

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



**“BIODISPONIBILIDAD Y HOMEOSTASIS DE HIERRO DURANTE
LA RECUPERACIÓN DE LA ANEMIA FERROPÉNICA
NUTRICIONAL CON DIETAS BASADAS EN LECHE (CABRA O
VACA) FORTIFICADAS EN HIERRO Y ÁCIDO FÓLICO”**

TESIS DOCTORAL

JOSÉ ANTONIO SERRANO REINA
2015

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: José Antonio Serrano Reina
ISBN: 978-84-9125-901-5
URI: <http://hdl.handle.net/10481/43831>

D^a M^a José Muñoz Alférez. Profesora Titular de Fisiología de la Universidad de Granada.

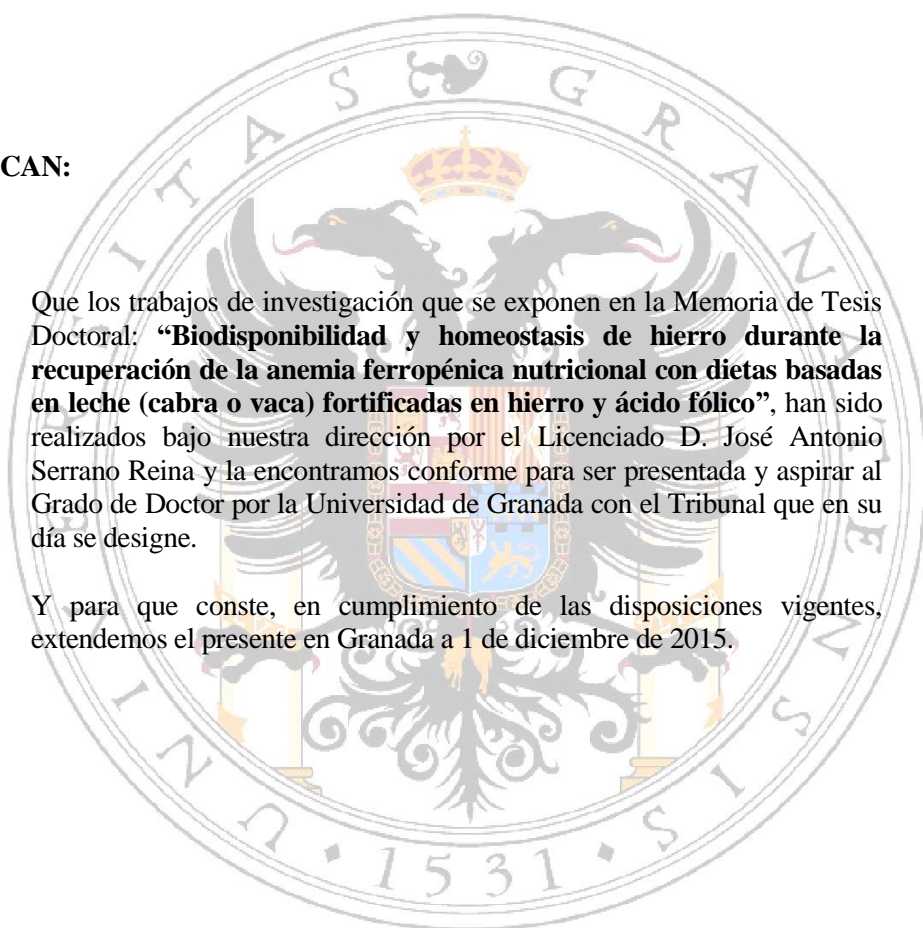
D^a M^a Inmaculada López Aliaga. Catedrática de Fisiología de la Universidad de Granada.

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

CERTIFICAN:

Que los trabajos de investigación que se exponen en la Memoria de Tesis Doctoral: **“Biodisponibilidad y homeostasis de hierro durante la recuperación de la anemia ferropénica nutricional con dietas basadas en leche (cabra o vaca) fortificadas en hierro y ácido fólico”**, han sido realizados bajo nuestra dirección por el Licenciado D. José Antonio Serrano Reina y la encontramos conforme para ser presentada y aspirar al Grado de Doctor por la Universidad de Granada con el Tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, extendemos el presente en Granada a 1 de diciembre de 2015.





**MEMORIA QUE PRESENTA EL LDO. D. JOSÉ ANTONIO SERRANO REINA PARA
ASPIRAR AL GRADO DE DOCTOR POR LA UNIVERSIDAD DE GRANADA**

ESTA TESIS DOCTORAL HA SIDO REALIZADA BAJO LA DIRECCIÓN DE:

Prof. Dra.
D^a M^a José Muñoz Alférez

Prof. Dra.
D^a M^a Inmaculada López Aliaga

Prof. Dr.
D. Javier Díaz Castro

Ldo.
D. José Antonio Serrano Reina

Agradecimientos



Quisiera transmitir mi agradecimiento a todos aquellos que, con su ilusión, cariño y esfuerzo han hecho posible la realización de esta Tesis, en especial:

A mi directora la profesora María José Muñoz Alférez por darme la oportunidad y el ánimo para embarcarme en esta aventura de mi Tesis Doctoral. Bajo su dirección ha sido todo más fácil y me ha dado a conocer el mundo de la investigación que no conocía hasta entonces. Muchas gracias por estar ahí siempre que lo he necesitado.

A mi directora la profesora M^a Inmaculada López Aliaga por haberme dado la oportunidad, igualmente, de poder realizar esta tesis, sin ese voto de confianza no hubiera sido posible. Además, siempre me decía “todo trabajo bien hecho necesita dedicarle su tiempo y siempre será valorado y reconocido”. Esto me ha servido para mejorar día a día e intentar hacer un trabajo digno.

A mi director el profesor Javier Díaz Castro por su inestimable ayuda en el laboratorio, su tiempo y su dedicación durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, gracias.

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

A la profesora María López-Jurado, anterior Directora del Departamento de Fisiología de la Universidad de Granada, por aceptarme en el Departamento.

Al profesor Jesús Rodríguez Huertas, Director del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INYTA) por poner a mi disposición las instalaciones de este Instituto.

A María Martín Facal por su incondicional apoyo, amistad y comprensión durante todo este periodo, mil gracias es poco.

A David Sánchez de Castro por su inestimable ayuda con la informática y el diseño gráfico, sin él no hubiera quedado tan bonito.

A Manuel Garrido Martínez por su ayuda con la Medicina y sus buenos consejos en cuanto a bibliografía médica, sin su aporte el enfoque médico no hubiera sido igual.

A Ángela Martín-Serrano Ortiz por su gran ayuda para guiarme en la búsqueda de las mejores bases de datos científicas, sin ella todo hubiera sido muchísimo más difícil y tedioso.

A Manuel Jesús Serrano Reina, mi hermano, por su ayuda con la impresión, la elección de colores y diseño, sin él no sé qué hubiera hecho, gracias.

A mi familia, por su apoyo, su cariño y su comprensión. De ahora en adelante se acabó eso de decir “no puedo, estoy muy liado con la tesis, lo siento”, intentaré compensar toda esa falta de tiempo.

A todos mis familiares y amigos por el apoyo y cariño que en los momentos más bajos me ayudaron a seguir adelante, gracias, gracias, gracias.

“Enseñar no es una función vital, porque no tiene el fin en sí misma; la función vital es aprender.”

“Los grandes conocimientos engendran las grandes dudas.”

“Las ciencias tienen las raíces amargas, pero muy dulces los frutos.”

Aristóteles (384 a. C – 348-7 a. C)

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

2,3-DHBA: *Dihydroxybenzoic acid*, ácido dihidroxibenzoico.

γ -GH: gamma-glutamil hidrolasa.

Abcb: *ATP-binding cassette, subfamily B*, proteína de unión al ATP, subfamilia B.

ADE: Índice de amplitud de distribución eritrocitaria.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ALA: *Aminolevulinic acid*, ácido aminolevulínico.

ALAS: *Aminolevulinic acid synthase*, ácido aminolevulínico sintasa.

ALK: *Activin receptor-like kinase*,

ALT: Alanina aminotransferasa.

AMP: Adenosina monofosfato.

Apo: Apoproteína.

APP: *Amyloid precursor protein*, proteína precursora amiloidea.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

AST: Aspartato aminotransferasa.

ATP: Adenosina trifosfato.

BFU-E: *Burst forming units-erythroid*, unidades formadoras de colonias eritroides.

BMP: *Bone morphogenetic protein*, proteína morfogénica ósea.

BMPR: *Bone morphogenetic protein Receptor*, receptor de la proteína morfogénica ósea.

