la utilización de Fe y Ca, y minimiza la interacción entre estos dos minerales. Cuando el Ca se consume junto al Fe en una comida, el Ca disminuye la absorción del Fe hemo como el no hemo. En cuanto al efecto sobre el Fe hemo, se reconoce que disminuye su biodisponibilidad cuando los dos minerales se administran en solución, pero no cuando se administra en comidas completas, es donde no se puede aislar el efecto de otros inhibidores (Grinder-Pedersen y col., 2004), a pesar de que el transporte del Fe hemo a través de la membrana apical del enterocito es diferente al del Fe no hemo, es probable que el DMT1 también esté implicado en el efecto del Ca sobre la biodisponibilidad del Fe hemo (Roughead y col., 2005). El Zn y el Fe no hemo compiten por el transportador DMT1, por lo tanto, en teoría, existe una disminución de la biodisponibilidad recíproca entre ambos microminerales. Sin embargo, estudios realizados indican que a pesar de que cuando se ingieren ambos metales en solución en relaciones de Zn:Fe mayores a 5:1, la biodisponibilidad del Fe se disminuye hasta en un 56%. Este efecto no se ve cuando la misma relación molar de los metales se consume en una mezcla de alimentos (Whittaker, 1998; Arredondo y Nuñez, 2005). Díaz-Castro y col., en 2009 encontraron que el consumo de leche de cabra resultaba beneficioso dado su contenido en vitamina C y D (Hartiti y col., 1994; Alférez y col., 2006). Sus especiales características nutricionales contribuyen a una mayor biodisponibilidad de Fe y Zn en situación de ferodeficiencia en ratas que consumen dieta basada en leche de cabra (Alférez y col., 2006; Campos y col., 2007; Nestares y col., 2008; Díaz-Castro y col., 2009). El efecto del Cu sobre la biodisponibilidad del Fe es paradójico, inicialmente, el Cu fue

reconocido como un factor antianémico debido a que la suplementación de este metal mejoraba las anemias ferropénicas, independientemente, de la suplementación con Fe, actualmente se sabe que la ceruloplasmina es una enzima dependiente de Cu implicada en la absorción intestinal y la movilización del Fe entre los distintos tejidos (Sharp, 2004) de esta forma, las deficiencias del Cu afectarían la biodisponibilidad de los dos tipos de Fe. Por otra parte, estudios realizados in vitro en células caco-2 sugieren que el Cu disminuye la biodisponibilidad del Fe no hemo, debido a que ambos metales utilizan el transportador de membrana apical DMT1 para su absorción (Arredondo y col., 2006). Se ha visto que el Mn tiene un efecto inhibitorio sobre la biodisponibilidad del Fe no hemo, pero aún no hay evidencia de que este efecto sea importante en dietas mixtas, es probable que actué sumado a los otros nutrientes y compuestos inhibidores (Rossander-Hulten y col., 1991; Gaitán y col., 2006).

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

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

### **2.2.1. REQUERIMIENTOS**

Los requerimientos de Fe en cada etapa de la vida están determinados por el estatus y los cambios fisiológicos a los que se enfrenta el organismo durante su desarrollo. Los requerimientos estimados son el promedio en respuesta de la biodisponibilidad del Fe, en un 5% para una dieta estrictamente vegetariana, un 10% en carne con ácido ascórbico y un 15% para dietas ricas en carne y frutas. Por ejemplo se estima una recomendación tres veces mayor (27.4 mg Fe/día), con Fe de un 5% de biodisponibilidad (WHO/FAO, 2004).

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

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

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

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

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

En niños prematuros y con bajo peso al nacer, la susceptibilidad de desarrollar una ferrodeficiencia es mucho mayor, ya que sus reservas corporales son menores, unido a un crecimiento postnatal más acelerado. Esto hace que las reservas se agoten más fácilmente, por lo que se hace necesario el suministro de Fe exógeno antes del 4º mes de vida.

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

En la adolescencia se produce un nuevo incremento de las demandas de Fe, como consecuencia del crecimiento acelerado. Durante el desarrollo puberal, un adolescente aumenta unos 10 Kg de peso, y debe acompañarse de un incremento de 300 mg de su Fe corporal para mantener constante los niveles de hemoglobina, que aumentan en este periodo de 50-100 g/L/año. En consecuencia, un adolescente varón requiere alrededor de 350 mg de Fe al año durante el pico de crecimiento (Uzel y Conrad, 1998). En las adolescentes las necesidades de Fe son superiores, ya que aunque



la velocidad de crecimiento es menor, se adicionan las pérdidas menstruales (Lönnerdal y Dewey, 1995). El aumento de unos 9 Kg de peso de una adolescente durante la pubertad, implica un aporte de unos 280 mg de Fe para mantener la concentración de hemoglobina en niveles adecuados. Un sangrado menstrual promedio de unos 30 mL de sangre implica la pérdida de unos 75 mg de Fe. En consecuencia, una adolescente en pleno pico de crecimiento requiere unos 455 mg de Fe al año.

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

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

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

En el hombre adulto, solo las pérdidas de Fe basal son un determinante en el requerimiento de este mineral. Se asumen pérdidas de 14 mg de Fe/Kg/día y siendo las recomendaciones de 8 mg/día. (Food and Nutrition Board, 2004).

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

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

| ETAPA             | EDAD             | HOMBRE (mg/d) | MUJER (mg/d) |
|-------------------|------------------|---------------|--------------|
| Lactantes         | 0-6 meses        | 0.27          | 0.27         |
| Lactantes         | 7-12 meses       | 11            | 11           |
| Niños             | 1-3 años         | 7             | 7            |
| Niños             | 4-8 años         | 10            | 10           |
| Niños             | 9-13 años        | 8             | 8            |
| Adolescentes      | 14-18 años       | 11            | 15           |
| Adultos           | 19-50 años       | 8             | 18           |
| Adultos           | Más de 51 años   | 8             | 8            |
| Embarazo          | Todas las edades | -             | 27           |
| Lactancia materna | 18 años o menos  | -             | 10           |
| Lactancia materna | Más de 19        | -             | 9            |

### 2.2.2. ABSORCION INTESTINAL Y TRANSPORTE DE HIERRO

El Fe de la dieta se absorbe principalmente en el intestino proximal, cerca de la unión gastroduodenal. Tres caminos se proponen en el proceso de la absorción. El Fe inorgánico no es eficientemente absorbido (Andrews, 1999). Cada transportador de

membrana es específico de un grupo de proteínas transportadoras y enzimas accesorias que cambian el estado de oxidación del Fe facilitando el proceso de transporte.

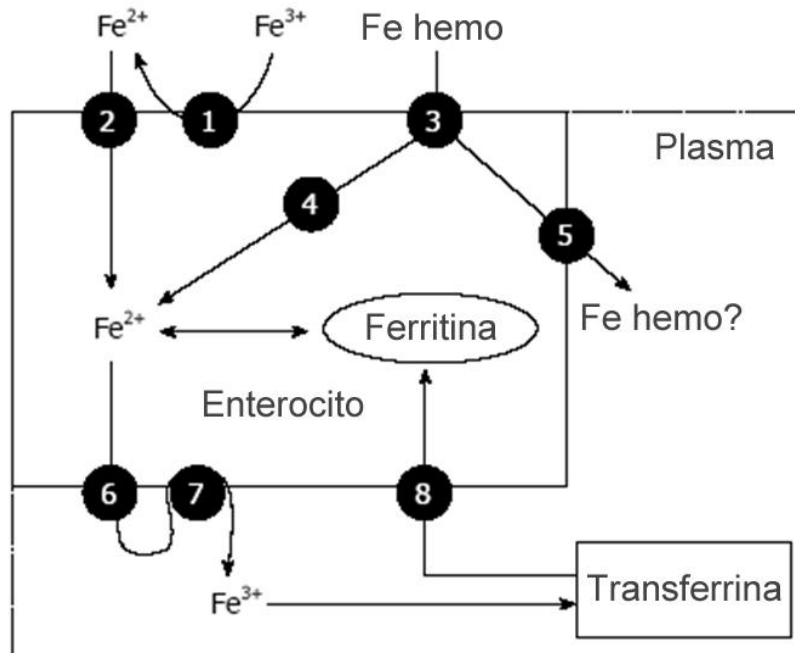
El Fe hemo es absorbido en los enterocitos por un transportador de proteínas 1 no identificado, el cual es reconocido por proteínas de membrana en el intestino proximal, donde es absorbido el grupo hemo en su mayoría. Sin embargo, queda incierto si algún grupo hemo podría atravesar las células intactas,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

El Fe no hemo o Fe elemental de la dieta es solubilizado por el medio ácido del estomago y de la luz duodenal. El Fe<sup>3+</sup> es convertido a Fe<sup>2+</sup> por el citocromo-b (Dcytb), es el primero en identificar la ferorreductasa presente en la superficie apical de los enterocitos. El incremento de la expresión de Dcytb en ferrodeficiencia indica su importancia en la bomba apical de Fe (McKie y col., 2001).

El Fe<sup>2+</sup> es transportado a través de la membrana celular por el transportador de metales divalentes 1 (DMT1), también son conocidos SLC11A2, NRAMP2 y DCT1. El DMT1 transporta otros metales divalentes como Zn, Mn, Co, Cu, Cd, Ni, Mg, etc. (Andrews, 1999; Muñoz y col., 2005), aunque es el único transportador de Fe conocido en el intestino, expresado en los endosomas de todas las células y se mantiene a través de las especies. El papel de DMT1 en la absorción intestinal es evidenciada por estudios en anemia microcítica en una mutación espontánea (G185R) en ratones y ratas de Belgrade, se encontró la causa significativa de defectos en la absorción intestinal de Fe y su asimilación por precursores eritrocitarios (Feming y col., 1998). Pero estos estudios sugieren que el DMT1 no es esencial para la transferencia placentaria o asimilación de Fe por otros tejidos (Gunshin y col., 2005). Sin embargo, mutaciones en

el DMT1 observadas en humanos con anemia congénita no causó interferencia con la absorción de Fe intestinal. Este efecto puede ser compensado con la eficaz absorción del Fe hemo, pero ha sido asociado con sobrecarga hepática de Fe.

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



- Transporte de Fe al plasma:

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

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

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

El  $Fe^{3+}$  como forma más abundante encontrada en la sangre, se encuentra en la apotransferrina en el plasma como complejo “ $Fe^{3+}$ -transferrina (Tf)”. La transferrina es una glucoproteína de 80 KDa, con dominios de unión al Fe en su extremo homólogos N- y C-terminal. Es sintetizada en el hígado, retina, testículo y cerebro.

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

Hay una clara especificidad que diferencia el porcentaje de saturación de la transferrina, siendo de un 80% en ratones y tan sólo 30% en células de humanos. También varía con el ciclo diurno (ritmo circadiano) o situaciones específicas tales

como la circulación de la vena porta y la medula ósea (Uchida y col., 1983; Andrews y Schmidt, 2007).

### **2.2.3. MECANISMOS HOMEOSTÁTICOS DEL HIERRO**

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

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

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

Por otra parte, los reguladores inflamatorios comunican una señal en respuesta a la infección o inflamación, resultado de la acumulación de Fe en los macrófagos. La homeostasis del Fe también se encuentra alterada debido a las señales de regulación en situación de hipoxia. Los reguladores implicados en la absorción intestinal pueden modular la liberación de Fe desde los hepatocitos y macrófagos, por las proteínas del suero y del plasma pudiendo actuar en múltiples lugares.

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

La expresión disminuida de la hepcidina en respuesta a la no hipoxia anémica, y su expresión aumentada en ratones y humanos con inflamación, sugiere que la hepcidina también puede participar en la mediación de la hipoxia y en la cascada de reguladores inflamatorios (Nicolas y col., 2002). La hepcidina también controla los niveles de Fe directamente actuando recíprocamente con la FPN1 (ferroportina 1), conduciendo a la internalización y degradación de FPN1 cuando los niveles de Fe son altos, por consiguiente bloqueando la liberación del Fe en los sitios de almacén, hepatocitos, enterocitos y macrófagos (Nemeth y col., 2004; Nemeth y Ganz, 2006a).

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

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

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

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



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

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

La unión de IRP a IRE en los extremos 5' UTR de ARNm codifica ferritina, ferroportina, y enzimas de la biosíntesis del grupo hemo, aminolevulinato sintetasa que interfieren con la iniciación de la traducción. Por otra parte, si la IRE está en los extremos 3' UTR de ARNm, como en el caso de TfR-1, la unión de las IRPS a múltiple IREs en los extremos 3' UTR de TFR1 conduce a la estabilización de ARNm-TfR-1 inhibiendo su degradación por la digestión de nucleasas (Hentze y col., 2004).

En condiciones de deficiencia de Fe, las IRPs activan la unión de la IRE y estabilizan al ARNm-TfR1, simultáneamente disminuyen la traducción de ARNm-ferritina, por consiguiente aumentando la respuesta de la disponibilidad de Fe en la célula. Por el contrario, cuando los niveles de Fe son altos, la unión de la IRE estará disminuida facilitando la traducción de ARNm-ferritina, disminuyendo la estabilidad

del ARNm-TfR1 y conduciendo la respuesta a la captura de Fe. La mayoría de estos mecanismos reguladores son estudiados in vitro y su papel in vivo no está claro.

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

En ratones transgénicos knockout para IRP1, IRP2 indica que el doble bloqueo produce letalidad embrionaria (Smith y col., 2004). Sorprendentemente no se observa ningún cambio fenotípico para ratones IRP1<sup>-/-</sup> que sugiere que la IRP2 puede compensar la pérdida de IRP (Hentze y col., 2004). Los ratones IRP2<sup>-/-</sup> manifestaron un aumento en el contenido de Fe y la expresión de DMT1, ferritina y ferroportina, aumentando la ferritina en suero y el contenido de Fe en hígado (Galy y col., 2005). Estas observaciones sugieren que hay otros factores no identificados que pueden participar con las proteínas IRPs en la homeostasis celular del Fe.

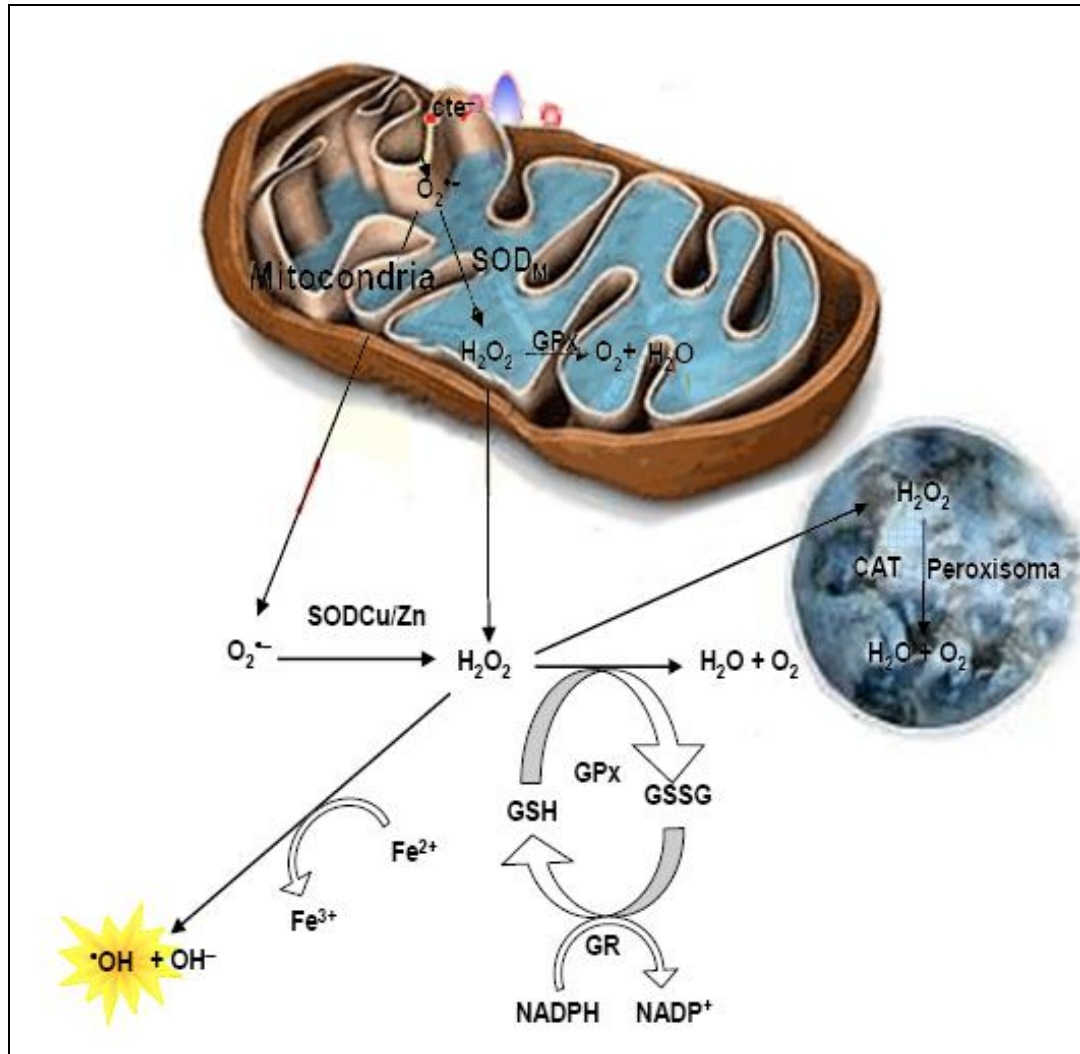
## **2.3. RADICALES LIBRES Y MECANISMOS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE**

### **2.3.1. 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 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; Murphy, 2009).

Sin embargo, en nuestro organismo existe un sistema de defensa antioxidante para evitar el daño que puede llegar a producir un aumento de los radicales libres. Debiendo existir un equilibrio entre los sistemas de defensa antioxidante y el de producción de radicales, que se conoce como balance oxidativo, que al inclinarse hacia la producción de radicales da lugar al denominado estrés oxidativo (Camougrand y Rigoulet, 2001; Remmen y Richardson, 2001; De la Fuente, 2002; Melov, 2002; Ott y col., 2007; Scherz-Shouval y Elazar, 2007). Además, se considera cada vez más que los radicales libres forman parte de la maquinaria de señalización intracelular (Cadenas y col., 2000; Navarro y col., 2001; Annunziato y col., 2003, Norberg y col., 2010).

**Figura 4.** Formación de radicales libres y su eliminación por sistemas defensivos enzimáticos.



### 2.3.2. TIPOS DE RADICALES LIBRES Y ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO (EROs)

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

La actividad como agente prooxidante de un radical libre depende de su reactividad, especificidad, selectividad y difusibilidad (Cheeseman y Slater, 1993; Lindsay y col., 2002). Estas especies oxidantes provocan daños acumulativos en moléculas fundamentales para el funcionamiento del organismo, tales como proteínas, lípidos y ADN.

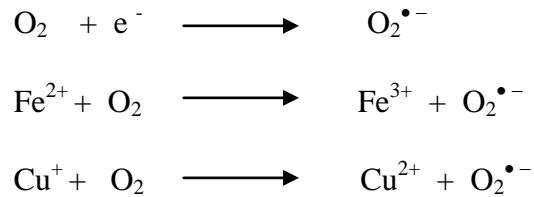
No obstante, el organismo tiene sus propios mecanismos de defensa para hacer frente a la acción de las especies oxidantes. En determinadas situaciones las defensas antioxidantes pueden verse desbordadas por la excesiva generación de EROs. Este desequilibrio entre especies oxidantes y antioxidantes se conoce como estrés oxidativo, el cual está asociado a numerosas enfermedades y al proceso normal de envejecimiento (Lee y col., 2004).

**Tabla 3.** Compuestos reactivos derivados del oxígeno (modificado de Cheeseman y Slater, 1993; Lindsay y col., 2002).

| RADICAL                       | NOMBRE                | SUSTRATO           | VIDA MEDIA                          |
|-------------------------------|-----------------------|--------------------|-------------------------------------|
| HO <sup>•</sup>               | Hidroxilo             | Cualquier molécula | 10 <sup>-9</sup> s                  |
| RO <sup>•</sup>               | R-oxilo               | LH (linoleato)     | 10 <sup>-6</sup> s                  |
| ROO <sup>•</sup>              | R-peroxilo            | LH                 | 7 s                                 |
| ROOH                          | Hidroperóxido         | LH                 | -                                   |
| L <sup>•</sup>                | Linoleil              | LH                 | 10 <sup>-6</sup> s                  |
| O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>  | Superóxido            | Enzimas            | Dismutación espontánea y enzimática |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Peróxido de hidrógeno | LH                 | Estable; Reducción enzimática       |
| NO <sup>•</sup>               | Nitroxilo             | LH                 | 5-6 s, 0.1 s (en corazón)           |
| <sup>1</sup> O <sub>2</sub>   | Singlete              | H <sub>2</sub>     | 10 <sup>-6</sup> s                  |

### 2.3.2.1. ANIÓN SUPERÓXIDO

El anión superóxido se produce en la reducción de oxígeno por la transferencia de un electrón o por autooxidación de metales de transición (Fridovich, 1983; Cheeseman y Slater, 1993; Lindsay y col., 2002):

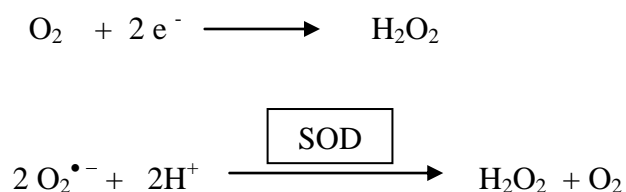


El anión superóxido, a pesar de no ser particularmente dañino, su importancia es como fuente de peróxido de hidrógeno y como reductor de metales de transición. La principal fuente de esta especie reactiva se produce en la mitocondria de forma accidental a nivel de los complejos I y III de la cadena de transporte electrónico, describiéndose que del 2-5% del oxígeno se reduce incompletamente hasta este 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  $\text{O}_2$ , aumentará proporcionalmente la generación del anión superóxido (Finkel y Holbrook, 2000; Camougrand y Rigoulet, 2001; Barbi de Moura y col., 2010).

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

### 2.3.2.2. PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

La génesis del peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) proviene de la reducción espontánea con dos electrones del oxígeno, pudiendo ser también generado en los sistemas biológicos por la reacción de dos moléculas de anión superóxido, 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, el hidroxilo (Cheeseman y Slater, 1993; Lindsay y col., 2002).

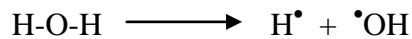
### 2.3.2.3. RADICAL HIDROXILO

El radical hidroxilo es extremadamente oxidante ya que reacciona con cualquier tipo de biomolécula (Halliwell y Gutteridge, 1989; Barbi de Moura y col., 2010). 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:

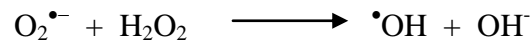
(a) Por la descomposición del peróxido de hidrógeno en presencia de metales de transición, principalmente hierro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) (Aust y col., 1985; Minotti y Aust, 1987; Soule y col., 2007; Wilcox y Pearlman, 2008) y cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) (Auroma y col., 1991). En el caso del hierro se trata de la denominada reacción de Fenton:



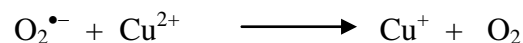
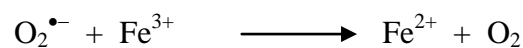
(b) Cuando se exponen los tejidos a radiaciones  $\gamma$ , la mayor parte de la energía captada es absorbida por el agua de las células. Se produce entonces la separación de una de las uniones covalentes entre el oxígeno y el hidrógeno del agua, dejando un único electrón en el hidrógeno, formando el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



(c) En la reacción llamada de Haber-Weiss no catalizada por metales de transición o también en la denominada reacción de Fenton conducida por el  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , el anión superóxido reacciona con el peróxido de hidrógeno (Halliwell y col., 1992; Soule y col., 2007; Wilcox y Pearlman, 2008):



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 (Cadenas y col., 2000; Halliwell, 2001; Remmen y Richardson, 2001; Barbi de Moura y col., 2010).

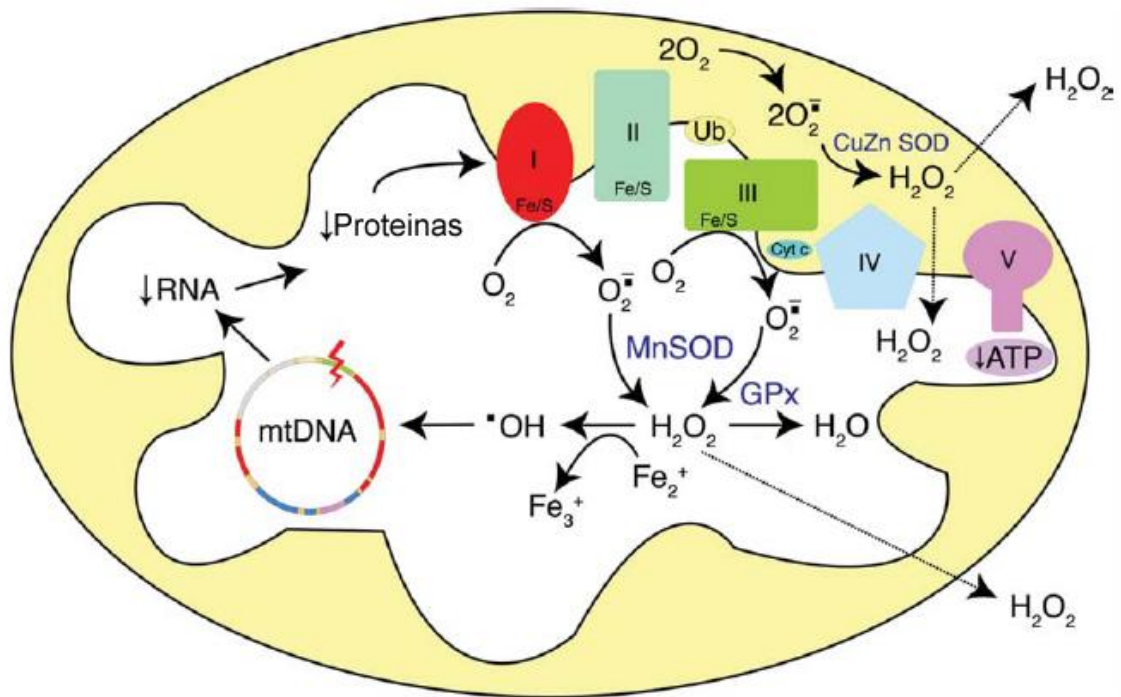
Otros radicales libres importantes son los radicales que se centran en el átomo de carbono ( $\text{R}\cdot$ ) formados a partir del ataque sobre moléculas (RH) como los lípidos. Producen la peroxidación lipídica y atacan las cadenas de ácidos grasos, ácidos



nucleicos, carbohidratos o proteínas. Estas EROs reaccionan rápidamente con el oxígeno para formar el radical peroxilo ( $\text{ROO}^\bullet$ ). Y a su vez estos pueden reaccionar y generar radicales alcoxilo ( $\text{RO}^\bullet$ ). Átomos con sulfuro también son atacados por radicales libres para producir el radical thiilo ( $\text{RS}^\bullet$ ), formado a partir de la oxidación del glutatión (Asmus, 1990):



**Figura 5.** Modelo esquemático de la producción de EROs a nivel mitocondrial (modificado de Barbi de Moura y col., 2010)



Durante la respiración mitocondrial, una pequeña cantidad del oxígeno molecular consumido por las células es convertido en el anión superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet -}$ ) mediante los complejos I y III. Las enzimas SOD (MnSOD y Cu/Zn SOD) convierten el  $\text{O}_2^{\bullet -}$  en peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), que será secuencialmente transformado en  $\text{H}_2\text{O}$  mediante la GPx. Por otra parte el  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede reaccionar con  $\text{Fe}^{2+}$  para generar radicales hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ). Este radical ataca fácilmente las moléculas, incluyendo el

mtDNA y consecuentemente altera la expresión de proteínas mitocondriales necesarias para la síntesis de ATP (Barbi de Moura y col., 2010).

### **2.3.3. DAÑOS CELULARES PROVOCADOS POR RADICALES LIBRES**

#### **2.3.3.1. 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 (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; Lindsay y col., 2002).

En la peroxidación lipídica se produce la oxigenación de ácidos grasos poliinsaturados (con 18 ó 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 ácidos grasos (Muggli, 1993; Lenaz, 1988).

Existe un mecanismo reparador del daño oxidativo de los lípidos que parece estar relacionado con la fosfolipasa A2, ya que su actividad en la membrana interna

mitocondrial parece incrementarse en situaciones asociadas a un aumento de la producción de EROs como tratamientos con endotoxinas bacterianas (Hatch y col., 1993). También se han observado aumentos de la fosfolipasa A2 en mitocondrias aisladas de ratas alimentadas con aceite de pescado (Malus y col., 1999), asociado a un incremento en la peroxidación lipídica. Por tanto, la fosfolipasa A2 parece ser una enzima reparadora que lleva a cabo la supresión de los lípidos oxidados de membrana (Van den Berg y col., 1993). Sin este mecanismo reparador, los lípidos peroxidados se acumularían y las consecuencias de esto podrían ser, entre otras, un aumento de la permeabilidad de la membrana y una pérdida del control de la respiración mitocondrial. Clásicamente el proceso de peroxidación lipídica consta de tres etapas:

1) 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 ( $L^{\bullet}$ ). 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 ( $\text{HO}_2^{\bullet}$ ) si es capaz de promover la iniciación, si bien, a pH fisiológico se encuentra a bajas concentraciones. Algunos complejos metálicos también son capaces de iniciar la peroxidación (Halliwell y Chirico, 1993).

Existe otro mecanismo de iniciación de las reacciones de peroxidación, como es la ruptura de enlaces químicos por acción fotolítica (Elgendy y Abou-Seif, 1998). No se debe olvidar el papel de las radiaciones ionizantes como mecanismo iniciador del daño

tisular. Es un hecho suficientemente conocido no sólo en la patología clínica, sino también en la industria de síntesis de polímeros, el papel de las radiaciones ionizantes y las especies intermediarias reactivas en dichos procesos (Bertsche, 1984).

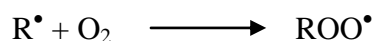
Finalmente, hay que mencionar el papel de las reacciones tóxicas desencadenadas por diversos xenobióticos como el tetracloruro de carbono, o fármacos antitumorales como la adriamicina, en cuyo mecanismo de acción farmacológica está implicada la formación de especies moleculares activadas (Valls-Bellés y col., 2002).

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.

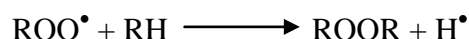
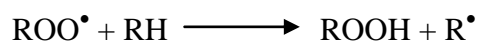
La peroxidación lipídica en membranas biológicas provoca desajustes en el funcionamiento de las mismas, cambios de la fluidez, inactivación de enzimas y receptores ligados a la membrana, así como un aumento no específico de la permeabilidad a iones tipo calcio (Halliwell y Chirico, 1993; Littarru y Battino,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

## 2) 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):



El radical peroxilo formado va a atacar a cualquier compuesto 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:



Los hidroperóxidos poliinsaturados se oxidan generando gran número de productos de reacción monoméricos y poliméricos (Cheeseman y Slater, 1993; Lindsay y col., 2002). 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; Lindsay y col., 2002).

### 3) 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  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , el cual es eliminado por la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa.

Las defensas antioxidantes juegan un papel preventivo en la peroxidación lipídica (Viña y col., 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. Es activa frente a hidroperóxidos de ácidos grasos libres pero no de los unidos a fosfolípidos, con lo cual, necesita la acción de la fosfolipasa A2. También se ha descrito una glutatión peroxidasa que no

necesita previa acción de esta enzima, se trata de una enzima dependiente de fosfolípido la cual actúa sobre hidroperóxidos de fosfolípidos y es exclusiva de la membrana mitocondrial (Ursini y Bindoli, 1987).

La transferrina y la ferritina secuestran metales, lo que hace inviable la rotura de hidroperóxidos (Halliwell y Gutteridge, 1986; Auroma y col., 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 apagar la cadena es utilizando antioxidantes por ejemplo,  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -tocoferol 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 (Kelso y col., 2002; Lenaz y col., 2002, Miyadera y col., 2002).

El  $\alpha$ -tocoferol 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 col., 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 y también 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; Lindsay y col., 2002).

### **2.3.3.2. EFECTOS SOBRE LAS PROTEÍNAS**

Las proteínas también son objeto de daño oxidativo alterándose su funcionamiento normal y por tanto su actividad biológica (Cheeseman y Slater, 1993; Melov, 2002). Alteraciones como fragmentación, agregación y susceptibilidad a la degradación proteolítica (Griffiths y cols., 1989). Así es conocida la fragmentación de la albúmina (Marx y Chevion, 1986) colágeno y  $\gamma$ -globulina (Wolf y Dean, 1986) como consecuencia del daño oxidativo. Los daños oxidativos en las proteínas originan agregación de las mismas por desnaturalización, tal y como ocurre en la ceruloplasmina (Cheeseman y Slater, 1993; Lindsay y col., 2002). Otro ejemplo de la importancia de la oxidación de proteínas lo representan las LDL o lipoproteínas de baja densidad, donde las histidinas y lisinas son modificadas por oxidación, lo que causa una alteración en el reconocimiento del receptor. (Griffiths y col., 2002).

Entre las proteínas existe una gran diferencia en la susceptibilidad frente al daño oxidativo. Por ejemplo, en una minuciosa comparación se demostró que la albúmina bovina (BSA) se oxidaba dos veces más rápido que la glutamina sintasa, y que proteínas intactas son menos sensibles a la oxidación que proteínas parcialmente desnaturalizadas (Beckman y Ames, 1998).

La oxidación proteica causa un aumento de la degradación proteolítica, incrementando la actividad de atrapadores de EROs. Además los procesos de oxidación proteica introducen frecuentemente nuevos grupos funcionales como grupos hidroxilos y grupos carbonilos, que contribuyen a alterar la movilidad y la función proteica. Una mejora en la caracterización de los efectos ha permitido identificar varios procesos secundarios que incluyen la fragmentación, el entrecruzamiento y el desdoblamiento,

que puede acelerar o impedir la proteólisis mediada por proteosomas, de acuerdo con la gravedad del daño oxidativo (Griffiths y col., 2002).

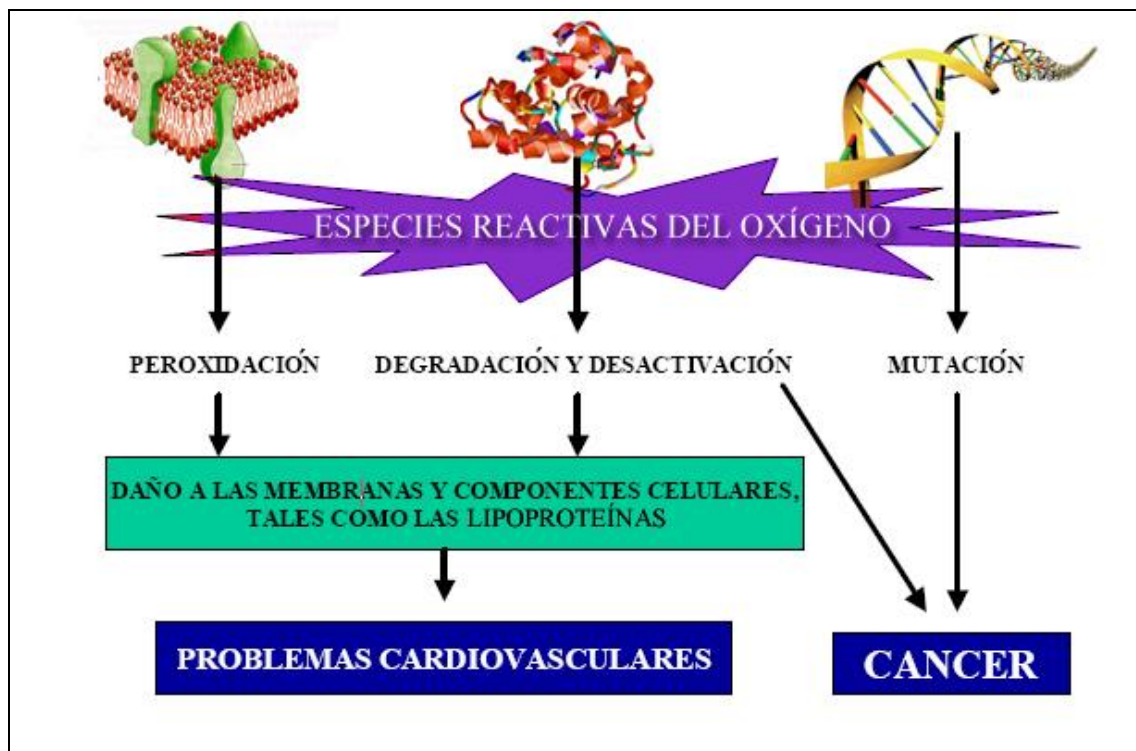
### **2.3.3.3. EFECTOS SOBRE EL MATERIAL GENÉTICO**

Algunos azúcares como la glucosa, manosa y otros desoxiazúcares se autooxidan produciendo cantidades de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que contribuyen a los niveles intracelulares de este compuesto en una concentración de 8-10 M (Lunec, 1992).