BVR: *Biliverdin reductase*, biliverdina reductasa.

Dcytb: *Duodenal cytochrome B*, citocromo b duodenal.

DHF: Dihidrofolato.

DMT1: *Divalent metal transporter 1*, transportador de metales divalentes 1.

DNFH: 2,4-dinitrofenilhidrazina.

Dre2: *Fe-S cluster assembly protein*, proteína de ensamblaje de núcleos Fe-S.

CDA: Coeficiente de digestibilidad aparente.

C/EBP α : *CCAAT-enhancer-binding protein*, proteínas de unión al activador CCAAT

Cfd1: *Cytosolic Fe-S cluster-deficient protein 1*, proteína deficiente de núcleos Fe-S 1.

CFU-E: *Colony forming units-erythroid*, unidades eritroides formadoras de colonias.

CHOP: *CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein*,

CIA: *Cytosolic ISC assembly*, ensamblaje citosólico de ISCs.

CIC-5: *Chloride channel 5*, canal de cloro 5.

CK-MB: Creatina quinasa isoenzima MB.

CLA: *Conjugated linoleic acid*, ácido linoleico conjugado.

CP: *Ceruloplasmin*, ceruloplasmina.

CREBH: *cAMP-responsive element binding protein, hepatocyte specific*, proteína de unión al element de respuesta al AMPc, específica de hepatocito.

Cys282Tyr: mutación sin sentido del gen de la hemocromatosis tipo 1.

EDTA: *Ethylenediaminetetraacetic acid*, ácido etilendiaminotetraacético.

EPO: Eritropoyetina.

ERH: Eficacia de regeneración de la hemoglobina.

FLVCR: *Feline leukaemia virus, subgroup C, receptor*, receptor del virus de la leucemia felina.

FAO: *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

FPN: *Ferroportin*, ferroportina.

FR: *Folate receptor*, receptor de folato.

G6F-DH: Glucosa-6 fosfato deshidrogenasa.

GABA: Ácido gamma-aminobutírico.

GDF15: *Growth differentiation factor 15*, factor de crecimiento diferenciador 15.

GCPII: Glutamato carboxipeptidasa II.

Grx: *Monothiol Glutaredoxin*, glutaredoxina.

HAMP: *Hepcidin antimicrobial peptide*, gen que codifica la hepcidina.

Hb: Hemoglobina.

HCM: Hemoglobina corpuscular media.

HCP1: *Heme carrier protein 1*, proteína transportadora de grupos hemo.

HDL: *High density lipoprotein*, lipoproteína de alta densidad.

HEPH: *Hephaestin*, hephaestina.

HFE: *High Iron Fe*, usualmente conocido como gen o proteína de la hemocromatosis humana.

HFM: *Hereditary folate malabsorption*, malabsorción hereditaria de folato.

HIF: *Hypoxia inducible factor*, factor inducible por hipoxia.

HIF-PH: *HIF-1 α prolyl-hydroxylase*, HIF-1 α prolil-hidroxilasa.

HJV: *Hemojuvelin*, hemojuvelina.

HK: Hexoquinasa.

HO-1: *Heme oxygenase 1*, hemo-oxigenasa.

Hp: *Haptoglobin*, haptoblogina.

Hpx: *Hemopexin*, hemopexina.

IFN- γ : Interferón gamma.

IGP: Glucosilfosfatidilinositol.

IL: *Interleukina*, interleucina.

IOP1: *Iron-only hydrogenase-like protein 1*, proteína hidrogenasa de hierro 1.

IRE: *Iron responsive element*, elementos de respuesta al hierro.

IRP: *Iron responsive protein*, proteínas de respuesta al hierro.

ISC: *Iron-sulfur clusters*, núcleos de Fe-S.

ISCA o Isa: *Iron-sulfur cluster assembly protein*, proteína ensambladora de núcleos Fe-S.

ISCS o Nfs1: *Nitrogen fixation homologue*, enzima con función desulfurasa de cisteína.

ISCU o Isu: *Iron-sulfur cluster assembly enzyme*, enzima ensambladora de núcleos Fe-S.

ISD11: *Iron-sulfur protein biogenesis, Desulfurase-interacting protein 11*, proteínas que intervienen en la biogénesis de proteínas con núcleos Fe-S.

JAK-STAT: *Janus kinase – signal transducer and activator of transcription*, vía de transducción de señales a través de las Janus-quinasas-transductores de la señal y activadores de la transcripción.

LCR: Líquido cefalorraquídeo.

Lcn2: *Lipocalin 2*, lipocalina 2.

LDH: Lactato deshidrogenasa.

LIP: *pool* de hierro lábil.

miR-122: *microRNA-122, liver specific*, microARN-122 específico de hígado.

MRP: *Multidrug resistance-associated protein*, proteínas asociadas a resistencia a múltiples fármacos.

NAALADasa: *N-acetylated α -linked acidic dipeptidase*, dipeptidasa ácida N-acetil α .

Nbp35: *Nucleotide-binding protein 35*, proteína de unión a nucleótidos 35.

NAD: Nicotinamida adenina dinucleótido.

NADP: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

Nramp: *Natural resistance-associated macrophage protein*, proteína de resistencia natural de macrófagos.

NTBI: *Non-transferrin-bound serum Iron*, hierro no unido a transferrina.

OMS/WHO: Organización Mundial de la Salud / *World Health Organization*.

PCBP1: *Poly(rC)-binding protein 1*, proteína de unión al poly-rC (poli-ribonucleótido de citosina) 1.

PCFT: *Proton coupled folate transporter*, transportador de folato portón-dependiente.

PE: Periodo experimental.

PHD: *Prolyl hydroxylase domain-containing protein*, proteína prolil-hidroxilasa.

PPE: Periodo pre-experimental.

PSMA: *Prostate-specific membrane antigen*, antígeno prostático de membrana.

RFC1: *Reduced folate carrier 1*, transportador de folato reducido.

RIPA: Radioinmunoprecipitación.

SDS: Dodecilsulfato sódico.

SAM: *S-Adenosyl methionine*, S-adenosil metionina.

Scara5: *Sacavenger receptor class A, member 5*, receptor para ferritina en riñón.

SLC: *Solute carrier family*, transportador de solutos.

SLC39A: *Solute carrier family 39 member A*, conocido también como Zin14, transportador de zinc.

SMAD: *Proteins involved in cell signaling*, proteínas implicadas en la señalización celular.

Steap: *Six-transmembrane epithelial antigen of prostate*, antígeno epitelial transmembrana prostático.

sTfR: *Soluble transferrin receptor*, receptor soluble de la transferrina.

TAG: Triacilglicérido.

Tah18: *NADPH-dependent diflavin oxidoreductase 1*, diflavin oxidoreductasa dependiente de NADPH 1.

Tf: *Transferrin*, transferrina.

TfR: *Transferrin receptor*, receptor de la transferrina.

TGF: *Transforming growth factor*, factor de crecimiento transformante.

THF: Tetrahidrofolato.

TIM-2: *T-cell immunoglobulin-domain and mucin-domain 2*, proteína transmembrana

que funciona como receptor de ferritina en roedores.

TMB: 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina.

TMPRSS6 o MT2: *Transmembrane protease, serine 6*, matriptasa-2.

TIBC o CTFH: *Total iron-binding capacity*, capacidad total de fijación de hierro.

TWSG1: *Twisted gastrulation protein homolog 1*, proteína homóloga de gastrulación 1.

UIBC: *Unsaturated iron-binding capacity*, capacidad de transporte de la transferrina insaturada.

VCM: Volumen corpuscular medio.

VHL: Síndrome de von Hippel Lindau.

Índice



1. OBJETO.....	1
2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	3
2.1. EL HIERRO EN LA NUTRICIÓN	3
2.1.1. Introducción	3
2.1.2. Fuentes alimentarias de hierro y biodisponibilidad.....	3
2.1.2. Funciones del hierro.....	6
2.1.4. Metabolismo del hierro	13
2.1.4.1. Requerimientos	13
2.1.4.2. Absorción.....	16
2.1.4.3. Distribución y captación celular	24
2.1.4.4. Metabolización.....	29
2.1.4.5. Depósitos de hierro en el organismo.....	33
2.1.4.6. Eliminación	36
2.1.4.7. Regulación homeostática del balance de hierro.....	37
2.1.4.7.1. Papel de la hepcidina en la regulación sistémica de hierro.....	37
2.1.5. Deficiencia de hierro.....	45
2.1.5.1. Causas de la anemia ferropénica.....	46
2.1.5.2. Consecuencias de la ferropénica.....	49
2.1.5.3. Tratamiento de la anemia ferropénica.....	52
2.1.6. Sobrecarga de hierro	57
2.2. IMPORTANCIA NUTRICIONAL DE LOS FOLATOS	61
2.2.1. Introducción	61
2.2.2. Estructura química y nomenclatura.....	63
2.2.3. Los folatos en la salud humana	64
2.2.4. Metabolismo.....	66
2.2.4.1. Absorción.....	66
2.2.4.2. Transporte	72
2.2.4.3. Excreción	74
2.3. LECHE DE CABRA.....	74
2.3.1. Introducción	74
2.3.2. Características organolépticas.....	75
2.3.3. Características nutricionales de la leche de cabra	77
2.3.3.1. Proteína de la leche de cabra.....	79
2.3.3.2. Carbohidratos de la leche de cabra	84
2.3.3.3. Composición lipídica de la leche de cabra.....	85
2.3.3.4. Composición mineral de la leche de cabra.....	89
2.3.3.5. Composición vitamínica de la leche de cabra.....	91
2.3.3.6. Otros componentes minoritarios de la leche de cabra.....	91
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	97
3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	97

3.2. DIETAS ENSAYADAS.....	100
3.3. TÉCNICAS ANALÍTICAS.....	102
3.3.1. Materia seca	102
3.3.2. Materia grasa.....	102
3.3.3. Contenido proteico.....	102
3.3.4. Mineralización por vía húmeda.....	102
3.3.4.1. Determinación de hierro.....	103
3.3.5. Hemoglobina, recuento de hematíes, volumen corpuscular medio, hematocrito, y plaquetas.....	103
3.3.6. Hierro sérico, TIBC (Capacidad total de unión al hierro), porcentaje de saturación de la transferrina	104
3.3.7. Ferritina sérica.....	104
3.3.8. Hpcidina sérica.....	104
3.3.9. DMT1 hepático	105
3.3.10. Transaminasas: ALT y AST.....	106
3.3.11. Creatinina y creatina quinasa MB	107
3.4. ÍNDICES BIOLÓGICOS.....	108
3.5. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	109
4. TABLAS Y FIGURAS	113
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	131
5.1. PERIODO PREEXPORIMENTAL.....	131
5.1.1. Parámetros hematológicos	131
5.1.2. Parámetros bioquímicos	132
5.1.3. Relación hepatosomática y contenido de hierro en hígado	133
5.1. PERIODO EXPERIMENTAL.....	134
5.2.1. Parámetros hematológicos	134
5.2.2. Parámetros bioquímicos	135
5.2.3. Relación hepatosomática y contenido de hierro en hígado	136
5.2.4. Expresión proteica hepática del transportador de metales divalentes (DMT1).....	137
5.2.5. Utilización nutritiva de hierro	139
5.2.6. Eficacia de regeneración de la hemoglobina (ERH)	140
6. RESUMEN Y CONCLUSIONES.....	145
7. BIBLIOGRAFÍA.....	151

Objeto



1. OBJETO

El hierro es el cuarto elemento más abundante de la corteza terrestre y en el ser humano forma parte de los minerales traza esenciales. A pesar de encontrarse en cantidades mínimas en el organismo, el hierro inorgánico y unido a proteínas es esencial en numerosos procesos biológicos indispensables para la vida, tales como el transporte y almacenamiento de oxígeno, fosforilación oxidativa, metabolismo de neurotransmisores, defensa inmunitaria y síntesis de ADN y ARN.

La deficiencia de hierro es la carencia nutricional más común y extendida en el mundo, y la principal causa de anemia, constituyendo uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial, que afecta no sólo a países con menos recursos, sino también a los países más industrializados. La Organización Mundial de la Salud (OMS/WHO) cifra el número de personas afectadas en más de 2000 millones (30% de la población mundial). Existen numerosos factores que regulan la homeostasis de hierro, incluyendo numerosas proteínas reguladoras que constituyen un campo de investigación emergente dada la alta prevalencia de esta enfermedad. Tras el descubrimiento de la hormona peptídica hepcidina, a finales de los años 90, se comenzó a dilucidar algunas de sus funciones y su gran importancia en el metabolismo del hierro, homeostasis y efectos en situación de anemia.

Por otra parte, la leche es uno de los alimentos más completos y nutritivos y una de las fuentes nutricionales más importante de proteínas y micronutrientes (especialmente calcio y fósforo). De los tipos de leche para consumo humano, la leche de cabra, alimento con excelentes características nutricionales y alto valor biológico, tiene un papel crucial para la economía y para la industria láctea de nuestro país. Aunque durante mucho tiempo se ha marginado este tipo de leche, en la actualidad está cobrando cada vez más relevancia siendo la base de numerosos productos lácteos, incluso ha sido utilizada para la elaboración de los productos denominados gourmet y en alimentos nutracéticos.

En este sentido, el Grupo de Investigación “Alimentación, Nutrición y Absorción” (AGR-206) ha demostrado que la leche de cabra mejora la utilización nutritiva de proteína, grasa y minerales en situación de ferropdeficiencia, sin embargo, la leche de cabra es deficitaria en ácido fólico, una vitamina hidrosoluble esencial en la división y maduración celular, con carácter antioxidante de gran importancia, de manera que su deficiencia, favorece el desarrollo de anemia megaloblástica, y la aparición de deficiencias neurológicas severas, enfermedades cardiovasculares o distintos tipos de cáncer.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, esta investigación se centra en estudiar en un modelo animal en período de crecimiento, la biodisponibilidad de hierro y eficacia de regeneración de la hemoglobina durante el tratamiento crónico con hierro en la recuperación de la anemia ferropénica nutricional con dietas elaboradas a base de leche de cabra o vaca suplementadas en hierro y ácido fólico, profundizando especialmente en los mecanismos de transporte de hierro entre compartimentos y el papel del hígado como órgano de depósito que se encuentra profundamente deplecionado en el transcurso de la ferropénica inducida experimentalmente.

Antecedentes Bibliográficos



2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2.1. EL HIERRO EN LA NUTRICIÓN

2.1.1. Introducción

El hierro es una elemento traza esencial para el ser humano. A pesar de encontrarse en cantidades mínimas en el organismo, participa en numerosos procesos biológicos indispensables para la vida, como el transporte y almacenamiento del oxígeno, la fosforilación oxidativa, el metabolismo de neurotransmisores y la síntesis de ADN y ARN.

El hierro es el cuarto elemento y el segundo metal más abundante en la corteza terrestre. Este elemento presenta tres estados de oxidación: Fe^0 (hierro metálico), Fe^{+2} (ferroso) y Fe^{3+} (férico). Pertenece a los elementos de transición, ya que tiene la capacidad de aceptar y donar electrones fácilmente, intercambiando de la forma férrica y ferrosa. Estos estados redox le permiten ser cofactor de enzimas, pero también le proporcionan características tóxicas cuando se encuentra en exceso. El hierro libre puede generar radicales libres a través de la reacción de Fenton, que dañan los componentes biológicos esenciales, como lípidos, proteínas y ADN (Asien y col., 2001).

2.1.2. Fuentes alimentarias de hierro y biodisponibilidad

La cantidad de hierro contenida en un alimento no puede separarse de su biodisponibilidad, en concreto, de la capacidad mayor o menor de ser absorbida. Debemos recordar que el hierro de los alimentos de origen animal se absorbe mejor que el de los de origen vegetal.

Las principales fuentes de hierro de origen animal son las carnes, en especial el hígado (de cerdo, cordero, pollo y, algo menos, ternera); entre los productos cárnicos elaborados que destacan por su gran contenido en hierro es la morcilla. Cuando comparamos el contenido de hierro entre los mariscos destacan los berberechos y las almejas. Los huevos tienen algo menos. El pescado no es muy rico en hierro, está alrededor del 0,5 al 1 mg de hierro por 100 gr de porción comestible. En cuanto a la leche y sus derivados son muy pobres en hierro. La leche materna contiene algo más de hierro que la de vaca, y la leche de cabra algo más que la de vaca (Farran y col., 2004).

Entre las fuentes de origen vegetal, destacan las legumbres y los frutos secos oleaginosos en porcentajes elevados de hierro, incluso mayores que los de las carnes (pero su absorción es menor). De las legumbres destacan la soja, la lenteja y el garbanzo. En cuanto a los frutos secos mencionar el pistacho y las pipas de girasol. Condimentos con una importante composición de hierro, sobresalen, el pimentón, la pimienta y el perejil (Farran y col., 2004).