La acumulación de lesiones del ADN nuclear (fragmentaciones y deleciones) producidas por los agentes endógenos, producen alteraciones somáticas que contribuyen al envejecimiento. Según la teoría de los radicales libres la acumulación de EROs y el daño que producen sobre el ADN puede ser la causa fundamental de los cambios fisiológicos asociados al envejecimiento. El ADN nuclear aislado de varios tejidos de ratas muestran un aumento del daño oxidativo con la edad, medido con el biomarcador 8-OH-dG (Lenaz, 1988). En una célula humana cualquiera, alrededor de 500 bases sufren daño oxidativo cada día. De estas lesiones oxidativas, las más peligrosas son las roturas de doble hélice, ya que son difíciles de reparar y pueden producir mutaciones puntuales, inserciones y deleciones de la secuencia de ADN, así como translocaciones cromosómicas (Valerie y Povirk, 2003).



**Figura 6.** Esquema de los daños causados por las EROs en las biomoléculas.



#### 2.3.4. FUENTES DE RADICALES LIBRES Y RELACIÓN CON DIVERSAS PATOLOGÍAS

Los radicales libres relacionados con las enfermedades humanas derivan de cuatro fuentes:

- a) Generados en los procesos biológicos intracelulares normales pero de forma exagerada e inadecuada.
- b) Liberados por células inflamatorias en su entorno.
- c) Secundarios a xenobióticos.
- d) Otros mecanismos fisiopatológicos que participan en el envejecimiento, así como con otras enfermedades relacionadas con la edad (Halliwell y Gutteridge, 1999), tales como arteriosclerosis, cataratas, diabetes, inflamaciones crónicas de tracto

digestivo y trastornos degenerativos del sistema nervioso como el Parkinson o el Alzheimer (Multhaup y Rupper, 1997; Kester y Scheltens, 2009).

El hígado y el corazón son los objetivos principales del daño inducido por las especies reactivas catalizadas por Fe, pero otros órganos como el páncreas y órganos endocrinos son también sensibles a los efectos tóxicos del Fe (Anderson y col., 2001; O'Neil y Powell, 2005).

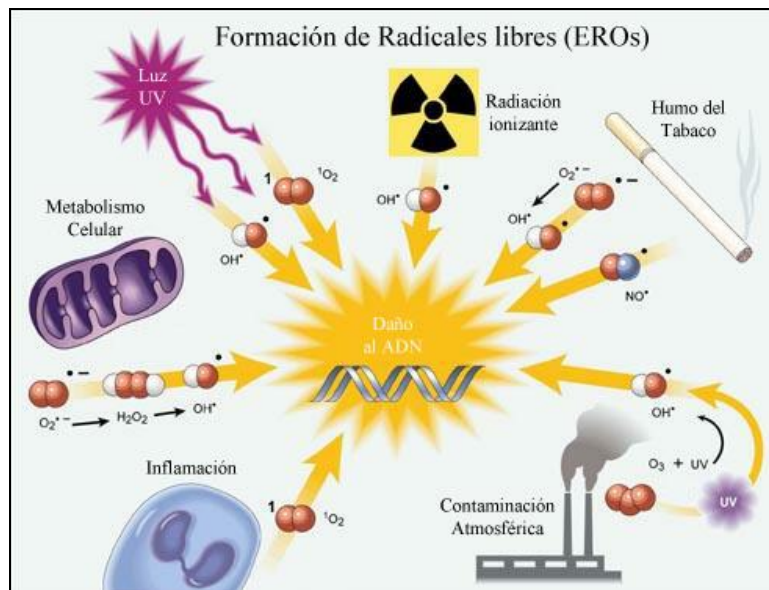
El hígado es el principal órgano de almacén de Fe en el organismo, y no es sorprendente la hepatotoxicidad como una consecuencia principal de la sobrecarga de Fe (Ramm y Ruddell, 2005). El daño que el Fe produce en hígado puede conducir a fibrosis y cirrosis y, en casos avanzados, al cáncer de hígado.

En el corazón, la formación de radicales hidroxilo inducidos por Fe no unido a transferrina causa una disfunción en la cadena respiratoria mitocondrial que conduce al paro cardíaco (Anderson y col., 2001).

El principal efecto de la oxidación de lípidos de membrana, a través de las reacciones en cadena de peroxidación lipídica, es la pérdida de fluidez de la membrana. Esto altera sus propiedades y funcionalidad, e incluso puede liberar proteínas ligadas a la membrana celular (Beckman y Ames 1998). Además, productos de la peroxidación lipídica (malondialdehído, 4-hidroxinonenal) son capaces de reaccionar con proteínas, fosfolípidos y ácidos nucleicos, causando así modificaciones estructurales en estas moléculas (Lee y col., 2004). En relación con las patologías asociadas con el estrés oxidativo, la oxidación de las lipoproteínas plasmáticas de baja densidad (LDL) ha sido implicada en el desarrollo de la aterosclerosis (Abuja y Albertini 2001). El daño oxidativo a proteínas incluye la oxidación de grupos sulfhidrilo, reacciones de oxidación catalizadas por metales que inducen uniones entre residuos de aminoácidos en las cercanías de los sitios de unión con metales, reacción con aldehídos, uniones

cruzadas entre proteínas y fragmentación de péptidos (Beckman y Ames 1998). Estas lesiones de las proteínas son importantes in vivo porque introducen modificaciones que pueden afectar a la función de receptores, enzimas, proteínas transportadoras, e incluso generar nuevos antígenos capaces de desencadenar la respuesta inmune. Además, las modificaciones proteicas podrían contribuir al daño secundario a otras biomoléculas, como por ejemplo inactivando los enzimas reparadores de ADN o alterando el funcionamiento de las ADN polimerasas durante la replicación del ADN (Halliwell y Whiteman 2004). Los ácidos nucleicos son susceptibles al daño oxidativo, el cual incluye modificaciones en las bases nitrogenadas, la formación de aductos entre bases y azúcares, uniones entre timina y tirosina, roturas de la hebra de ADN y enlaces cruzados con otras moléculas (Beckman y Ames 1998). Por ejemplo, los radicales hidroxilo oxidan los nucleósidos guanosina y timina a 8-hidroxi-2-desoxiguanosina y timinglicol, respectivamente, introduciendo cambios en el ADN. Si el estrés oxidativo es excesivo y los sistemas de reparación del ADN se pueden ver superados, estas modificaciones pueden conducir a la mutagénesis y carcinogénesis (Lee y col., 2004).

**Figura 7.** Principales fuentes generadoras de radicales libres (EROs).



## **2.4. EL ÁCIDO FÓLICO EN LA NUTRICIÓN**

### **2.4.1. INTRODUCCIÓN**

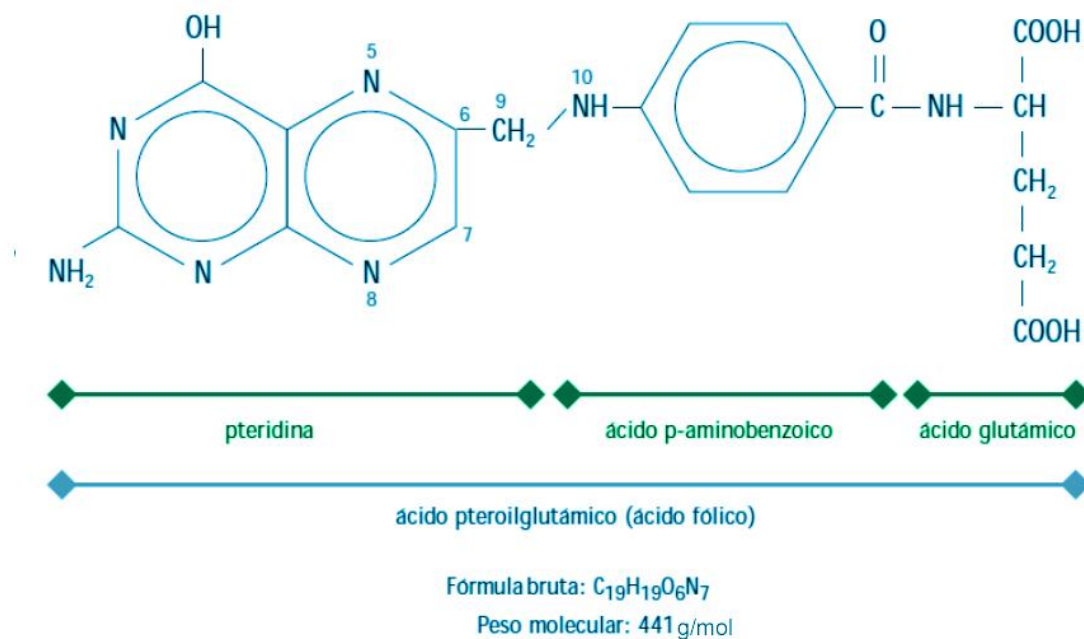
En 1931 se extrajo por primera vez de la levadura de cerveza un compuesto capaz de curar la enfermedad que conocemos hoy en día como anemia megaloblástica. Fue la primera enfermedad que respondía de forma positiva a un tratamiento con ácido fólico. Sin embargo, no fue hasta doce años después cuando se identificó el ácido fólico como tal (Hoffpauer y Bonnette, 1998) y, posteriormente, en 1947 se sintetizó por primera vez. A partir de entonces, se iniciaron numerosos estudios encaminados a conocer la importancia del ácido fólico en el organismo y la repercusión de su ingesta en la dieta (Rosenberg, 2005). De forma natural, el ácido fólico se encuentra en pequeñas cantidades mientras que sus derivados, los folatos, se encuentran en concentraciones mucho mayores, llegando a ser los que mayoritariamente se ingieren en el organismo a través de la dieta; su principal fuente son los vegetales de hoja verde, de los que adquiere su nombre (del latín, folium). Así, el mayor aporte lo encontramos en verduras, como el brócoli, las espinacas o las acelgas (aportan alrededor de 140  $\mu\text{g}/100\text{gr}$  de producto). También se encuentra en los frutos secos, donde destacamos los cacahuetes (110  $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) o las almendras (96  $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) y en cantidades menores, en naranjas, limones, espárragos y fresas. Un alimento con cantidades altas de ácido fólico es el hígado (192  $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) (Moreiras y col., 2011). El ácido fólico es la forma sintética, la más activa y se encuentra en estado oxidado. Su estabilidad es mayor que la de los folatos por lo que es la forma que habitualmente se utiliza para la fortificación de alimentos. Es muy importante diferenciar entre uno y otros ya que la biodisponibilidad del ácido fólico duplica prácticamente la de los folatos. Para encontrar dosis de ácido

fólico similares a las de los folatos hay que recurrir a los alimentos fortificados como los cereales de desayuno, los cuales pueden alcanzar hasta el 100% de la cantidad diaria recomendada (CDR). En el caso de personas adultas, se recomienda un aporte diario de unos 400  $\mu\text{g}$  de ácido fólico, 600 $\mu\text{g}/\text{día}$  para mujeres gestantes y unos 500  $\mu\text{g}/\text{día}$  para mujeres en periodo de lactación (OMS, 2006).

## 2.4.2. ESTRUCTURA Y CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DEL ÁCIDO FÓLICO

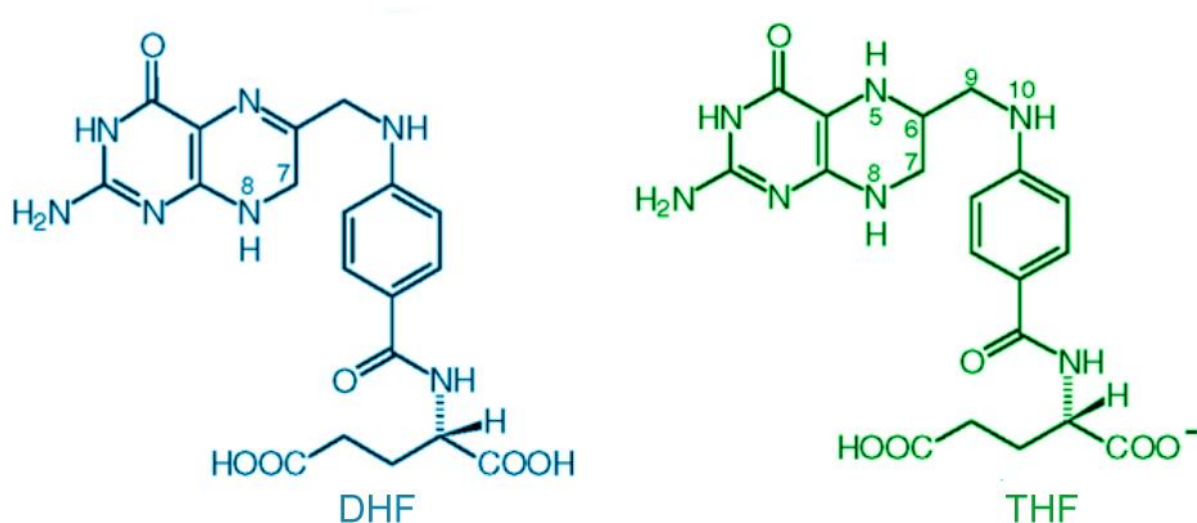
El ácido fólico (ácido pteroilmonoglutámico) es una vitamina hidrosoluble esencial perteneciente al grupo B cuyo peso molecular es 441.4 g/mol.

**Figura 8.** Estructura del ácido fólico. (Varela-Moreiras y col., 2000).



Estructuralmente está constituido por el anillo bicíclico de la pteridina conjugada al ácido p-aminobenzóico por un enlace metileno (C9-N10) el cual, a su vez, está unido a una molécula de ácido glutámico (monoglutamato) mediante un enlace peptídico. Folato es el término que se utiliza de forma genérica para referirse a una familia de vitaminas hidrosolubles del grupo B que tienen estructura y propiedades nutricionales similares a las del ácido fólico. Estructuralmente, los folatos se diferencian del ácido fólico en que el anillo de pteridina está en forma reducida y hay más de una molécula de glutámico, es decir, son poliglutamatos en los que las moléculas de glutámico están unidas unas a otras directamente mediante enlaces  $\gamma$ -glutamilo. Los más frecuentes en el organismo son los mono, penta y hexaglutamatos. Unos de otros se diferencian en el número de moléculas de ácido glutámico y en el estado de oxidación. Si el anillo de pteridina se encuentra reducido en las posiciones N7 y N8, se forman los dihidrofolatos (DHF) y si lo está en las posiciones N5, N7, N8 y N10, se forman los tetrahidrofolatos (THF). Estos THF, a su vez, son capaces de aceptar unidades metilo (un solo carbono) que se fijan en las posiciones 5 y 10 o en ambas, dependiendo del estado de oxidación.

**Figura 9.** Estructura del DHF y THF.

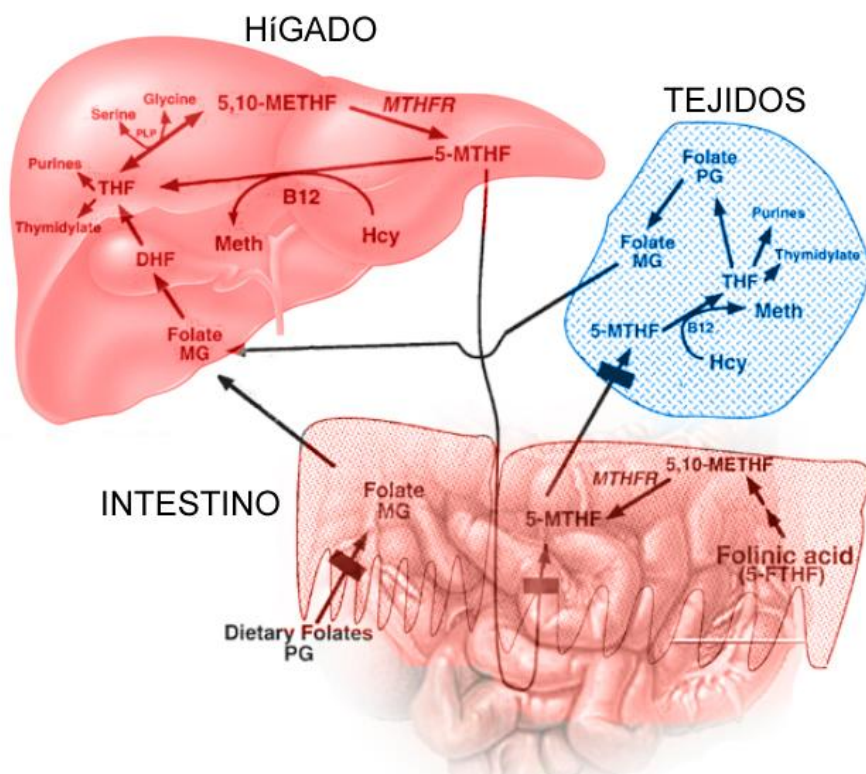


Su principal función es la de ser aceptores y donantes de unidades monocarbonadas, fundamentalmente de grupos metilo. En este sentido, y como se verá más adelante, los THF portadores de un grupo metilo son esenciales para la síntesis de algunos aminoácidos (metionina), de nucleótidos, de ADN y ARN.

Los folatos existen principalmente en dos formas: como 5-metiltetrahidrofolato (5-Me-THF), que es el mayoritario, y como formiltetrahidrofolatos (formil-THF). El 5-Me-THF por oxidación se transforma en 5-metil-5,6-dihidrofolato (5-Me-5,6-DHF) siendo esta forma la que más comúnmente se encuentra. Durante el proceso de digestión, el 5-Me-5,6-DHF se degrada rápidamente por ser más inestable; el ácido ascórbico, secretado de forma activa en el estómago desempeña un papel importante, ya que salva la labilidad del 5-Me-5,6-DHF al reducirlo de nuevo a la forma estable 5-Me-THF. Este mecanismo es crucial para optimizar la biodisponibilidad de los folatos (Lucock, 2000).

En general, los monoglutamatos son transferidos del interior del enterocito al plasma sin sufrir modificaciones, excepto una parte que son reducidos y metilados a 5-Me-THF, que es la forma en la que habitualmente se encuentra en el plasma. Difunden por el torrente sanguíneo hasta alcanzar diversos órganos, principalmente el hígado (Figura 10) donde los monoglutamatos se metabolizan siendo reducidos por la dihidrofolato reductasa a DHF y THF y metilados posteriormente, formándose 5-Me-THF que, cedido a la circulación, alcanza los distintos tejidos, en especial aquellos que muestran una gran división celular como la médula ósea, la mucosa gastrointestinal y el sistema inmune. Se estima que entre un 10 y un 20% de los folatos absorbidos son retenidos ahí (Gregory, 1995).

**Figura 10.** Representación simplificada del metabolismo del ácido fólico (modificado de Massy, 1999).



El 5-Me-THF sólo puede perder su grupo metilo cediéndolo a la homocisteína para la síntesis de metionina, reacción catalizada por la metionina sintetasa que requiere de la vitamina B<sub>12</sub> para su actividad. El THF formado debe transformarse posteriormente en un poliglutamato que es la forma más activa del ácido fólico. Para ello, tanto en el hígado como en los tejidos extrahepáticos, existe una folilpoliglutamato sintetasa que cataliza la transformación hasta alcanzar entre 5 y 6 unidades de glutámico. Así, en los tejidos se encuentran fundamentalmente los poliglutamatos mientras que en sangre y orina, mayoritariamente los monoglutamatos.

En cuanto al catabolismo y excreción de los poliglutamatos, a nivel intracelular la molécula sufre una rotura a nivel del enlace C9-N10 dando aminobenzoilpoliglutamato, que es hidrolizado a monoglutamato y finalmente N-acetilado antes de excretarse por vía renal. El folato excretado como tal, se reabsorbe en



su totalidad en el túbulo proximal. También puede excretarse vía biliar o por las heces, siendo muy difícil cuantificar las pérdidas del folato correspondientes a la microflora intestinal (Mataix y Ochoa, 2002).

El 30-40% de los folatos se encuentran en el plasma sanguíneo parcialmente unidos a proteínas ligantes de baja afinidad, como la albúmina, a través de las cuales son transportados. También aparecen ligados a la transferrina y la  $\alpha$ 2-macroglobulina. Existen también proteínas ligantes de alta afinidad, las cuales aumentan en los estadios de deficiencia de fólico asociados al embarazo, leucemia, uremia o enfermedades hepáticas; estas proteínas son similares a las ligantes de folato asociadas a las membranas celulares (Lucock, 2000).

La afinidad de los transportadores varía dependiendo de la forma en la que se encuentren los folatos. Así, la PCFT (protein-coupled folate transporter), tiene mayor afinidad por los folatos reducidos, mientras que las  $\alpha$  y  $\beta$ -RF (reduce folate) tienen mayor afinidad por el ácido fólico (Nygren-Babol y col., 2005; Assaraf, 2006; Zhao y col., 2009). Los niveles bajos o la ausencia de PCFT provocan un déficit en el transporte de los folatos causando una enfermedad, “malabsorción hereditaria de folatos”, que puede ser grave (Qiu y col., 2006).

Una de las funciones más importantes del ácido fólico, en su forma reducida (THF), y concretamente el 5-Me-THF, es actuar como coenzima en las reacciones de transferencia de unidades de un carbono, de restos metilo (Wagner, 1995), haciendo posibles reacciones como las siguientes:

1. Interconversión de serina y glicina. El THF es capaz de captar el grupo metilo de la serina en reacción reversible, dando lugar al 5,10-metilen-THF. Éste es un compuesto inestable que se degrada rápidamente a formaldehído y THF pero, no

obstante, participa en una serie de reacciones de gran relevancia como son las que a continuación se relacionan.

2. Síntesis de pirimidinas. El 5,10-metilen-THF cede el grupo metileno y dos electrones del anillo de la pteridina al deoxiuridilato (dUMP) para la síntesis de deoxitimidina monofosfato, lo que permite la síntesis de timidilato y de ADN. En esta reacción se genera DHF que debe reducirse posteriormente para producir THF. La enzima que cataliza la reacción es la dihidrofolato reductasa (DHFR) la cual, en consecuencia, es un factor limitante de la síntesis de ADN.

3. Síntesis de purinas. El 5,10-metilen-THF se transforma en el 10-formil-THF que participa directamente en la síntesis de purinas. Este es quizás el papel más importante del ácido fólico y sus derivados. El aminoimidazol-4-carboxamida (AICAR) y el glicinamida ribonucleótido reciben una unidad formilo del 10- formil-THF y se desencadena una cascada de reacciones que conducen a la formación de ácido inosínico, precursor de los nucleóticos púricos (Rosenblatt, 1995).

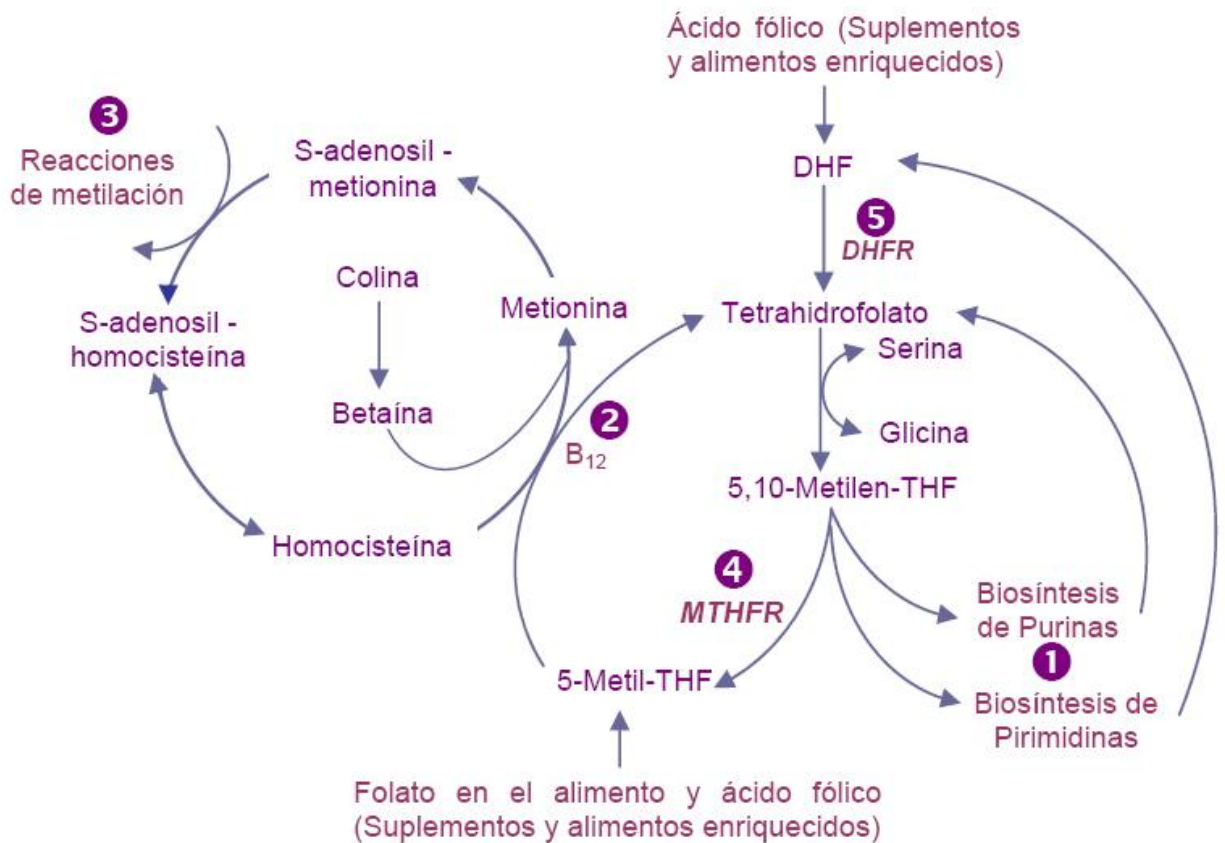
4. Síntesis de metionina y S-adenosil-metionina. La metilación de la homocisteína es un proceso indispensable para la síntesis de metionina, uno de los aminoácidos esenciales. El proceso se desencadena a partir del 5,10-metilen- THF, el cual puede reducirse a través de una reacción reversible dando lugar a 5-Me-THF. Este compuesto cede el grupo Me a la homocisteína para la síntesis de metionina, reacción catalizada por la metionina sintetasa (MS), enzima que requiere de la vitamina B<sub>12</sub> para su actividad (Figura 11). Cuando se produce una deficiencia de cobalamina, incluso habiendo suficientes folatos y 5-Me-THF, se produce lo que se denomina “Folate-trap” ya que el 5-Me-THF queda “atrapado” y no puede ni ser convertido a THF ni volver a la forma 5,10-metilen-THF (Stranger, 2002). Cuando esto ocurre, el ciclo de metilación se reduce, con las consiguientes implicaciones metabólicas (Bailey y Gregory, 1999).

La metionina puede volver a su vez a homocisteína, generando THF; esta vía es metabólicamente muy importante ya que se genera S-adenosil metionina (SAM) que actúa como donante de grupos metilo en gran número de transmetilaciones catalizadas por las ADN metil transferasas (DNMTs) implicadas en la síntesis de ADN, principalmente en la metilación del nucleósido citosina-guanina (CpG).

5. Participación indirecta en los procesos de oxidación permitiendo la generación de compuestos reactivos al oxígeno. Esto se debe a que el 5-Me-THF posee una estructura similar a la de la tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>), cofactor esencial de la oxidonítrico sintetasa endotelial (eNOS). Esta enzima tiene dos maneras de actuar, bien uniéndose al 5-Me-THF o bien acoplándose a la BH<sub>4</sub>. Cuando este cofactor se acopla a la sintetasa se produce óxido nítrico (NO). Sin embargo, debido al estrés oxidativo, este cofactor puede oxidarse formándose BH<sub>2</sub>, compuesto inactivo, de forma que disminuye la formación de NO y aumenta la generación de especies reactivas al oxígeno, produciendo radicales libres que pueden favorecer la aterogénesis. En las últimas décadas, el interés por la repercusión del ácido fólico y folatos en la salud ha aumentado notablemente. En un principio, se centraba en su papel en la prevención de defectos del tubo neural como la espina bífida, pero en la actualidad, tras el conocimiento de su implicación metabólica (ver apartado anterior) se ha relacionado con otras muchas enfermedades relacionadas, la mayoría de ellas, con la transferencia de grupos metilo y las reacciones que implican a la metionina y a la biosíntesis de las purinas y pirimidinas (Wald y col., 1998; Lucock, 2000; Van der Put y col., 2001; Gregory, 2004; Caudill, 2010).

**Figura 11.** Resumen de los componentes principales del ciclo bioquímico de los folatos.

Abreviaturas: DHFR = Dihidrofolato reductasa; MTHFR = Metilentetrahidrofolato reductasa. Reacciones: 1. Biosíntesis de nucleótidos para la incorporación en el ADN y ARN; 2. Remetilación de la Homocisteína para formar Metionina (Vitamina B<sub>12</sub> actúa como coenzima); 3. Reacciones de metilación, incluyendo ADN, ARN, fosfolípidos y proteínas; 4. MTHFR, cataliza la formación del 5-metil-THF necesario para las reacciones de metilación; 5. Dihidrofolato reductasa (Ross, 2010).



### **2.4.3. BIODISPONIBILIDAD DEL ÁCIDO FÓLICO**

#### **2.4.3.1. ABSORCIÓN DE ÁCIDO FÓLICO**

El mecanismo de absorción de los folatos es complejo. Los folatos se encuentran en los alimentos, en su gran mayoría (90%), en forma de poliglutamatos y asociados a proteínas; es así como se encuentran a nivel intracelular. El resto se encuentran como monoglutamatos que son las formas extracelulares y en los que se transforman los poliglutamatos por acción de las enzimas digestivas. La absorción se realiza principalmente en el yeyuno, aunque parte se absorbe también en el colon; ambas absorciones han de tenerse en cuenta a la hora de calcular la biodisponibilidad total. Los folatos presentes de forma natural en los alimentos se encuentran en forma poliglutámicas, las cuales deben ser hidrolizadas hasta monoglutámicas en el intestino, previamente a su absorción (Gregory, 1996; Ball, 1998). Esta hidrólisis es catalizada por la enzima pteroilglutamato hidrolasa (conjugasa), localizada en el borde en cepillo de la mucosa intestinal. Reisenauer y Halsted (1987) calcularon que el contenido de pteroilglutamato hidrolasa en el borde en cepillo es elevado. Ciertos factores en los alimentos, tales como la fibra dietética y algunos ácidos orgánicos, por ejemplo en el zumo de naranja y tomates, pueden inhibir la desconjugación de poliglutamatos, afectando la absorción (Wei y col., 1996, Wei y Gregory 1998, Bailey y col., 1988, Keagy y col., 1988; Wright y col., 2007).

Los monoglutamatos formados son transportados al interior del enterocito por un proceso de transporte activo que implica un intercambio iónico a través de la membrana por un gradiente de pH. El pH óptimo para dicho transporte es 5.8 (Fowler, 1998). Los folatos son aniónicos al pH intraluminal y son intercambiados en la membrana por iones

hidroxilo (Lucock, 2000). Se han detectado en las membranas las denominadas “proteínas ligantes de folatos” (FBP, folate binding proteins) que están implicadas en este transporte activo. Las FPB permiten la entrada en la célula a través de una vacuola de la membrana; introduce los folatos en forma de monoglutamatos, se rompe posteriormente la unión entre ambos, se libera el monoglutamato y vuelven a su posición original en la membrana (Lee y col., 1992). Sin embargo, a altas dosis, el mecanismo de absorción es el transporte pasivo (Fowler, 1998) y su paso a través de la membrana intestinal involucra a un transportador de folatos, pH-dependiente. Incluso a altas concentraciones de folatos la absorción puede tener lugar mediante un mecanismo saturable que involucra difusión pasiva (Gregory, 1995). Sin embargo, el ácido fólico tiene que ser hidrolizado hacia DHF y finalmente a la forma MTHF.

Este mecanismo explica la absorción del folato libre de la dieta, sin embargo, en la leche está fundamentalmente unido a una proteína y éste complejo proteína-folato es absorbido intacto en gran parte en el íleon, por un mecanismo diferente al sistema de transporte activo de absorción del folato libre. Por ello, la disponibilidad biológica del folato en la leche o del folato de las dietas a las cuales se les ha añadido leche es considerablemente mayor que el folato libre (Verwei y col., 2003).

Además, la transformación de ácido fólico en su forma activa, L-MTHF, es un paso crítico ya que esta conversión frecuentemente se ve interrumpida por numerosos factores intrínsecos al individuo como son: la edad, el metabolismo y la genética. Un 40% de los adultos se ven afectados por defectos genéticos que pueden limitar la cantidad de ácido fólico que se transforma a folato activo, el cual neutraliza la homocisteína (Gregory, 1995).

Si tenemos en cuenta que el ácido fólico tiene que ser primero transformado en la forma activa para poder ser absorbido y utilizado, la forma sintética (6S)-5-MTHF

permite su paso directo a la circulación y al resto del organismo sin transformación previa (Pietrzik y col., 2001).

#### **2.4.3.2. TRANSPORTE DE ÁCIDO FÓLICO**

Una vez absorbido y dentro de la célula entérica, el ácido pteroilglutámico se transforma en THF, gracias a la dihidrofolato reductasa, metilándose posteriormente y dando el 5-MTHF que pasa al torrente sanguíneo. El 5-MTHF alcanza la vena portal, y llega al hígado donde aproximadamente del 10-20 % de los folatos absorbidos son retenidos, mientras que el resto circula a otros tejidos (Gregory, 1995).

Una vez los monoglutamatos están en sangre, se dirigen al hígado donde son de nuevo transformados en poliglutamatos, los cuales pueden ser reenviados a sangre o a bilis. El hígado y las células rojas de la sangre son los principales tejidos de almacenamiento de los folatos. El hígado almacena el folato en forma reducida y conjugada o lo convierte en MTHF que es secretado en la bilis y reabsorbido en la mucosa intestinal, estando disponible para los tejidos extrahepáticos. En humanos el contenido de folatos totales en el organismo es de 5-10 mg, de los cuales la mitad residen en el hígado en forma de tetra-, penta-, hexa y heptaglutamatos del 5-MTHF y 10-HCO-THF (Combs, 1992; Herbert y Das, 1994). Los tejidos extrahepáticos acumulan folato a concentraciones por encima del plasma por desmetilación y formación de poliglutamatos (Herbert y Das, 1994). Como se ha comentado anteriormente, después de la absorción, el 5-MTHF llega a la circulación portal. Muchos de estos folatos son captados por el hígado, aunque algunos llegan a la bilis donde son recirculados por el ciclo enterohepático.

Los glóbulos rojos contienen niveles más altos de folatos que en plasma, y prácticamente todos los folatos que se encuentran en los eritrocitos son las formas

poliglutámicas del 5-MTHF. Por tanto, el L-MTHF es la forma predominante en plasma y en el transporte a los tejidos, siendo el único que puede atravesar la barrera cerebro-encefálica. Estas características positivas de esta forma de folato, se pueden extrapolar al (6S)-5-MTHF. El nivel de folatos en eritrocitos es uno de los parámetros más usados para medir a largo plazo el estado de folatos en el organismo. La concentración de folatos en plasma es también un buen indicador del estado de los folatos en el organismo aunque puede estar influenciado por la ingesta diaria de folatos en la dieta (Ratnam y Freisheim, 1990).

#### **2.4.3.3. EXCRECIÓN DE ÁCIDO FÓLICO**

Los folatos se filtran en el glomérulo y son reabsorbidos en el túbulo renal proximal (Whitehead, 1986). La mayor parte de los folatos secretados son reabsorbidos. La limpieza renal de los derivados de los folatos es inversamente proporcional a sus afinidades por las proteínas específicas de unión de los folatos en los túbulos proximales del riñón (Birn y col., 1993). Como se describe abajo, también la orina posee derivados de los folatos (Williams y col., 1982).

La excreción biliar de los folatos se estima en unos 100 µg/día en humanos (FAO/OMS, 2002). Muchos de estos folatos serían reabsorbidos a nivel del intestino delgado, existiendo una excreción fecal. Sin embargo la excreción de folatos en heces es variable y no se utiliza como una medida de disponibilidad debido a la biosíntesis de folatos por medio de la flora intestinal. Estudios en animales, a los cuales se les administró un tratamiento con drogas sulfatadas para producir una deficiencia completa de folatos, se demostró que la síntesis bacteriana de folatos contribuye a su almacenamiento hepático, aunque no se ha cuantificado el alcance de ésta contribución.



Las pérdidas de folatos por vía biliar y fecal pueden verse incrementadas cuando hay problemas de absorción intestinal (Gregory, 1995).

#### **2.4.4. SUPLEMENTACIÓN DE ALIMENTOS CON ÁCIDO FÓLICO**

Tanto la suplementación como el enriquecimiento en ácido fólico se realizan para contribuir al mantenimiento de los niveles adecuados en el organismo. En 2009, Vaesken y col., realizaron un estudio sobre los alimentos fortificados con ácido fólico comercializados en nuestro país. En este estudio se observó que la cantidad utilizada para fortalecer alimentos suele ser superior al 15% de la cantidad diaria recomendada (CDR) por 100 g/ml o ración y se identificaron seis grupos de alimentos enriquecidos: cereales y derivados (52%), leches y derivados (17%), alimentos para lactantes y niños de corta edad (12%), productos dietéticos y de régimen (11%), bebidas no alcohólicas (6%) y grasas comestibles (2%). Por grupos, los alimentos mayoritarios fueron los cereales para desayuno, leche, batidos y preparados lácteos, dentro de los productos lácteos y dentro de los alimentos para lactantes, las papillas. Igualmente se establecieron cuatro grupos diana a los que van dirigidos estos alimentos tomando como referencia la alegación directa mediante marketing del envase: lactantes, infantil, madres y sobrepeso. La mayoría de los productos carecían de población diana (37%), mientras que un 28% de los alimentos utilizados para el estudio iba dirigido a población con sobrepeso, siendo los productos mayoritarios los cereales y sus derivados.