La biodisponibilidad de un nutriente o componente de un alimento se entiende como la proporción del mismo que es digerida, absorbida y finalmente se utiliza para funciones metabólicas normales. Es importante tener en cuenta que dicho nutriente debe ser también disponible para ser transportado a los lugares de acción o a sus reservorios corporales según el metabolismo normal del mismo (Toxqui y col., 2010).

Dado que el proceso digestivo constituye el principal regulador fisiológico del hierro corporal y que una vez absorbido los mecanismos para excretarlo son ineficaces, los componentes de los alimentos que afectan su solubilidad y transporte intestinal, modificarán su biodisponibilidad. El conocimiento de dichos factores, estimuladores o inhibidores, puede ser muy útil para los pacientes que sufren trastornos del metabolismo del hierro, bien por deficiencia o por sobrecarga (Toxqui y col., 2010).

Potenciadores de la absorción de hierro

- El medio ácido en el intestino favorece la absorción de los minerales en general, debido a que a pH bajo se mantienen en solución. Así, el hierro en la forma Fe^{2+} , al ser más soluble, es más disponible que en la forma oxidada Fe^{3+} .
- Los alimentos de origen animal (carne, pescado, pollo,...) contienen el denominado “factor carne” que incrementa la absorción de hierro. Dicho factor parece estar constituido por una serie de péptidos que se liberan durante la digestión de estos alimentos proteicos. Dichos péptidos se combinan con el hierro formando complejos solubles y lo protegerían de otros componentes inhibitorios de la dieta permitiendo su absorción más eficazmente (Vaquero, 1998). Más recientemente se ha descrito que puede tratarse de fracciones de hidratos de carbono (glucosaminoglucanos) (Huh y col., 2004) o fosfolípidos (Armah y col., 2008), presentes de forma natural en estos alimentos.
- Se ha documentado muy bien el papel estimulante de la absorción de hierro que ejerce la vitamina C o ácido ascórbico (Vidal y Farré, 2001; Van Dokkum, 2003). Este nutriente actúa de varias maneras: reduce el hierro a la forma Fe^{2+} , más soluble; y forma en el medio ácido del estómago un complejo ascorbato férrico muy estable, que permanece soluble al pH más alto del duodeno. Constituye por tanto el mejor

potenciador de la biodisponibilidad del hierro no hemo que se conoce. Para que esta activación de la absorción sea efectiva, deben ingerirse en la misma comida los alimentos ricos en hierro y los que aportan vitamina C (por ejemplo, legumbres y naranja), requisito de simultaneidad que a menudo se ignora. Así, es habitual que aunque las personas con deficiencia de hierro conozcan que los cítricos aumentan la absorción de hierro, suelen tomarlos en ayunas o separados de las comidas principales que generalmente son las que aportan una proporción mayor del hierro de la dieta (Toxqui y col., 2010).

- Respecto a la grasa, los ácidos grasos saturados y el aceite de oliva, también favorecen la absorción de hierro, mientras que la grasa más insaturada, particularmente el ácido linoleico y los omega-3 (eicosapentaenoico y docosahexaenoico), en exceso, pueden reducir la biodisponibilidad de este (Pérez-Granados y col., 2003).
- La vitamina A: es habitual que las deficiencias de hierro y vitamina A coexistan en los países en vías de desarrollo, Gargari y col. (2006) han demostrado que un incremento en la ingesta de vitamina A puede ser considerado como un método eficaz para incrementar la biodisponibilidad de hierro, y así combatir de manera simultánea el déficit de hierro y vitamina A. La vitamina A interviene en la diferenciación celular y por ello favorece la movilización de las reservas de hierro para su uso en la hematopoyesis (Gaitán y col., 2006).
- Otros ácidos orgánicos: ácidos orgánicos como los ácidos cítrico, málico, tartárico y láctico también potencian la absorción de hierro no hemo (Gillooly col., 1983, Ballot y col., 1987).

Inhibidores de la absorción de hierro

- Tradicionalmente se ha considerado que la fibra dietética es un inhibidor de la absorción de minerales. Sin embargo, junto con la fibra dietética se consumen una serie de componentes, como polifenoles y fitatos, cuya acción sobre la absorción del hierro es mucho más importante que la de la fibra en sí misma. Por otro lado, muchos alimentos que aportan una cantidad apreciable de minerales son a su vez ricos en fibra y otros compuestos, con lo que la biodisponibilidad del hierro de estos alimentos puede estar disminuida, pero en valor absoluto la cantidad absorbida puede ser suficiente. El ácido fítico (inositol hexafosfato) es un potente inhibidor de la absorción del hierro no-hemo. No obstante, por determinados tratamientos culinarios o industriales (fermentación, germinación), este ácido pierde grupos fosfatos reduciéndose en consecuencia su capacidad de secuestrar hierro. Respecto a los polifenoles (ácidos fenólicos, flavonoides, polifenoles condensados), aun siendo

solubles, como en el caso de los del té, pueden tener la capacidad de secuestrar fuertemente el hierro impidiendo su absorción (Van Dokkum, 2003).

Es importante resaltar que el consumo de bebidas antioxidantes ricas en polifenoles, goza de gran popularidad, y las personas con predisposición a anemia ferropénica, desconocen la importancia de separar su consumo de las comidas principales.

Así mismo, se han descrito las capacidades de diferentes fuentes de fibra dietética para quelar varios metales, entre ellos, el hierro (Toxqui y col., 2010). Sin embargo en un estudio realizado por Vaquero y cols. (2000), se observó que la influencia del consumo de una fibra insoluble hipocolesterolemianta rica en taninos condensados procedente de algarroba, como única fibra dietética o en combinación con celulosa o con pectina, no modificaba la biodisponibilidad de hierro.

Sin embargo, la fibra presente en algunas algas parece inhibir la absorción de hierro. Bocanegra y col. (2003) estudiaron la biodisponibilidad de hierro en dietas que contenían algas con poder hipocolesterolemianta (Bocanegra y col., 2008, 2009). Se observó que la absorción aparente de hierro disminuía por la presencia del alga *Nori*, pero no por la del alga *Konbu*, en la dieta (Bocanegra y col., 2008).

- Otros minerales (Ca, Zn, Cu, Cd, etc.) interaccionan con el hierro en el tracto gastrointestinal. Así, ingestas excesivas de calcio y zinc pueden reducir la biodisponibilidad del hierro, interaccionando en la propia mucosa. Además, el calcio, es el único componente de los alimentos que en condiciones particulares puede inhibir el hierro tipo hemo ingerido (Van Dokkum y col., 2003). No obstante, la repercusión del consumo de calcio está disminuida cuando se produce un consumo de leche de cabra con respecto a la de vaca (López Aliaga y col., 2000).

2.1.2. Funciones del hierro

Salvo ciertas excepciones, casi todas las células requieren del hierro como cofactor fundamental en actividades bioquímicas, como puede ser transporte de oxígeno, metabolismo energético y síntesis de ADN. Esto es debido a la flexibilidad de coordinación química y la gran reactividad redox del hierro, que permite asociarse con proteínas y unirse al oxígeno, transferir electrones o mediar reacciones catalíticas (Asien y col., 2001). Sin embargo, es también potencialmente tóxico, porque, en condiciones aeróbicas, favorece la catalización de las especies reactivas de oxígeno y la formación de radicales libres muy reactivos (como el

hidroxilo) a través de la reacción de Fenton (Koppenol, 1993). Como el hierro puede pasar fácilmente entre su forma reducida ferrosa (Fe^{2+}) y su forma oxidada férrica (Fe^{3+}), se requiere de cantidades mínimas catalíticas para que se produzca un cambio en el equilibrio redox. El estrés oxidativo está asociado con el daño de macromoléculas celulares, lesión de tejidos y enfermedades (Galaris y Pantopoulos, 2008; Kell, 2009). Por lo tanto la adquisición, uso y detoxificación de hierro plantea un reto considerable para las células y organismos, que han desarrollado mecanismos sofisticados para satisfacer sus necesidades metabólicas y conjuntamente reducir al mínimo el riesgo de toxicidad (Andrews, 2008; De Domenico y col., 2008).