Las cantidades de ácido fólico recomendadas diariamente varían dependiendo del país y del grupo de población al que van dirigidas. En Estados Unidos y Canadá, la cantidad diaria recomendada (RDA) ya en 1990 fue de 200 µg ácido fólico y en 2002, la FAO/OMS estableció una Ingesta de Nutriente Recomendada (RNI) para el ácido fólico de 400 µg (Gabarra, 2006). Durante el periodo de 1995-2007 los RDA/RNI fueron

sustituidas y ampliadas por las DRI (Dietary Reference Intakes) que incluyen, además conceptos como Ingesta Adecuada (AI), usada cuando no se puede utilizar la RDA, Requerimiento Medio Estimado (EAR) o nivel de ingesta diaria de un nutriente estimado para cubrir el requerimiento de la mitad (mediana) de los individuos sanos, o el Nivel Máximo de Ingesta Tolerable (UL) que es el umbral a partir del cual empiezan a observarse efectos adversos y/o el nivel máximo de ingesta que no produce tales efectos. En el caso de los folatos, la UL se sitúa en 1000 µg para adultos (Gabarra, 2006).

En 2006, la Organización Mundial de la Salud (OMS), estableció como DRI para adultos 400 equivalentes dietéticos de folatos (DFE), 600 para mujeres embarazadas y 500 para mujeres en periodo de lactancia. Para establecer una relación entre la absorción de folatos y del ácido fólico, se establecieron unas nuevas unidades, los equivalentes dietéticos de folatos (DFE). Estas unidades tienen en cuenta que la biodisponibilidad del ácido fólico presente como fortificante en los alimentos se estima en un 85% y la de los folatos un 50%, la relación sería (85/50) igual a 1.7. Por ello, 1 µg ácido fólico como fortificante = 1.7 µg DFE. Estas estimaciones deben ser revisadas con los nuevos avances científicos con el fin de adecuarlas a las nuevas necesidades. En cualquier caso, los DFE pueden expresarse de diferentes maneras (Suitor y Bailey, 2000):

1 µg DFE = 1 µg folatos en alimentos = 0.6 µg ácido fólico añadido a alimentos = 0.5 µg ácido fólico ingerido sin alimentos.

1 µg ácido fólico como suplemento = 2 µg DFE.

En España, las ingestas recomendadas (IR), tienen en cuenta distintos grupos de población y así, son de 400 µg de ácido fólico para adultos, 600 µg para mujeres gestantes y de 100 a 200 µg para la población infantil. A efectos legales, a la hora de

establecer una cantidad en el etiquetado, la referencia aplicable es la de la CDR de 200 µg (Vaesken y col., 2009) (Real Decreto 1669/2009).

Los valores de ingestión máxima se refieren únicamente a la ingestión de ácido fólico de alimentos enriquecidos o de suplementos, siendo para los adultos de 1000 µg/día, no estableciéndose ingestiones máximas para los folatos naturales de los alimentos. Este valor ha sido establecido como norma de seguridad dado que se han encontrado valores de toxicidad para la ingestión de 5 mg/día de ácido fólico tolerables (Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, 2004).

#### **2.4.5. PATOLOGÍAS RELACIONADAS CON LA DEFICIENCIA DE ÁCIDO FÓLICO**

Los folatos, así como varias formas de tetrahidrofolatos (THF), son substratos y coenzimas en la adquisición, transporte, y procesos enzimáticos de unidades de un átomo de carbono para el metabolismo de aminoácidos y ácido nucleicos y su regulación metabólica (Bailey, 1995; Cook, 2001). Los folatos además de donar unidades de un átomo de carbono para la metilación de la homocisteína a metionina, la cual es empleada en reacciones de metilación celular y síntesis de proteínas. Los folatos están implicados en la síntesis de purinas y timidilatos, además de la interconversión de glicina a serina y en la rotura de la histidina para formar glutamato (Quinlivan y col., 2006).

Existe una estrecha relación entre un inadecuado estado nutricional para los folatos, una elevada concentración de homocisteína, y el riesgo de enfermedad coronaria, trombosis venosa, estenosis carotídea y otras enfermedades vasculares (Bailey, 1995; Rimm y col., 1998). Además una deficiencia de folatos está asociada con un aumento en el riesgo de serios defectos en el nacimiento: “Defectos del tubo neural”

(DTN) (Laurence y col., 1981; Medical y col., 1991; Czeizel y Dudas, 1992; Botto y col., 1999; Bjorklund y Gordon, 2006). Las tasas de los DTN varían dependiendo del área geográfica, estatus socioeconómico y raza (Pitkin, 2007). Por ejemplo, en Europa (excluyendo al Reino Unido e Irlanda) la prevalencia de DTN es alrededor de 10 casos por cada 10.000 embarazos (Busby y col., 2005) mientras que en una región de China la prevalencia fue de 1387 casos por cada 10.000 embarazos, siendo una de las más altas prevalencias en el mundo (Li y col., 2006).

El riesgo de cierto tipo de cáncer (como el de colon, cervical, y pulmón) además incrementa cuando la ingesta de folatos es insuficiente (Kim, 1999; Choi y Mason., 2000). La deficiencia de folatos puede también contribuir a la depresión (Fava y col., 1997; Green y Miller, 1999), afectar el sistema inmune (Green y Miller., 1999), y provocar daños neuronales y neurológicos (Green y Miller., 1999; Houston y col., 1999; Snowdon y col., 2000).

Como se ha comentado anteriormente, los niveles de homocisteína en plasma están muy relacionados con el estado nutricional de los folatos, es decir, una acumulación de homocisteína tiene lugar si el estatus de los folatos en el organismo es bajo como consecuencia de una reducción en el ciclo de la metionina. Los elevados niveles de homocisteína son un factor de riesgo en el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares (Lucock, 2000; Refsum y col., 1998; Scott y Weir, 1996; Selhub y Rosenberg, 1996; Wald y col., 1998). Sin embargo hay que tener en cuenta que los elevados niveles de homocisteína pueden ser el resultado de otras deficiencias de vitaminas del grupo B, como la vitamina B<sub>12</sub> o B<sub>6</sub> (Selhub y Rosenberg, 1996; Refsum y col., 1998) o debido a la homocistinuria. La homocistinuria tiene lugar por una deficiencia de la enzima metionina sintetasa que es la encargada de catalizar la transferencia de un grupo metilo desde el 5-CH<sub>3</sub>THF a la homocisteína, dando lugar a

THF y metionina (Refsum y col., 1998; Swanson y col., 2001). Los folatos participan en procesos bioquímicos que implican la transferencia de grupos de carbono, entre ellos se incluye el metabolismo de aminoácidos y síntesis de purinas y pirimidinas que son incorporadas al ADN y ARN (Bailey y col., 2001).

Los folatos están implicados en la remetilación de la homocisteína para formar metionina, que posteriormente es transformada a S-Adenosilmetionina, el cual será el principal suministrador de grupos metilo- en un número considerable de reacciones químicas incluyendo la metilación del ADN, ARN, proteínas, fosfolípidos y neurotransmisores.

El interés actual en la investigación de la nutrición de los folatos incluye el efecto de las variaciones genéticas que influyen en la utilización de los mismos folatos. Varios polimorfismos en un único nucleótido asociado con el metabolismo de los folatos han sido identificados, el más estudiado hasta la fecha es la variante 677C3T metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR). Esta enzima cataliza la conversión del 5,10 metilentetrahidrofolato a 5- metiltetrahidrofolato, la cual sirve como donador de un átomo de carbono a la homocisteína para formar metionina. Los individuos que son homocigóticos para este polimorfismo pueden tener una actividad de la enzima MTHFR hasta un 50% más bajo comparado con aquellos que no lo tienen (Kang y col., 1988; Bailey y Gregory, 1999). Este polimorfismo aumenta el riesgo de una hiperhomocisteinemia cuando va asociado un bajo estatus para el folato (Jacques y col., 1996; Kauwell y col., 2000), lo cual apoya la sugerencia de que los individuos que son homocigóticos para el polimorfismo 677C3T tienen un requerimiento más elevado para los folatos (Rosenberg y Rosenberg, 1998).

1) Ácido fólico y anemia megaloblástica:

La anemia megaloblástica es una enfermedad hematológica caracterizada por la aparición de glóbulos rojos más grandes de lo habitual, deformados o fragmentados. Es una consecuencia de la ausencia de la vitamina B<sub>12</sub> y de ácido fólico/folatos en la dieta y su influencia en la síntesis de ADN (Lucock, 2000; Stranger, 2002).

Existen diversas causas de deficiencia de folatos relacionadas con la anemia megaloblástica:

a) Dieta insuficiente. La anemia megaloblástica debida a la deficiencia de folatos en la dieta afecta a personas con consumo crónico de alcohol, con anomalías mentales y en algunos casos de malnutrición proteica, estados de pobreza y de falta de atención en personas de edades avanzadas pueden llevar también a una deficiencia de folatos y por tanto a una posible anemia megaloblástica (Green y col., 2005).

b) Malabsorción intestinal. En algunos casos, se ha sugerido la inhibición de la hidrolasa intestinal por algunos fármacos como causa de la malabsorción de folatos, aunque este mecanismo no ha podido ser demostrado. Son más frecuentes aquellos cuadros en los que la malabsorción es secundaria a anormalidades en la mucosa intestinal, como en el caso del Sprue tropical, la enfermedad de Crohn (enteritis regional), enfermedad de Whipple, la esclerodermia, la amiloidosis y la diverticulitis del intestino delgado. En la resección quirúrgica del estómago o atrofia de la mucosa gástrica, se produce una absorción inadecuada de folatos por la aclorhidria secundaria. Determinados fármacos pueden interferir en la absorción de folatos (De Paz, 2006).

c) Aumento de las necesidades de folatos. Existen determinadas situaciones en las que se ven aumentadas las necesidades de folatos, como es en el embarazo y en los primeros meses de vida. Este incremento en las necesidades de folatos puede llevar a una deficiencia grave en personas que se encuentren en el límite de sus requerimientos

dietéticos diarios (RDI). La anemia megaloblástica debida a la deficiencia de folatos se detecta después de 36 semanas de embarazo. Debido a la suplementación de folatos antes y durante el embarazo, la prevalencia de anemia megaloblástica es menor. En países subdesarrollados, donde la ingesta de folatos diaria es inadecuada y sin una adecuada suplementación durante la gestación, la prevalencia de anemias megaloblásticas es del 50%. En los recién nacidos prematuros los requerimientos de folatos son más elevados que los de un recién nacido a término, debido a su rápido crecimiento durante los 2-3 primeros meses, pudiendo aparecer una posible anemia megaloblástica a las 4-6 semanas de vida. En los ancianos, al carecer de una dentadura adecuada, generalmente no pueden tomar verduras frescas o alimentos crudos, y muchas veces la dieta se basa en conservas enlatadas. Se estima que entre el 10- 30% de los personas mayores de 50 años presentan una capacidad reducida de absorber vitamina B<sub>12</sub> (Farhan y col., 2005). En los niños, el déficit de folatos se observa con más frecuencia en los prematuros y tras dietas exclusivas basadas en leche de cabra, cuyo contenido en folatos es muy bajo, o la utilización de sustitutos lácteos sin suplementos vitamínicos (De Paz, 2006).

Al coexistir la síntesis defectuosa del ADN y la normal del ARN, células plasmáticas crecen de forma anómala; en los eritrocitos se observa un aumento del tamaño de la célula, del citoplasma, en relación con el tamaño nuclear, por lo que adoptan formas anómalas, normalmente ovaladas. La formación anómala de estas células (dispoiesis) provoca su destrucción intramedular, originándose hiperbilirrubinemia e hiperuricemia. Como están afectadas todas la líneas celulares, además de la anemia, el déficit de ácido fólico/folatos puede desarrollar leucopenia y trombocitopenia, aunque suelen tardar más tiempo en aparecer.

Debido a la implicación de los dos compuestos, a nivel clínico es difícil distinguir entre una deficiencia en folatos o en cobalamina. Sin embargo, un tratamiento con cobalamina hace que la situación vuelva rápidamente a la normalidad, ya que terminará con la inhibición, mientras que si se suministran folatos, éstos sólo serán convertidos a DHF y THF, los cuales serán utilizados para la división celular.

Tratamientos con dosis altas de folatos, durante un tiempo prolongado sólo enmascaran la causa real de una anemia perniciosa debida a la falta de vitamina B12 (Stranger, 2002). El tratamiento para la anemia megaloblástica causada por una deficiencia de folatos se basa en administrar una cantidad de 200 a 500 µg/d de ácido fólico. La respuesta verifica el diagnóstico, ya que una anemia producida por falta de cobalamina no responde a dosis tan bajas de ácido fólico (Watkins y col., 2009).

## 2) Ácido fólico y defectos del tubo neural (DTN):

La espina bífida y la anencefalia son las dos enfermedades más comunes en el feto asociadas a fallos en el cierre del tubo neural. Cuando se producen malformaciones en la columna, “espina bífida”, la médula espinal queda al descubierto en la parte inferior de la columna pudiendo producir parálisis parcial o total. Esta enfermedad comienza a desarrollarse durante los días 24-27 de embarazo, cuando la mujer, muchas veces, desconoce su estado. Aunque la etiología de estas enfermedades es muy compleja, el papel del ácido fólico en la reducción de los DTN está bien establecido ya que se han asociado a niveles altos de homocisteína, a factores genéticos que condicionan la síntesis de enzimas implicadas en el ciclo de la metionina, a la síntesis defectuosa del ADN y finalmente, a bajos niveles de vitamina B<sub>12</sub>.

Uno de los estudios más representativos y que indujeron a recomendar el consumo de ácido fólico en mujeres que planificaban su embarazo, fue el llevado a cabo



en 1991 por 33 centros de investigación bajo los auspicios del Consejo Británico de Investigaciones Médicas. En ese estudio se suministró ácido fólico a mujeres que habían tenido anteriormente un embarazo con DTN. Los resultados obtenidos mostraron que con la ingesta pauta de ácido fólico antes y durante el embarazo, la recurrencia de DTN disminuyó el 72% frente al grupo que no lo había consumido (Hoffpauer y Bonnette, 1998).

En la actualidad, distintas organizaciones internacionales recomiendan aumentar su presencia en la dieta, bien con el aporte de los alimentos que son ricos en folatos o con alimentos enriquecidos. Así, en Chile, es obligatoria la fortificación de harinas con ácido fólico en cantidades de 220 µg/100 g de harina. Desde 1998, en Estados Unidos es obligatorio el enriquecimiento con ácido fólico en cereales y derivados. En 2001, en E.E. U.U. se llevó a cabo un estudio sobre la incidencia de DTN después del consumo de alimentos fortificados observándose una disminución del un 19% (Morales, 2002).

En la actualidad se recomienda una ingesta de ácido fólico, a modo de suplementos, de 400 µg diarios a las mujeres que están planificando su embarazo (Rosenberg, 2005).

### 3) Ácido fólico y cáncer:

Un estado deficiente de folatos puede reducir la disponibilidad de la S-adenosilmetionina (SAM), necesaria para la metilación de ADN y por lo tanto, podría influir en la expresión genética. Este estado también puede dar lugar a una síntesis de ADN anormal, basada en la no incorporación de grupos uracilo, lo cual lleva a la ruptura del cromosoma y a la interrupción en la reparación del ADN (Zhangy col., 1999). Estos ADN anómalos están asociados a la carcinogénesis (Maruti y col., 2009). Numerosos estudios apoyan este hecho. Por un lado, se ha visto que una ingesta baja de

folatos está asociada a un riesgo alto de cáncer de mama y de colon en estudios epidemiológicos, más concretamente, en casos en los que se consumió alcohol, ya que éste es un antagonista del ácido fólico (Slattery y col., 1999; Zhang y col., 1999; Pelucchi y col., (2005) observaron que combinando una ingesta alta de folatos en la dieta y un consumo de alcohol bajo, se reducía el riesgo de padecer cáncer de próstata hasta un 54%. En 2009, Maruti y col. observaron que las mujeres que habían consumido 1200 DFE/día (Dietary folate equivalents) tenía un 22% menos de riesgo de padecer cáncer de mama que aquellas que consumían menos folatos. Por otro lado, existen otros estudios con resultados contrarios como el realizado por Hultdin y col. (2005) quienes no encontraron una relación directa entre la ingesta de folatos y el cáncer de próstata.

En 2008, Slatore y col., realizaron un estudio de cohortes con hombres y mujeres de edades comprendidas entre 50 y 76 años para determinar la influencia de la ingesta de varias vitaminas en la prevención del cáncer de pulmón. No encontraron evidencias de que el uso de multivitaminas, suplementos de vitamina C, vitamina E o folatos estuvieran asociados con una baja incidencia de este tipo de cáncer. La utilización de agentes inhibidores de la hidrofolato reductasa (metotrexato o el 5-fluorouracilo) ha recibido especial atención en el tratamiento de cáncer al bloquear el paso de DHF a THF. La afinidad del metotrexato por la enzima es 105 veces mayor que por el DHF. Como consecuencia, disminuye la biosíntesis de purinas y pirimidinas y por último, de ADN, deteniendo la proliferación de células neoplásicas (Stranger, 2002).

Sin embargo, existen evidencias de que la ingesta elevada de folatos puede causar una paradójica aceleración de la carcinogénesis en individuos que presentan metástasis. Se debe a que las células neoplásicas, en su rápido crecimiento, requieren altas cantidades de ácido fólico para mantener la síntesis de timidina a un ritmo necesario para satisfacer las mayores necesidades de ADN (Mason, 2009). Así, en

aquellos individuos que presenten lesiones neoplásicas, la ingesta de ácido fólico supone un riesgo adicional a la formación de tumores.

#### 4) Ácido fólico y enfermedades cardiovasculares:

El efecto que presenta el ácido fólico sobre los niveles de homocisteína es bien conocido (Kim, 2004; Wen y col., 2008). La hiperhomocisteinemia, encontrada en más de un 40% de individuos con enfermedades cerebro-cardiovasculares, coronarias o periféricas puede considerarse como un factor de riesgo cardiovascular. Los niveles elevados de homocisteína en sangre superiores a 100  $\mu\text{moles/L}$  se consideran un factor severo de riesgo cardiovascular, moderado si son entre 30-100  $\mu\text{moles/L}$  y bajos entre 16-30  $\mu\text{moles/L}$  (Murthy y col., 2003). Estudios desarrollados en este sentido han demostrado que la administración oral de 0.5–5 mg diarios de ácido fólico da como resultado una reducción del 25-30% en la concentración de homocisteína (Bellamy y col., 1999; Chambers y col., 2000; Carnicer y col., 2007; Moens y col., 2008). Sin embargo, la administración de ácido fólico junto con vitaminas B<sub>6</sub> y B<sub>12</sub> no parece ser suficiente para reducir el riesgo de eventos cardiovasculares (Lonn y col., 2006). En 2008, Albert y col., observaron que en mujeres con historial de enfermedades cardiovasculares o con 3 o más factores de riesgo, la administración de ácido fólico, vitaminas B<sub>6</sub> y B<sub>12</sub> no redujo los posibles factores de riesgo, aunque disminuyan los niveles de homocisteína. También se ha relacionado un bajo consumo de ácido fólico, con el riesgo de preeclampsia (Bodnar y col., 2006; Wen y col., 2008).

#### 5) Ácido fólico y depresión:

La hipótesis de la relación entre la deficiencia de folato y la depresión tiene sus orígenes en los estudios clásicos de Herbert, que experimentó personalmente los efectos

de una dieta pobre en folato, apareciendo al cabo de los 4 meses modificaciones en las funciones mentales y en la conducta (Herbert y col., 1994). Posteriormente, en el estudio realizado por Shorvon y col., (1980) se observó que el 56% de los pacientes que presentaba anemia megaloblástica también tenía síntomas maníaco-depresivos. Estos datos han sido confirmados tanto en pacientes psiquiátricos (Bottiglieri y col., 2000) como no psiquiátricos (Lindeman y col., 2000). Además del efecto neurotóxico producido por los valores elevados de homocisteína, la deficiencia de metionina enlentece las reacciones de transmetilación en el sistema nervioso central, por lo que no se sintetizan los neurotransmisores. En pacientes depresivos se han encontrado concentraciones reducidas de metionina. Ello parece ser debido a que existe relación entre el metabolismo del folato y el de la serotonina. Una de las hipótesis apunta a la tetrahidrobiopterina como enlace entre los dos metabolismos (Bottiglieri y col., 1992).

#### 6) Ácido fólico y función cognitiva/ enfermedad de Alzheimer:

La demencia es la principal causa de deterioro cognitivo en el anciano. Diversos estudios han puesto de manifiesto que tanto los pacientes con enfermedad de Alzheimer como aquellos con demencia vascular presentan concentraciones plasmáticas bajas de folato y vitamina B<sub>12</sub>, lo que conduce a valores elevados de homocisteína. Los valores elevados de homocisteína han sido propuestos como un factor de riesgo independiente en la demencia vascular (Boushey y col., 1995; Fassbender y col., 1999), y también parecen implicados en la fisiopatología de la demencia tipo Alzheimer (Nilsson y col., 1996; Clarke y col., 1998; Snowdon y col., 2000). En el estudio realizado por Snowdon y col. (2000) en monjas norteamericanas, los indicadores neuropatológicos de enfermedad de Alzheimer postmortem fueron correlacionados con las concentraciones séricas de folato obtenidas en vida antes del diagnóstico de la enfermedad, obteniéndose

correlaciones significativas. En su estudio, Clarke y col. (1998) encontraron una fuerte asociación negativa entre los valores de folato sérico y el riesgo de presentar la demencia tipo Alzheimer. Esto ha sido confirmado recientemente por el estudio de Seshadri y col. (2002), en el que los valores elevados de homocisteína fueron un factor de riesgo para el desarrollo posterior de la demencia tipo Alzheimer. La relación de homocisteína con folato (también con las vitaminas B<sub>6</sub> y B<sub>12</sub>) se aproxima al concepto definido por Rosenberg y Miller (1992) de deficiencia subclínica de vitaminas y función neurocognitiva en el anciano. En la revisión de González-Gross y col. (2001) se propone que las concentraciones elevadas de homocisteína pueden ser un marcador temprano y sensible de deterioro cognitivo.

## 2.5. CARACTERÍSTICAS NUTRICIONALES DE LA LECHE DE CABRA

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

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

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

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

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

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

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

Estudios en niños han demostrado que los resultados obtenidos en cuanto a ganancia de peso, aumento en la estatura, mineralización esquelética, densidad de hueso y contenido de vitaminas en sangre (vitamina A, niacina, tiamina y riboflavina) son superiores cuando se suministra una alimentación con leche de cabra (Chacón, 2005). No obstante, los pediatras no la recomiendan como sustituto total de la leche materna en

niños menores de un año dado su alto nivel proteico y mineral, y por su bajo contenido de carbohidratos, ácido fólico y vitaminas B<sub>6</sub> y B<sub>12</sub> (Darnton y col., 1987).

### **2.5.1. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS**

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

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

El sabor se debe, según Kim Ha y Lindsay (1991), a los ácidos grasos libres, especialmente a los de cadena ramificada 4-metiloctanoico y 4-etiloctanoico. También



contribuyen al fuerte sabor de la leche caprina las mayores concentraciones de ácidos grasos caproico, caprílico y cáprico, de 6, 8 y 10 átomos de carbono respectivamente. Además, su mayor contenido con respecto a otras leches en Cl y minerales, le confieren un sabor ligeramente salobre.

Se diferencia de la leche de vaca en que ésta es ligeramente ácida, mientras que la de cabra es casi alcalina (pH 6.7), debido a su mayor contenido proteico y a las diferentes combinaciones de sus fosfatos (Saini y Gill, 1991), por lo que esta leche se utiliza en personas con problemas de acidez (Jandal, 1996).

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

### **2.5.2. COMPOSICIÓN DE LA LECHE DE CABRA**

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

La composición general de la leche de cabra varía dentro de un amplio margen dependiendo de las características genéticas propias de cada raza. Estas diferencias genéticas tienen una considerable influencia en la digestión de esta leche. Aún más, el estado y el momento de lactancia en que se hace el ordeño, así como la dieta del animal,

su salud y su estado fisiológico general tiene un efecto directo sobre todos los constituyentes mayores y menores de la leche (Chacón, 2005).

De manera que el contenido graso puede variar desde un mínimo del 3,00% hasta un máximo de 6.63% la proteína desde un 2.90% hasta un 4.60%, la lactosa puede oscilar entre un 3.80-5.12% mientras que la caseína se altera menos por esos factores: 2.45-2.72% (Gnan y col., 1985; Espie y Mullan, 1990; Faria y col., 1999):

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

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

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

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

En cuanto al porcentaje de materia grasa y su composición, como ya se ha comentado, depende en gran medida de la dieta y carga genética del animal, así como

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

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

**Tabla 4.** Composición química de la leche de cabra en comparación con la de vaca (modificado de Sanz Ceballos y col., 2009).

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

### 2.5.2.1. PROTEÍNAS Y AMINOÁCIDOS

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

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

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

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

**Tabla 5.** Fracción proteica de la leche de cabra (modificado de Sanz Ceballos y col., 2009).

|   | LECHE CABRA<br>(g/100 g) | LECHE VACA<br>(g/100 g) | DIFERENCIAS<br>PARA LECHE DE<br>CABRA (%) |
|---|--------------------------|-------------------------|---|
| <b>Caseína</b>  | 82.70                    | 82.65                   | ~   |
| <b><math>\alpha</math>1-caseína</b>                   | 18.92                    | 30.80                   | <b>- 62.8</b>                             |
| <b><math>\alpha</math>2-caseína</b>                   | 8.52                     | 7.50                    | ~   |
| <b><math>\beta</math>+<math>\kappa</math>-caseína</b> | 55.26                    | 44.35                   | <b>+19.7</b>                              |
| <b>Proteínas Séricas</b>                              | 17.30                    | 17.35                   | ~   |

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

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

que tienen contacto. En este sentido las  $\alpha$ -lactoalbúminas y  $\beta$ -lactoglobulinas que se encuentran en la fracción acuosa de la leche (el suero), son menos problemáticas ya que son alterables por la acción del calor, al ser termosensibles, y por lo tanto su poder alergénico se inactiva en productos tratados térmicamente como son las leches en polvo o de larga duración pasteurizadas con un sistema de ultra alta temperatura a 100 °C durante 10 segundos por UHT; sin embargo, las caseínas son termoestables a los tratamientos estándar, y por lo tanto las personas sensibles a ellas reaccionarán ante cualquier producto que las contengan aunque haya sido tratado térmicamente (Chacón, 2005).

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

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

Seis de los diez aminoácidos esenciales se encuentran en cantidades superiores en la leche de cabra frente a la de vaca (Haenlein, 2004). Cabe destacar el alto contenido de lisina de la leche de cabra a pesar de tener menor cantidad de  $\alpha$ 1-caseína (Sanz Ceballos, 2007).

De acuerdo con Chandan y col. (1992), la concentración enzimática en las leches de cabra y vaca son bastante diferentes. La actividad proteolítica de la leche de cabra fresca es más alta que la de vaca, mientras que la actividad xantina-oxidasa (XO) es un

10% menor en la leche de cabra. La lipólisis de la leche de cabra es muy diferente a la de vaca, generándose en aquella ácidos grasos libres y productos aromáticos característicos, debidos a la distribución de la lipoprotein-lipasa (LPL) en varias de sus fracciones.

El consumo de dieta basada en leche de cabra conduce a una mejora de la utilización nutritiva de proteína en comparación con la dieta basada en leche de vaca en modelos animales con resección intestinal (Barrionuevo y col., 1980; 1985). López-Aliaga y col. (2003) indicaron que el consumo de leche de cabra en animales con un 50% de resección de intestino delgado conduce a una mejora en el coeficiente de eficacia en crecimiento, conversión del alimento y una mejor utilización nutritiva de la proteína en dicha patología.

#### **2.5.2.2. HIDRATOS DE CARBONO**

En cualquier leche el hidrato de carbono mayoritario es la lactosa (4,7-4,8%). Antes de ser absorbido por el intestino delgado y pasar a la sangre, este disacárido tiene que descomponerse en azúcares simples (glucosa y galactosa). Este paso se realiza en la superficie de las células de la mucosa intestinal por medio de una enzima llamada lactasa, que determina la capacidad de digestión de la leche. Si existe una insuficiencia de lactasa, el azúcar de la leche se acumula en el intestino, fermenta y produce gas, más tarde será evacuada mediante deposiciones líquidas (diarrea), debido al aumento en la luz intestinal de este disacárido osmóticamente activo. Así, valores bajos de lactasa se asocian a la intolerancia láctea (Ganong, 2004).

El contenido de lactosa en la leche de cabra es bajo en comparación con la leche de otras especies animales (aproximadamente de 1% a 13% menos que la de vaca y

hasta 41% menos que la humana), lo cual está directamente relacionado con que esta leche presente menos problemas asociados con la intolerancia (Chacón, 2005).

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

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

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

### **2.5.2.3. LÍPIDOS**

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



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

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

La leche de cabra es más saludable que la de otros rumiantes, en gran medida, gracias a su perfil de ácidos grasos (Haenlein, 2004). Una de las principales diferencias en la composición lipídica de las leches de cabra y vaca está en el tipo de ácidos grasos que componen los triglicéridos. En la leche de cabra el porcentaje de ácidos grasos de cadena media (C6:0 caproico, C8:0 caprílico, C10:0 cáprico) es superior al de la leche de vaca (en un 46%). Así, la leche de cabra es más rica en triglicéridos de cadena media (MCT). Estos triglicéridos son una fuente de energía rápida, ya que se absorben

directamente en el intestino delgado proximal y no necesitan la participación de las sales biliares para su absorción. Por ello son muy útiles en dietas para pacientes con insuficiencia pancreática, fibrosis quística, déficit o ausencia de sales biliares, hepatitis crónica o neonatal, cirrosis biliar o alcohólica, ictericia obstructiva e hiperlipoproteinemia (Boza y Sanz Sampelayo, 1997). Además, la oxidación mitocondrial de los ácidos grasos de cadena media es, en parte, independiente de los niveles de carnitina, lo cual supone una ventaja en casos de déficits de este enzima (Odle, 1997). Debido a su rápida absorción, los MCT han sido utilizados en la prevención de la obesidad. Los ácidos grasos derivados de estos triglicéridos son rápidamente oxidados en el hígado, por lo que estimulan la saciedad de forma rápida, disminuyen los depósitos de grasa y facilitan el control de peso, sin modificar el aporte energético (St-Onge y Jones 2002).

En un estudio realizado en ratas con resección intestinal del 50% de intestino delgado distal, la utilización digestiva de la grasa fue mayor en los animales que consumieron dieta elaborada a base de leche de cabra (rica en MCT), con respecto a los que consumían dieta basada en leche de vaca (Alfárez y col., 2001). Recientemente, otro estudio de Díaz-Castro y col (2013) revela que el consumo de leche de cabra mejora el perfil lipídico y reduce los niveles de colesterol LDL circulante, debido a la mayor excreción por vía biliar y a la disminución de la síntesis endógena del mismo.

La leche de cabra excede a la de vaca en la cantidad de ácidos grasos esenciales que no son sintetizados por el organismo humano como el linoleico, linolénico, araquidónico que también presentan beneficios para la salud humana (Haelein, 2004), lo cual es muy valioso en términos de la aceptación de este alimento debido a la creciente preocupación por la nutrición. Se ha demostrado que la leche de cabra es un alimento cardiosaludable, ya que reduce los niveles de LDL-colesterol, manteniendo dentro del

rango fisiológico los niveles de triglicéridos, HDL-colesterol y transaminasas (GOT y GPT) (López-Aliaga y col., 2005). Varios estudios han investigado, los posibles efectos del ácido linoleico conjugado (CLA) sobre la salud humana, sus propiedades están relacionadas con isómeros específicos, con propiedades anticancerígenas (Ip y col., 1999), antiaterogénicas, (McGuire y McGuire, 2000) y antidiabéticas (tipo II) (Ryder y col., 2001), alterando la división de sustancia nutritiva y el metabolismo lipídico (Park y col., 1999), reduciendo la hiperglucemia, con modulación inmune y mejora de la mineralización de hueso (McGuire y McGuire, 2000; Pariza y col., 2001). El contenido de CLA está muy relacionado con la dieta del animal.

#### **2.5.2.4. MINERALES**

La composición mineral de las leches de cabra y vaca no presenta grandes diferencias (Haenlein, 2001). Sin embargo, es destacable la mayor cantidad de Ca, P, K, Mg y Cl, y la menor de Na y S, de la leche de cabra respecto a la de vaca (Park, 2006).

Asimismo, existen estudios científicos que demuestran que la biodisponibilidad de ciertos minerales si es diferente, siendo mucho más ventajosa en la leche de cabra (Gueguen, 1996; López-Aliaga y col., 2000; Campos y col., 2003, López-Aliaga y col., 2003; Alférez y col., 2003; Alférez y col., 2006; Campos y col., 2007; Díaz-Castro y col., 2009). La composición mineral de la leche depende de la especie animal, de la época del año y de la alimentación proporcionada.

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

|           | <b>LECHE CABRA<br/>(g/100 g)</b> | <b>LECHE VACA<br/>(g/100 g)</b> | <b>DIFERENCIAS PARA<br/>LECHE DE CABRA (%)</b> |
|-----------|----------------------------------|---------------------------------|--|
| <b>Ca</b> | 158.57                           | 113.58                          | <b>+28.4</b>                                   |
| <b>P</b>  | 118.97                           | 87.04                           | <b>+26.8</b>                                   |
| <b>Mg</b> | 12.92                            | 9.40                            | <b>+27.2</b>                                   |
| <b>Fe</b> | 0.15                             | 0.09                            | <b>+40.0</b>                                   |
| <b>Cu</b> | 0.042                            | 0.014                           | <b>+66.6</b>                                   |
| <b>Zn</b> | 0.528                            | 0.463                           | <b>+12.3</b>                                   |

La leche de cabra contiene una cantidad de Fe ligeramente superior a la de vaca y la biodisponibilidad de este elemento es mucho mayor en la primera. En un estudio realizado por López-Aliaga y col., (2000), la utilización digestiva del Fe y Ca, así como el depósito en órganos diana fue superior en los animales que ingirieron dietas basadas en leche de cabra, lo cual sugiere que la leche de cabra minimiza las interacciones Fe-Ca, y por tanto, favorece su metabolismo. Además, Alférez y col., (2006) estudiaron el efecto de la leche de cabra comparativamente a la de vaca en ratas con anemia ferropénica nutricional inducida, concluyendo que el Fe presente en la leche de cabra favorece su depósito en órganos diana y la vuelta a la normalidad de los parámetros hematológicos alterados como consecuencia de la anemia ferropénica nutricional. El efecto beneficioso de la leche de cabra sobre la utilización digestiva de Fe puede deberse a varios factores nutricionales que se encuentran en la leche de cabra en mayor proporción como son: la cisteína y la lisina, que inducen la solubilización de Fe ferroso o férrico formando quelatos tridentados, son el principal factor asociado con una mayor absorción del metal (Van Campen, 1973). Por otra parte, el mayor contenido de ácido ascórbico (vitamina C) en la leche de cabra, contribuye a aumentar la absorción de Fe

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

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

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

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

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

La leche de la cabra contiene Se en una cantidad similar a la leche materna (13,3  $\mu\text{L}$  vs. 15,2  $\mu\text{L}$ ) y muy superior a la leche de vaca (9,5  $\mu\text{L}$ ). Este mineral se caracteriza

por su acción antioxidante (Food and Nutrition Board, 2004) puesto que actúa como cofactor de la enzima glutatión peroxidasa, implicada en los procesos de eliminación de radicales libres del organismo. Así pues, el aporte de Se es muy importante no sólo porque suele ser deficiente en el cuerpo humano, si no porque ayuda a controlar el sistema inmunológico y actúa directamente sobre ciertos virus impidiendo su multiplicación. El Se se vincula más con la parte acuosa que con la fracción grasa de la leche, pues en la leche descremada queda el 94% del Se total, del cual un 69% se asocia con la fracción de caseína (Dael y col., 1992).

#### **2.5.2.5. VITAMINAS**

La leche de cabra contiene niveles más altos de vitaminas del grupo B que la leche de vaca, a excepción de las vitaminas B<sub>6</sub> y B<sub>12</sub> que están en menor cantidad (Jauber y Kalantzopoulos, 1996). El contenido en vitamina D y ácido nicotínico también es superior en la leche de cabra.

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

El principal inconveniente de la leche de cabra es su bajo contenido en ácido fólico (vitamina B<sub>9</sub>) en comparación con el de la leche de vaca y la humana. Algunos casos descritos de anemia megaloblástica (patología asociada al déficit de esta vitamina) en niños de 3 a 12 meses alimentados exclusivamente con leche de cabra, fue una de las razones del descrédito que sufrió la leche caprina en los años 60 y 70 (Sullivan y col.,

1966). Esta carencia se debe a una glicoproteína que presenta la capacidad de unir ácido fólico y que no se encuentra en la leche de vaca (Chandan y col., 1992). Esta patología responde muy bien al tratamiento con ácido fólico. Trabajos experimentales han demostrado que la fortificación de la leche de cabra con ácido fólico no solo eleva su nivel nutricional si no que debería ser un estándar cuando esta leche se destina a dietas infantiles (Chacón, 2005).

**Tabla 7.** Composición vitamínica de las leches de cabra y vaca (modificado de Chandan y col., 1992; O'Connor, 1994).

| VITAMINAS               | LECHE DE CABRA | LECHE DE VACA |
|-------------------------|----------------|---------------|
| A, UI/L                 | 2030.0         | 1260.0        |
| D, µg/L                 | 0.6            | 0.3           |
| E, mg/L                 | 0.3            | 1.0           |
| K, µg/L                 | 12.0           | -             |
| B <sub>1</sub> , mg/L   | 0.5            | 0.1           |
| B <sub>2</sub> , mg/L   | 1.4            | 1.4           |
| Niacina, mg/L           | 2.7            | 0.8           |
| Ácido ascórbico, mg/L   | 21.0           | 15.6          |
| Ácido pantoténico, mg/L | 3.1            | 3.0           |
| B <sub>6</sub> , mg/L   | 0.5            | 0.7           |
| B <sub>12</sub> , µg/L  | 0.7            | 3.5           |
| Ácido fólico, µg/L      | 6.0            | 50.0          |
| Colina, mg/L            | 119.9          | 120.0         |
| Inositol, mg/L          | 110.5          | 109.3         |

### 2.5.2.6. FACTORES BIOACTIVOS

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

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

La leche de cabra también es más rica en nucleótidos. Al contrario de lo que ocurre con las poliaminas, el patrón de secreción de nucleótidos es muy similar en las leches caprina y bovina. En el calostro, la concentración es máxima, y a partir de las primeras semanas, disminuye. Sin embargo, el contenido en nucleótidos totales es



siempre mayor en la leche de cabra. La leche de vaca sólo es más rica en ácido orótico (73 mg/L) (Belitz y Grosch, 1997), producto intermedio de la biosíntesis de los nucleótidos de pirimidina asociado con el síndrome del hígado graso, del que solo existen trazas en la leche humana (Jauber y Kalantzopoulos, 1996).

La leche de cabra es particularmente rica en la coenzima Q, por lo que también se le ha atribuido cierta actividad anticancerígena (Chacón, 2005). Otros factores bioactivos presentes en cantidades traza se recogen en la siguiente tabla:

**Tabla 8.** Factores bioactivos presentes en la leche de cabra (Chacón, 2005).

| FACTOR BIOACTIVO                    | FUNCIONALIDAD   |
|-------------------------------------|---|
| Linfocitos B                        | Producción de anticuerpos                                 |
| Macrófagos                          | Respuesta inmune  |
| Neutrófilos                         | Respuesta inmune  |
| Linfocitos T                        | Respuesta inmune  |
| Anticuerpos IgA/IgG                 | Respuesta inmune  |
| Proteína ligante de B <sub>12</sub> | Evita proliferaciones bacterianas indeseable              |
| Factor bifidum                      | Promueve el desarrollo de <i>bifidobacterium</i> en colon |
| Fibronectina                        | Favorece a los macrófagos                                 |
| γ Interferón                        | Favorece a los macrófagos                                 |
| Lisozima                            | Ruptura de paredes celulares microbianas                  |
| Mucinas y oligosacáridos            | Probióticos   |
| Factores de crecimiento             | Estímulo del sistema digestivo y del crecimiento          |





### 3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

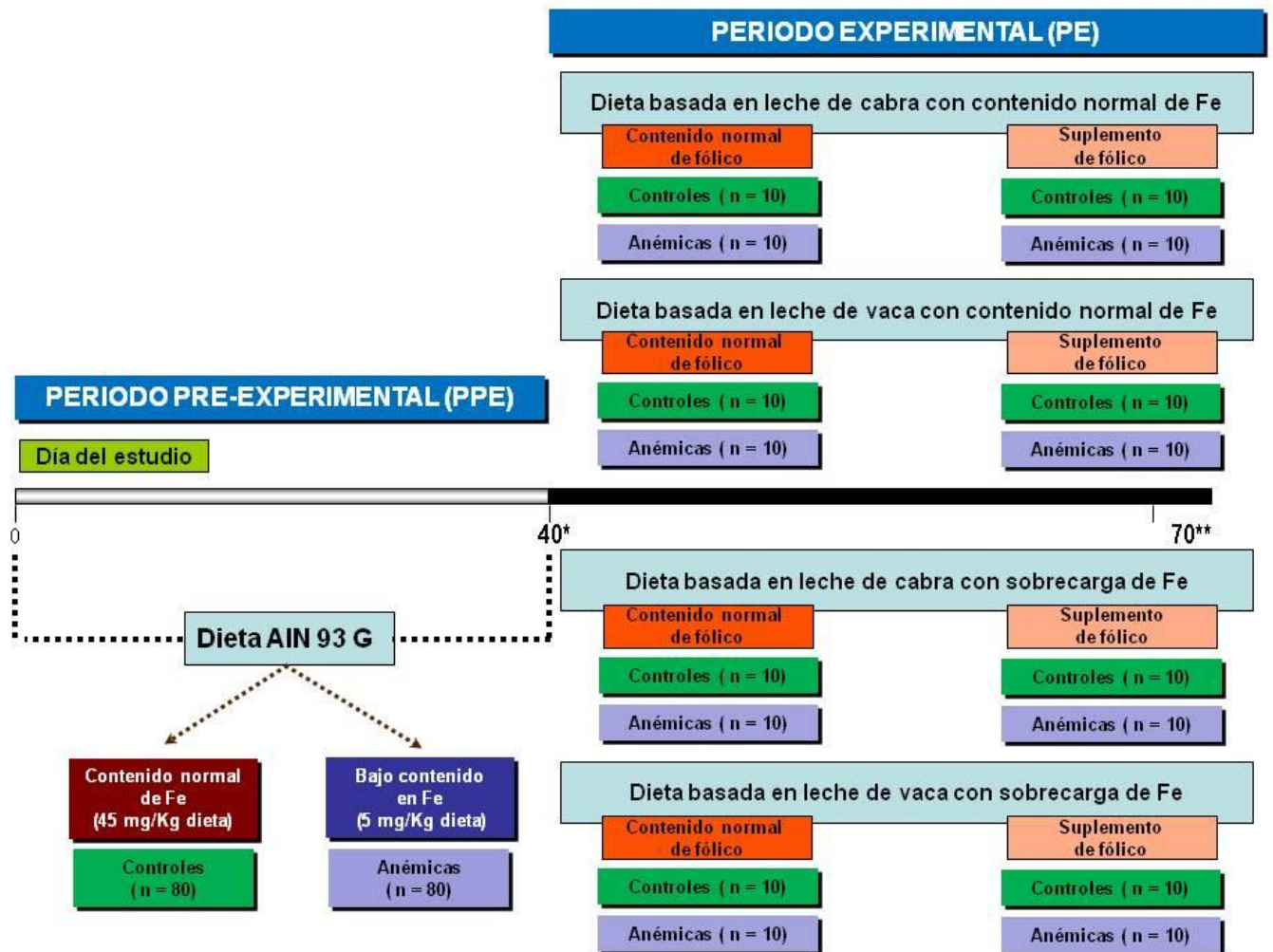
Se han utilizado 160 ratas macho (*Ratus norvegicus*, raza Wistar albina), recién destetadas, procedentes del Servicio de Animales de Laboratorio de la Universidad de Granada. Los protocolos de manejo, cuidado y sacrificio de animales empleados fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de Granada y de acuerdo con las directrices comunitarias de la Unión Europea.

Tras el destete, las ratas son divididas en dos grupos experimentales. La ferrodeficiencia es inducida en uno de los grupos por la técnica desarrollada previamente por nuestro grupo de investigación (Pallarés y col., 1993): las ratas son sometidas a un periodo pre-experimental (PPE) de 40 días, en los cuales se les suministra dieta estándar AIN-93G (Reeves y col., 1993), pero con bajo contenido en Fe (5 mg/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 /kg dieta) (Reeves y col., 1993).

Desde el comienzo del estudio, las ratas fueron alojadas en células individuales de metabolismo. Estas células se encuentran situadas en una habitación aireada y termorregulada ( $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) con fotoperíodo controlado de 12 horas (luz-oscuridad) y un 55-60% de humedad. El agua bidestilada está disponible *ad libitum*, mientras que la ingesta de alimento se controla (*pair feed*), de manera que los animales ingieren el 80% de la ingesta media de cada periodo al día, para evitar las diferencias debidas a la cantidad de dieta ingerida. En el día 40 del PPE, se toman muestras de sangre periférica de la vena caudal para el control hematológico de la anemia.

Tras el PPE, los animales (n=160) se sometieron a un periodo experimental (PE) en el cual, los grupos controles y anémicos eran divididos en cuatro subgrupos, alimentados durante 30 días con 8 tipos diferentes de dieta: basadas en leche de cabra o

vaca, y con contenido normal (45 mg/kg dieta) o sobrecarga de Fe (450 mg/kg dieta) y contenido normal (2mg/kg dieta) o suplemento de ácido fólico (40 mg/kg dieta). La dosis de 450 mg Fe/kg dieta es la más común para inducir la sobrecarga crónica de Fe en estudios animales (Raja y col., 1994) y la dosis de 40 mg/kg dieta de ácido fólico es la más comúnmente empleada en estudios de suplementación (Achón y col., 2000). La estabilidad del ADN fue evaluada mediante ensayo comet alcalino, tras toma de muestra sanguínea de la vena caudal. Posteriormente, los animales son sacrificados siguiendo el Protocolo del Comité de Ética de la Universidad de Granada. Se anestesia al animal con pentobarbital sódico (Sigma Diagnostics, St Louis, MI, USA) a una dosis de 5 mg/100 g de peso por vía intraperitoneal y tras laparotomía media, las ratas son desangradas mediante canulación de la aorta abdominal. Parte de sangre es obtenida con EDTA como anticoagulante, se centrifuga (1500 g, 4°C, 15 min) para la obtención de plasma y se emplea para la determinación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Otra alícuota es obtenida sin anticoagulante, para separar las células rojas del suero. Posteriormente se extraen el hígado, cerebro y mucosa duodenal y se lavan con solución salina (NaCl al 0.9%). Las fracciones citosólicas de hígado, cerebro y mucosa duodenal y eritrocito se obtienen por centrifugación diferencial con hemólisis hipotónica el mismo día del sacrificio y se conservan congeladas a -80°C hasta posterior análisis del daño oxidativo a los lípidos y proteínas. La Figura 12 muestra el diseño experimental del estudio.

**Figura 12.** Diseño experimental del estudio

Leyenda de la Figura 12:

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

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

### 3.2. DIETAS ENSAYADAS

La Tabla 9 muestra la composición de las dietas ensayadas durante el PPE y PE.

**Tabla 9.** Dietas ensayadas durante el PPE y PE.

| COMPONENTE  | CANTIDAD (g/Kg) |
|---|-----------------|
| <b>PPE</b>  |                 |
| <b>Dieta AIN 93 G (contenido normal o bajo contenido en Fe) <sup>a</sup></b>        |                 |
| Caseína   | 200             |
| Aceite de oliva virgen  | 100             |
| Almidón de trigo  | 500             |
| Ingredientes constantes <sup>b</sup>  | 200             |
| <b>PE</b>   |                 |
| <b>Dietas con leche de vaca (contenido normal o sobrecarga de Fe) <sup>c</sup></b>  |                 |
| Proteína de leche de vaca   | 204             |
| Lactosa de leche de vaca  | 295             |
| Grasa de leche de vaca  | 100             |
| Almidón de trigo  | 201             |
| Ingredientes constantes <sup>b</sup>  | 200             |
| <b>Dietas con leche de cabra (contenido normal o sobrecarga de Fe) <sup>c</sup></b> |                 |
| Proteína de leche de cabra  | 205             |
| Lactosa de leche de cabra   | 290             |
| Grasa de leche de cabra   | 100             |
| Almidón de trigo  | 205             |
| Ingredientes constantes <sup>b</sup>  | 200             |

Leyenda de la Tabla 9:

<sup>a</sup> Contenido de Fe en la dieta durante el PPE: Las dietas fueron preparadas de acuerdo con las recomendaciones del Instituto Americano de Nutrición (Reeves y col., 1993) para las ratas controles (contenido normal de Fe: 45 mg/kg dieta) y con bajo contenido en Fe para las ratas anémicas (5 mg/kg dieta) (Pallarés y col., 1993).

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

<sup>c</sup> Para las dietas basadas en leche de cabra y vaca empleadas en el PE se formularon correctores minerales específicos teniendo en cuenta el contenido mineral que aportaban las leches para alcanzar las citadas recomendaciones. Las dietas se prepararon de acuerdo a las recomendaciones del Instituto Americano de Nutrición (Reeves y col., 1993) para los grupos control (45 mg/kg dieta) y con elevado contenido en Fe (450 mg/kg dieta) para los grupos de sobrecarga (Raja y col., 1994). El corrector vitamínico se preparó de acuerdo a las directrices del Instituto Americano de Nutrición (Reeves y col., 1993) para las dietas normales en ácido fólico (2 mg/kg dieta) y con alto contenido en ácido fólico (40 mg/kg dieta) para las suplementadas (Achón y col., 2000).

La dieta estándar AIN 93-G del PPE y los suplementos minerales y vitamínicos son preparados de acuerdo a las recomendaciones del Instituto Americano de Nutrición (Reeves y col., 1993) pero con ligeras modificaciones en la fuente y nivel de grasa: la grasa proviene de aceite de oliva en lugar de soja (debido a sus conocidos efectos beneficiosos sobre la salud y por ser la más comúnmente consumida en nuestro país) y la proporción de grasa es 10% en lugar del 7%. La fuente de Fe empleada fue citrato férrico. El contenido en Fe por análisis en las dietas ensayadas utilizadas durante el PPE fue: 44.71 mg/kg en la dieta para los animales controles y 6.31 mg/kg en la dieta que recibieron las ratas anémicas. Las dietas basadas en leche se elaboraron con leche en polvo desnatada de cabra (raza Murciano-Granadina) o vaca (raza Holstein). Se tomaron las cantidades necesarias de leche en polvo de cabra o vaca para obtener una dieta con un 20% de proteína. Puesto que el contenido de grasa en la dieta era



indetectable (< 0.01%, debido a que se trata de leches desnatadas), ésta se añadió para conseguir una dieta con un 10% de grasa. La grasa se obtuvo por purificación de nata o mantequilla (de cabra o vaca, respectivamente). Ambos tipos de grasa se fundían al baño maría y posteriormente se centrifugaban a 300 g (Hetticj, Universal 30 RF, Germany) durante 15 min a 4°C, para separar el sobrenadante que constituía la grasa pura. El contenido en Fe (mg/kg dieta) en las dietas usadas durante el PE, fue el siguiente por análisis:

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

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

### **3.3. TÉCNICAS ANÁLITICAS**

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

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

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

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

### **3.3.3. CONTENIDO PROTEICO**

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

### **3.3.4. MINERALIZACIÓN POR VÍA HÚMEDA**

Un gramo de dieta en sustancia seca se coloca en un vaso de precipitado, se añaden 10-12 mL de ácido nítrico concentrado (riqueza del 69%) y se tapa con un vidrio de reloj. Se coloca en un baño de arena SELECTA (Selecta, Barcelona, España) a una temperatura de 70-80°C y se espera la aparición de vapores rojizos/anaranjados de óxido nítrico. Se añaden 2 mL de ácido nítrico (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) a la muestra, tantas veces como sea necesario hasta la aparición de vapores blanquecinos. En este momento se comienza a añadir 10 mL de mezcla nítrico/perclórico (4:1, v/v) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) en alícuotas de 2 mL cada vez, hasta completar la mineralización. Una vez finalizada la mineralización, se deja enfriar, se filtra en papel Whatman del nº 41, libre de cenizas (Whatman International Ltd., Maidstone, UK) y se enrasa hasta un volumen final de 25 mL en un matraz aforado. Como resultado final obtenemos una solución transparente que se emplea en la posterior determinación de minerales.

#### **3.3.4.1. DETERMINACIÓN DE HIERRO**

Las concentraciones de Fe en las dietas se determinan por espectrofotometría de absorción atómica (EAA) (PERKIN ELMER 1100B, Norwalk, USA) a partir de una

muestra adecuada, previamente mineralizada por vía húmeda y diluida convenientemente, comparándose frente a una serie de patrones de concentración conocida. En la espectroscopia atómica se consigue que los átomos individuales de una especie interactúen con la radiación electromagnética.

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 BCR 185; Community Bureau of Reference, Brussels, Belgium). El valor derivado del análisis de este material de referencia es: Fe:  $210 \pm 6$  mg/kg (valor certificado:  $214 \pm 6$  mg/kg).

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

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

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

### **3.3.6. FERRITINA SÉRICA**

Los niveles de ferritina sérica se determinan usando 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 microplate reader (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 (capacidad total de fijación al Fe) y los niveles de Fe sérico enzimáticamente, usando un kit comercial SIGMA Iron and total iron-binding capacity (Sigma Diagnostics, St. Louis, MI, USA). El ensayo se adapta a microplacas, usando 50  $\mu$ L de suero en 250  $\mu$ L de tampón más 5  $\mu$ L de reactivo cromógeno. La absorbancia de la reacción se monitoriza en un lector de microplacas a 550 nm usando un lector Bio-Rad

microplate reader (Bio-rad Laboratories Inc., California, USA). El porcentaje de saturación de la transferrina ha sido calculado usando la siguiente ecuación:

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

### **3.3.8. DAÑO OXIDATIVO AL MATERIAL GENÉTICO. ELECTROFORESIS EN GEL DE CÉLULAS AISLADAS (ENSAYO COMET ALCALINO)**

La técnica usada en nuestro estudio es el ensayo Comet alcalino (alkaline single-cell gel electrophoresis). De forma general, el ensayo comet alcalino cursa con varias fases comenzando con el aislamiento de las células, incorporación de éstas en agarosa, lisis con detergente y un alto contenido en sales, tratamiento alcalino para desenmarañar las hebras de ADN, electroforesis, neutralización, tinción y cuantificación (Duthie and Hawdon, 1998; Díaz-Castro y col., 2008).

Se utilizan portas de cristal donde se depositan 85  $\mu\text{L}$  de agarosa HMP (High Melting Point) al 1% en PBS que es desecada previamente en la estufa a 40° C. De esta manera se consigue que las sucesivas capas de agarosa queden fijadas al portaobjetos. Una vez desecada, se depositan 85  $\mu\text{L}$  de agarosa HMP al 1% en PBS a 37°C y pH=7.4. Se coloca un cubreobjetos y se deja el porta en la nevera (5 minutos) para que solidifique. Se retiran los cubres después de la solidificación.

#### **Aislamiento de linfocitos de sangre periférica**

Para el aislamiento de los linfocitos se toman 50  $\mu\text{L}$  de sangre periférica de la vena caudal y se introducen en un eppendorf con EDTA como anticoagulante y completando hasta un volumen final de 1 mL con medio de cultivo RPMI 1640 (Sigma

Diagnostics, St. Louis, MO, USA) suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal (Gibco, Scotland, UK).

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

### **Inclusión de linfocitos en agarosa**

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

### **Lisis de las membranas celulares con detergente**

Para conseguir la ruptura de las membranas celular y nuclear, se colocan los portas en solución de lisis [2.5 M NaCl, 10 mM Tris, 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA, NaOH a pH=10 y 1% (v/v) Triton X-100 (Sigma Diagnostics, St. Louis, MI, USA)] durante al menos 1 hora, con lo cual se consigue que se desestructuren las membranas plasmáticas y se eliminan las proteínas celulares, así queda al descubierto el nucleóide con el material genético, donde finalmente se evalúa el daño.

### **Tratamiento alcalino**

Posteriormente, los portas se colocan de forma ordenada (asegurando el contacto entre ellos, para que la migración de los fragmentos de ADN sea correcta) en una cubeta de electroforesis que contiene tampón alcalino (0.3 M NaOH y 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA) durante 40 minutos a 4° C, con el fin de que se produzca la desnaturalización o separación de las cadenas de ADN.

### **Electroforesis en gel de las células aisladas**

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

### **Neutralización**

Una vez terminada la electroforesis, se necesita neutralizar el álcali de los geles lavando los portaobjetos con una tampón adecuado (0.4M Tris base a pH 7.5). Se someten a tres lavados consecutivos de 5 minutos cada uno manteniendo la temperatura de 4° C y oscuridad.

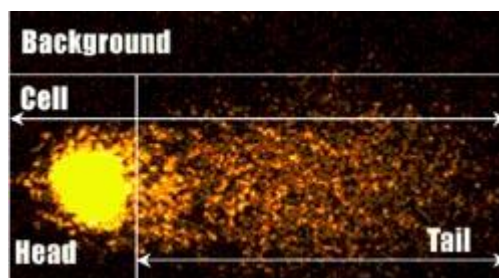
### **Tinción y cuantificación del ensayo mediante microscopía y software**

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

Los nucleoides teñidos con DAPI se examinan bajo un microscopio-UV Leica DMLS (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) con filtro de excitación de 435nm, y

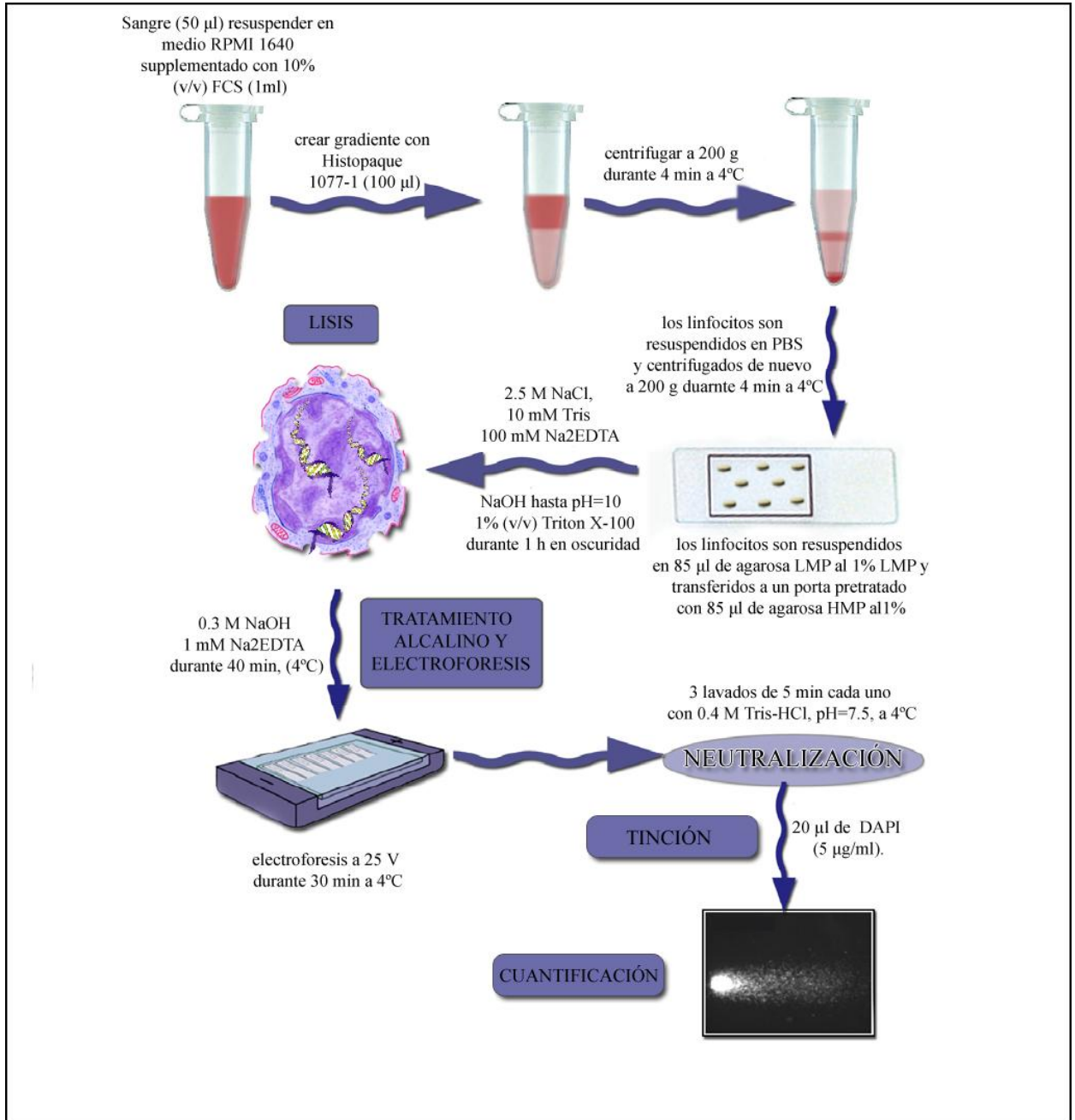
amplificador de 400. El análisis se realizó con una cámara Hitachi (Satandard Video with Meteor II) empleando el software para imágenes Kinetic Imaging Komet 5.5 (Kinetic Imaging Ltd, Liverpool, UK). Se contabilizaron un total de 100 comets por cada gel (seleccionados al azar en diversos campos). Los parámetros usados para la cuantificación del daño en el ADN han sido: el porcentaje de fluorescencia en la cola del comet (representando la fracción de ADN en la misma), porcentaje de ADN en la cabeza (representando la fracción del material genético en la misma) y el Olive Tail Moment (definido como el producto de la longitud de la cola del comet y la fracción de ADN en la misma,  $OTM = [\text{Media de la cola} - \text{Media de la cabeza}] \times \% \text{ ADN en cola}/100$ ). El OTM es un buen índice para cuantificar el daño en el ADN, porque evalúa no sólo que cantidad de ADN ha migrado desde la región de la cabeza, sino que además indica la distancia que ha recorrido ese fragmento de ADN (Figura 13). En la figura 14 se muestra un esquema simplificado del ensayo.

**Figura 13.** Representación de los índices empleados para la determinación del OTM.





**Figura 14.** Esquema simplificado de las diferentes fases del ensayo Comet alcalino.



### **3.3.9. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE CITOSOL ERITROCITARIO, HEPÁTICO, CEREBRAL, DUODENAL Y DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO PROTEICO**

Se llevaron a cabo distintas centrifugaciones diferenciales para separar las fracciones citosólicas de eritrocito, hígado, cerebro y mucosa duodenal de acuerdo al procedimiento descrito previamente (DeSandro y col., 1991). Las muestras de hígado y cerebro y raspado de mucosa duodenal 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 centrífuga 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 hígados y cerebros, 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 hemolisis 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.

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

### **3.3.10. DAÑO OXIDATIVO A LOS LÍPIDOS. ESPECIES REACTIVAS AL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)**

La peroxidación lipídica se evalúa en plasma y fracciones citosólicas de eritrocito, hígado, cerebro, y mucosa duodenal, 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 (TCA) 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 (TEP) (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland) como fuente de malondihaldehído (MDA).

### **3.3.11. DAÑO OXIDATIVO A LAS PROTEÍNAS. DETERMINACIÓN DE GRUPOS CARBONILO**

La oxidación proteica en hígado, cerebro, mucosa duodenal y plasma, se determina de acuerdo al método espectrofotométrico basada con la reacción de la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) con las proteínas carbonilo (PC) para formar hidrazonas (Reznick y Packer, 1994). Las muestras proteicas se colocan en dos eppendorfs añadiendo al primero 1 mL de DNPH 10 mM (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland) en HCl 2.5 M (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), mientras que al otro tubo se le añade 1 mL de HCl 2.5 M. Se incuba 1 hora a temperatura ambiente con vortex cada 10 min. Se añade 500 µL de tricloroacético (TCA) al 20% (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) y se incuba 10 min a 4°C. Tras centrifugar a 3000 g durante 3 min, se lava el pellet 3 veces con 1 mL de etanol-etilacetato (1:1) para eliminar el reactivo libre (dejando 10 min entre lavados). Se redisuelve la proteína en guanidina 6 M a 37°C. Se centrifuga a 3000 g 3 min para eliminar cualquier material insoluble. Puesto que se pierde alrededor de un 10-15% de proteínas en los pasos de lavado, se adopta un

procedimiento de determinación de proteína en los pellets finales tras los lavados. Los pellets tratados con HCl 2.5 M se disuelven en cloruro de guanidina 6 M (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland) y las proteínas son determinadas a una longitud de onda de 280 nm (Thermo Spectronic, Rochester, NY, USA). Los niveles de PC se calculan a la máxima absorbancia (366 nm) (Thermo Spectronic, Rochester, NY, USA) en las muestras tratadas con DNPH, expresando los resultados en nmol/mg proteína.

### 3.3.12. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Los datos se presentan como valor medio  $\pm$  EEM (error estándar de la media) durante el PPE y como valor medio  $\pm$  DER (desviación estándar residual) en el PE. Todos los análisis se han efectuado con el paquete estadístico “Statistical Package for Social Sciences” (SPSS, versión 20.0, 2012). Los datos fueron analizados mediante un diseño aleatorizado en bloques con adaptación factorial (2x2x2x2), 2 (tipo de dieta: leche de cabra frente a leche de vaca) x 2 (grupo de animal: controles frente a anémicas) x 2 (contenido de Fe en la dieta: normal frente a sobrecarga) x 2 (contenido de ácido fólico en la dieta: normal frente a suplementada) y por el método de los mínimos cuadrados (Steel y col. 1997). El modelo tiene en cuenta las variaciones causadas por el tipo de dieta, anemia, contenido de Fe y contenido de ácido fólico en las dietas. Cuando los términos de la interacción no eran estadísticamente significativos ( $P > 0.05$ ), los mínimos cuadrados fueron calculados del modelo, tras omitir estos términos (Steel y col. 1997). Las diferencias entre grupos (control frente anémico, normal de Fe frente a sobrecarga y normal de ácido fólico frente a suplementado) fueron analizados mediante el test de la *t de Student*. El análisis de la varianza (One-Way ANOVA) se empleó para comparar las diferentes dietas suministradas a los dos grupos de animales (controles y anémicos). Las

medias individuales se compararon usando el test “post hoc” de Tukey, cuando los efectos principales y sus interacciones resultaban significativas. Las diferencias son consideradas significativas para todos los tratamientos estadísticos a un nivel de  $P < 0.05$ .





# RESULTADOS Y DISCUSIÓN





#### 4.1. PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS EN SITUACIÓN DE ANEMIA FERROPÉNICA NUTRICIONAL

En los animales controles, todos los parámetros hematológicos estudiados (recuento de hematíes, VCM, hematocrito, plaquetas, Hb, Fe sérico, ferritina sérica, porcentaje de saturación de la transferrina y TIBC) están dentro de los límites normales (Campos y col., 1998) para esta especie al final del PPE. Sin embargo, cuando los animales consumen una dieta con bajo contenido en Fe durante 40 días (PPE), la concentración de Hb disminuye ( $P < 0.001$ ). Además, el hematocrito, el Fe sérico, ferritina sérica y la saturación de la transferrina son bajos ( $P < 0.001$ ), en tanto, los niveles de plaquetas y TIBC están marcadamente elevados ( $P < 0.001$ ) (Tabla 10), resultados que demuestran que la anemia ferropénica ha sido inducida.

**Tabla 10.** Parámetros hematológicos de ratas controles y anémicas en el día 40 del PPE (datos expresados como media  $\pm$  error estándar de la media).

| Parámetros hematológicos             | Grupo experimental                    |                                    |
|--------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|
|                                      | Controles<br>(contenido normal de Fe) | Anémicas<br>(bajo contenido de Fe) |
| Concentración de Hb (g/L)            | 129.1 $\pm$ 2.8                       | 75.5 $\pm$ 2.7 *                   |
| Recuento de hematíes ( $10^{12}$ /L) | 7.2 $\pm$ 0.1                         | 6.3 $\pm$ 0.2 *                    |
| Hematocrito (%)                      | 39.8 $\pm$ 0.7                        | 27.8 $\pm$ 0.5 *                   |
| Recuento de plaquetas ( $10^9$ /L)   | 725 $\pm$ 24.1                        | 1392 $\pm$ 66.8 *                  |
| VCM (fL)                             | 55.7 $\pm$ 0.2                        | 39.2 $\pm$ 0.6 *                   |
| Fe sérico ( $\mu$ g/L)               | 1392 $\pm$ 121                        | 701 $\pm$ 57 *                     |
| Ferritina sérica ( $\mu$ g/L)        | 83.1 $\pm$ 2.6                        | 50.3 $\pm$ 1.4 *                   |
| Saturación transferrina (%)          | 47.2 $\pm$ 7.1                        | 3.8 $\pm$ 0.3 *                    |
| TIBC ( $\mu$ g/L)                    | 2849 $\pm$ 203                        | 17845 $\pm$ 728 *                  |

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

## **4.2. DAÑO OXIDATIVO AL MATERIAL GENÉTICO, LÍPIDOS Y PROTEÍNAS EN LA RECUPERACIÓN DE LA ANEMIA FERROPÉNICA NUTRICIONAL CON DIETAS BASADAS EN LECHE CON CONTENIDO NORMAL O SOBRECARGA DE HIERRO Y SUPLEMENTADAS O NO EN ÁCIDO FÓLICO**

Los datos relativos a los procesos de daño oxidativo al material genético, lípidos y proteína se muestran en las Tablas 11, 12 y 13.

### **4.2.1. DAÑO OXIDATIVO AL MATERIAL GENÉTICO**

Tras 30 días de alimentar a los animales con las dietas basadas en leche con contenido normal o sobrecarga de Fe y contenido normal o suplemento de ácido fólico (día 70 del estudio), el daño intrínseco en el ADN de linfocitos de sangre periférica es mucho más bajo en ambos grupos, controles y anémicos, alimentados con dietas basadas en leche de cabra en comparación con los animales que consumen dietas basadas en leche de vaca ( $P < 0.001$ ), como se pone de manifiesto por el porcentaje de ADN en cabeza, cola y OTM. Este efecto es más pronunciado en ratas anémicas alimentadas con dietas suplementadas en ácido fólico, que es casi tres veces más alto, como revelaba el porcentaje de ADN en la cola y el OTM de ratas alimentadas con dieta basada en leche de cabra versus dieta basada en leche de vaca.

La anemia tiene una influencia positiva en el OTM de ratas que consumen dieta basada en leche de cabra suplementada en ácido fólico (con contenido normal o sobrecarga de Fe) en comparación con los animales alimentados con dietas con

contenido normal de ácido fólico ( $P < 0.05$ ), mejorando la estabilidad del material genético y por tanto disminuyendo la fragmentación de la doble hélice del ADN.

Cuando se suministran las dietas basadas en leche con sobrecarga de Fe, el efecto perjudicial de la sobrecarga de Fe en la estabilidad del ADN es mucho más bajo en los animales que consumen dieta basada en leche de cabra ( $P < 0.001$  para todos los parámetros de estabilidad del material genético estudiados), con valores de OTM que resultan menos de la mitad de aquellos encontrados para los que consumen dietas basadas en leche de vaca, este índice resulta particularmente útil, ya que proporciona la medida más estable para determinar el daño en el ADN en términos relativos, porque presenta un mayor grado de uniformidad en dispersiones cuartiles.

Finalmente, el suplemento de ácido fólico tiene un efecto beneficioso en la estabilidad del ADN en los animales alimentados con ambas dietas basadas en leche ( $P < 0.01$  para el OTM en ratas alimentadas con dietas con contenido normal en Fe;  $P < 0.01$  para el % de ADN en cabeza y cola y  $P < 0.05$  para el OTM en ratas alimentadas con dietas con sobrecarga de Fe) (Tabla 11).