De este modo, podemos destacar las siguientes funciones del hierro:

- Transporte y almacenamiento de oxígeno: el hierro es un constituyente de la molécula de hemoglobina, que se encuentra en los hematíes y contiene más del 65% del hierro total del organismo. Esta proteína es un tetrámero formado por 4 cadenas de globina, cada una de ellas con un grupo hemo que contiene un átomo de hierro capaz de unirse al oxígeno reversiblemente en los capilares pulmonares formando oxihemoglobina, la cual, discurre por el torrente sanguíneo para llegar a los tejidos, donde el oxígeno es liberado para intervenir en los procesos oxidativos. Parte del CO_2 que se forma entonces es transportado por la misma hemoglobina que se libera de ella en los pulmones para iniciar nuevamente el ciclo (Schechter, 2008). Es de vital importancia el metabolismo de hierro en el músculo, ya que representa el 40% de la masa del cuerpo humano y contiene del 10 al 15% del hierro del cuerpo, principalmente en la mioglobina, una hemoproteína encargada del transporte y almacenamiento de oxígeno desde los capilares hasta las mitocondrias, para ser utilizado durante el proceso de contracción muscular (Ordway y Garry, 2004).
- Eritropoyesis: la eritropoyetina (EPO) y el hierro son vitales para la eritropoyesis, pues están involucrados en diferentes etapas del proceso diferenciación y maduración de las células madre pluripotenciales a eritrocitos (Figura nº 1). La EPO es crucial a lo largo de aproximadamente 10-13 días cuando los progenitores eritroides BFU-E (*burst forming units-erythroid*) se transforman en unidades eritroides formadoras de colonias (CFU-E, *Colony Forming Unit-Erythroid*) que se diferencian a proeritroblastos, porque, en su ausencia, tiene lugar la apoptosis en las fases CFU-E y BFU-E (Papayannopoulou y col., 2005). Durante este largo período de la eritropoyesis, una pequeña cantidad de hierro es incorporada en la hemoglobina dentro de la

célula. En cambio, la incorporación de hierro en la síntesis de hemoglobina es más evidente durante el segundo, posterior y más corto (3-4 días), estadio en el que los eritroblastos se desarrollan a reticulocitos. En esta etapa, la falta de hierro puede dañar la completa hemoglobinización de los hematíes, dando lugar a una verdadera y grave deficiencia funcional de hierro (Besarab y col., 2009).

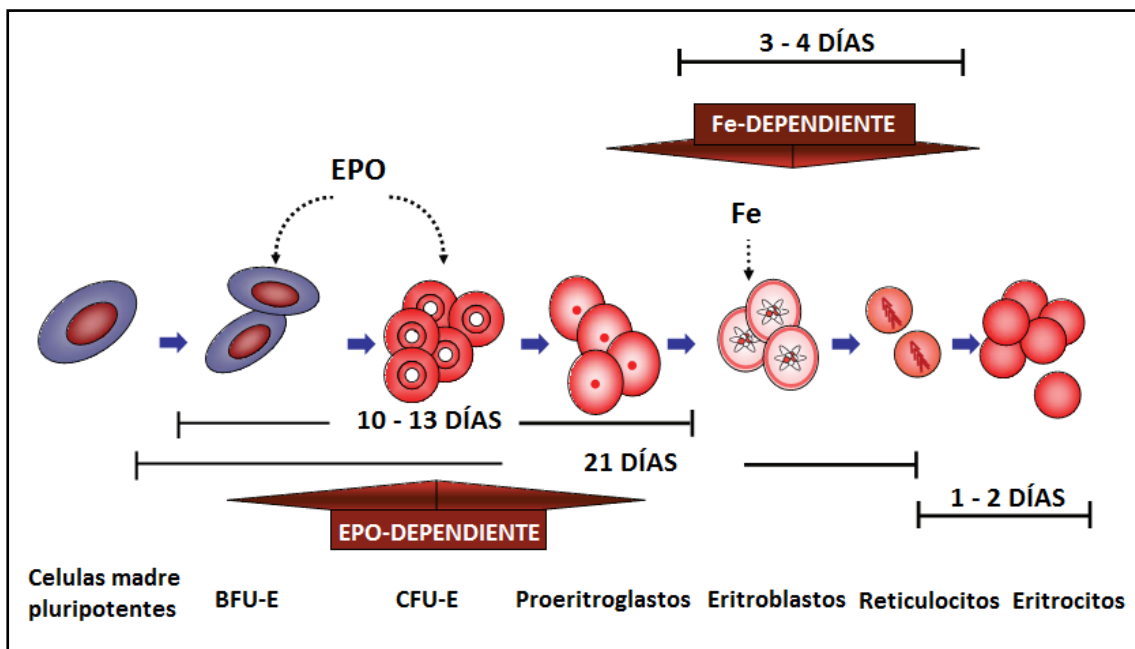


Figura nº 1: Importancia de la EPO y el Fe en la eritropoyesis (modificado de Besarab y col., 2009).

- Sensibilización al oxígeno: el factor inducible por hipoxia (HIF, *hipoxia inducible factor*) es un factor de transcripción que regula la respuesta celular a la hipoxia y actúa como regulador de la homeostasis del oxígeno (Semenza, 2000; Kaelin, 2002; Semenza, 2003). HIF activa genes que codifican las proteínas que aumentan la disponibilidad del oxígeno y permiten la adaptación metabólica en ausencia del mismo, controlando la expresión de decenas de productos de los genes y proteínas implicados en la angiogénesis, la eritropoyesis, la glucólisis, la apoptosis, el tono vascular, la regulación del pH y la homeostasis epitelial. En presencia de oxígeno, tiene lugar la hidroxilación del residuo de prolina HIF-1 α P564 por una enzima denominada HIF-1 α prolil-hidroxilasa (HIF-PH), necesitando de hierro y oxígeno, este proceso transformará el HIF-1 α en un objetivo para la degradación (Jaakkola y col., 2001; Masson y col., 2001; Yu y col., 2001; Min y col., 2002). En condiciones de hipoxia, el oxígeno molecular no está disponible y de esta forma las enzimas están inactivas, lo que implica un

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

- Transporte de electrones, metabolismo energético y detoxificación del organismo: el hierro participa en los procesos redox que se dan en las reacciones de transferencia de electrones en la cadena respiratoria, facilitando la fosforilación oxidativa que permite fosforilar el ADP para obtener ATP. El hierro se encuentra formando parte de la estructura de los citocromos, que están compuestos por proteínas estructurales y del grupo hemo, en proteínas ferro-sulfuradas, en las cuales el hierro está unido a azufre inorgánico o de la cisteína, y en las proteínas de Rieske, que tienen centros de Fe-S que están unidos a histidina en lugar de cisteína. La función de los citocromos es transportar electrones, como por ejemplo, en la mitocondria donde intervienen en la producción oxidativa de energía (Nelson y Cox, 2008).

El citocromo P-450, sin embargo, se encuentra en el retículo endoplasmático y no en la mitocondria. También contiene un grupo hemo en su estructura. Entre otras funciones, el citocromo P-450, en la corteza suprarrenal, participa en la hidroxilación de esteroides, detoxificación mediante hidroxilación de distintos fármacos (barbitúricos, xenobióticos y, en general, de fármacos insolubles) y de carcinógenos ambientales (como los que se encuentran en el humo del tabaco) (Nelson y Cox, 2008).

- Antioxidante y funciones pro-oxidantes beneficiosas: Una de las consecuencias derivadas de la producción bioenergética mitocondrial es la generación de radicales libres del oxígeno, como los radicales de superóxido e hidroxilo y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂). El anión superóxido se genera directamente como consecuencia de las reacciones colaterales de la cadena de transporte electrónico con el oxígeno. Éstos pueden convertirse en H₂O₂ (en presencia de la superóxido dismutasa) que, a su vez, puede reaccionar para formar radicales de hidroxilo. Normalmente, estos subproductos tóxicos con un gran poder oxidante capaz de dañar la célula son neutralizados por enzimas antioxidantes, como la catalasa y peroxidasa (Marín-García y Goldenthal, 2002).

Las catalasas y las peroxidases son enzimas que contienen hierro en su forma hemo. Estas enzimas antioxidantes pueden catalizar la conversión de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. El peróxido de hidrógeno es un subproducto del metabolismo celular que tiene algunas funciones útiles incluyendo una respuesta inmunológica saludable. Debido a sus demostradas propiedades antioxidantes, la catalasa es muy beneficiosa para el organismo. Además de actuar como súper antioxidante, la catalasa también tiene la habilidad de usar el peróxido de hidrógeno para oxidar toxinas incluyendo el metanol, etanol, ácido fórmico, formaldehído, y nitrito. Esta doble actividad la convierte en una enzima celular crucial (Edward, 2011).

- Sistema inmunitario: Tanto el hierro como la hepcidina son esenciales en la respuesta inmunidad innata y adaptativa. Los niveles de hierro tienen un impacto no sólo en la inmunidad del huésped sino también en el patógeno. La hepcidina originalmente fue identificada como un péptido antimicrobiano y se ha visto que es esencial para la inmunidad innata. Estudios recientes han demostrado que la hepcidina es también importante para la respuesta inmunitaria adaptativa (Dao y Meydani, 2013).