**Tabla 11.** Daño oxidativo en el ADN de linfocitos de sangre periférica de ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche de cabra o vaca, con contenido normal o sobrecarga de Fe y contenido normal o suplemento de ácido fólico (n=10 por grupo).

| PARÁMETRO        | Dieta basada en leche de cabra |                     |                        |                     |                        | Dieta basada en leche de vaca |                        |                      |                        | Nivel de significación           |                 |                 |                 |                     |
|------------------|--------------------------------|---------------------|------------------------|---------------------|------------------------|-------------------------------|------------------------|----------------------|------------------------|----------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------|
|                  | Grupos Control                 |                     | Grupos Anémicos        |                     |                        | Grupos Control                |                        | Grupos Anémicos      |                        | Efectos principales <sup>1</sup> |                 |                 |                 |                     |
|                  | Contenido de Fe                | Normal en fólico    | Suplementada en fólico | Normal en fólico    | Suplementada en fólico | Normal en fólico              | Suplementada en fólico | Normal en fólico     | Suplementada en fólico | DER <sup>2</sup>                 | Dieta           | Anemia          | Contenido de Fe | Contenido de fólico |
| % ADN en cabeza  | Normal                         | 95.27 <sup>a</sup>  | 95.36 <sup>a</sup>     | 94.53 <sup>A</sup>  | 96.64 <sup>A</sup>     | 87.65 <sup>b</sup>            | 85.12 <sup>b</sup>     | 86.75 <sup>B</sup>   | 88.99 <sup>B</sup>     | 0.825                            | <i>P</i> <0.001 | NS <sup>3</sup> | <i>P</i> <0.05  | NS                  |
|                  | Sobrecarga                     | 86.28 <sup>aD</sup> | 94.87 <sup>aE</sup>    | 81.01 <sup>AD</sup> | 95.61 <sup>AE</sup>    | 83.13 <sup>b</sup>            | 86.55 <sup>b</sup>     | 74.65 <sup>BCD</sup> | 89.41 <sup>BE</sup>    | 0.832                            | <i>P</i> <0.001 | NS              |                 | <i>P</i> <0.01      |
| % ADN en cola    | Normal                         | 4.73 <sup>a</sup>   | 4.64 <sup>a</sup>      | 5.47 <sup>A</sup>   | 3.36 <sup>A</sup>      | 12.35 <sup>b</sup>            | 14.88 <sup>b</sup>     | 13.25 <sup>B</sup>   | 11.01 <sup>B</sup>     | 0.825                            | <i>P</i> <0.001 | NS              | <i>P</i> <0.05  | NS                  |
|                  | Sobrecarga                     | 13.72 <sup>aD</sup> | 5.12 <sup>aE</sup>     | 18.99 <sup>AD</sup> | 4.39 <sup>AE</sup>     | 16.87 <sup>a</sup>            | 13.45 <sup>b</sup>     | 25.35 <sup>BCD</sup> | 10.59 <sup>BE</sup>    | 0.832                            | <i>P</i> <0.001 | NS              |                 | <i>P</i> <0.01      |
| OTM <sup>4</sup> | Normal                         | 0.065 <sup>a</sup>  | 0.051 <sup>a</sup>     | 0.078 <sup>A</sup>  | 0.034 <sup>ACE</sup>   | 0.119 <sup>b</sup>            | 0.244 <sup>BE</sup>    | 0.137 <sup>B</sup>   | 0.128 <sup>BC</sup>    | 0.011                            | <i>P</i> <0.001 | <i>P</i> <0.05  | <i>P</i> <0.05  | <i>P</i> <0.01      |
|                  | Sobrecarga                     | 0.060 <sup>a</sup>  | 0.060 <sup>a</sup>     | 0.083 <sup>A</sup>  | 0.046 <sup>ACE</sup>   | 0.171 <sup>bD</sup>           | 0.178 <sup>bD</sup>    | 0.156 <sup>B</sup>   | 0.138 <sup>BC</sup>    | 0.010                            | <i>P</i> <0.001 | <i>P</i> <0.05  |                 | <i>P</i> <0.05      |

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

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

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

<sup>4</sup>OTM, Olive tail moment.

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

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

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

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

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

#### 4.2.2. DAÑO OXIDATIVO A LOS LÍPIDOS

Con respecto al daño oxidativo a los lípidos (Tabla 12), en general, los niveles de TBARS eran más altos en todos los tejidos estudiados, en ambos grupos de animales, (controles y anémicos), alimentados con dieta basada en leche de vaca con sobrecarga de hierro. En los animales alimentados con dietas basadas en leche de cabra con sobrecarga de Fe y suplementada en ácido fólico, este tipo de leche tiene un efecto beneficioso, reduciendo el porcentaje de peroxidación lipídica en hígado, plasma, eritrocito ( $P < 0.05$ ) y especialmente en cerebro y mucosa duodenal ( $P < 0.001$ ), cuyos valores son la mitad de los encontrados en los animales alimentados con dietas basadas en leche de vaca.

La anemia no tiene efecto sobre la peroxidación lipídica (no hay cambios en los niveles de TBARS) en todos los tejidos estudiados bajo las distintas condiciones experimentales.

La sobrecarga de Fe en la dieta tiene un efecto negativo sobre la peroxidación lipídica en ratas controles y anémicas alimentadas con dieta elaborada con leche de vaca y contenido normal de ácido fólico ( $P < 0.01$  en hígado y cerebro;  $P < 0.05$  en plasma, eritrocito y mucosa duodenal).

El suplemento de ácido fólico en la dieta, una vez más, tiene un efecto beneficioso protegiendo a los lípidos del daño oxidativo en todos los tejidos estudiados (hígado, eritrocito, cerebro, mucosa duodenal y plasma), ya sea con contenido normal o sobrecarga de Fe ( $P < 0.001$ ).

**Tabla 12.** Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (nmol/mg proteína) en fracciones citosólicas de hígado, eritrocito, cerebro, mucosa duodenal y plasma de ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche de cabra o vaca, con contenido normal o sobrecarga de Fe y contenido normal o suplemento de ácido fólico (n=10 por grupo).

| TEJIDO          | Dieta basada en leche de cabra |                     |                    |                     | Dieta basada en leche de vaca |                     |                    |                      | Nivel de significación |                  |                 |          |                                  |                 |
|-----------------|--------------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|-------------------------------|---------------------|--------------------|----------------------|------------------------|------------------|-----------------|----------|----------------------------------|-----------------|
|                 | Contenido de Fe                | Grupos Control      | Grupos Anémicos    | Grupos Control      | Grupos Anémicos               | Grupos Control      | Grupos Anémicos    | Grupos Control       | Grupos Anémicos        | DER <sup>2</sup> | Dieta           | Anemia   | Efectos principales <sup>1</sup> | Contenido de Fe |
| Hígado          | Normal                         | 5.85 <sup>a</sup>   | 2.67 <sup>aE</sup> | 5.87 <sup>A</sup>   | 2.67 <sup>AE</sup>            | 5.50 <sup>a</sup>   | 2.75 <sup>aE</sup> | 6.11 <sup>A</sup>    | 2.97 <sup>AE</sup>     | 0.216            | NS <sup>3</sup> | NS       | P < 0.01                         | P < 0.001       |
|                 | Sobrecarga                     | 7.48 <sup>aD</sup>  | 2.77 <sup>aE</sup> | 7.65 <sup>AD</sup>  | 2.84 <sup>AE</sup>            | 8.60 <sup>bD</sup>  | 2.96 <sup>aE</sup> | 8.75 <sup>BD</sup>   | 3.01 <sup>AE</sup>     | 0.223            | P < 0.05        | NS       |                                  |                 |
| Eritrocito      | Normal                         | 8.23 <sup>a</sup>   | 3.92 <sup>aE</sup> | 9.28 <sup>A</sup>   | 4.42 <sup>AE</sup>            | 9.46 <sup>b</sup>   | 5.00 <sup>bE</sup> | 8.78 <sup>A</sup>    | 4.43 <sup>AE</sup>     | 0.327            | P < 0.05        | NS       | P < 0.05                         | P < 0.001       |
|                 | Sobrecarga                     | 9.64 <sup>a</sup>   | 3.67 <sup>aE</sup> | 10.06 <sup>A</sup>  | 4.06 <sup>AE</sup>            | 14.49 <sup>BD</sup> | 5.01 <sup>bE</sup> | 11.91 <sup>BCD</sup> | 4.27 <sup>AE</sup>     | 0.368            | P < 0.05        | P < 0.05 |                                  |                 |
| Cerebro         | Normal                         | 11.38 <sup>a</sup>  | 5.22 <sup>aE</sup> | 11.13 <sup>A</sup>  | 4.84 <sup>AE</sup>            | 11.10 <sup>a</sup>  | 5.27 <sup>aE</sup> | 11.56 <sup>A</sup>   | 5.72 <sup>BE</sup>     | 0.322            | NS              | NS       | P < 0.01                         | P < 0.001       |
|                 | Sobrecarga                     | 13.52 <sup>aD</sup> | 5.10 <sup>aE</sup> | 13.76 <sup>AD</sup> | 4.92 <sup>AE</sup>            | 19.98 <sup>bD</sup> | 6.67 <sup>bE</sup> | 17.61 <sup>BCD</sup> | 6.33 <sup>BE</sup>     | 0.359            | P < 0.01        | P < 0.05 |                                  |                 |
| Mucosa duodenal | Normal                         | 6.46 <sup>a</sup>   | 2.93 <sup>aE</sup> | 6.23 <sup>A</sup>   | 2.83 <sup>AE</sup>            | 11.11 <sup>b</sup>  | 5.40 <sup>bE</sup> | 9.85 <sup>BC</sup>   | 4.90 <sup>BE</sup>     | 0.181            | P < 0.001       | P < 0.05 | P < 0.05                         | P < 0.001       |
|                 | Sobrecarga                     | 8.43 <sup>aD</sup>  | 3.12 <sup>aE</sup> | 6.84 <sup>A</sup>   | 2.53 <sup>AE</sup>            | 15.71 <sup>bD</sup> | 5.43 <sup>bE</sup> | 14.54 <sup>BD</sup>  | 5.03 <sup>BE</sup>     | 0.195            | P < 0.001       | NS       |                                  |                 |
| Plasma          | Normal                         | 3.01 <sup>a</sup>   | 1.37 <sup>aE</sup> | 3.08 <sup>A</sup>   | 1.41 <sup>AE</sup>            | 3.57 <sup>a</sup>   | 1.72 <sup>aE</sup> | 2.98 <sup>A</sup>    | 2.21 <sup>BE</sup>     | 0.328            | NS              | NS       | P < 0.05                         | P < 0.001       |
|                 | Sobrecarga                     | 3.85 <sup>a</sup>   | 1.47 <sup>aE</sup> | 4.05 <sup>A</sup>   | 1.33 <sup>AE</sup>            | 5.88 <sup>bD</sup>  | 1.76 <sup>aE</sup> | 5.49 <sup>BD</sup>   | 2.25 <sup>BE</sup>     | 0.335            | P < 0.05        | NS       |                                  |                 |

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

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

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

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

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

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

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

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

### 4.2.3. DAÑO OXIDATIVO A PROTEÍNAS

El daño oxidativo a las proteínas, determinado como grupos carbonilo, se muestra en la Tabla 13. En animales controles, el consumo de leche de cabra, ya sea con contenido normal o con suplemento de ácido fólico, disminuye el daño oxidativo a las proteínas en hígado ( $P < 0.001$  para las dietas con contenido normal y sobrecarga de Fe), mucosa duodenal ( $P < 0.001$  para las dietas con contenido normal de Fe y  $P < 0.01$  para las dietas con sobrecarga) y plasma ( $P < 0.05$  para las dietas con contenido normal de Fe y  $P < 0.01$  para las dietas con sobrecarga); además, en ratas anémicas los grupos carbonilo son más bajos en la mucosa duodenal para todas las dietas basadas en leche de cabra ( $P < 0.01$ ).

La anemia no tiene efecto sobre los valores de proteínas carbonilo en los tejidos estudiados bajo las diferentes condiciones experimentales.

La sobrecarga de Fe en las dietas basadas en leche con contenido normal de ácido fólico aumenta el daño oxidativo a proteínas en hígado ( $P < 0.01$ ) y plasma ( $P < 0.001$ ) de animales controles y anémicos y en cerebro de ratas anémicas ( $P < 0.05$ ).

Finalmente, el suplemento de ácido fólico en las dietas basadas en leche con contenido normal o sobrecarga de Fe, disminuye considerablemente la susceptibilidad al daño oxidativo proteico en todos los tejidos estudiados (hígado, mucosa duodenal y plasma ( $P < 0.001$ )).



**Tabla 13.** Grupos carbonilo en proteínas (nmol/mg proteína) en fracciones citosólicas de hígado, cerebro, mucosa duodenal y plasma de ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche de cabra o vaca, con contenido normal o sobrecarga de Fe y contenido normal o suplemento de ácido fólico (n=10 por grupo).

| TEJIDO          | Dieta basada en leche de cabra |                    |                        |                    |                        | Dieta basada en leche de vaca |                        |                    |                        |                  | Nivel de significación |                  |             |             |                 |
|-----------------|--------------------------------|--------------------|------------------------|--------------------|------------------------|-------------------------------|------------------------|--------------------|------------------------|------------------|------------------------|------------------|-------------|-------------|-----------------|
|                 | Contenido de Fe                | Normal en fólico   | Suplementada en fólico | Normal en fólico   | Suplementada en fólico | Normal en fólico              | Suplementada en fólico | Normal en fólico   | Suplementada en fólico | Normal en fólico | Suplementada en fólico | DER <sup>2</sup> | Dieta       | Anemia      | Contenido de Fe |
| Hígado          | Normal                         | 3.64 <sup>a</sup>  | 2.02 <sup>aE</sup>     | 5.11 <sup>AC</sup> | 2.84 <sup>AE</sup>     | 4.78 <sup>b</sup>             | 3.80 <sup>bE</sup>     | 4.94 <sup>A</sup>  | 2.91 <sup>ACE</sup>    | 0.531            | $P < 0.01$             | $P < 0.05$       | $P < 0.01$  | $P < 0.001$ |                 |
|                 | Sobrecarga                     | 5.40 <sup>aD</sup> | 2.45 <sup>aE</sup>     | 7.40 <sup>AD</sup> | 3.37 <sup>AE</sup>     | 6.79 <sup>bD</sup>            | 3.93 <sup>bE</sup>     | 7.88 <sup>AD</sup> | 3.52 <sup>AE</sup>     | 0.592            | $P < 0.01$             | NS               |             | $P < 0.001$ |                 |
| Cerebro         | Normal                         | 3.99 <sup>a</sup>  | 2.22 <sup>aE</sup>     | 3.82 <sup>A</sup>  | 2.01 <sup>AE</sup>     | 4.33 <sup>a</sup>             | 2.40 <sup>aE</sup>     | 3.96 <sup>A</sup>  | 2.33 <sup>AE</sup>     | 0.418            | NS <sup>3</sup>        | NS               | $P < 0.05$  | $P < 0.001$ |                 |
|                 | Sobrecarga                     | 4.57 <sup>a</sup>  | 2.08 <sup>aE</sup>     | 5.33 <sup>AD</sup> | 2.32 <sup>AE</sup>     | 5.14 <sup>a</sup>             | 2.45 <sup>aE</sup>     | 5.34 <sup>AD</sup> | 2.43 <sup>AE</sup>     | 0.435            | NS                     | NS               |             | $P < 0.001$ |                 |
| Mucosa Duodenal | Normal                         | 5.32 <sup>a</sup>  | 3.13 <sup>aE</sup>     | 5.68 <sup>A</sup>  | 3.34 <sup>AE</sup>     | 6.84 <sup>b</sup>             | 4.43 <sup>bE</sup>     | 7.20 <sup>B</sup>  | 4.95 <sup>BE</sup>     | 0.415            | $P < 0.001$            | NS               | NS          | $P < 0.001$ |                 |
|                 | Sobrecarga                     | 6.78 <sup>a</sup>  | 3.23 <sup>aE</sup>     | 6.12 <sup>A</sup>  | 3.52 <sup>AE</sup>     | 8.52 <sup>bD</sup>            | 4.58 <sup>aE</sup>     | 7.94 <sup>B</sup>  | 4.99 <sup>BE</sup>     | 0.418            | $P < 0.01$             | NS               |             | $P < 0.001$ |                 |
| Plasma          | Normal                         | 13.65a             | 7.59aE                 | 18.14AC            | 9.55ACE                | 16.92b                        | 9.95bE                 | 18.01A             | 10.01AE                | 0.576            | $P < 0.05$             | $P < 0.05$       | $P < 0.001$ | $P < 0.001$ |                 |
|                 | Sobrecarga                     | 17.40aD            | 7.91aE                 | 22.24ACD           | 9.67ACE                | 20.26bD                       | 10.19bE                | 21.85AD            | 9.92AE                 | 0.605            | $P < 0.01$             | $P < 0.05$       |             | $P < 0.001$ |                 |

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

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

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

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

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

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

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

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

### **4.3. DISCUSIÓN**

#### **4.3.1. PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS EN SITUACIÓN DE ANEMIA FERROPÉNICA NUTRICIONAL**

En la anemia por deficiencia de Fe se reduce la cantidad de Fe corporal llegando los depósitos corporales a estar completamente deplecionados y en el resto de tejidos existe algún grado de deficiencia férrica. La clave para entender los parámetros del estatus de Fe determinados en el presente estudio es el conocimiento de la circulación interna de Fe fundamental, que resulta de la eliminación y reemplazo diario de 30-40 mg de Fe presente en la hemoglobina de los glóbulos rojos senescentes. Unos minutos antes de la captación de las células rojas senescentes por los macrófagos en el bazo y la médula ósea, el Fe es extraído de la hemoglobina y devuelto al plasma donde se liga fuertemente a su transportador extracelular, la transferrina. Durante la siguiente hora, la transferrina que contiene Fe ligado, se une a receptores específicos localizados predominantemente sobre la superficie de precursores de células rojas en la médula ósea. El ciclo del Fe es completado cuando los eritrocitos recién formados son devueltos a la circulación durante los 7-10 días siguientes. Existen otras importantes comunicaciones entre el Fe plasmático, la mucosa intestinal y el hígado, aunque estas rutas sean minoritarias comparadas con el sistema principal eritroide.

Bajo nuestras condiciones experimentales, todos los parámetros hematológicos de ratas alimentadas con dieta con bajo contenido en hierro durante 40 días (ratas anémicas) son marcadamente diferentes de los animales controles. La ferropenia ocurre porque las ratas con niveles normales de Fe pierden gran parte de sus depósitos

corporales antes de que se produzca un descenso en la hemoglobina (durante los primeros días de restricción de Fe en la dieta). La determinación de rutina más extensamente usada en la anemia por deficiencia de Fe es la saturación de Fe en la transferrina plasmática, que es realmente baja en esta patología (Thomas y Thomas, 2002), hallazgo que está de acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio. El volumen corpuscular medio (VCM) es el marcador más importante para detectar la anemia por deficiencia de Fe en las células rojas circulantes (Cook, 2005) y una vez más, los resultados de este estudio confirman el grado de ferodeficiencia alcanzado en los animales durante 40 días de restricción de Fe en la dieta (PPE). La ferritina sérica ha sido la determinación más útil para conocer el estatus férrico durante las últimas tres décadas y tiene la ventaja de que su concentración es directamente proporcional a los depósitos corporales de Fe (Finch y col., 1986), por tanto a la luz de estas consideraciones podemos concluir que los depósitos corporales de Fe están profundamente agotados después de la restricción dietética de Fe durante 40 días.

#### **4.3.2. DAÑO OXIDATIVO AL MATERIAL GENÉTICO, LÍPIDOS Y PROTEÍNAS EN LA RECUPERACIÓN DE LA ANEMIA FERROPÉNICA NUTRICIONAL CON DIETAS BASADAS EN LECHE CON CONTENIDO NORMAL O SOBRECARGA DE HIERRO Y SUPLEMENTADAS O NO EN ÁCIDO FÓLICO**

Estudios previos de nuestro grupo de investigación, han mostrado que la leche de cabra tiene una mejor calidad lipídica, mejorando la utilización nutritiva de la grasa y disminuyendo las concentraciones de colesterol plasmático (Alfárez y col. 2001; López-Aliaga y col. 2005 y Díaz-Castro y col., 2013).

Este efecto puede ser explicado gracias a varios factores. En primer lugar, debido a los mayores niveles de triglicéridos de cadena media (MCT) de la leche de cabra (34 %) en comparación con la leche de vaca (21 %), dado que la presencia de MCT en la dieta reduce la síntesis de colesterol endógeno y su absorción intestinal (García Unciti, 1996) y además tiene un mayor contenido en carnitina (Penn y col., 1987), que a nivel mitocondrial favorece el proceso de  $\beta$ -oxidación (Bach y Babayan, 1985), incrementando la producción de energía derivada de los ácidos grasos (Fushiki y col., 1995) y por tanto, disminuye la disponibilidad de sustratos lipídicos susceptibles de ser atacados por radicales libres (Díaz-Castro y col., 2010). En segundo lugar, la leche de cabra tiene mayores niveles de ácidos grasos mono y poliinsaturados que la leche de vaca, lo cual induce a un efecto hipocolesterolémico, ya que reduce las concentraciones de triglicéridos plasmáticos (López-Aliaga y col. 2005). En tercer lugar, estudios de nuestro grupo de investigación han demostrado que los niveles de colesterol son inferiores en animales alimentados con dieta basada en leche de cabra comparada con la de leche de vaca, ya que el consumo de leche de cabra aumenta la excreción de colesterol vía biliar y por lo tanto se reducen los niveles de LDL-colesterol circulante (Díaz-Castro y col., 2013). Es conocido que un aumento del LDL-colesterol está directamente relacionado con tasas superiores de peroxidación lipídica, aumentando la generación de aniones superóxido y el daño oxidativo a los lípidos (Al-Benna y col., 2006). Además, el consumo de leche de cabra conduce a una reducción en la concentración de triglicéridos plasmáticos (Haenlein, 2001). La mejor utilización nutritiva de la grasa de la leche de cabra y el saludable perfil lipídico plasmático inducido por este tipo de leche proporciona menos sustrato para la peroxidación lipídica y por consiguiente disminuye la generación de radicales libres (Díaz-Castro y col.,

2012) en animales que consumen este tipo de leche, evitando una vez más el daño oxidativo a las biomoléculas.

Por otra parte y teniendo en cuenta lo comentado previamente, es interesante destacar los efectos protectores del consumo de leche de cabra sobre las biomoléculas de la mucosa del epitelio duodenal, especializada en la digestión y absorción de nutrientes. Las células duodenales son el lugar del organismo en el cual el contacto con el Fe de la dieta es más directo y por tanto, el efecto catalítico y pro-oxidante del Fe es más pronunciado. Sin embargo, como hemos mencionado, los niveles más altos de MCT en la leche de cabra, ejercerán un efecto protector sobre la mucosa duodenal, ya que mejoran la tasa de reposición o *turnover* del epitelio duodenal, protegiendo el intestino en sujetos expuestos a sustancias pro-inflamatorias (Ishii y col., 2009) y por lo tanto previniendo los efectos negativos del Fe sobre los lípidos y proteínas de estas células.

En relación al daño oxidativo sobre el material genético, un interesante resultado del presente estudio es el papel positivo del consumo de leche de cabra sobre la estabilidad genómica, incluso durante la repleción crónica con sobrecarga de Fe, resultados que están de acuerdo con los obtenidos previamente por nuestro grupo de investigación (Díaz-Castro y col., 2010) y que se puede justificar, al menos en parte, debido a la alta biodisponibilidad de Mg (Nestares y col., 2008) y Zn (Díaz-Castro y col., 2009) cuando se consume habitualmente leche de cabra.

La ruta de reparación de la escisión de nucleótidos está principalmente involucrada en la eliminación del daño inducido en el ADN por mutágenos ambientales y el Mg es un cofactor esencial en prácticamente todos los pasos de esta ruta (Barzilay y col., 1995; Hartwig, 2001; Hanawalt, 2002). Además, el Mg también se requiere para la reparación de fracturas de la doble hélice del ADN (Baechtold y col., 1999).

Por otra parte, diversos metales pueden interactuar con el Zn, previniendo el daño oxidativo mediado por Fe. Uno de los mecanismos aceptados que están implicados en la acción antioxidante del Zn, un metal que no posee actividad redox, es su capacidad para competir con el Fe en múltiples lugares de unión a nivel celular, previniendo el ciclo redox del Fe y minimizando la oxidación de los grupos químicos en las cercanías de estas uniones. En este contexto, el Zn puede reducir la oxidación lipídica, proteica y el daño oxidativo al material genético causado por Fe (Díaz-Castro y col., 2010). Además, Zago y Onteiza (2001) mostraron que el Zn actúa compitiendo con el Fe en estado ferroso por los lugares de unión cargados negativamente en la membrana plasmática celular.

Una consecuencia de la deficiencia de Zn es un marcado incremento en la concentración de Fe intracelular y en la propia membrana, lo cual puede incrementar la generación de radicales libres a esos niveles. Esta protección contra el daño genómico es particularmente importante ya que el daño oxidativo al ADN, especialmente las fracturas de la doble hélice, es altamente dependiente de la cantidad de Fe unido al ADN lo que puede catalizar la generación de radicales hidroxilo específicos en cada sitio de unión. Este hecho apoya nuestros hallazgos con respecto a la estabilidad del

ADN en ratas que consumen dietas basadas en leche de cabra, ya sea sin o con sobrecarga crónica de Fe (Díaz-Castro y col., 2010), que puede ser explicado, al menos en parte, a la buena utilización nutritiva de Zn que tiene este tipo de leche (Díaz-Castro y col., 2009).

Además, estudios previos de nuestro grupo de investigación, también han demostrado que el consumo de leche de cabra tiene efectos positivos en la defensa enzimática antioxidante (catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa), incluso en condiciones de sobrecarga de Fe, retirando y neutralizando el exceso de radicales libres producidos en todos los tejidos estudiados en condiciones normales e incluso de sobrecarga de Fe (Díaz-Castro y col., 2012).

Por otra parte, el Ca de la dieta induce un incremento en el daño oxidativo celular, que se pone de manifiesto por las mayores actividades de las enzimas antioxidantes en dietas con alto contenido en Ca (Díaz-Castro y col., 2013). El Ca plasmático es secuestrado en parte por la mitocondria induciendo a una mayor producción de especies reactivas de oxígeno y activando varias enzimas que conducen a un aumento en la producción de radicales libres (Kristian y Siesjö, 1998), liberando moléculas que disparan una cascada de reacciones que conducen al estrés oxidativo y la muerte celular.

En este sentido, la leche de cabra mejora el metabolismo del Ca, debido a su mayor contenido en vitamina D, lisina y cisteína, que mejoran la absorción de Ca por transporte pasivo (Alfárez y col. 2006). Finalmente, Díaz-Castro y col. (2011) han mostrado que la leche de cabra provoca una disminución en la tasa de secreción de parathormona, mejorando la utilización del mineral y su depósito en órganos diana, factores que conduciran a un menor tráfico de Ca en el organismo, disminuyendo su potencial oxidativo y apoyando los resultados obtenidos en este estudio.

La anemia por deficiencia de Fe no afecta la estabilidad del ADN, ni tampoco el daño oxidativo a lípidos y proteínas en la mayor parte de los tejidos estudiados; sin embargo, la ferodeficiencia tiene un leve efecto protector sobre los lípidos (en hígado y plasma) y sobre las proteínas (en eritrocito, cerebro y mucosa duodenal) reduciendo el daño oxidativo, resultados que están de acuerdo con los obtenidos previamente por nuestro grupo de investigación, ya que un estado antioxidante adecuado, junto con una cantidad insuficiente de Fe disponible, podrían ejercer un efecto protector en el animal, evitando la generación de especies reactivas del oxígeno catalizadas por Fe a través de las vías de Fenton y de Haber-Weiss (Díaz-Castro y col., 2008), lo que contribuye a explicar y apoyar nuestros resultados acerca del daño oxidativo a las biomoléculas en el presente estudio.

El anión superóxido es un radical libre del oxígeno que rápidamente puede interaccionar con el óxido nítrico derivado del endotelio vascular para formar peroxinitrito, sumamente reactivo, que es un potente oxidante y puede causar daño a las biomoléculas (Estévez y Jordán, 2002). La nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa es la principal enzima que actúa en la generación del anión



superóxido y su activación conduce a una producción masiva de especies reactivas del oxígeno. Sin embargo, estudios previos (Woo y col., 2006) han mostrado que la suplementación con ácido fólico inhibe de manera muy eficaz la producción de anión superóxido mediada por la NADPH-oxidasa que conduce al daño oxidativo de lípidos y proteínas, explicando el efecto positivo de la suplementación con ácido fólico observado en este estudio sobre la estabilidad de biomoléculas, protegiéndolas del daño inducido por el estrés oxidativo con todas las dietas ensayadas, incluso en condiciones de sobrecarga crónica de Fe. Además, reforzando estos datos, otros autores han mostrado que la suplementación con ácido fólico mejora de manera muy eficaz la capacidad antioxidante total del plasma (Alvares Delfino, 2007), mientras otros estudios mostraron que una suplementación con folato durante 15 días conduce a una disminución en la oxidación de la LDL-colesterol *in vitro* (Bunout y col. 2000), hecho que está de acuerdo con nuestros resultados, en los que se ha observado una disminución en la peroxidación lipídica y en el daño oxidativo a las proteínas en todos los tejidos estudiados después de la suplementación con ácido fólico.

Además, el efecto beneficioso de la suplementación con ácido fólico sobre la estabilidad de ADN, puede ser explicado también por el papel crucial que tiene en la síntesis y reparación del material genético. La conversión de deoxiuridina monofosfato (dUMP) a timidina monofosfato (TMP) requiere el ácido fólico en su forma química de 5,10, metil-tetrahidrofolato (THF) como donador de grupos metilo. Los desequilibrios en desoxirribonucleótidos, cuyo resultado es la deficiencia de folato, afectan negativamente a la replicación celular y reparación del material genético, conduciendo a la mutagénesis. En condiciones de depleción de folato, la metilación de dUMP a TMP conduce a un aumento de los niveles celulares de deoxiuridina trifosfato y errores en la

incorporación de uracilo en la molécula de ADN, que se inserta en lugar de la timina. Los procesos de reparación celular del ADN, eliminan el uracilo en condiciones normales. Sin embargo, si la conversión de dUMP a timidina está continuamente limitada por la baja disponibilidad de folato, el uracilo se incorpora y elimina continuamente de manera errónea en un ciclo de reparación catastrófico, que en última instancia induce a fracturas en la doble hélice del ADN e inestabilidad de los cromosomas (Blount y Ames, 1995; Duthie y Hawdon, 1998).





# RESUMEN Y CONCLUSIONES



## 5. RESUMEN Y CONCLUSIONES

La investigación llevada a cabo estudia el daño oxidativo a las principales biomoléculas (ADN, lípidos, proteínas) durante el establecimiento y recuperación de la anemia ferropénica nutricional, tras el consumo de dietas basadas en leche de cabra o vaca con un contenido normal o con sobrecarga crónica de Fe y suplementadas o no en ácido fólico.

Los animales se sometieron a un Periodo Pre-Experimental (PPE) de 40 días, un grupo control que se alimenta con dieta estándar, con contenido normal de Fe (45 mg/Kg dieta) y otro grupo anémico que se alimenta con bajo contenido en Fe (5 mg/Kg dieta). Las dietas empleadas en el PPE se han preparado con el mismo contenido de grasa (procedente de aceite de oliva, 10%) y proteína (aportada por caseína, 20%). Las diferencias entre las dietas empleadas en el PPE están determinadas por el corrector mineral, que en el caso de la dieta que reciben los animales anémicos, se prepara omitiendo el Fe, para inducir la ferrodeficiencia, realizándose un estudio hematológico en ambos grupos al final de dicho periodo.

Posteriormente, los animales se someten a un Periodo Experimental (PE), y son alimentados con dietas basadas en leche de cabra o vaca (elaboradas con un 10% de grasa y un 20% de proteína, aportada por cada tipo de leche), con un contenido normal (45 mg/kg dieta) o sobrecarga de Fe (450 mg/Kg dieta) y contenido normal (2 mg/Kg dieta) o alto contenido de ácido fólico (40 mg/Kg dieta). Tras 30 días del consumo de las dietas basadas en leche, se determinan el daño oxidativo al material genético (en linfocitos de sangre periférica) y el daño oxidativo a lípidos y proteínas en plasma y en citosol hepático, cerebral, eritrocitario y mucosa duodenal.

Tras la discusión de los resultados obtenidos se ha podido llegar a las siguientes

CONCLUSIONES:

### **CONCLUSIÓN PRIMERA**

El consumo de una dieta con bajo contenido en hierro durante 40 días, altera profundamente el proceso hematopoyético, afectando a todos los parámetros hematológicos estudiados. La disminución del volumen corpuscular medio, el marcador más importante para indicar una severa deficiencia de Fe en las células rojas circulantes y el descenso de la ferritina sérica, que es directamente proporcional a los depósitos corporales de Fe, indican que éstos estaban profundamente deplecionados tras la restricción crónica de Fe y que se ha alcanzado un grado de ferodeficiencia severa.

### **CONCLUSIÓN SEGUNDA**

La anemia ferropénica nutricional no afecta la estabilidad del ADN, ni el daño oxidativo a proteínas y lípidos en la mayor parte de los tejidos estudiados; sin embargo, muestra un leve efecto protector sobre las proteínas (en eritrocito, cerebro y mucosa duodenal) y sobre los lípidos (en hígado y plasma), reduciendo el daño oxidativo, debido a la existencia de una suficiente capacidad compensatoria en el organismo para mantener las defensas antioxidantes elevadas, junto con una cantidad insuficiente de Fe disponible, factores ambos que ejercen un efecto protector, evitando la generación de especies reactivas de oxígeno catalizadas por hierro y por tanto el subsiguiente daño a las biomoléculas.

### **CONCLUSIÓN TERCERA**

El consumo habitual de leche de cabra protege el material genético contra el daño oxidativo en linfocitos de sangre periférica, incluso durante la sobrecarga crónica de hierro, debido a que mejora la defensa enzimática antioxidante, limitando la generación de especies reactivas de oxígeno. Todo ello debido a que presenta una mayor biodisponibilidad de magnesio, cofactor esencial en todas las rutas de reparación del ADN y a la mejora de la biodisponibilidad del cinc, lo que reduce el efecto prooxidante del hierro, compitiendo por los sitios de unión en el material genético y de esta manera se favorece la estabilidad del ADN.

### **CONCLUSIÓN CUARTA**

La leche de cabra debido a su buena calidad lipídica y a su mayor contenido en carnitina, sustancia que favorece la  $\beta$ -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos, reduce la peroxidación lipídica disminuyendo la generación de radicales libres, especialmente la del radical superóxido, evitando así el daño oxidativo de los lípidos y proteínas.



## CONCLUSIÓN QUINTA

Las células duodenales, especializadas en la digestión y absorción de nutrientes, son el lugar del organismo donde el contacto con el hierro de la dieta es más directo y prolongado, por tanto el efecto catalítico y pro-oxidante de este mineral es más pronunciado en este tejido. La leche de cabra con niveles más altos de triglicéridos de cadena media ejerce un efecto protector sobre la mucosa duodenal mejorando la tasa de reposición o *turnover* del epitelio duodenal y previene al intestino de los efectos indeseables del hierro sobre las biomoléculas de estas células, incluso en situación de sobrecarga crónica.

## CONCLUSIÓN SEXTA

La suplementación con ácido fólico mejora la estabilidad de las biomoléculas y disminuye la susceptibilidad al daño oxidativo con todas las dietas estudiadas, incluso en condiciones de sobrecarga crónica de hierro. La capacidad del ácido fólico para inhibir la producción del anión superóxido mediada por la NADPH-oxidasa mejora la capacidad plasmática antioxidante, lo que conduce a la disminución del daño oxidativo a nivel de lípidos y proteínas, explicando el efecto positivo observado en el presente estudio. El efecto beneficioso de la suplementación con ácido fólico sobre la estabilidad de ADN es también debido a su papel crucial en la síntesis y reparación del material genético, como elemento donante de grupos metilo.

## **CONCLUSIÓN GENERAL**

El suplemento de ácido fólico en la leche de cabra tiene efectos beneficiosos, protegiendo los constituyentes celulares del ataque de los radicales libres, incluso en situación de sobrecarga crónica de hierro, consecuencia común del tratamiento de la anemia ferropénica. Por tanto, sería aconsejable la inclusión en la dieta de este tipo de leche suplementada en ácido fólico, en la población en general y en la afectada por anemia ferropénica nutricional, especialmente en aquellos grupos sometidos a tratamiento oral de hierro, lo que evitaría los efectos indeseables de la sobrecarga de este mineral en todos los tejidos, especialmente en el hígado y mucosa duodenal, los lugares más expuestos al hierro procedente de la dieta y por tanto los más susceptibles de ser atacados por los radicales libres catalizados por este mineral.





# BIBLIOGRAFIA



## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Abboud, S., Haile, D.J. (2000). A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J. Biol. Chem.*, **275**:19906-19912.
- Abuja, P.M., Albertini, R. (2001). Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin. Chim. Acta*, **306**:1-17.
- Achón, M., Alonso-Aperte, E., Reyes, L., Ubeda, N., Varela-Moreiras, G. (2000). High-dose folic acid supplementation in rats: effects on gestation and the methionine cycle. *Br. J. Nutr.* **83**:177-183.
- Agte, V., Jahagirdar, M., Chiplonkar, S. (2005). Apparent absorption of eight micronutrients and phytic acid from vegetarian meals in ileostomized human volunteers. *Nutrition*, **21(6)**:678-685.
- Al-Benna, S., Hamilton, C.A., McClure, J.D., Rogers, P.N., Berg, G.A., Ford, I., Delles, C., Dominiczak, A.F. (2006). Low-density lipoprotein cholesterol determines oxidative stress and endothelial dysfunction in saphenous veins from patients with coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**: 218-223.
- Alfárez, M.J.M., Barrionuevo, M., López-Aliaga, I., Sanz-Sampelayo, M.R., Lisbona F., Robles, J.C., Campos, M.S. (2001). Digestive utilization of goat and cow milk fat in malabsorption syndrome. *J. Dairy Res.* **68**: 451-461.
- Alfárez, M.J.M., López-Aliaga, I., Barrionuevo, M., Lisbona, F., Hartiti, S., Pallarés, I., Campos, M.S. (1996). Calcium absorption in rats with distal intestinal resection: influence of dietary fat, cholecalciferol and nature of the adaptive response. *Int. J. Vit. Nutr. Res.* **66**: 59-65.

- Alfárez, M.J.M., López-Aliaga I., Barrionuevo M., Campos, M.S. (2003). Effect of dietary inclusion of goat milk on the bioavailability of zinc and selenium in rats. *J. Dairy Res.* **70**:181-187.
- Alfárez, M.J.M., López-Aliaga, I., Nestares, T., Díaz-Castro, J., Barrionuevo, M., Ros P.B., Campos, M.S. (2006). Dietary goat milk improves iron bioavailability in rats with induced nutritional ferropenic anaemia in comparison with cow milk. *Int. Dairy J.* **16**: 813–821.
- Albert, C., Cook, N., Gaziano, J., Zaharris, E., MacFadyen, J., Danielson, E., Buring, J.E., Manson, J.E. (2008). Effect of folic acid and B vitamins on risk of cardiovascular events and total mortality among women at high risk for cardiovascular disease. A randomized trial. *Am. J. Med. Assoc.* **299** (17): 2027-2036.
- Almeida, K.H., Sobol, R.W. (2007). A unified view of base excision repair: lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification». *DNA Repair (Amst)* **6**:695-711.
- Alvares Delfino, V.D., De Andrade Vianna, A.C., Mocelin, A.J., Sabbatini Barbosa, D., Aiko Mise, R., Matsuo, T. (2007). Folic acid therapy reduces plasma homocysteine levels and improves plasma antioxidant capacity in hemodialysis patients. *Nutrition* **23**: 242–247.
- Anderson G.J. (2007) Mechanisms of iron loading and toxicity. *Am. J. Hematol.*, **82**:1128-1131.
- Anderson, L.J., Holden, S., Davis, B., Prescott, E., Charrier, C.C., Bunce, N.H., Firmin, D.N., Wonke, B., Porter, J., Walker, J.M., Pennell, D.J. (2001). Cardiovascular T2-star (T2\*) magnetic resonance for the early diagnosis of myocardial iron overload. *Eur. Heart J.* **22**:2171-2179.

- Andrews, N.C. (1999). Disorders of iron metabolism. *New Engl. J. Med.* **341**:1986-1995.
- Andrews, N.C., Schmidt, P.J. (2007). Iron homeostasis. *Ann. Rev. Physiol.* **69**:69-85.
- Ania, B.J., Suman, V.J., Fairbanks, V.F. (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., Di Renzo, G.F. (2003). Apoptosis induced in neuronal cells by oxidative stress: role played by caspases and intracellular calcium ions. *Toxicol. Lett.* **139(2-3)**:125-133.
- Arbiza, S.F. (1986). Producción de caprinos. AGT Editores México pp. 105-128.
- Arredondo, M., Nuñez, M.T. (2005). Iron and copper metabolism. *Mol. Aspects Med.* **26(4-5)**: 313-327.
- Arredondo, M., Martinez, R., Nuñez, M.T., Ruz, M., Olivares, M. (2006). Inhibition of iron and copper uptake by iron, copper and zinc. *Biol. Res.* **39**:95-102.
- Asmus, K.D. (1990). Sulphur centered free radicals. *Methods Enzymol.* **186**:168-180.
- Assaraf, Y. G. (2006). The role of multidrug resistance efflux transporters in antifolate resistance and folate homeostasis. *Drug Resistance Updates*, **9 (4-5)**: 227-246.
- Auroma, O.I., Halliwell, B., Gajewski, E., Dizdaroglu, M. (1991). Cooper ion dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* **273**:601-604.
- Aust, S.D., Morehouse, L.A., Thomas, C.E. (1985). Role of metals in oxygen radical reactions. *J. Free Rad. Biol. Med.* **1**:3-29.



- Babit, J., Huang, F.W., Xia, Y., Sidis, Y., Andrews, N.C., LIN, H. (2007). Modulation of bone morphogenetic protein signaling in vivo regulates systemic iron balance. *J. Clin. Invest.* **117**:1933-1939.
- Bach, A.C., Babayan, U.K. (1985) Medium-chain triglycerides: an uptake. *Am. J. Clin. Nutr.* **4**:67-71.
- Baech, S.B., Hansen, M., Bukhave, K., Jensen, M., Sorensen, S.S., Kristensen, L., Purslow, P.P., Skibsted, L.H., Sandström, B. (2003). Nonheme-iron absorption from a phytate-rich meal is increased by the addition of small amounts of pork meat». *Am. J. Clin. Nutr.* **77(1)**:173-179.
- Baechtold, H., Kuroda, M., Sok, J., Ron, D., López, B.S., Akhmedov, A. (1999). Human 75 kDa DNA pairing protein is identical to the pro-oncoprotein TLS/FUS and is able to promote D-loop formation. *J. Biol. Chem.* **274**:34337-34342.
- Ball, G.F.M. (1998). Folate. En: *Bioavailability and analysis of vitamins in foods*. Chapman & Hall. Cornwall pp. 439-495.
- Bailey, L.B, Barton, L.E, Hillier, S.E, Cerda, J.J. (1988). Bioavailability of mono and polyglutamyl folate in human subjects. *Nutrition Rep. Int.* **3**: 509-518.
- Bailey, L.B. (1995). Folate. En: *Health and Disease*, Marcel Dekker, New York. pp.195-235
- Bailey, L.B., Gregory, 3rd J.F. (1999). Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and other enzymes: Metabolic significance, risks and impact on folate requirement. *J. Nutr.* **129**:919–922.
- Bailey L.B, Moyers S., Gregory, J.F. (2001). Folate. In: Bowman BA, Russell RM (eds): *Present Knowledge in Nutrition*, 8th ed. Washington, DC: ILSI Press, pp. 214–229.

- Baltussen, R., Knai, C., Sharan, M. (2004). Iron fortification and iron supplementation are cost-effective interventions to reduce iron deficiency in four subregions of the world. *J. Nutr.* **134**: 2678-2684.
- Ban, C., Yang, W. (1998). Crystal structure and ATPase activity of MutL: implications for DNA repair and mutagenesis. *Cell* **95**:541-552.
- Barbi de Moura, M., Santana dos Santos, L., Van Houten, B. (2010). Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases and cancer. *Envirom. Mol. Mut.* **51**:391-405.
- Barrionuevo, M., Campos, M.S., Urbano, G., Varela, G. (1980). Intestinal resections in rats. Influence on protein absorption. *Rev. Esp. Fisiol.* **36**:119-122.
- Barrionuevo, M., Campos, M.S., Gómez- Travededo, M.T., Sanz Rus, A. (1985). Compensatory capacity of remaining intestine in rats with intestinal resection: nutritive utilization of protein and fat. *Ars Pharm.* **26**: 73-80.
- Barzilay, G., Mol, C.D., Robson, C.N., Walker, L.J., Cunningham, R.P., Tainer, J.A., Hickson, I.D. (1995). Identification of critical active-site residues in the multifunctional human DNA repair enzyme HAP1. *Nat. Struct. Biol.* **2(7)**: 561-568.
- Beard, J.L. (2001). Iron biology in immune function, muscle, metabolism, and neuronal functioning. *J. Nutr.* **131**:568S-579S.
- Beckman, K.B., Ames, B.N. (1998). The free radicals theories of aging matures. *Physiol. Rev.* **78**: 547-581.
- Belewu, M.A., Aiyegbusi, O.F. (2002). Comparison of the mineral content and apparent biological value of milk from human, cow and goat. *J. Food Tech. Africa.* **7**: 9-11.
- Belitz, H.D., Grosch, W. (1997). *Química de los alimentos*. 2ª ed. Zaragoza: Acribia, pp: 813.

- Bellamy, M. F., McDowell, I. F., Ramsey, M. W., Brownlee, M., Newcombe, R. G., Lewis, M.J. (1999). Oral folate enhances endothelial function in hyperhomocysteinaemic subjects. *Europ. J. Clin. Inves.* **29**: 659-662.
- Bertsche, V. (1984). Induction and repair of x-ray damage in mamamlian cell cultures treated mith membrane-active drugs. *Br. J. Cancer* **49**: 121-130.
- Beutler E., Hoffbrand V.A., Cook J.D. (2003). Iron deficiency and overload. *Hematology*, **2003**:40-61.
- Bevilacqua, C., Martin P., Candalh, C., Fauquant, J., Piot, M., Roucayrol, A.M., Pilla F., Heyman, M. (2001). Goats' milk of defective  $\alpha$ S1-casein genotype decreases intestinal and systemic sensitization to  $\beta$ -lactoglobulin in guinea pigs. *J. Dairy Sci.* **68**: 217-222.
- Bianca-María, E., Ravilacqua, C., Martin, P., Chandal, C. (2001). Goat´s milk of defective  $\alpha$  s<sub>1</sub>-casen genotype decreases intestinal and systemic sensibilization to  $\beta$ -lactoglobulin in guinea pigs. *J. Dairy Res.* **68**:217-227.
- Birn, H., Selhub, J., Christensen, E.I. (1993). Internalisation and intracellular transport of folate binding in rat kidney proximal tubule. *Am. J. Physiol.* **264**: 302- 310.
- Bjorklund, N.K., Gordon, R. (2006). A hypothesis linking low folate intake to neural tube defects due to failure of post-translation methylations of the cytoskeleton. *Internat. J. Develop. Biol.* **50**: 135-141.
- Bloem, M.W. (1995). Interdependence of vitamin A and iron: an important association for programmes of anaemia control. *Proc. Nutr. Soc.* **54(2)**: 501-508.
- Blount, B., and Ames, B. (1995). DNA damage in folate deficiency. *Bailliere's Clinical Haematology*, Academic Press, New York. Vol. 8 pp. 461–478.

- Bodnar, L.M., Tang, G., Ness, R.B., Harger, G., Roberts, J.M. (2006). Periconceptional multivitamin use reduces the risk of preeclampsia. *Am. J. Epidemiol.* **64** (5): 470-477.
- Bomford, A. (2002). Genetics of haemochromatosis. *Lancet*, **360**:1673–1681.
- Borrás, A. (1968). Cómo comer y beber leche. *Comité Nacional Lechero*, **8**:7-130.
- Bothwell, T.H. (1995). Overview and mechanism of iron regulation. *Nutr. Rev.* **53**:237-245.
- Bottiglieri, T., Hyland, K., Laundy, M., Godfrey, P., Carney, M.W., Toone, B.K., Reynolds, E.H. (1992). Folate deficiency, biopterin and monoamine metabolism in depression. *Psychol. Med.* **22**: 871-876.
- Bottiglieri, T., Laundy, M., Crellin, R., Toone, B.K., Carney, M.W., Reynolds, E.H. (2000). Homocysteine, folate, methylation, and monoamine metabolism in depression. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **69**:228-232.
- Boushey, C.J., Beresford, S.A.A., Omenn, G.S., Motulsky, A.G. (1995). A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for cardiovascular disease. *JAMA* **274**:1049-1057.
- Botto, L.D., Moore, C.A., Khoury, M.J., Erickson, J.D. (1999). Neural tube defects. *N. Engl. J. Med.* **341**: 1509-1519.
- Boza, J. (1992). Obtención de hidrolizados enzimáticos de proteínas lácteas. Estudio del valor nutritivo y de la capacidad antigénica. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.
- Boza, J., Sanz Sampelayo, M.R. (1984). Antecedentes históricos de la cabra en Andalucía. *Jábega*. **45**: 69-75.
- Boza, J., Sanz-Sampelayo, M.R. (1997). Nutritional aspects of goat milk. *An. Acad. Cienc. Vet. Andalucía Oriental*, **10**:109-139.

- Branda, R.F. (2000). Anemia Ferropriva. En: Wood, M.E. Secretos de Hematología y Oncología. 2ª Ed. McGraww-Hill Interamericana, pp: 37-41.
- Breuer, W., Hershko, C., Cabantchik, Z.I. (2000). The importance of non-transferrin bound iron in disorders of iron metabolism. *Transfus. Sci.* **23**:185-192.
- Brody, T. (1999). *Nutritional Biochemistry*. 2ª Ed. San Diego: Acad. Press.
- Bunout, D., Garrido, A., Suazo, M., Kauffman, R., Venegas, P., De La Maza. P., Petermann, M., Hirsch, S. (2000). Effects of supplementation with folic acid and antioxidant vitamins on homocysteine levels and LDL oxidation in coronary patients. *Nutrition* **16**: 107-110.
- Busby, A., Armstrong, B., Dolk, H., Armstrong, N., Haeusler, M., Berghold, A., Gillerot, Y., Baguette, A., y col. (EUROCAT Folic Acid Working Group) (2005). Preventing neural tube defects in Europe: A missed opportunity. *Reproductive Toxicology* **20**: 393-402.
- Cadenas, E., Davies, K.J.A. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. *Free Rad. Biol. Med.* **29(3-4)**: 222-230.
- Camaschella C., Roetto A., De Cobbi M. (2002). Genetic hemochromatosis: genes and mutations associated with ironoverloading. *Best Pract. Res. Clin. Hematol.* **15**:261-276.
- Camougrand, N., 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 M.S., Barrionuevo M., Alférez M.J.M., Gómez-Ayala A.E., Rodríguez- Matas, M.C., López-Aliaga I., Lisbona, F. (1998). Interactions among iron, calcium, phosphorus and magnesium in nutritionally iron-deficient rats. *Exp. Physiol.* **83**:771-781.

- Campos, M.S., Barrionuevo, M., Alférez, M.J.M., Nestares, T., Díaz-Castro, J., Ros, P.B., Ortega, E., Lopez-Aliaga, I. (2007). Consumption of caprine milk improves metabolism of calcium and phosphorus in rats with nutritional ferropernic anaemia. *Int. Dairy J.* **17**: 412-419.
- Campos, M.S., López Aliaga, I., Alférez, M.J.M., Nestares, T., Barrionuevo, M. (2003). Effects of goats' or cows' milk on nutritive utilization of calcium and phosphorus in rats with intestinal resection. *Br. J. Nutr.* **90**: 61-67.
- Carnicer, R., Navarro, M. A., Arbones-Mainar, J. M., Acin, S., Guzman, M. A., Surra, J. C., Arnal, C., de Las Heras, M., Blanco-Vaca, F., Osada, J. (2007). Folic acid supplementation delays atherosclerotic lesion development in apoE deficient mice. *Life Sciences* **80**: 638-643.
- Caudill, M. (2010). Folate bioavailability: implications for establishing dietary recommendations and optimizing status. *Am. J. Clin. Nutr.* **91**:1455S-1460S.
- Cavalli-Sforza, T., Berger, J., Smitasiri, S., Viteri, F. (2005). Weekly iron-folic acid supplementation of women of reproductive age: impact overview, lessons learned, expansion plans, and contributions toward achievement of the millennium development goals. *Nutr. Rev.*, **63**: S152-S158.
- Chacón, A. (2005). Aspectos nutricionales de la leche de cabra (*Capra hircus*) y sus variaciones en el proceso agroindustrial. *Agronomía Mesoamericana*, **16(2)**: 239-225.
- Chacón, A. (2006). Comparación de la titulación de la acidez de leche caprina y bovina con hidróxido de sodio y cal común saturada. *Agronomía Mesoamericana*, **17(1)**:55-61.

- Chambers, J. C., Ueland, P. M., Obeid, O. A., Wrigley, J., Refsum, H., Kooner, J.S. (2000). Improved vascular endothelial function after oral B vitamins: an effect mediated through reduced concentrations of free plasma homocysteine. *Circulation*, **102**: 2479-2483.
- Chandan, R.C., Attaie, R., Sahani, K.M. (1992). Nutritional aspects of goat milk and its products. In: Recent advances in goat production. Pre-Conference Proceedings, Vol. I, part II, pp. 399-420.
- Cheeseman, K.H., Slater, T.F. (1993). Free radical in medicine. *Br. Med. Bull.* **49 (3)**:679-699.
- Chilliard, Y. (1996). Caractéristiques biochimies des lipids du lait de chèvre. Comparison avec les laits de vache et humain. In: Intérêts nutritionnel et diététique du lait de chèvre. INRA editions, pp. 51-65.
- Choi, S.W., Mason, J.B. (2000). Folate and carcinogenesis: an integrated scheme. *J.Nutr.* **130**: 129-132.
- Clarke, R., Smith, A.D., Jobst, K.A., Refsum, H., Sutton, L., Ueland, P.M. (1998). Folate, vitamin B<sub>12</sub>, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer's disease. *Arch. Neurol.* **55**:1449-1455.
- Cogswell, ME., Parvanta, I., Ickes, L., Yip, R., Brittenham, G.M. (2003). Iron supplementation during pregnancy, anemia, and birth weight: a randomized controlled trial. *Am. J. Clin. Nutr.* **78**:773-781.
- Combs, G. F. Jr. (1992). The vitamins. Fundamental aspects in nutritional health. Academic Press, San Diego, CA.
- Conrad, M.E., Umbreit, J.N. (2002). Pathways of iron absorption. *Blood Cells Mol. Dis.* **29**:336-355.

- Cook, R. (2001). Folate metabolism. En: R. Carmel, D.W. Jacobsen (Eds.), Homocysteine in health and disease, Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 113-134.
- Cook, J.D. (2005). Diagnosis and management of iron-deficiency anaemia. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **18**:319-332
- Craven, C.M., Alexander, J., Eldridge, M., Kushner, J.P., Bernstein, S., Kaplan J. (1987). Tissue distribution and clearance kinetics of non-transferrin-bound iron in the hypotransferrinemic mouse: A rodent model for hemochromatosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**:3457-3461.
- Czajka-Narins D.M. (1998). Minerals. En: Krause's Food, Nutrition and Diet Therapy. 9<sup>a</sup> ed. México D.F: Mc-Graw-Hill Interamericana pp. 123-167.
- Czeizel, A.E., Dudas, I. (1992). Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N. Engl J. Med.* **327**:1832-1835.
- Dael, P.V., Shen, L., Renterghem, R., Deelstra, H. (1992). Selenium content of goat milk and its distribution in protein fractions. *Zeitschrift fuer Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, **195(1)**:3-7.
- Dallman, P.R., Yip, R., Oski, F.A. Iron deficiency and related nutritional anemias. En: Natham, P., Oski, F.A. (1993). *Hematology of infancy and childhood*. 4<sup>a</sup> Ed. Philadelphia: W.B. Saunders pp. 413-450.
- Dandriofosse, G., Peulen, O., El Khefif, N., Deloyer, P., Dandriofosse, A.C., Grandfils C. (2000). Are milk polyamines preventive agents against food allergy? *Proc. Nutr. Soc.* **59**: 81-86.
- Darnton, I., Coveney, J., Davey, G.R. (1987). Goat milk, nutritional and public health aspects: a review *Food Tech. Australia*. **39**: 572-688.



- De la Fuente, M. (2002). Effects of antioxidants on immune system ageing. *Eur. J. Clin. Nutr.* **56(3)**: 5-8.
- Delea, T.E., Sofrygin, O., Thomas, S.K., Baladi J.F., Phatak, P.D., Coates, T. (2007). Cost effectiveness of once-daily oral chelation therapy with Deferasirox versus infusional Deferoxamine in transfusiondependent thalassaemia patients. *Pharmacoeconomics* **25**: 329–342.
- De Paz, R., Hernández-Navarro, F. (2006). Manejo, prevención y control de la anemia megaloblástica secundaria a déficit de ácido fólico. *Nutr. Hosp.* **21 (1)**: 113-119.
- DeSandro, V., Chevrier, M., Boddaert, A., Melcion, C., Cordier, A., 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. (2007). Efecto de la leche de cabra o vaca enriquecida o no en Ca sobre la biodisponibilidad de Fe, Ca, P y Mg en situación de anemia ferropénica nutricional. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.
- Díaz-Castro, J., Alférez, M.J.M., López-Aliaga, I., Nestares, T., Granados, S., Barrionuevo, M., Campos, M.S. (2008). Influence of nutritional iron deficiency anemia on DNA stability and lipid peroxidation in rats. *Nutrition* **24**:1167-1173.
- Díaz-Castro, J., Alférez, M.J.M., López-Aliaga, I., Nestares, T., Campos, M.S. (2009). Effect of calcium-supplemented goat or cow milk on zinc status in rats with nutritional ferropenic anaemia. *Int. Dairy J.* **19**:116-121.
- Díaz-Castro, J., Alférez, M.J.M., López-Aliaga, I., Nestares, T., Sánchez-Alcover, A., Campos, M.S. (2013). Bile composition, plasma lipids and oxidative hepatic damage induced by calcium supplementation; effects of goat or cow milk consumption. *J. Dairy Res.* **80**, 246-254.

- Díaz-Castro, J., Hijano, S., Alférez, M.J.M., López-Aliaga, I., Nestares, T., López-Frías, M., Campos, M.S. (2010). Goat milk consumption protects DNA against damage induced by chronic iron overload in anaemic rats. *Int. Dairy J.* **20**, 495-499.
- Díaz-Castro J, Pérez-Sánchez, L.J., Ramírez López-Frías, M., López-Aliaga, I., Nestares, T., Alférez, M.M.J., Ojeda, M.L., Campos, M.S. (2012) Influence of cow or goat milk consumption on antioxidant defence and lipid peroxidation during chronic iron repletion. *Br. J. Nutr.* **108**, 1–8.
- Díaz-Castro, J., Ramírez López-Frías, M., Campos, M.S., López-Frías, M., Alférez, M.J.M., Nestares, T., Ortega, E., López-Aliaga, I. (2011) Goat milk during iron repletion improves bone turnover impaired by severe iron deficiency. *J. Dairy Sci.* **94**, 2752–2761.
- Domenico, I.D., Ward, D.M., Kaplan, J. (2008). Regulation of iron acquisition and storage: consequences for iron-linked disorders. *Nat. Rev.* **9**:72-81.
- Donovan, A., Brownlie, A., Zhou, Y., Shepard, J., Pratt, S.J, Moynihan, J., Paw, B.H., Drejer, A., Baruti, B., Zapata, Z., Lawt, C., Brugnara, C., Lux, S.E., Pinkus, G.S., Pinkus, J.L., Kingsley, P.D., Palis, J., Fleming, M.D., Andrews, N.C., Zon, L.I. (2000). Positional cloning of zebrafish ferroportin 1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* **403**:776-781.
- Drakesmith, H., Schimansk, I.L.M., Ormerod, E., Merryweather-Clarke, A.T., Viprakasit, V., Edwards, J.P., Sweetland, E., Bastin, J.M., Cowley, D., Chinthammitr, Y., Robson, K.J., Townsend, A.R. (2005). Resistance to hepcidin is conferred by haemochromatosis-associated mutations of ferroportin. *Blood* **106**:1092-1097.

- Duthie, S.J., Hawdon, A. (1998). DNA stability (strand breakage, uracil misincorporation, and defective repair) is increased by folic acid depletion in human lymphocytes in vitro. *FASEB J.* **12**, 1491-1497.
- Elgendy, F.M., Abou-Seif, M.A. (1998). Photolysis and membrane lipid peroxidation of human erythrocytes by m-chloroperbenzoic acid. *Photochem. Photobiol.* **277(1)**: 1-11.
- Emery, T. (1992). Iron oxidation by casein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **182(3)**: 1047-1052.
- Espie, W.H., Mullan, W.M.A. (1990). Compositional aspects of goat milk in northern Ireland. *Milchwissenschaft.* **145**: 361-362.
- Esposito, B.P., Breuer, W., Sirankapracha, P., Pootrakul, P., Hershko, C., Cabantchik, Z.I. (2003). Labile plasma iron in iron overload: Redox activity and susceptibility to chelation. *Blood* **102**:2670-2677.
- Estévez, A. Jordán, J. (2002). Nitric oxide and superoxide, a deadly cocktail, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **962**: 207-211.
- Fairbanks, V.F. (1999). Iron in medicine and nutrition. En: Shils, M., Olson, J.A., Shike, M., Ross, A.C. *Nutrition in health and disease.* 9ªEd. Baltimore: Williams and Wilkins pp. 223-239.
- Fairweather-Tait, S.J. (2001a). *Iron. J. Nutr.* **131(4)**:1383S-1386S.
- Fairweather-Tait, S.J. (2001b). Bioavailability of nutrients and other bioactive components from dietary supplements: iron. *J. Nutr.* **131**:S1383-S1386.
- FAO/OMS. (2002). Human vitamin and mineral requirements. Report of a joint FAO/OMS expert consultation, Bangkok, Thailand. Ed. World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

- Farhan, J., Al-Jummaa, S., Alrajhi, A.A., Al-Rayes, H., Al-Nasser, A. (2005). Documentation and coding of medical records in a tertiary care center: a pilot study. *Ann. Saudi Med.* **25**: 46-49.
- Faria Reyes, J.P., García, A., Allara, M., García, A., Olivares, Y., Ríos, G. (1999). Some physico-chemical and microbiological characteristics of goat milk produced in Quisiro. *Rev. Fac. Agron.* **16**: 99-106.
- Fassbender, K., Mielke, O., Bertsch, T., Naf, B., Fröschen, S., Hennerici, M.(1999). Homocysteine in cerebral macroangiography and microangiopathy. *Lancet* **353**:1586-1587.
- Fava, M., Borus, J.S., Alpert, J.E., Nierenberg, A.A., Rosenbaum, J.F., Bottiglieri, T. (1997). Folate, vitamin B<sub>12</sub>, and homocysteine in major depressive disorders. *Am. J. Psychiatry* **154**: 426-428.
- Feder, J.N., Gnirke, A., Thomas, W., Tsuchihashi, Z., Ruddy, D.A., Basava, A., Dormishian, F., Domingo, R. JR., Ellis, M.C., Fullan, A., Hinton, L.M., Jones, N.L., Kimmel, B.E., Kronmal, G.S., Lauer, P., Lee, V.K., Loeb, D.B., Mapa, F.A., McClelland, E., Meyer, N.C., Mintier, G.A., Moeller, N., Moore, S.T., Morikang, E., Prass, C.E., Quintana, L., Starnes, S.M., Schatzman, R.C., Brunke, K.J., Drayna, D.T., Risch, N.J., Bacon, B.R., Wolff, R.K. (1996). A novel MHC class 1-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat. Genet.* **13**:399-408.
- Feder, J.N., Penny, D.M., Irrinki, A., Lee, V.K., Lebron, J.A., Watson, N., Tsuchihashi, Z., Sigal, E., Bjorkman, P.J., Schatzman, R.C. (1998). The haemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**:1472-1477.

- Fehr, P., Chilliard, Y., Sauvant, D. (1982). Goat milk and its components. Proc. Int. Conf. Goat Production and Disease, pp. 113-121.
- Feming, M.D., Romano, M.A., Su M.A., Garrick, L.M., Garrick, M.D., Andrews, N.C. (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.
- Finch, C.A., Bellotti, V., Stray, S., Lipschitz, D.A., Cook, J.D., Pippard, M.J., Huebers, H.A. (1986). Plasma ferritin determination as a diagnostic tool. West J. Med. **145(5)**: 657–663.
- Finkel, T., Holbrook, N.J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature, **408(6809)**: 239-247.
- 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. Nat. Ac. Press, pp. 290-393.
- Fowler, B. (1998). Genetic defects of folate and cobalamin metabolism. Europ. J. Pediatr. **157 (2)**: S60-S66.
- Franchini, M. (2006). Hereditary iron overload: Update on pathophysiology, diagnosis, and treatment. Am. J. Hematol. **81**:202-209.
- Frank, G., Qiu, J., Somsouk, M., Wenig, Y., Somsouk, L., Nolan, J.P., Shen, B. (1998). Partial functional deficiency of E160D flap endonuclease-1 mutant in vitro and in vivo is due to defective cleavage of DNA substrates. J. Biol. Chem. **273**: 33064-33072.

- Frazer, D.M., Wilkins, S.J., Beckee, E.M., Murphy, T.L., Vulpe, C.D., McKie, A.T., Anderson, G. J. (2003). A rapid decrease in the expression of DMT1 and Dcytb but not Ireg1 or hephaestin explains the mucosal block phenomenon of iron absorption. *Gut*, **52**: 340-346.
- Fridovich, I. (1983). Superoxide radical: and endogenous toxicant. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **23**: 239-257.
- Fushiki T., Matsumoto K., Inoue K., Kawada T., Sugimoto, E. (1995). Swimming endurance capacity of mice is increased by chronic consumption of medium-chain triglycerides. *J. Nutr.* **125**: 531-539.
- Gabarra, A. G. (2006). Ingesta de Nutrientes: conceptos y recomendaciones internacionales. *Nutr. Hosp.* **21 (4)**: 437-447.
- Gabrilove, J. (2000). Overview: erythropoiesis, anemia and the impact of erythropoietin. *Semin. Hematol.* **37**:1-13.
- Gabutti, V., Borgna-Pignatti, C. (1994). Clinical manifestations and therapy of transfusional haemosiderosis. *Baillieres Clin. Haematol.* **7**:919-940.
- Gaitán, D.C., Olivares, M.G., Arredondo, M.O., Pizarro, A. (2006). Iron bioavailability in humans. *Rev. Chil. Nutr.* **33(2)**:142-148.
- Galy, B., Ferring, D., Minana, B., Bell, O., Janser, H.G., Muckenthaler, M., Schümann, K., Hentze, M.W. (2005). Altered body iron distribution and microcytosis in mice deficient in iron regulatory protein 2 (IRP2). *Blood* **106**:2580-2589.
- Ganong, W.F. (2004). *Fisiología médica*. 19ª Ed. Editorial Manual Moderno pp: 513-514.
- García Ara, M.C., Boyano Martínez, M.T., Díaz Pena, J.M., Martín Muñoz, F., Pascual Marcos, C., García Sánchez, G., Martín Esteban, M.(2003). Incidencia de alergia a proteínas de leche de vaca en el primer año de vida y su repercusión en el consumo de hidrolizados. *Ann. Pediatr.* **58**:100-105.

- García-Casal, M.N., Layrisse, M., Solano, L., Baron, M.A., Arguello, F., Llovera, D., Ramírez, J., Leets, I., Tropper, E. (1998). Vitamin A and beta-carotene can improve nonheme iron absorption from rice, wheat and corn by humans. *J. Nutr.* **128(3)**: 646-650.
- García Unciti, M.S. (1996). Utilidad terapéutica de los triglicéridos de cadena media (MCT). Dietas cetogénicas en la epilepsia infantil. *Nutrición Clínica* **16**:7-35.
- Gera, T., Sachdev, H.P. (2002). Effect of iron supplementation on incidence of infectious illness in children: Systematic review. *B.M.J.* **325**:1142-1147.
- Gibson, R.S., Yeudall, F., Drost, N., Mtitimuni, B.M., Cullinan, T.R. (2003). Experiences of a community-based dietary intervention to enhance micronutrient adequacy of diets low in animal source foods and high in phytate: a case study in rural Malawian children. *J. Nutr.* **133(2)**: 3992S-3999S.
- Girotti, A.W., Thomas, J.P., Jordan, J.E. (1985). Inhibitory effect of Zn (II) on free radical lipid peroxidation in erythrocyte membranes. *Free Radic. Biol. Med.* **1**:395-401.
- Gnan, S.O., Erabti, H.A., Rana, M.S. (1985). The composition of libyan goat milk. *Aust. J. Dairy Technol.* **40**: 165-166.
- González-Gross M, Marcos A, Pietrzik K. (2001). Nutrition and cognitive impairment in the elderly. *Br. J. Nutr.* **86**: 313-321.
- Grantham-McGregor, S., Ani, C. (2001). A review of studies on the effect of iron deficiency on cognitive development in children. *J. Nutr.* **131**: 649S-68S.
- Green, R., Miller, J.W. (1999). Folate deficiency beyond megaloblastic anemia: hyperhomocysteinemia and other manifestation of dysfunctional folate status. *Semin. Hematol.* **36**: 47-64.

- Green, R., Miller, J.W. (2005). Vitamin B12 deficiency is the dominant nutritional cause of hiperhomocisteinemia in a folic acid- fortified population. *Clin. Chem. Lab. Med.* **43**: 1048-1051.
- Gregory, J. F. (1995). The bioavailability of folate. En: Bailey, L. *Folate in Health and Disease*. New York: Marcel Decker. pp. 195-235.
- Gregory, J. F. (1996). Vitamins. En: Fennema O.R. ed. *Food Chemistry*,. 3<sup>rd</sup> ed. Marcel Dekker, Inc., New York. pp. 531-616.
- Gregory, J. F. (2004). Dietary folate in a changing environment: Bioavailability, fortification and requirements. *J. Food Sci.* **69 (1)**: 59-60.
- Griffiths, H.R., Moller, L., Bartosz, G., Bast, A., Bertoni-Freddari, C., Collins, A., Cooke, M., Coolen, S., Haenen, G., Hoberg, A.M., Loft, S., Lunec, J., Olinski, R., Parry, J., Pompella, A., Poulsen, H., Verhagen, H., Astley, S.B. (2002). Biomarkers. *Mol. Asp. Med*, **23**: 201-208.
- Griffiths, R.H., Unsworth, J., Blake, D.R., Lunec, J. (1988). *Free Radicals in chemistry, pathology and medicine*. London: Richelieu Press. pp. 439-454.
- Grinder-Pedersen, L., Bukhave, K., Jensen, M., Hojgaard, L., Hansen, M. (2004). Calcium from milk or calcium-fortified foods does not inhibit nonheme-iron absorption from a whole diet consumed over a 4-d period. *Am. J. Clin. Nutr.* **80**: 404-409.
- Gueguen, L. (1996). Le valeur nutritionnelle minérale du lait du chèvre. En: *Intérêts nutritionnel er diététique du lait de chévre*. INRA editions, pp. 67-80.
- Gunshin, H., Fujiwara, Y., Custodio, A.O., Dizenzo, C., Robine, S., Andrews, N.C. (2005). Slc11a2 is required for intestinal iron absorption and erythropoiesis but dispensable in placenta and liver. *J. Clin. Invest.* **115**:1258-1266.
- Gutteridge J.M. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin. Chem.* **41**:1819-1828.



- Haas, J.D., Brownlie, T. (2001). Iron deficiency and reduced work capacity: a critical review of the research to determine a causal relationship. *J. Nutr.* **131**: 676S-690S.
- Haenlein, G.F.W. (2001). Past, present, and future perspectives of small ruminant dairy research. *J. Dairy Sci.* **84**: 2097-2115.
- Haenlein, G.F.W. (2004). Goat milk in human nutrition. *Small Rumin. Res.* **51**: 155-163.
- Haenlein, G.F.W. (2007). About the evolution of goat and sheep milk production. *Small Rumin. Res.* **68**:3-6.
- Hahn, P.F., Bale, W.F., Ross, J.F., Balfour, W.M., Whipple, G.H. (1943). Radioactive iron absorption by gastrointestinal tract: influence of anemia, anoxia and antecedent feeding distribution in growing dogs. *J. Exp. Med.* **78**:169-188.
- Hallberg, L. (1981). Bioavailability of dietary iron in man. *Annu. Rev. Nutr.* **1**:123-147.
- Hallberg, L. (1988). Iron balance in pregnancy. En: Berger, H. *Vitamins and minerals in pregnancy and lactation*. Nestle Nutrition Workshop Series. New York: Raven Press, pp. 115-127.
- Hallberg, L., Brune, M., Erlandsson, M., Sandberg, A.S., Rossander-Hulten, L. (1991). Calcium: effect of different amounts on nonheme- and heme-iron absorption in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **53**(1):112-119.
- Hallberg, L., Hulthen, L. (2000). Prediction of dietary iron absorption: an algorithm for calculating absorption and bioavailability of dietary iron. *Am. J. Clin. Nutr.* **71**(5): 1147-1160.
- Hallberg, L., Hulthen, L., Garby, L. (1998). Iron stores in man in relation to diet and iron requirements. *Eur. J. Clin. Nutr.* **52**(9): 623-631.
- Halliwell, B. (2001). Role of free radicals in neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* **18**:685-716.

- Halliwell, B., Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* **57(S)**:715-722.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1984). Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. *Lancet* **1**:1396-1398.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1986). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.* **286**:501-514.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M. (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic. Biol. Med.* **18**:125-126.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1989). Protection against oxidants in biological systems; the superoxide theory of oxygen toxicity. En: Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. Eds. *Free Rad. Biol. Med.* (2<sup>nd</sup> ed) Clarendon Press pp.152-156.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1999). *Free radicals in biology and medicine*, (3<sup>rd</sup> ed) Oxford Science Publications, New York. pp. 617–783.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M., Cross, C.E. (1992). Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now?. *J. Lab. Clin. Med.* **119(6)**: 598-620.
- Halliwell, B., Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.* **142**: 231- 255.
- Hallterman, J.S., Kaczorowski, J.M., Aligne, C.A, Auinger, P., Szilagyi, P.G. (2001). Iron deficiency and cognitive achievement among schoolaged children and adolescents in the United States. *Pediatrics* **107(6)**: 1381-1386.
- Hanawalt, P.C. (2002). Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. *Oncogene* **21**: 8949-8956.

- Har-El, R., Chevion, M. (1991). Zinc (II) protects against metal mediated free radical induced damage: studies on single and double-strand DNA breakage. *Free Radic. Res. Commun.* **12**:509-515.
- Hartiti, S., López-Aliaga, I., Barrionuevo, M., Lisbona, F., Pallarés, I., Alférez, M.J.M., Gómez-Ayala, A.E., Campos, M.S. (1994). Zinc metabolism in rats: effects of intestinal resection, cholecalciferol and ascorbic acid. *Nutr. Res.* **14**:1523-1534.
- Hartwig, A. (2001). Role of magnesium in genomic stability. *Mutat. Res.* **465**:113-121.
- Hatch, G.M., Vance, D.E., Wilton, D.C. (1993). Rat liver mitochondrial phospholipase-A2 is an endotoxin-stimulated enzyme of kupffer cell wich is release during liver perfusion. *Biochem. J.* **293**: 143-150.
- Hentze, M.W., Muckenthaler, M.U., Andrews, N.C. (2004). Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* **117**: 285-297.
- Hentze, M.W., Caughman, S.W., Casey, J.L., Koeller, D.M., Rouault, T.A., Harford, J.B., Klausner, R.D. (1988). A model for the structure and functions of iron-responsive elements. *Gene*, **72**:201-208.
- Herbert, V., Das, K.C. Folic acid and vitamin B<sub>12</sub>. (1994). En: Shils, M.E., Olson, J.A., Shike, M. editors. *Modern nutrition in health and disease*. 8<sup>th</sup> ed. Malvern P.A. Lea y Febiger, pp. 402-425.
- Hercberg, S., Galan, P.(1992). Nutritional anemias. *Bailleres Clin. Haematol.* **5**:143-168.
- Hider, RC. (2002). Nature of nontransferrin-bound iron. *Eur. J. Clin. Invest.* **32**:50-54.
- Hillman, R.S., Ault, K.A. Iron deficiency anemia. (1995). En: Hillman, R.S., Ault, K.A., Rinder, H.M. *Hematology in Clinical Practice. A guide to diagnosis and management*. McGraw-Hill, Inc. pp. 72-85.