El exceso o déficit de hierro afectan a la respuesta inmune. Tanto la deficiencia como la sobrecarga de hierro afectan a la función inmune. Oppenheimer y col. (2001) demostraron que la deficiencia de hierro afecta a la función de los neutrófilos, la linfoproliferación, la producción de citoquinas y a la actividad de las células NK (“*natural killer*”). Por otro lado, son numerosos los estudios que han arrojado luz sobre el efecto negativo de la sobrecarga de hierro por las suplementaciones, la enfermedad o la transfusión sanguínea en la vulnerabilidad a infecciones (Schaible, 2004; Doherty, 2007; Drakesmith y Prentice, 2008, Drakesmith y Prentice, 2012). La suplementación de hierro en regiones con malaria endémica puede aumentar el riesgo de infección, pero se han visto estudios que no son uniformes, en algunos estudios se aumenta el riesgo, en otros no y disminuye el riesgo con anemia (Prentice y col., 2007). Este es un tema muy controvertido ya que la severidad de las infecciones sugiere que depende de la salud del individuo después de la suplementación y el estado nutricional antes de la misma (Dao y Meydani, 2013).

El hierro y la hepcidina en la inmunidad innata. Como el hierro es necesario para casi todos los organismos vivos, una de las primeras líneas de defensa del cuerpo

humano como hospedador es privar a los patógenos invasores del hierro que necesitan. En respuesta a esta primera defensa, algunos patógenos han evolucionado para invadir las reservas del hierro del hospedador (Drakesmith y Prentice, 2012), como es el parásito de la malaria (*Plasmodium falciparum*). Otros microorganismos cuando invaden producen unos sideróforos que son capaces de captar el hierro libre y unido a transferrina (Ganz, 2008).

El sistema inmune del hospedador también ha evolucionado de forma diferente pero igualmente efectivo, que incluye el privar a los patógenos de hierro. Es el caso de la lipocalina-2, producida por los neutrófilos y células epiteliales que se une a los sideróforos inhibiendo su acción (Flo y col., 2004). La lactoferrina, que tiene alta afinidad por el hierro durante la infección. Además, la hepcidina tiene un papel central contra patógenos extracelulares. La hepcidina, a su vez, está regulada por la acción de citoquinas pro-inflamatorias IL-6 e IL-1 (interleucinas) (Peyssonnaud y col., 2006). La hepcidina durante la infección promueve la eliminación del hierro del medio a través de la captación celular por parte del hospedador. Theurl y col. (2009) demostraron que la hepcidina regula la expresión de ferroportina y los niveles celulares de hierro.

El hierro y la hepcidina en la inmunidad adaptativa. Un estatus óptimo de hierro es necesario para la inmunidad adaptativa. El hierro y la expresión del TfR (*Transferrin receptor*, receptor de la transferrina) son esenciales para la activación y proliferación de los linfocitos (Porto y De Sousa, 2007). Tanto la deficiencia de hierro como la sobrecarga están asociadas con la alteración de inmunidad celular (Joynson y col., 1972; Omara y Blakley., 1994). La deficiencia de hierro se ha demostrado que disminuye el recuento de linfocitos y su proliferación, así como la producción de interferón- γ (IFN- γ) e interleucina 2 (IL-2) (Dao y Meydani, 2013).

El papel de la hepcidina en la inmunidad adaptativa se ha definido más recientemente. Pinto y col. (2010) demostraron que la producción de hepcidina de los linfocitos incrementa cuando se produce la estimulación de los anticuerpos anti-linfocitos T (anti-CD3 y anti-CD28) y que la caída parcial de hepcidina altera la proliferación de linfocitos T. Este efecto se revierte por medio de la adición de péptidos sintéticos de hepcidina.

En conjunto, estos descubrimientos sugieren que la homeostasis del hierro y la respuesta inmune están estrechamente relacionadas. La interacción entre el estado del hierro y la respuesta inmune es compleja, esto implica que el estado

óptimo de los niveles de hierro puede depender de la naturaleza del patógeno. El hierro juega un importante papel tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa, pero aún quedan cuestiones que resolver, especialmente en el papel que juega la hepcidina en la inmunidad adaptativa (Dao y Meydani, 2013).

- Sistema nervioso y desarrollo cognitivo: el papel de hierro en la función del sistema nervioso es muy importante. El hierro parece intervenir en la síntesis, degradación y almacenamiento de neurotransmisores, serotonina, dopamina y ácido gamma-aminobutírico (GABA). La distribución del GABA y la dopamina coincide aproximadamente con la de este metal, y se ha sugerido que debe existir alguna participación del hierro en las funciones dopaminérgicas y gabaminérgicas (Toxqui y col., 2010).

El hierro es necesario como cofactor en los procesos metabólicos del sistema nervioso central incluyendo la fosforilación oxidativa, la producción de neurotransmisores, el metabolismo del óxido nítrico, y el transporte de oxígeno (Madsen y Gitlin, 2007). Durante los primeros años de vida, el contenido de hierro en el cuerpo aumenta considerablemente. En recién nacidos sanos, los requerimientos de hierro están suplidos por las reservas del niño. A partir del cuarto mes, las necesidades de hierro incrementan hasta 0.78 mg/día debido al agotamiento progresivo de las reservas internas y al rápido crecimiento con una expansión del volumen sanguíneo, se incrementan los tejidos y las reservas de hierro (Hermoso y col., 2011). Este rápido crecimiento con alta necesidad de hierro hace especialmente vulnerable a bebés y niños pequeños con alto riesgo de padecer anemia por deficiencia de hierro, especialmente de 6 a 24 meses (Leung y Chan, 2001). Los adolescentes representan otro grupo de riesgo de padecer anemia por falta de hierro debido al rápido crecimiento y con ello al aumento de la demanda de hierro durante la pubertad. La deficiencia de hierro y la anemia pueden causar un serio impacto en la salud de niños y adolescentes y su posterior desarrollo, como por ejemplo, efectos sobre la morbilidad, retraso en desarrollo mental y conductual, bajo rendimiento escolar y retraso en el crecimiento, así como efectos adversos en el desarrollo cognitivo que pueden no revertir una vez tratado el problema con hierro (Idjradinata y Pollitt, 1993; Bruner y col., 1996; Hermoso y col., 2011).

- Síntesis de ADN: la síntesis de *novo* de desoxi-ribonucleótidos, en todos los organismos, está catalizada por la enzima ribonucleótido reductasa, siendo

imprescindible y limitante en la síntesis de ADN. Estas enzimas tienen varias subunidades dentro de las cuales se encuentra un núcleo metálico formado por Fe-Fe y Fe-Mn. En estudios realizados (Gräslund y Sahlin, 1996; Tong y col., 1998; Saleh y col., 2004) se ha visto que estos núcleos de la ribonucleótido reductasa son fundamentales para su actividad redox (Leidel y col., 2012).

2.1.4. Metabolismo del hierro

2.1.4.1. Requerimientos

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

En mujeres embarazadas, se ha sugerido que los suplementos alimenticios de hierro podrían mejorar los niveles de hierro en el feto y recién nacidos, sin embargo, el transporte de hierro al feto es un proceso activo y este está protegido de la deficiencia de hierro, incluso cuando la madre tiene una leve o moderada anemia ferropénica. Según la ESPAGHAN (*European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition*) y CoN (*Committee on Nutrition*), según los últimos estudios realizados, no hay pruebas evidentes de que la suplementación con hierro mejore el estatus del hierro en recién nacidos (Domellöf y col., 2014).

Estudios realizados en la década de 1950 demostraron que el total de hierro al nacer es de aproximadamente de 75 mg/kg (Widdowson y col., 1988). En el recién nacido, la mayor parte del hierro corporal se encuentra en la hemoglobina, además, en niños sanos con un peso corporal normal también tienen algunas reservas que corresponden al 25% del total. Cuando se produce el nacimiento, el niño pasa de un ambiente relativamente hipóxico del útero a la atmósfera rica en oxígeno, se detiene la síntesis de hemoglobina y esta cae desde los 170 g/l hasta los 120 g/l durante las primeras semanas de vida (Domellöf y col., 2007). Debido al reciclaje del hierro de los eritrocitos senescentes, este hierro se transfiere a los depósitos. Durante los siguientes meses, como el niño sigue creciendo, el hierro de los depósitos pasa a la hemoglobina, con lo que un recién nacido normal es autosuficiente en lo que respecta al hierro hasta que el niño duplica su peso, que se produce en 4 a 6 meses de edad (Domellöf y col., 2007). Por lo tanto, la lactancia materna exclusiva durante ese período puede satisfacer las necesidades de lactantes a pesar de la baja concentración de hierro en la leche materna (0.3 mg/l).