- Hoffpauer, D. W., Bonnette, R. E. (1998). Enrichment update on folic acid. *Cereals Foods World* **4**: 365-367.
- Houston, D.K., Johnson M.J., Nozza, R.J., Gunter, E.W., Shea, K.J., Cutler, G.M., Edmonds, J.T. (1999). Age-related hearing loss, vitamin B<sub>12</sub> and folate in elderly women. *Am. J. Clin. Nutr.* **69**: 564-571.
- Hultdin, J., van Guelpen, B., Bergh, A., Hallmans, G., Stattin, P. (2005). Plasma folate, vitamin B12, and homocysteine and prostate cancer risk: A prospective study. *Internat. J. Cancer* **113**: 819-824.
- Hurrell, R.F. (2002). How to ensure adequate iron absorption from iron-fortified food. *Nutr. Rev.* **60**: S7-S15.
- Hurrell, R.F. (2003). Influence of vegetable protein sources on trace element and mineral bioavailability. *J. Nutr.* **133(9)**: 2973S-2977S.
- Hurrell, R.F., Lynch, S.R., Trinidad, T.P., Dassenko, S.A., Cook, J.D. (1988). Iron absorption in humans: bovine serum albumin compared with beef muscle and egg white. *Am. J. Clin. Nutr.* **47(1)**:102-107.
- Infante, D., Tormo, R., Zandueta, M. (2003). Empleo de leche de cabra en pacientes con alergia a las proteínas de la leche de vaca *An. Pediatr.* **59**: 138-142.
- Ishii, K., Kono, H., Hosomura, N., Tsuchiya, M., Ohgiku, M., Tanaka, N., Fujii, H. (2009). Medium-chain triglycerides enhance mucous secretion and cell proliferation in the rat. *J. Gastroenterol.* **44(3)**: 204-211.
- Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J.M., Lane, W.S., Kaelin, W.G. JR. (2001). HIF $\alpha$  targeted for VHL-mediated destruction by proline hidroxilation: implications for oxigen sensing. *Science* **292**:464-468.
- Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y.M., Wilson, M.I., Gielbert, J., Gaskell, S.J., Kriegsheim, A.V., Hebestreit, H.F., Mukherji, M., Schofield, C.J., Maxwell, P.H., Pugh, C.W.,

- Ratcliffe, P.J. (2001). Targeting of HIF-alpha to the Von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by oxygen regulated prolin hidroxilation. *Science* **292**:468-472.
- Jacques, P.F., Bostom, A.G., Williams, R.R., Ellison, R.C., Eckfeldt, J.H., Rosenberg, I.H., Selhub, J., Rozen, R. (1996). Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* **93**:7-9.
- Jandal, J.M. (1996). Comparative aspects of goat and sheep milk. *Small Rumin. Res.* **22**: 177-185.
- Jauber, O., Kalantzopoulos, O. (1996). Quality of goat milk for cheese and other products. *VI Int. Conf. Goats Int.* **1**: 274-284.
- Kang, S.S., Zou, J., Wong, P.W.K., Kowalisyn, J., Strokosch, G. (1988). Intermediate homocysteinemia: A thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *Am. J. Hum. Genet.* **43**: 414-421.
- Kauwell, G.P.A., Wilsky, C.E., Cerda, J.J., Herrlinger-Garcia, K., Hutson, A.D., Theriaque, D.W., Boddie, A., Rampersaud, G.C., Bailey, L.B. (2000). Methylenetetrahydrofolate reductase mutation (677C3T) negatively influences plasma homocysteine response to marginal folate intake in elderly women. *Metabolism* **49**: 1440–1443.
- Keagy, P.M., Shane, B., Oace, S.M. (1988). Folate bioavailability in humans: effects of wheat bran and beans. *Am. J. Clin. Nutr.* **47**: 80-88.
- Kearney, S.L., Nemeth, E., Neufeld, E.J., Thapa, D., Ganz, T., Weinstein, D.A., Cunningham, M.J. (2007). Urinary hepcidin in congenital chronic anemias. *Pediat. Blood Cancer* **48**: 57-63.

- Kelso, G.F., Porteous, C.M., Hughes, G., Ledgerwood, E.C., Gane, A.M., Smith, R.A., Murphy, M.P. (2002). Prevention of mitochondrial oxidative damage using targeted antioxidants. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **959**:263-274.
- Kester M.I., Scheltens P. (2009). Dementia: The bare essentials. *Pract. Neurol.* **9**: 241-251.
- Kim, Y.I. (1999). Folate and cancer prevention: a new medical application of folate beyond hyperhomocysteinemia and neural tube defects. *Nutr. Rev.* **57**: 314-321.
- Kim, Y. (2004). Folate and DNA methylation: a mechanistic link between folate deficiency and colorectal cancer?. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **13 (4)**: 511-519.
- Kim, H.A., J. Lindsay, R. (1991). Contributions of cow, sheep and goat milk to characterizing branched-chain fatty acid and phenolic flavors in varietal cheeses. *J. Dairy Sci.* **74**:3267-3274.
- Kjeldahl, J. Z. (1983). Neue Methode zur Bestimmung des stickstoffs in organischen Körpern. *Z. Anal. Chem.* **22**:366-382.
- Knuston, M.D., Vafa, M.R., Haile, D.J., Wessling-Resnick, M. (2003). Iron overloading and erythrophagocytosis increase ferroportin 1 (FPN1) expression in J774 macrophages. *Blood* **102**:4191-419.
- Krishnamurthy, P., Xie, T., Schuetz, J.D. (2007). The role of transporters in cellular heme and porphyrin homeostasis. *Pharmacol. Ther.* **114**:345-358.
- Kristian, T., Siesjö, K.B. (1998). Calcium in ischemic cell death. *Stroke* **29**: 705-718.
- Lara-Villoslada, F., Olivares, M., Jiménez, J., Boza, J., Xaus, J. (2004). Goat milk is less immunogenic than cow milk in a murine model of atopy. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **39**: 354-360.

- Laurence, K., James, N., Miller, M., Tennant, G., Campbell, H. (1981). Double-blind randomized controlled trial of folate treatment before conception to prevent recurrence of neural-tube defects. *Br. Med. J.* **282**: 1509-1511.
- Laxminarayan, R., Mills, A.J., Breman, J.G., Measham, A.R., Alleyne, G., Claeson, M., Jha, P., Musgrove, P., Chow, J., Shahid-Salles, S., Jamison, D.T. (2006). Advancement of global health: key messages from the Disease Control Priorities Project. *Lancet* **367**: 1193-1208.
- Layrisse, M., Martinez-Torres, C., Roche, M. (1968). Effect of interaction of various foods on iron absorption. *Am. J. Clin. Nutr.* **21(10)**:1175-1183.
- Lee, G.R. (1993). Iron deficiency and iron deficiency anemia. In: Lea and Febiger. *Clinical Hematology*. Wintrobe`s. 9<sup>a</sup> Ed. Philadelphia-London pp. 808-839.
- Lee, J, Koo, N, Min, DB. (2004). Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **3**:21-33.
- Lee, H. C., Shoda, R., Krall, J. A., Foster, I. D., Selhub, J., Rosenberry, T. L. (1992). Folate binding protein from kidney brush border membranes contains components of a glycoinositol phospholipid anchor. *Biochemistry* **31**: 3236-3243.
- 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, M.L., Giuliano, G., Pich, M.M., Paolucci, U., Castelli, G.P., Ventura, B. (2002). Role of mitochondria in oxidative stress and aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **959**:199-213.
- Li, Z., Ren, A., Zhang, L., Ye, R., Li, S., Zheng, J., Hong, S., Wang, T., Li, Z. (2006). Extremely high prevalence of neural tube defects in a 4-county area in Shanxi

- Province, China. *Birth Defects Research Part A, Clin. Mol. Teratol.* **76**: 237-240.
- Lindeman, R.D., Romero, L.J., Koehler, K.M., Liang, H.C., LaRue, A., Baumgartner, R.N., Garry, P.J. (2000). Serum vitamin B<sub>12</sub>, C and folate concentrations in the New Mexico elder health survey: correlations with cognitive and affective functions. *J. Am. Coll. Nutr.* **19**: 68-76.
- Lindsay, D.G., Astley, S.B. (2002). European research on the functional effects of dietary antioxidants- EUROFEDA. *Mol. Aspects Med.* **23**:1-38.
- Littarru, G.P., Battino, M. (1994). Natural antioxidants and sports medicine. *Int. J. Sports. Cardiol.* **2**:127-130.
- Liu, J., Atamna, H., Kuratsune, H., Ames, B.N. (2002). Delaying brain mitochondrial decay and aging with mitochondrial antioxidants and metabolites. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **959**:133-166.
- Liu, X.B., Ynag, F., Haile, D.J. (2005). Functional consequences of ferroportin 1 mutations. *Blood Cell Mol. Dis.* **35**:33-46.
- Lonn, E., Yusuf, S., Arnold, M. J., Sheridan, P., Pogue, J., Micks, M., Genest, J. Jr. (2006). Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. *New Engl. J. Med.*, **354 (15)**: 1567-1577.
- Lönnerdal, B., Dewey, K.G. (1995). Epidemiología de la deficiencia de hierro en lactantes y niños. *An. Nestlé*, **53**:12-19.
- López-Aliaga, I., Alférez, M.J.M., Barrionuevo, M., Lisbona, F., Campos, M.S. (2000). Influence of goat and cow milk on the digestive and metabolic utilization of calcium and iron. *J. Physiol. Biochem.* **56**: 201-208.
- López-Aliaga, I., Alférez, M.J.M., Barrionuevo, M., Nestares T., Sanz Sampelayo, M.R., Campos, M.S. (2003). Study of nutritive utilization of protein and magnesium in



- rats with resection of the distal small intestine: beneficial effect of goat milk. *J. Dairy Sci.* **86**: 2958-2966.
- López-Aliaga, I., Alférez, M.J.M, Nestares, M.T, Ros, P.B., Barrionuevo, M., Campos, M.S. (2005). Goat milk feeding causes an increase in biliary secretion of cholesterol and a decrease in plasma cholesterol levels in rats. *J. Dairy Sci* **88**: 1024-1030.
- Lou, D.Q., Nicolas, G., Lesbordes, J.C., Viatte, L., Grimber, G., Szajnert, M.F., Kahn, A., Vaulont, S. (2004). Functional differences between hepcidin 1 and 2 in transgenic mice. *Blood* **103**: 2816-2821.
- Lowry, O.H., Rosenburgh, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-270.
- Lucock, M. (2000). Folic acid: Nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Molecular Genet. Metabolism.* **71**: 121-138.
- Ludwiczek, S., Aigner, E., Theurl, I., Weiss, G. (2003). Cytokine mediated regulation of iron transport in human monocytic cells. *Blood* **101**: 4148-4154.
- Lunec, J. (1992). Free radicals: their involvement in disease processes. *Biochem. Clin.* **16(2)**: 99-108.
- Lynch, S.R. (1997). Interaction of iron with other nutrients. *Nutr. Rev.* **55(4)**:102-110.
- McGuire, M. A., McGuire, M. K. (2000). Conjugated linoleic acid (CLA): A ruminant fatty acid with beneficial effects on human health. *J. Anim. Sci.* **77**:1-8.
- Malus, C.D., Weber, P.C., Leaf, A. Bonventre, J.V. (1999). Incorporation of marine lipids into mitochondrial membranes increase susceptibility to damage by calcium and reactive oxygen species. Evidence for encade activation of phospholipase A2 in mitochondria enchired with n-3 fatty acids. *Proc. Nutr. Acad. Sci. USA* **87**: 8845-8849.

- Martin P. (1996). La composition protéique du lait de chèvre: ses particularités. In: Interêts nutritionnel et diététique du latí de chèvre. INRA Editions pp. 27-49.
- Martínez-Férez A. (2004). Obtención de oligosacáridos de la leche de diferentes especies por tecnología de membranas. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada.
- Martínez-Férez, A., Rudloff, S., Guadix, A., Henkel, C.A., Pohlentz, G., Boza, J.J., Guadix, E.M., Kunz, C. (2006). Goat's milk as a natural source of lactose-derived oligosaccharides: isolation by membrane technology. *Int. Dairy J.* **16**: 173-181.
- Maruti, S. S., Ulrich, C. M., White, E. (2009). Folate and one-carbon metabolism nutrients from supplements and diet in relation to breast cancer risk. *Am. J. Clin. Nutr.* **89**: 624-633.
- Marx, G., Chevion, M. (1986). Site-specific modification of albumin by free radicals. Reaction with copper (II) and ascorbate. *Biochem. J.* **234**: 236-297.
- Mason, J. B. (2009). Folate, cancer risk, and the Greek god, Proteus: a tale of two chameleons. *Nutr. Rev.* **67 (4)**: 206-212.
- Massey, A.C. (1992). Microcytic anemia: Differential diagnosis and management of iron deficiency anemia. *Med. Clin. North. Am.* **76**:549-566.
- Massy, Z.A. (1999). Reversal of hyperhomocystinaemia in chronic renal failure-is folic or folinic acid the answer?. *Nephrol. Dial. Transplant.* **14(12)**: 2810- 2812.
- Mataix Verdú, J., Ochoa Herrera, J. (2002). Vitaminas. En: J. Mataix Verdú, *Nutrición y Alimentación Humana (Vol. 1)*. Majadahonda, Madrid, España Ed. Ergon. ISBN: 8484730883. pp. 137-203.
- McKie, A.T., Barrow, D., Latunde-Dada, G.O., Rolfs, A., Sager, G., Mudaly, E., Mudaly, M., Richardson, C., Barlow, D., Bomford, A., Peters, T.J., Raja, K.B., Sgirali,

- S., Hediger, M.A., Farzaneh, F., Simpson, R.J. (2001). An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science* **291**:1755-1759.
- McKie, A.T., Marciani, P., Rolfs, A., Brennan, K., Wehr, K., Barrow, D., Miret, S., Bomford, A., Peters, T., Farzaneh, F. (2000). A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol. Cell* **5**: 299-309.
- McPhail, A.P., Bothwell, T.H. (1992). The prevalence and causes of nutritional iron deficiency anemia. En: Fomon, S.J., Zlotkin, S. *Nutritional anemias*. Nestlé Nutrition Workshop Series, vol.30, Nestec Ltd., Vevey/Raven Press, Ltd., New York pp. 1-12.
- Medical Research Council Vitamin Study Research Group (1991). Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet* **338**: 131-137.
- Melov, S. (2002). Therapeutics against mitochondrial oxidative stress in animal models of aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **959**:330-340.
- Minotti, G., Aust, D. (1987). The role of iron in the initiation of lipid peroxidation. *Chem. Phys. Lipids.* **44**:191-208.
- Miret, S., Simpson, R.J., McKie, A.T. (2003). Physiology and molecular biology of dietary iron absorption. *Annu. Rev. Nutr.* **23**: 283-301.
- Miyadera, H., Kano, K., Miyoshi, H., Ishii, N., Hekimi, S., Kita, K. (2002). Quinones in long-lived *clk-1* mutants of *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Lett.* **512(1-3)**: 33-37.
- Moens, A. L., Vrints, C. J., Claeys, M. J., Timmermans, J. P., Champion, H. C., Kass, D. A. (2008). Mechanisms and potential therapeutic targets for folic acid in cardiovascular disease. *Am. J. Physiol. - Heart and Circulatory Physiology* **294**: H1971-H1977.

- Monsen, E.R. (1988). Iron nutrition and absorption: dietary factors which impact iron bioavailability *J. Am. Diet Assoc.* **88**: 786-7890.
- Morales, A. S. (2002). Ácido fólico en la prevención de defectos del tubo neural. *Fronteras en Obstetricia y Ginecología* **2(1)**: 25-30.
- Moreiras, O., Carbajal.A., Cabrera, L., Cuadrado, C. (2011). Tablas de composición de alimentos. 15<sup>a</sup> edición revisada y ampliada. Ediciones Pirámide (Grupo Anaya S.A.), Madrid.
- Muggli, R. (1993). Free radicals tissue damage: the protective role of antioxidant nutrients. En: Free radicals and antioxidants in nutrition. Coringiu, F., Banm, S., Dessi, M.A. Eds. The Richelieu Press. London, pp. 189-194.
- Multhaup, G., Rupper, T. (1997). Reactive oxygen species and Alzheimer disease. *Biochem. Pharmacol.* **54(5)**: 533-559.
- Mulvihill, B., Kirwan, F.M., Morrissey, P.A., 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.
- Muñoz M., Campos A., García J.A., Ramírez G. (2005). Physiopathology of iron metabolism: diagnostic and therapeutic implications. *Nefrologia* **25**:9-19.
- Muñoz, M., Villar, I., Garcia-Erce, J.A. (2009). An update on iron physiology. *World J.Gastroenterol.* **15(37)**: 4617-4626.
- Murphy, MP. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* **417**:1-13.
- Murthy, S. N., Matta, A. S., Mondal, D., McNamara, D. B. (2003). Methods in assessing homocysteine metabolism. *Metab. Syndr Relat. Disord.* **1 (2)**: 129-140.

- Nadadur, S.S., Srirama, K., Mudipalli, A. (2008). Iron transport and homeostasis mechanisms: Their role in health and disease. *Indian J. Med. Res.* **128**: 533-544.
- Navarro, A., López-Cepero, J.M., Sánchez del Pino, M.J. (2001). Skeletal muscle and aging. *Frontiers in Bioscience* **6**: 26-44.
- Nemeth, E., Ganz, T. (2006a). Hepcidin and iron-loading anaemias. *Haematologica* **91**:727-732.
- Nemeth, E., Ganz, T. (2006b). Regulation of iron metabolism by hepcidin. *Annu. Rev. Nutr.* **26**: 323-342.
- Nemeth E., Tuttle M.S., Powelson J., Vaughn M.B., Donovan A., Ward D.M., Ganz T., Kaplan J. (2004). Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* **306**: 2090-2093.
- Neri, S. Gardini, A., Facchini, A., Olivieri, F., Franceschi, C., Ravaglia, G., Mariani, E. (2005). Mismatch repair system and aging: microsatellite instability in peripheral blood cells from differently aged participants. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **60**:285-292,
- Nestares, T., Díaz-Castro, J., Alférez, M.J.M., López-Aliaga, I., Barrionuevo, M., Campos, M.S. (2008). Calcium-enriched goat milk, in comparison with similarly enriched cow milk, favours magnesium bioavailability in rats with nutritional ferropenic anaemia. *J. Sci. Food Agric.* **88**:319-327.
- Nicolas, G., Bennoun, M., Devaux, I., Beaumont, C., Grandchamp, B., Kahn, A., Vaulont, S. (2001). Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 8780-8785.
- Nicolas, G., Chauvet, C., Viatte, L., Danaan, J.L., Bigard, X., Devaux, I., Beaumont, C., Kahn, A., Vaulont, S. (2002). The gene encoding the iron regulatory peptide

- hepcidin is regulated by anemia, hypoxia and inflammation». *J. Clin. Invest.* **110**:1037-1044.
- Nilsson, K., Gustafso, L., Fäldt, R., Andersson, A., Brattström, L., Lindgren, A., Israelsson, B., Hultberg, B. (1996). Hyperhomocysteinaemia -a common finding in a psychogeriatric population. *Eur. J. Clin. Invest.* **26**: 853-859.
- Niki, E. (1987). Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chem. Phys. Lipids* **44**: 227-253.
- Nissenson, A.R., Berns, J.S., Sakiewicz, P., Ghaddar, S., Moore, G.M., Schleicher, R.B., Seligman, P.A. (2003). Clinical evaluation of heme iron polypeptide: sustaining a response to rHuEPO in hemodialysis patients. *Am. J. Kidney Dis.* **42**: 325-330.
- Norberg, E., Orren, S., Zhivotovsky, B. (2010). Mitochondrial regulation of cell death: processing of apoptosis-inducing factor (AIF). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **396(1)**: 95-100.
- Nygren-Babol, L., Sternesjö, A., Jägerstad, M., & Björck, L. (2005). Affinity and rate constants for interactions of bovine folate-binding protein and folate derivatives determined by optical biosensor technology. Effect of stereoselectivity *J. Agric. Food Chem.* **53 (13)**: 5473-5478.
- O'Connor, D.L. (1994). Folate in goat milk products with reference to other vitamins and minerals: a review. *Small Rumin. Res.* **14**: 143-149.
- Odle, J. (1997). New insights into the utilization of medium-chain triglycerides by the neonate: observations from a piglet model. *J. Nutr.* **127**:1061-1067.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **95**: 351-358.

- OMS (Organización Mundial de la Salud). (2006). Defining and setting programme goals. En: L. Allen, B. de Benoist, O. Dary, R. Hurrell (Edits.), Guidelines on food fortifications with micronutrients. pp. 139-177.
- O'Neil, J., Powell, L. (2005). Clinical aspects of hemochromatosis. *Semin. Liver Dis.* **25**:381-391.
- Oppenheimer, S.J. (2001). Iron and its relation to immunity and infectious disease. *J. Nutr.* **131**: 616S-633S.
- Orino, K., Lehman, L., Tsuji, Y., Ayaki, H., Torti, S.V., Torti, F.M. (2001). Ferritin and the response to oxidative stress. *Biochem. J.* **357**: 241-247.
- Oski, F.A. (1993). Iron deficiency in infancy and childhood. *N. Engl. J. Med.* **329**:190-198.
- Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S., Zhivotovsky, B. (2007). Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* **12**:913-922.
- Pallarés, I., Lisbona, F., López-Aliaga, I., Barrionuevo, M., Alférez, M.J.M., Campos, M.S. (1993). Effects of iron deficiency on the digestive utilization of iron, phosphorus, calcium and magnesium in rats. *Br. J. Nutr.* **70**: 609-620.
- Papanikolaou, G., Tzilianos, M., Christakis, J.I., Bogdanos, D., Simirika, K., Macxfarlane, J., Goldberg, Y.P., Sakellaropoulos, N., Ganz, T., Nemeth, E. (2005). Heparin in iron overload disorders. *Blood*, **105**: 4103-410.
- Pariza, M.W., Park, Y., Cook, M.E. (2001). The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Progr. Lipid Res.* **40**: 283-298.
- Park Y.W. (1994). Hypo-allergenic and therapeutic significance of goat milk. *Small Rumin. Res.* **14**: 151-155.

- Park Y.W. (2006). Goat milk. Chemistry and nutrition. En: Park, Y.W. Haenlein, G.F.W. Handbook of milk of non-bovine mammals. Oxford: Blackwell Publishing. pp. 34-58.
- Park, Y.W., Storkson, J.M., Albright, K.J., Liu, W., Pariza, M.W. (1999). Evidence that the trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. *Lipids* **34**: 235-241.
- Patterson, A.J. (2001). Dietary treatment of iron deficiency in women of child-bearing age. *Am. J. Clin. Nutr.* **74**: 650-656.
- Pauline, L., Lee, L., Beutler, E. (2009). Regulation of hepcidin and iron-overload disease. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **4**: 489-515.
- Pelucchi, C., Galeone, C., Talamini, R., Negri, E., Parpinel, M., Franceschi, S., Montella, M., La Vecchia, C. (2005). Dietary folate and risk of prostate cancer in Italy. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **14 (4)**: 944-948.
- Penn, D., Dolderer, M., Schmidt-Sommerfeld, E. (1987). Carnitine concentrations in the milk of different species and infant formulas. *Biol. Neonate* **52**: 70-79.
- Peyssonaux, C., Zinkernagel, A.S., Schuepbach, R.A., Rankin, E., Vaulont, S., Hasse, V.H., Nizet, V., Johnson, R.S. (2007). Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). *J. Clin. Invest.* **117**:1926-1932.
- Pietrangelo, A. (2002). Physiology of iron transport and the hemochromatosis gene. *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.* **282**:G403-G414.
- Pietrangelo, A. (2006). Hereditary hemochromatosis. *Biochim. Biophys. Acta* **1763**: 700-710.
- Pietrzik, K., Bohlmann, A.M., Fohr, I., Prinz- Langenohl, R., Nau, H. (2001). 5-Methyltetrahydrofolate (5-MTHF) *versus* pteroylmonoglutamic acid (PGA) -



- what is the better alternative for supplementation? *FASEB J. Experimental Biology* **15(4)**: 491.
- Pitkin, R.M. (2007). Folate and neural tube defects. *Am. J. Clin. Nutr.* **85(suppl)**: 285S-288S.
- Ploszaj, T., Ryniewicz, Z., Moty, L.T. (1997). Polyamines in goat's colostrum and milk. *Comp. Biochem. Physiol.* **118B**: 45-52.
- Punnonen, K., Irjala, K., Rajamaki, A. (1997). Serum transferrin receptor and its ratio to serum ferritin in the diagnosis of iron deficiency. *Blood* **9**:1052-1057.
- Quinlivan, E.P., Hanson, A.D., Gregory, J.F. (2006). The analysis of folate and its metabolic precursors in biological samples. *Anal. Biochem.* **348**: 163- 184.
- Qiu, A., Jansen, M., Sakaris, A., Hee, Min, S., Chattopadhyay, S., Tsai E., Sandoval, C., Zhao, R., Akabas, M.H., Goldman, I.D. (2006). Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. *Cell* **127**: 917-928.
- Raja, K.B., Simpson, R.J., Pippard, M.J., Peters, T.J. (1988). In vivo studies on the relationship between intestinal iron ( $\text{Fe}^{3+}$ ) absorption, hypoxia and erythropoiesis in the mouse. *Br. J. Haematol.* **68(3)**: 373-378.
- Raja, K.B., Simpson, R.J., Peters, T.J. (1994). Intestinal iron absorption studies in mouse models of iron-overload. *Br. J. Haematol.* **86**:156-162.
- Ramm, G.A., Ruddell, R.G. (2005). Hepatotoxicity of iron overload: Mechanisms of iron induced hepatic fibrogenesis. *Semin. Liver Dis.* **25**:433-449.
- Ratnam, M., Freisheim, J.H. (1990). Proteins involved in the transport of folates and antifolates by normal and neoplastic cells. En: Picciano, M.F., Stokstad, E.L.R., Gregory, J.F., eds. *Contemporary Issues in Clinical Nutrition. Vol. 13. Folic acid Metabolism in Health and Disease.* New York: Wiley- Liss pp. 91-120.

- Real Decreto 1669/2009, de 6 de noviembre, por el que se modifica la norma de etiquetado sobre propiedades nutritivas de los productos alimenticios, aprobada por el Real Decreto 930/1992 de 17 de julio. BOE (Boletín Oficial del Estado) N° 269, pp. 92956-92959.
- Reddy, M.B., Cook, J.D. (1997). Effect of calcium intake on nonheme iron absorption from a complete diet. *Am. J. Clin. Nutr.* **65**:1820-1825.
- Reeves, P., Nielsen, F., 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.
- Refsum, H., Ueland, P.M., Nygård, O., Vollset, S.E. (1998). Homocysteine and cardiovascular disease. *An. Rev. Med.* **49**: 31-62.
- Reisenauer, A., Halsted, C. (1987). Human folate requirements. *J. Nutr.* **117**: 600-602.
- Remmen, H.V., Richardson, A. (2001). Oxidative damage to mitochondria and aging. *Exp. Gerontol.* **36**:957-968.
- Reznick, A.Z., Packer, L. (1994). Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* **233**: 357-363.
- Rimm, E.B., Willett, W.C., Hu, F.B., Sampson, L., Colditz, G.A., Manson, J.E., Hennekens, C., Stampfer, M.J. (1998). Folate and vitamin B6 from diet and supplements in relation to risk of coronary heart disease among women. *J. Am. Med. Assoc.* **279**: 359-364.
- Robinson, K., Arheart, K., Refsum, H., Brattstrom, L., Goers, G., Ueland, P., Rubba, R., Palma-Reis, R., Meleady, L., Daly, L., Witteman, J., Graham, I. (1998). Low circulation folate and vitamin B<sub>6</sub> concentrations: risk factors for stroke, peripheral vascular disease, and coronary artery disease. *Circulation* **97**: 437-443.

- Rosenberg, I. H. (2005). Science-based micronutrient fortification: which nutrients, how much, and how to know?. *Am. J. Clin. Nutr.* **82**: 279-280.
- Rosenberg, I.H., Miller, J.W. (1992). Nutritional factors in physical and cognitive functions of elderly people. *Am. J. Clin. Nutr.* **55(6 Suppl)**:1237S-1243S.
- Rosenberg, I.H., Rosenberg, L.E. (1998). The implications of genetic diversity for nutrient requirements: The case of folate. *Nutr. Rev.* **56**: S47-S53.
- Rosenblatt, D. S. (1995). Inherited disorders of folate transport and metabolism. En: Scriver, R.C., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York, EEUU: McGraw-Hill. ISBN: 007913035. pp. 3897-3933.
- Ross, M.E. (2010). Gene–environment interactions, folate metabolism and the embryonic nervous system. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, **2 (4)**: 471-480.
- Rossander-Hulten, L. (1991). Calcium: effect of different amounts on nonheme- and heme-iron absorption in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **53(1)**:112-119.
- Rouault, T.A. (2006). The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nat. Chem. Biol.* **2**:406-414.
- Roughead, Z.K., Zito, C.A., Hunt, J.R. (2005). Inhibitory effects of dietary calcium on the initial uptake and subsequent retention of heme and nonheme iron in humans: comparisons using an intestinal lavage method. *Am. J. Clin. Nutr.* **82(3)**: 589-597.
- Ryder, J.W., Portocarrero C.P., Song, X.M., Cui, L., Yu, M., Combatsiaris, T., Galuska, D., Bauman, D.E., Barbano, D.M., Charron, M.J., Zierath, J.R., Houseknecht, K.L. (2001). Isomer-specific antidiabetic properties of conjugated linoleic acid. *Diabetes* **50**: 1149-1157.

- Saini, A.L., Gill, R.S. (1991). Goat milk: An attractive alternate. *Indian Dairyman* **42**: 562-564.
- Samarzija, D., Havranec, J.L., Pavic, V., Mioc, B. (2001). Effects of stage of lactation on the chemical composition of goat milk". *Czech J. Anim. Sci.* **46**: 548-553.
- Sánchez M. (2004). Especies menores para pequeños productores: cabras lecheras. In: Memoria de la XIX Reunión Nacional sobre Caprinocultura. Acapulco Gro. pp. 219-223.
- Sandberg, A.S., Brune, M., Carlsson, N.G., Hallberg, L., Skoglund, E., Rossander-Hulthen, L. (1999). Inositol phosphates with different numbers of phosphate groups influence iron absorption in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **70(2)**: 240-246.
- Sanderson, P. A. (1986). New method of analysis of feeding stuffs for the determination of crude oils and fat. En: Haresing W., Cole, D.J.A. Recent advances in animal nutrition. London: Butter Worths pp. 77-86.
- Sandstrom, B. (2001). Micronutrient interactions: effects on absorption and bioavailability. *Br. J. Nutr.* **85(2)**: S181-S185.
- Santana, M.A., Pihakaski-Maunsbach, K., Sandal, N., Marcker, K.A., Smith, A.G. (1998). Evidence that the plant host synthesizes the heme moiety of leghemoglobin in root nodules. *Plant. Physiol.* **116(4)**:1259-1269.
- Sanz Ceballos, L. (2007). Caracterización de la leche de cabra frente a la de vaca. Estudio de su valor nutritivo e inmunológico. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia, Universidad de Granada.
- Sanz Ceballos, L., Ramos Morales, E., de la Torre Adarve, G., Díaz Castro, J., Pérez Martínez, L., Sanz Sampelayo, M.R. (2009). Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology. *J. Food Comp. Anal.* **22**: 322-329.

- Sanz Sampelayo, M.R., Martín, A.J., Pérez, I. Gil Extremera, F., Boza, J. (2004). Dietary supplements for lactating goats by polyunsaturated fatty acid-rich protected fat. Effects after supplement withdrawal. *J. Dairy Sci.* **87**: 1796-1802.
- Saran, M., Michael, C., Bors, W. (1988). Reaction of NO with O<sub>2</sub> implications for the action of endothelium-derived relaxing factor. *Free Radic. Res. Commun.* **83**:1705-1715. En: Cheeseman, K.H. Slater, T.F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bull.* **49(3)**: 481-493.
- Scherz-Shouval, R., Elazar, Z. (2007). ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. *Trends Cell Biol.* **17**:422-427.
- Scott, J., Weir, D. (1996). Homocysteine and cardiovascular disease. *QJM – Monthly J. Assoc. Physic.* **89**: 561-563.
- Selhub, J. y Rosenberg, I.H. (1996). Folic acid. En: Present knowledge in Nutrition. Eds. Ziegler, E.E., Filer, L.J. ILSI Press. Washington DC, pp. 206- 219.
- Seshadri, S., Beiser, A., Selhub, J., Jacques, P.F., Rosenberg, I.H., D'Agostino, R.B., Wilson, P.W., Wolf, P.A. (2002). Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* **346**: 476-483.
- Sharp P. (2004). The molecular basis of copper and iron interactions. *Proc. Nutr. Soc.* **63(4)**: 563-569.
- Shorvon, S.D., Carney, M.W., Chanarin, I., Reynolds, E.H. (1980). The neuropsychiatry of megaloblastic anaemia. *Br. Med. J.* **281**:1036-1038.
- Siega-Riz, A.M., Hartzema, AG., Turnbull, C., Thorp, J., McDonald, T., Cogswell, M.E. (2006). The effects of prophylactic iron given in prenatal supplements on iron status and birth outcomes: a randomized controlled trial. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **194**: 512-519.

- Slatore, C.G., Littman, A.J., Au, D.H., Satia, J.A., White, E. (2008). Long-term use of supplemental multivitamins, vitamin C, vitamin E and folate does not reduce the risk of lung cancer. *Am. J. Respirat. Crit. Care Med.* **177**: 524-530.
- Slattery, M. L., Potter, J. D., Samowitz, W., Schaffer, D., Leppert, M. (1999). Methylene tetrahydrofolate reductase, diet, and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers and Prev.* **8**: 513-518.
- Smith, S.R., Cooperman, S., Lavaute, T., Tresser, N., Ghosh, M., Meyron-Holtz, E., Land, W., Ollivierre, H., Jortner, B., Switzer, R.R.D., Messing, A., Rouault, T.A. (2004). Severity of neurodegeneration correlates with compromise of iron metabolism in mice with iron regulatory protein deficiencies. *Ann. NY Acad. Sci.* **1012**: 65-83.
- Snowdon, D.A., Tully, C.L., Smith, C.D., Riley, K.P., Markesbery, W.R. (2000). Serum folate and the severity of atrophy of the neocortex in Alzheimer disease: findings from the Nun Study. *Am. J. Clin. Nutr.* **71**: 993-998.
- Soule, B. P., Hyodo, F., Matsumoto, K., Simone N.L., Cook, J.A., Krishna, M.C., Mitchell, J.B. (2007). The chemistry and biology of nitroxide compounds. *Free Radic. Biol. Med.* **42**:1632-1650.
- Steel, R.G.D., Torrie, J.H., Dickey, D.A. (1997). Principles and procedures of statistics: A biometrical approach. 3<sup>rd</sup> edition Steel, R.G.D., Torrie, J.H., Dickey, D.A. editors. New York: McGraw-Hill.
- Stephenson L.S., Lathan M.C., Ottesen E.A. (2000). Global malnutrition. *Parasitology* **121**:S15-S22.
- Stewart W.B., Yule, C.L., Claiborne, H.A., Snowman, R.T., Whipple, G.H. (1950). Radioiron absorption in anemic dogs: fluctuations in the mucosal block and evidence for a gradient of absorption in the gastrointestinal tract. *J. Exp. Med.* **92**:75-82.

- Stoltzfus, R.J. (2001). Iron-deficiency anemia: reexamining the nature and magnitude of the public health problem. *J. Nutr.* **131(2)**: 697S-701S.
- St-Onge, M.P., Jones, P. (2002). Physiological effects of medium chain triglycerides: potential agents in the prevention of obesity. *J. Nutr.* **132**: 329-332.
- Stranger, O. (2002). Physiology of folic acid in health and disease. *Current Drug Metabolism* **3**, 211-223.
- Suitor, C.W., Bailey, L.B. (2000). Dietary folates equivalents: interpretation and application. *J. Am. Dietetic Assoc.* **100(1)**, 88-94.
- Sullivan, L.W., Luhby, L.A., Streiff, L.W. (1966). Studies on the daily requirement for folic acid in infants and the etiology of folate deficiency in goat's milk megaloblastic anemia. *Am. J. Clin. Nutr.* **18**: 311-317.
- Swain, J.H., Johnson, L.K., Hunt, J.R. (2007). Electrolytic iron or ferrous sulphate increase body iron in women with moderate to low iron stores. *J. Nutr.* **137**: 620-627.
- Swain, R.A., Kaplan, B., Montgomery, E. I. (1996). Iron deficiency anemia: When is parenteral therapy warranted?. *J. Postgrad. Med.* **100**:181-193.
- Swanson, D.A., Liu, M.L., Baker, P.J., Garrett, L., Stitzel, M., Wu, J.M., Harris, M., Banerjee, R., Shane, B., Brody, L.C. (2001). Targeted disruption of the methionine synthase gene in mice. *Mol. Cel. Biol.* **21**: 1058- 1065.
- Tappenden, K.A., Thomson, A.B., Wild, G.E., Mc Burney, M.I. (1997). Short-chain fatty acid-supplemented total parenteral nutrition enhances functional adaptation to intestinal resection in rats. *Gastroenterology* **112**: 792-802.
- Teucher, B., Olivares, M., Cori, H. (2004). Enhancers of iron absorption: ascorbic acid and other organic acids. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **74(6)**: 403-419.
- Thomas, C., Thomas, L. (2002). Biochemical markers and hematologic indices in the diagnosis of functional iron deficiency. *Clin. Chem.* **48**: 1066-1076.

- Torti, F.M., Torti, S.V. (2002). Regulation of ferritin genes and protein. *Blood* **99**: 3505-3516.
- Uchida, T., Akitsuki, T., Kimura, H., Tanak, T., Matsuda, S., Kariyone, S. (1983). Relationship among plasma iron, plasma iron turnover, and reticuloendothelial iron release. *Blood* **61**: 799-802.
- Ursini, F., Bindoli, A. (1987). The risk of selenium peroxidases in the protection against microsomal lipid peroxidation. *Chem. Phys. Lipid* **44**: 255-276.
- Uzel, C., Conrad, M.E. (1998). Absorption of heme iron. *Semin. Hermatol.* **35**: 27-34.
- Vaesken, M., Alonso-Aperte, E., Varela-Moreiras, G. (2009). Alimentos fortificados con ácido fólico comercializados en España: tipo de productos, cantidad de ácido fólico que proporcionan y población a la que van dirigidos. *Nutr. Hosp.* **24(4)**: 459-466.
- Valerie, K., Povirk, L. (2003). Regulation and mechanisms of mammalian double strand break repair. *Oncogene* **22(37)**: 5792-5812.
- Valls-Bellés, V., Muñiz, P., González, P., González-Sanjosé, M.L., Beltrán, S. (2002). Mechanism of protection by epicatechin against tert-butylhydroperoxide induced oxidative cell injury in isolated rat hepatocytes and calf thymus DNA. *Process Biochem.* **37**: 659-667.
- Van Campen, D.R. (1973). Enhancement of iron absorption from ligated segments of rat intestine by histidine, cysteine and lysine. Effects of removing ionizing groups and of stereoisomerism. *J. Nutr.* **103**:139-142.
- Van den Broek, N.R., Letsky, E.A. (2000). Etiology of anemia in pregnancy in south Malawi. *Am. J. Clin. Nutr.* **72**: 247S-256S.



- Van der Berg, J.J., Op Den Kamp, J.A., Lubin, B.H., Kuypers, F.A. (1993). Conformational changes in oxidized phospholipids and their preferential hydrolysis by phospholipase A2: a monolayer study. *Biochemistry* **32**: 4962-4967.
- Van der Put, N. M. J., Van Straaten, H.W.M., Blom, H.J., Trijbels, F.J.M. (2001). Folate, homocysteine and neural tube defects: an overview. *Exp Biol Med.* **226** (4): 243-270.
- Varela-Moreiras, G., Aperte, E.A., Prieto, R.P. (2000). La determinación “*in vitro/in vivo*” de la biodisponibilidad del ácido fólico contenido en la cerveza. Facultad de Ciencias Experimentales y Técnicas. Universidad San Pablo-CEU.
- Verwei, M., Arkbåge, K., Havenaar, R., van den Berg, H., Witthöft, C., Schaafsma, G. (2003). Folic acid and 5-Methyltetrahydrofolate in fortified milk are bioaccessible as determined in a dynamic *in vitro* gastrointestinal model. *J. Nutr.* **133**(7): 2377-2383.
- Viña, J., Sastre, J., Anton, V., Rivelles, M., Bruseghini, L., Esteras, A., Asensi, M. (1993). Role of antioxidants in aging prevention. *J. Clin. Nutr. Gastroent.* **8**(S): S30-S33.
- Vulpe, C.D., Kuo, Y.M., Murphy, T.L., Cowley, L., Askwith, C., Libina, N., Gitschier, J., Anderson, G.J. (1999). Hephæstin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nat. Genet.*, **21**(2):195-199.
- Wagner, C. (1995). Biochemical role of folate in cellular metabolism. En: Bailey, L. *Folate in Health and Disease*. New York, EEUU: Marcel Dekker. pp. 23- 42.

- Wald, N.J., Watt, H.C., Law, M.R., Weir, D.G., McPartlin, J., Scott, J.M. (1998). Homocysteine and ischemic heart disease - Results of a prospective study with implications regarding prevention. *Arch. Intern. Med.* **158**: 862-867.
- Watkins, D., Whitehead, V.M., Rosenblatt, D.S. (2009). Megaloblastic anemia in Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood (7<sup>a</sup> ed). Orkin, S.H., Ginsburg, D., Nathan, D.A., Look, A.T., Fisher, D.E. (eds). Capítulo 11, pp. 467-520.
- Wei, M.M., Bailey, L.B., Toth, J.P., Gregory, J.F.III. (1996). Bioavailability of humans of deuteriumlabelled monoglutamyl and polyglutamyl folates is affected by selected foods. *J. Nutr.* **126**: 3100-3108.
- Wei, M.M., Gregory, J.F. III. (1998). Organic acids in selected foods inhibit intestinal brush border Pteroyl Polyglutamate hydrolase in vitro: potential mechanism affecting the bioavailability of dietary polyglutamate folate. *J. Agric. Food Chem.* **46**: 211-219.
- Weinstein D.A., Roy C.N., Fleming M.D., Loda M.F., Wolfsdorf J.I., Andrews N.C. (2002). Inappropriate expression of hepcidin is associated with iron refractory anemia: implications for the anemia of chronic disease. *Blood* **100**: 3776-3781.
- Wen, S. W., Chen, S. K., Rodger, M., White, R. R., Yang, Q., Smith, G. N., Sigal, R.J., Perkins, S.L., Walker, M.C. (2008). Folic acid supplementation in early second trimester and the risk of preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **198 (45)**: 1-7.
- Wendel, A. (1993). Glutathione peroxidase. En: Cheeseman, K.H., Slater, T.F. *Free Rad. Biol. Med. British Council Bulletin.*
- WHO. (2001). Iron deficiency anaemia: assessment, prevention, and control. A guide for programme managers. Geneva, World Health Organization.

- WHO. (2003). Surgical care at the district hospital. Geneve. World Health Organization.
- WHO/FAO. (2004). Requirements of vitamin A, iron, folate and vitamin B<sub>12</sub>. Food and Nutrition Series, Rome. FAO. **23**: 33-50.
- WHO/FAO. (2006). Guidelines on Food Fortification with Micronutrients. Geneve. World Health Organization.
- WHO. (2007). Iron supplementation of young children in regions where malaria transmission is intense and infectious disease highly prevalent. Lyon. Food Nutr. Bull. vol. 28, no. 4 (supplement).
- Whitehead, V.M. (1986). Pharmacokinetics and physiological disposition of folate and its derivatives. En: Blakely R.L., Whitehead, V.M., eds. Folate and Pterins. Vol. 3. New York: John Wiley and Sons, pp. 177-205.
- Whittaker P. (1998). Iron and zinc interactions in humans. Am. J. Clin. Nutr. **68(2)**: 442S-446S.
- Wienk, K.J., Marx, J.J., Beynen, A.C. (1999). The concept of iron bioavailability and its assessment. Eur. J. Nutr. **38(2)**: 51-75.
- Wilcox, C. S., Pearlman, A. (2008). Chemistry and antihypertensive effects of tempol and other nitroxides. Pharm. Rev. **60**: 418-469.
- Williams, W.M., Huang, K.C. (1982). Renal tubular transport of folic acid and methotrexate in the monkey. Am J. Physiol. **242**: F484-F490.
- Wolff, S.P., Dean, R.T. (1986). Fragmentation of proteins by free radicals and its effect on their susceptibility to enzyme hydrolysis. Biochem. J. **234**: 399-403.
- Woo, C.W.H., Prathapasinghe, G.A., Siow, Y.L., O.K. (2006). Hyperhomocysteinemia induces liver injury in rat: Protective effect of folic acid supplementation. Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease. **1762(7)**: 656–665.

- Wright, A., Dainty, J., Finglas, P. (2007). Folic acid metabolism in human subjects revisited: potential implications for proposed mandatory folic acid fortification in the UK. *Br. J. Nutr.* **98** (4): 667-675.
- Yagi, K. (1976). A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem. Med.* **15**: 212-216.
- Yip, R. (2000). Significance of an abnormality low or high haemoglobin concentration during pregnancy. Special consideration of iron nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* **72**: 272S-279S.
- Zago, M.P., Oteiza, P.I. (2001). The antioxidant properties of zinc: interactions with iron and antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* **31**: 266-274.
- Zhang, S., Hunter, D. J., Hankinson, S. E., Giovannucci, E. L., Rosner, B. A., Colditz, G. A., Speizer, F. E., Willett, E. C. (1999). A prospective study of folate intake and the risk of breast cancer. *J. Amer. Med. Assoc.* **281**: 1632-1637.
- Zhao, R., Matherly, L. H., Goldman, I. D. (2009). Membrane transporters and folate homeostasis: intestinal absorption and transport into systemic compartments and tissues. *Expert Rev. Mol. Med.* 11 : e4 doi: 10.1017/S1462399409000969.
- 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.

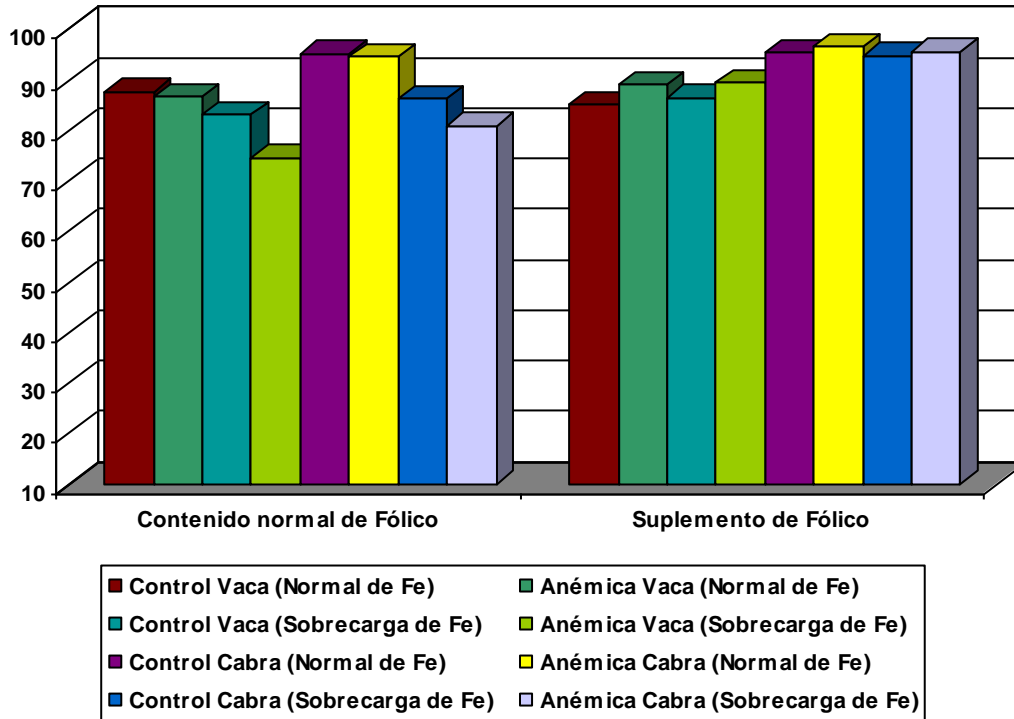




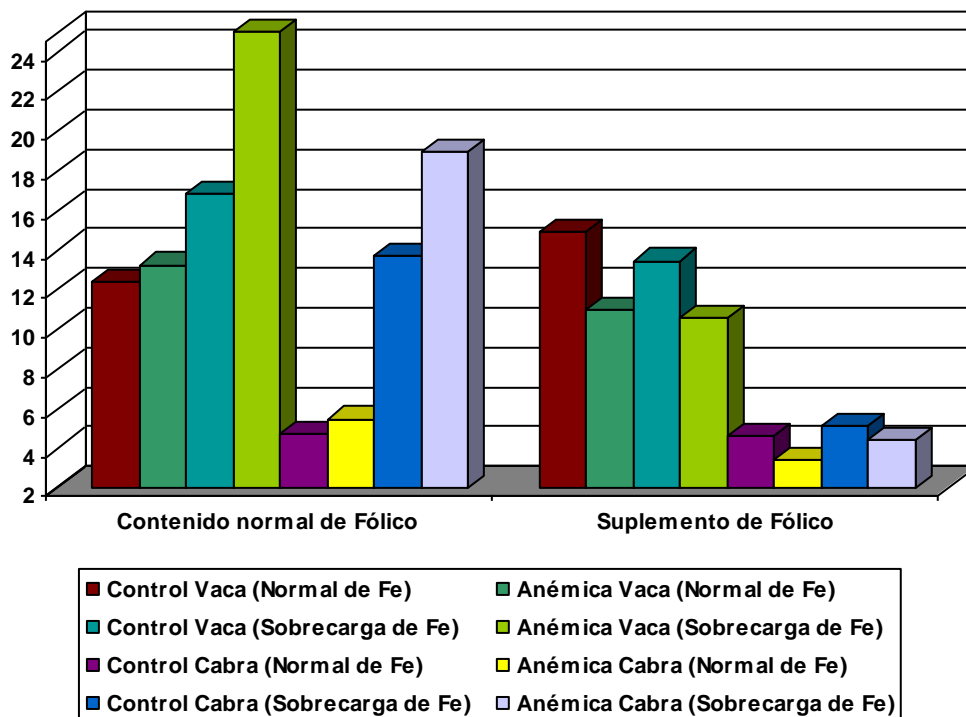
APÉNDICE DE  
FIGURAS



**Figura 15A.** Porcentaje de DNA en cabeza de linfocitos de sangre periférica de ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche de cabra o vaca, con contenido normal o sobrecarga de Fe y contenido normal o suplemento de ácido fólico (n=10 por grupo).

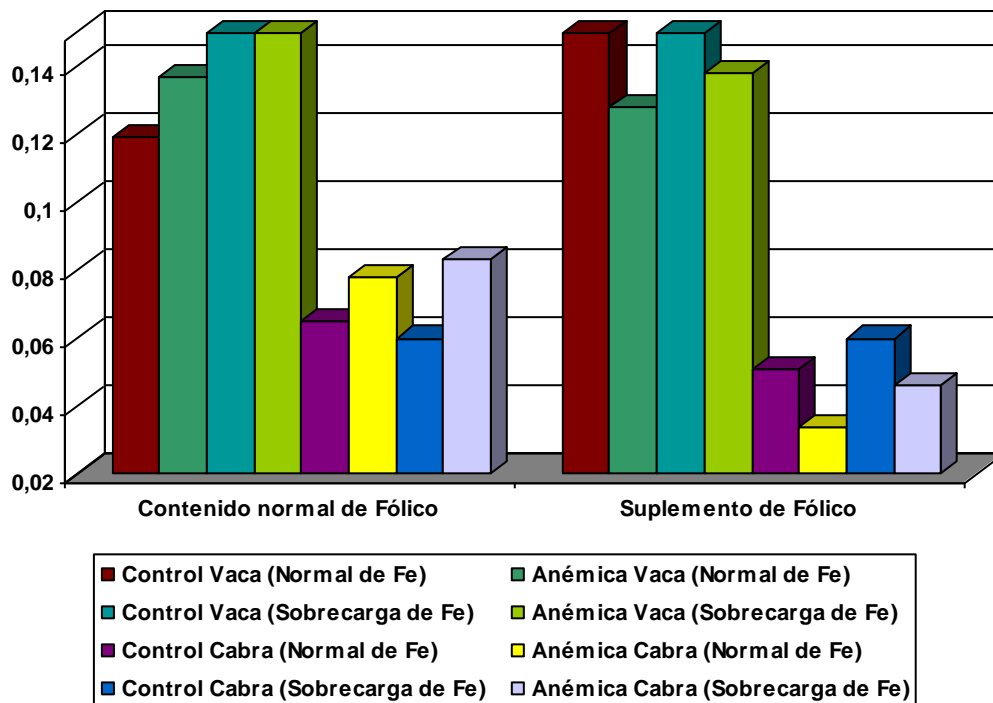


**Figura 15B.** Porcentaje de DNA en cola de linfocitos de sangre periférica de ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche de cabra o vaca, con contenido normal o sobrecarga de Fe y contenido normal o suplemento de ácido fólico (n=10 por grupo).

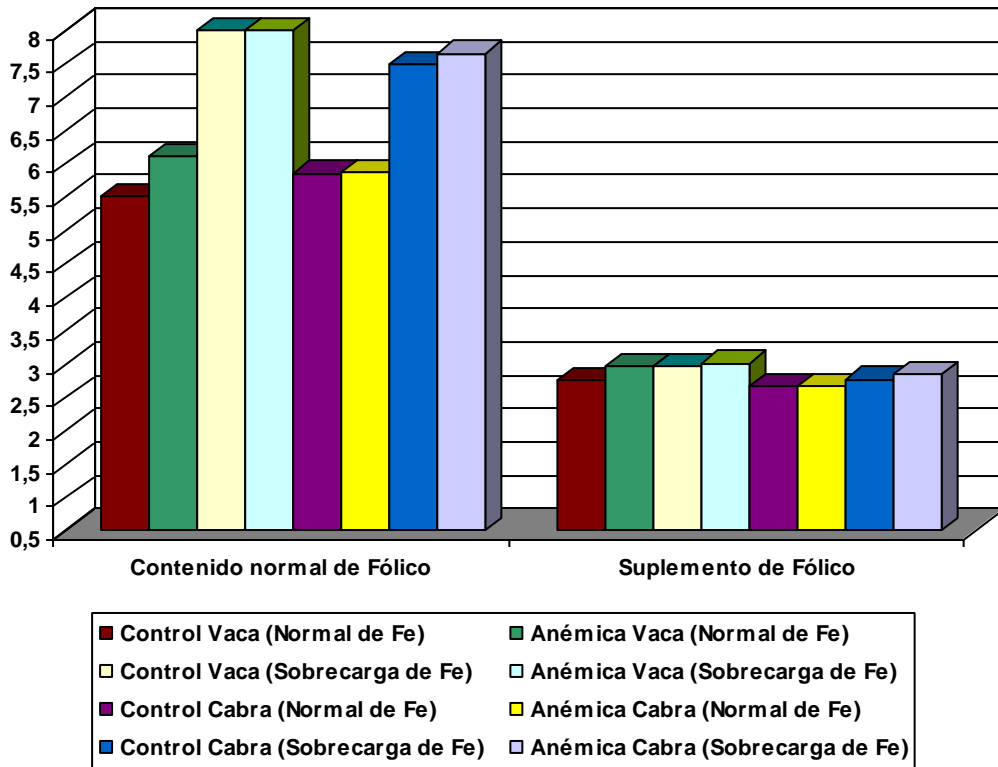




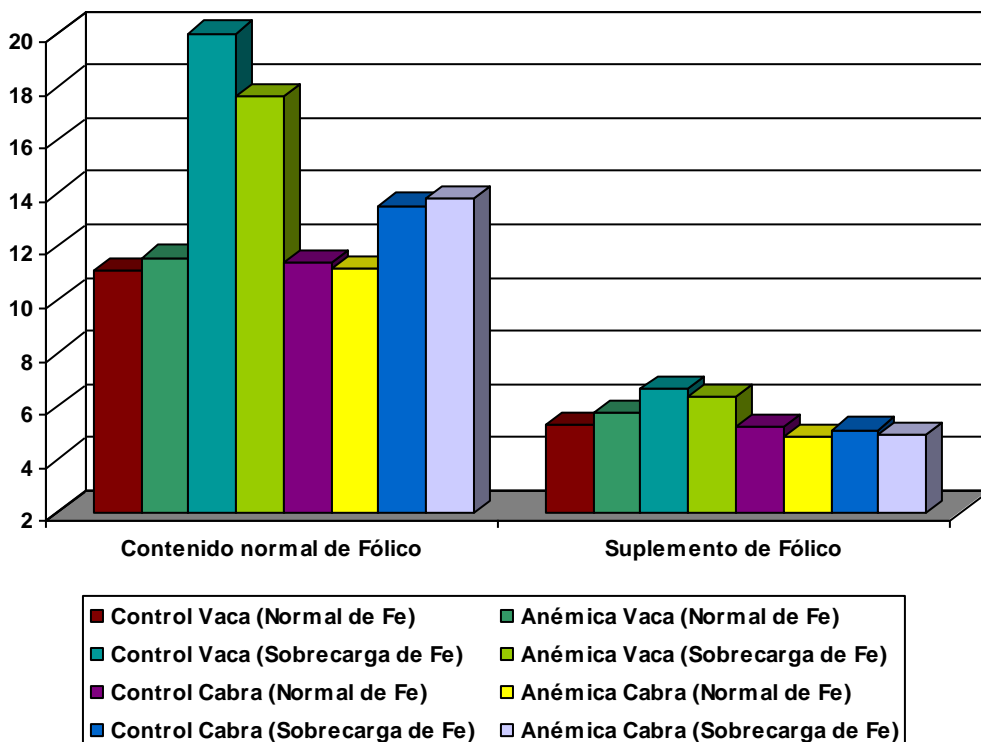
**Figura 15C.** OTM de linfocitos de sangre periférica de ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche de cabra o vaca, con contenido normal o sobrecarga de Fe y contenido normal o suplemento de ácido fólico (n=10 por grupo).



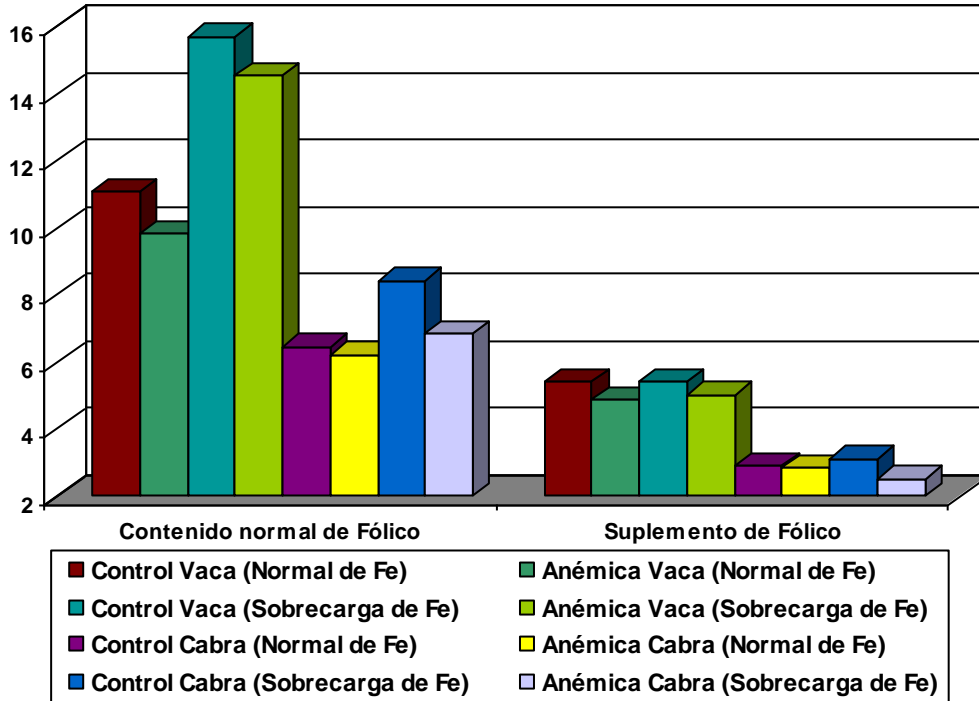
**Figura 16A.** Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (nmol/mg proteína) en fracciones citosólicas de hígado de ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche de cabra o vaca, con contenido normal o sobrecarga de Fe y contenido normal o suplemento de ácido fólico (n=10 por grupo).



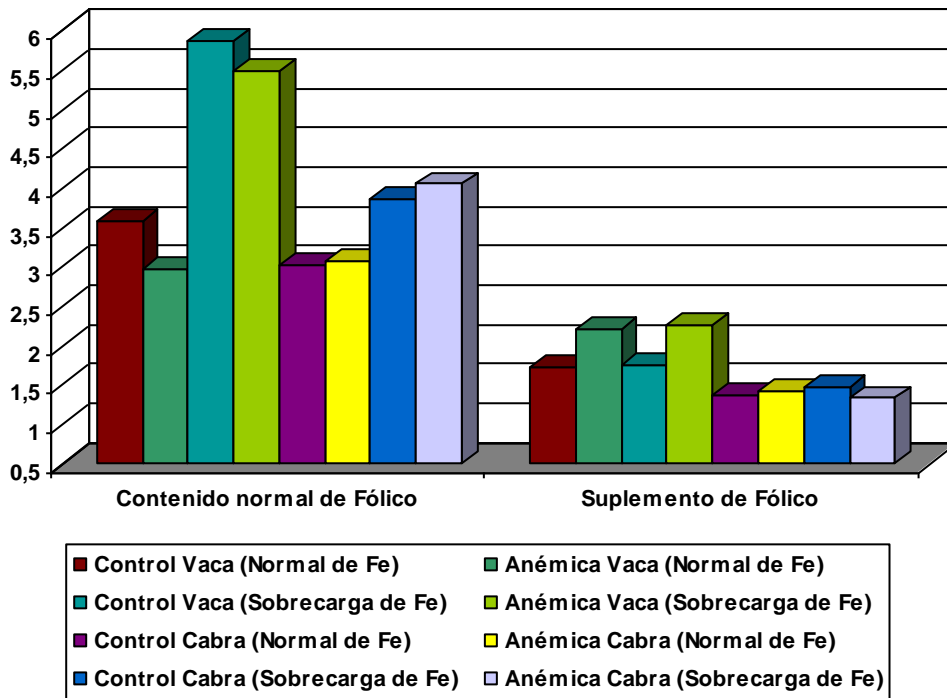
**Figura 16B.** Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (nmol/mg proteína) en fracciones citosólicas de cerebro de ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche de cabra o vaca, con contenido normal o sobrecarga de Fe y contenido normal o suplemento de ácido fólico (n=10 por grupo).



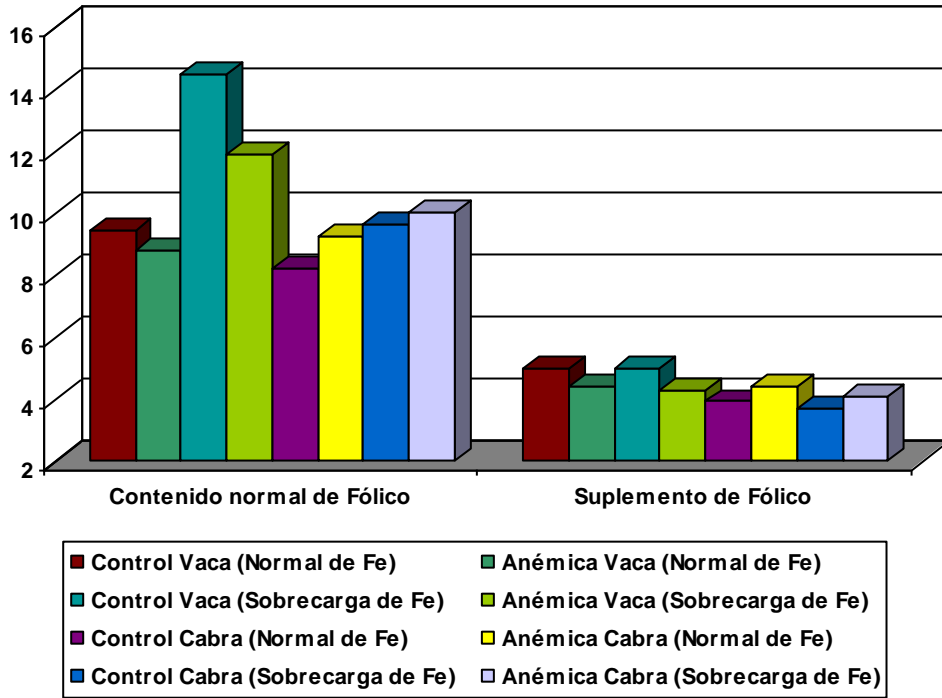
**Figura 16C.** Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (nmol/mg proteína) en fracciones citosólicas de mucosa duodenal de ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche de cabra o vaca, con contenido normal o sobrecarga de Fe y contenido normal o suplemento de ácido fólico (n=10 por grupo).



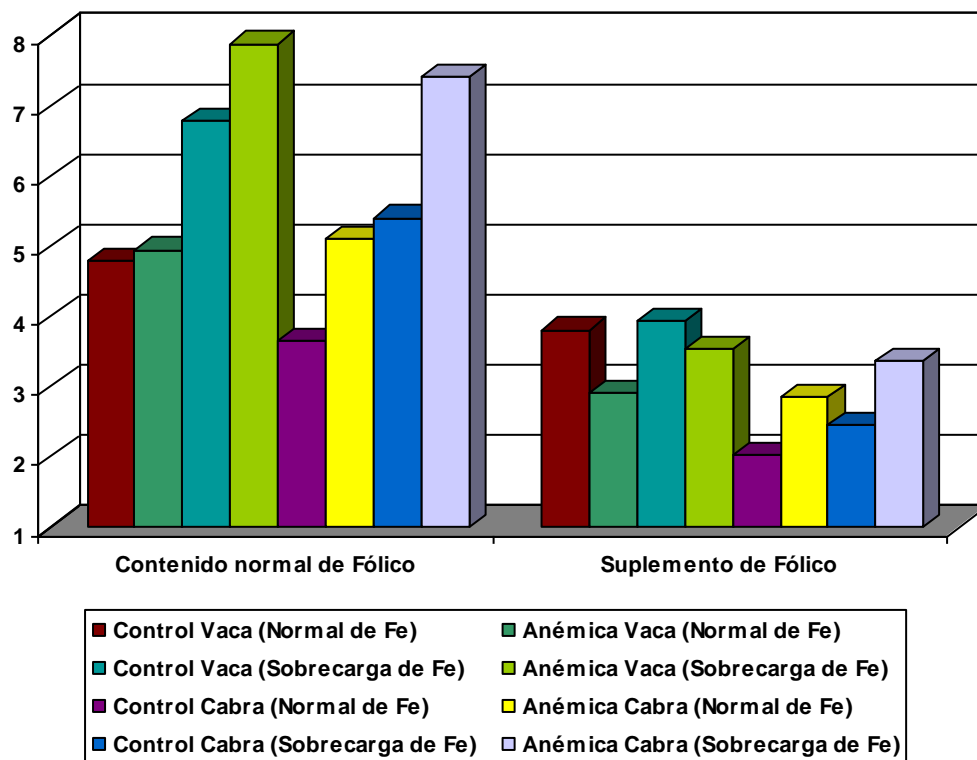
**Figura 16D.** Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (nmol/mg proteína) en fracciones citosólicas de plasma de ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche de cabra o vaca, con contenido normal o sobrecarga de Fe y contenido normal o suplemento de ácido fólico (n=10 por grupo).



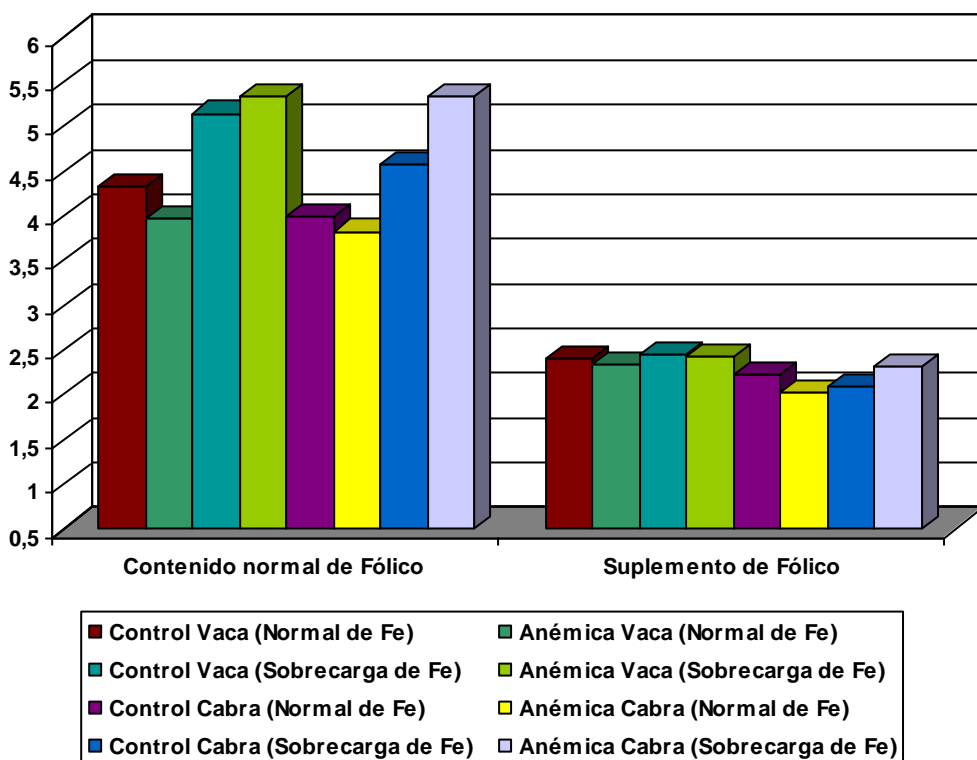
**Figura 16E.** Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (nmol/mg proteína) en fracciones citosólicas de eritrocito de ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche de cabra o vaca, con contenido normal o sobrecarga de Fe y contenido normal o suplemento de ácido fólico (n=10 por grupo).



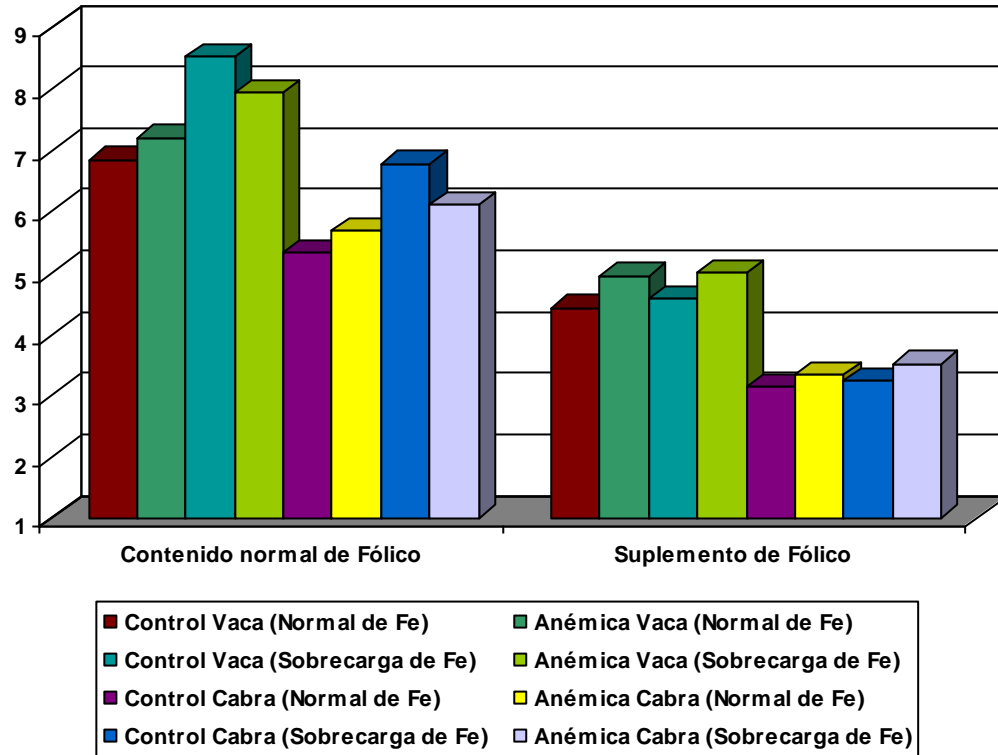
**Figura 17A.** Grupos carbonilo en proteínas (nmol/mg proteína) en fracciones citosólicas de hígado de ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche de cabra o vaca, con contenido normal o sobrecarga de Fe y contenido normal o suplemento de ácido fólico (n=10 por grupo).



**Figura 17B.** Grupos carbonilo en proteínas (nmol/mg proteína) en fracciones citosólicas de cerebro de ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche de cabra o vaca, con contenido normal o sobrecarga de Fe y contenido normal o suplemento de ácido fólico (n=10 por grupo).



**Figura 17C.** Grupos carbonilo en proteínas (nmol/mg proteína) en fracciones citosólicas de mucosa duodenal de ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche de cabra o vaca, con contenido normal o sobrecarga de Fe y contenido normal o suplemento de ácido fólico (n=10 por grupo).



**Figura 17D.** Grupos carbonilo en proteínas (nmol/mg proteína) en fracciones citosólicas de plasma de ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche de cabra o vaca, con contenido normal o sobrecarga de Fe y contenido normal o suplemento de ácido fólico (n=10 por grupo).