Entre 6 y 24 meses de edad, el niño se vuelve dependiente del hierro de la dieta y, debido a su rápido crecimiento, las necesidades de hierro por kilogramo de peso son las más altas que en cualquier otro período de la vida, después de los dos años de vida las necesidades nutricionales de hierro se estabilizan ya que el crecimiento se produce de forma más lenta (Domellöf y col., 2014). Existe un método factorial propuesto primero por Dallman y col. (1980) y posteriormente por Oski (1993) con el cual podemos hacer un cálculo aproximado de las necesidades de hierro en niño. Según estos estudios y atendiendo a las recomendaciones de las autoridades, a continuación se desglosan las recomendaciones de la ingesta diaria de hierro.

Tabla n° 1: Ingesta recomendada de hierro para recién nacidos y niños (modificado de Domellöf y col., 2014).

Edad	Ingesta recomendada (mg/día)	Ingesta diaria recomendada (mg/Kg·día)
6 a 12 meses	7.8 – 11	0,9 – 1,3
1 a 3 años	5.8 – 9.0	0.5 – 0.8
4 a 8 años	6.1 – 10	0.3 – 0.5
9 a 13 años	8 – 11	0.2 – 0.3

Otro de los períodos críticos en el desarrollo del hombre y la mujer es la adolescencia, que se caracteriza por un acelerado crecimiento y desarrollo. Estos cambios requieren de una considerable entrada de energía y nutrientes y, por lo tanto, la dieta consumida debe cumplir estos requisitos. Durante este período, los adolescentes adquieren 15-25% de su tamaño adulto y 40-50% del peso adulto. Hay un aumento en la producción de hueso y músculo y, por consiguiente, en la expansión del volumen de sangre total, lo que implica una mayor necesidad de hierro (Beard, 2000; Mesias y col., 2013)

Durante la pubertad, los adolescentes ganan alrededor de 10 kg de peso corporal, lo que implica una mayor cantidad de hierro en el cuerpo. El hierro es necesario para satisfacer la creciente demanda de hemoglobina para la expansión del volumen sanguíneo, la mioglobina de la masa muscular y las enzimas necesarias para el crecimiento (Muñoz Hoyos y Carballo Molina, 2005). Durante este período de crecimiento se produce una movilización de las reservas de hierro, tal como se refleja en la disminución de la ferritina sérica. De este modo, se observa un patrón similar al observado en los lactantes (Lind y col., 2004).

El uso neto de hierro del aumento de la masa de hemoglobina depende de la tasa de aumento de volumen sanguíneo y la tasa de cambio en la concentración de hemoglobina. El volumen de sangre en chicos es de aproximadamente 75 ml/kg y en chicas de 66 ml/kg, con un

contenido medio de hierro de la hemoglobina de 3.39 mg/g. Durante el período de crecimiento acelerado, los requerimientos de hierro en la dieta en chicos son 2.9 mg/día, debido a la tasa de crecimiento más elevada que las niñas, que sólo necesitan 1.1 mg/día. Sin embargo, los requerimientos de hierro en chicas comienzan a aumentar después de la menarquia, una vez que se alcanza el pico máximo de crecimiento, y esta situación se mantiene hasta la menopausia. Se estima que se pierden 30-40 ml de sangre en cada menstruación, dando lugar a una pérdida de alrededor de 15-30 mg de hierro/ciclo. En consecuencia, las pérdidas de hierro menstruales implican una mayor demanda de hierro y las adolescentes necesitan alrededor de 455 mg de hierro/año después de la menarquia, mientras que los hombres necesitan 350 mg de hierro/año (Mesias y col., 2013).

La ingesta de hierro es necesaria para reemplazar las pérdidas basales derivadas principalmente de la descamación de las células epiteliales, el sudor y las pérdidas menstruales, pero también es necesario para satisfacer las demandas de crecimiento. La ingesta de hierro recomendada para los adolescentes se muestra en la siguiente tabla.

Tabla nº 2: Ingesta recomendada de hierro en adolescentes (mg/día) (modificado de Mesias y col., 2013).

España (Moreiras y col., 2013)			Europa (Scientific Committee for Food, 1993)			Estados Unidos (Institute of Medicine, 2001)		
Edad	Chico	Chica	Edad	Chico	Chica	Edad	Chico	Chica
10-12	12	18	11-14	10	18-22	9-13	8	8
13-15	15	18	15-17	13	17-21	14-18	11	15
16-19	15	18	18+	9	16-20	19+	8	18

Uno de los períodos más importantes en la vida de una mujer, en cuanto a cambios fisiológicos se refiere, es la gestación. En la mujer gestante se requiere un aporte extra de hierro para poder hacer frente a los cambios y requerimientos del embarazo.

El contenido en hierro del feto de 20 semanas es inferior a 30 mg, pero llega a 270 mg en el recién nacido a término. Por lo tanto, la velocidad de depósito del hierro tendría que ser diez veces más elevada (2 mg/día) durante la segunda mitad del embarazo que durante la primera para hacer frente a las necesidades fetales. Sin embargo, dichas necesidades representan sólo una fracción de la cantidad de hierro necesaria durante el embarazo. Se estima que la placenta contiene 30-175 mg (Potier De courcy, 1997), que el aumento de la masa globular de la madre requiere 200-600 mg y que las pérdidas sanguíneas maternas en el momento del parto representan 100-250 mg, lo que su necesidad total de hierro sería de 1000 mg. Pero si se considera que la reducción de la masa globular después del parto recicla hierro hacia las

reservas maternas, la necesidad total se reduce a 850 mg, la mayor parte en el curso del segundo y tercer trimestre. Por consiguiente, suponiendo que las reservas maternas sean constantes, la absorción de hierro debería aumentar de 0.8 mg/día durante las primeras semanas a 10-12 mg/día durante las últimas semanas de gestación. Bajo estas observaciones, cabría esperar que la mujer con una alimentación normal estaría expuesta a riesgo de deficiencia, sobre todo en el tercer trimestre, ya que la absorción media ronda 10-15% del hierro de la dieta. Pero en realidad, en el curso del embarazo se produce un aumento considerable de las capacidades de absorción intestinal del hierro, aumento que concierne tanto al hierro hemínico como al hierro mineral (Ayoubi y col., 2012).

Después de la menopausia los requerimientos nutricionales de la mujer se igualan a los hombres, como ocurre durante la etapa de niñez.

Tabla nº 3: Ingesta de hierro recomendada en mujer adulta y gestante (mg/día) (modificado de Sánchez-Muniz col., 2013).

España (Moreiras y col., 2013)			Estados Unidos (Institute of Medicine, 2001)		
Edad	Mujer	Gestante	Edad	Mujer	Gestante
–	18	18	–	18	27
20–39	18		19–30	18	
40–49	18		31–50	18	
50–59	10		50–70	8	
60+	10		70+	8	
Lactancia	18		Lactancia	27	

2.1.4.2. Absorción

La absorción del hierro depende de la cantidad de hierro en la dieta, su biodisponibilidad y las necesidades de este en el organismo. Una dieta occidental proporciona aproximadamente 15 mg diarios de hierro. De este hierro, la digestión en la luz intestinal libera cerca de la mitad de forma soluble, de la cual únicamente alrededor de 1 mg (5-10 % del hierro dietético) se transfiere a la sangre portal en un hombre adulto sano (Worwood, 2008).

Formas del hierro en el intestino

El hierro de la dieta se puede encontrar en muchas formas, pero normalmente se clasifica como hierro hemo y no hemo (Sharp, 2010). El hierro hemo se encuentra con abundancia en la carne como parte de las hemoproteínas, hemoglobina y mioglobina. El bajo pH del estómago, junto con las enzimas proteolíticas del estómago y el intestino delgado, ayudan a liberar el

hierro de las hemoproteínas. El hemo en sí tiene una solubilidad muy limitada, pero forma complejos solubles con otros componentes de la dieta en el lumen intestinal. El hierro se libera del hemo después de su entrada a los enterocitos intestinales (Fuqua y col., 2012).

El hierro no hemo se presenta en muchas más formas tanto en alimentos vegetales como animales. Este hierro está asociado con una gama de proteínas, incluyendo la proteína de almacenamiento de hierro ferritina, y también se encuentra en las vacuolas de las células vegetales. Si bien el bajo pH del estómago puede estabilizar el hierro en su forma reducida (Fe^{2+}) o de forma ferrosa, la mayoría del hierro de la dieta se encuentra en forma oxidada (Fe^{3+}) o en forma férrica, que tiene una baja solubilidad y biodisponibilidad. Durante el proceso de digestión, sin embargo, el hierro no hemo es muy probable que coexista en muchos complejos diferentes con los productos de la digestión en el tracto intestinal, lo que puede mejorar o alterar su absorción. Por ejemplo, los fitatos de origen vegetal y taninos pueden secuestrar algunas formas de hierro no hemo y disminuir considerablemente su absorción, mientras que el ácido ascórbico y compuestos de las carnes (“factor carne”) pueden aumentar la absorción. La absorción del hierro de la ferritina no se ve tan fuertemente afectado por estos componentes de unión al hierro de la dieta. En cuanto a la absorción del hierro hemo, tampoco se ve afectado por estos agentes quelantes o potenciadores del hierro. Junto con otras pruebas, este hecho sugiere que la ferritina y el hierro hemo son absorbidos por diferentes mecanismos que las formas de hierro de bajo peso molecular (Lonnerdal, 2009; Fuqua y col., 2012).

Paso del hierro a través del enterocito

La absorción de la mayoría del hierro se produce en la parte superior de intestino delgado, en el duodeno y en el yeyuno proximal, a través de las células del epitelio intestinal, o enterocito (Collins y Anderson, 2012). Estas células se caracterizan por presentar una cara apical que está en contacto con el lumen del intestino y el contenido de la dieta, y una cara basolateral en contacto con la sangre. Los enterocitos surgen de la división de las células madre de las criptas intestinales y migran hasta la vellosidad, que con el epitelio intestinal se renueva completamente cada 3-4 días. Las características físicas del tracto gastrointestinal, tales como el área superficial del intestino, que se incrementa bajo condiciones de deficiencia de hierro, y el pH en el estómago (un pH bajo aumenta la solubilidad de hierro), también pueden afectar de forma importante en la absorción de hierro (Collins y Anderson, 2012).

Los enterocitos diferenciados del duodeno expresan altos niveles de proteínas implicadas en la absorción de hierro de la dieta. En el borde en cepillo, la principal proteína implicada en el transporte del Fe^{2+} es el transportador de metales divalentes (DMT1) (Courville y col., 2006; Collins y Anderson, 2012). Los ratones a los que se les somete a una ablación del intestino

delgado específica para DMT1 mueren poco después del nacimiento de una anemia severa, lo que demuestra la importancia de este transportador en la absorción de hierro (Gunshin y col., 2005). La actividad de la ferrireductasa que se encuentra en el ribete en cepillo facilita la reducción del Fe^{3+} de la dieta a la forma Fe^{2+} , que es el sustrato para el DMT1. El citocromo b duodenal con actividad ferrireductasa (Dcytb) es capaz de proporcionar la actividad reductasa, pero existen otras reductasas, como la metaloreductasa Steap2, que también tiene este papel (McKie, 2008).

La absorción del hierro hemo y de la ferritina es menos conocida. Hay evidencias de que el hemo es absorbido por endocitosis mediada por receptores (Collins y Anderson, 2012), pero el receptor de alta afinidad para el hemo en los enterocitos aún no se ha podido identificar. La proteína transportadora del hemo (HCP-1) acoplado al transportador de folato fue identificada como el transportador apical del hemo y (Shayeghi y col., 2005; Collins y Anderson, 2012), sin embargo, la proteína parece ser que juega un papel mucho más importante en la absorción de folato y tiene mucha menos afinidad por el hemo. También hay evidencias de que la ferritina de la dieta también entra en los enterocitos por medio de endocitosis (San Martín y col., 2008).

Una vez el hierro está dentro del enterocito este puede almacenarse dentro de la ferritina endógena o exportarlo a la sangre para el transporte a otros tejidos. El hemo ingerido es degradado por la hemo oxigenasa 1 (HO-1) para liberar el Fe^{3+} , el hierro de la ferritina ingerida también tiene que ser liberado (Collins y Anderson, 2012). El hierro de todas las formas dietéticas, ya liberado, termina en la sangre unido a la transferrina, que parece ser que forma un *pool* común de hierro dentro del enterocito, pero aún no sé conoce la naturaleza de este *pool* de hierro y como se transporta dentro del enterocito (Fuqua y col., 2012).

La ferroportina (FPN1), proteína transmembrana que está localizada en la membrana basolateral de los enterocitos, es la única proteína exportadora de hierro que se conoce en mamíferos y es la responsable del paso del hierro desde los enterocitos en la circulación sanguínea (Anderson y Vulpe, 2009). La supresión de la FPN1 en las células intestinales en ratones da como resultado un bloqueo casi completo de la absorción intestinal de hierro y una consiguiente acumulación de hierro en los enterocitos intestinales (Donovan y col., 2005). La FPN1 transporta el hierro en su forma Fe^{2+} , pero la transferrina (Tf) plasmática sólo se une al hierro en la forma Fe^{3+} , por este motivo, se cree que la ferroxidasa juega un papel muy importante en la oxidación del hierro transportado por la FPN1. Sin la actividad de una ferroxidasa, la FPN1 es internalizada y degradada (De Domenico y col., 2009). Mientras que otros tipos de células utilizan la ceruloplasmina (CP, proteína que utiliza el cobre como cofactor) circulante unida a glicosil fosfatidil inositol (GPI) como ferroxidasa para la FPN1, la no expresión de la CP parece no afectar a la absorción de hierro, salvo en situaciones de

extrema necesidad de hierro (Collins y Anderson, 2012). En cambio, las células intestinales utilizan un análogo de la CP unido a membrana llamado hephaestina (HEPH) (Vulpe y col., 1999). Algunos estudios han indicado que la HEPH y la FPN1 pueden interactuar (Collins y Anderson, 2012). La HEPH cuando está mutada en ratón provoca anemia ligada al sexo, lo que da como resultado una acumulación de hierro en los enterocitos y una anemia sistemática (Vulpe y col., 1999). La proteína precursora amiloidea (APP) es otra ferroxidasa que se expresa en los enterocitos intestinales que podría desempeñar un papel importante en la absorción de hierro (Duce y col., 2010).

Regulación de la absorción de hierro

Ya que no hay mecanismos conocidos que regulen la eliminación de hierro del cuerpo, es crítico que la absorción de hierro esté estrechamente regulada para que se suplan con precisión las necesidades orgánicas del mismo. En un adulto sano, la mayor parte de las necesidades diarias de hierro se compensan por el reciclaje del hierro de los glóbulos rojos senescentes mediante la degradación de los macrófagos retículoendoteliales. Sin embargo, el cuerpo debe absorber suficiente hierro de la dieta para compensar las pérdidas “obligadas” debido a la eliminación de las células epiteliales, la menstruación y otras pérdidas menores. Este suministro también debe satisfacer los mayores requerimientos que se producen en el crecimiento, el embarazo, las condiciones de hipoxia y a las pérdidas de sangre (hemorragias). Si se absorbe demasiado hierro, como en enfermedades genéticas como la hemocromatosis, el hierro desborda la capacidad de almacenamiento del cuerpo, lo que resulta en un daño oxidativo mediado por hierro en los tejidos. La regulación de la absorción de hierro está mediada a través de una interacción compleja a nivel local y sistémico (Fuqua y col., 2012).

- **Regulación sistémica**

La absorción de hierro desde los enterocitos intestinales, así como el flujo de salida de hierro reciclado de los macrófagos, se controla sistémicamente por la hormona peptídica de 25 aminoácidos llamada **hepcidina** (Nemeth y Ganz, 2009; Knutson, 2010). La hepcidina, que es sintetizada principalmente en los hepatocitos, circula por la sangre y se une al exportador de hierro FPN1 de la superficie celular, incluyendo la membrana basolateral de los enterocitos. Esta unión provoca la internalización y la posterior degradación de la FPN1, y por tanto la liberación de hierro en la sangre disminuye (Nemeth y col., 2004). La mutación de la FPN1 que impide la unión de la hepcidina provoca una sobrecarga de hierro, en humanos se conoce como hemocromatosis tipo 4 (Pietrangelo y col., 2011). Hay datos que sugieren que la hepcidina puede ser

capaz de actuar directamente sobre el DMT1 en los enterocitos, pero aún se tiene que seguir investigando (Fuqua y col., 2012). La regulación de la producción de hepcidina es compleja (Knutson, 2010), pero se sabe que los niveles de hepcidina aumentan cuando aumentan las reservas de hierro, durante una infección e inflamación, mientras que disminuyen durante la hipoxia, bajo deficiencia de hierro y cuando aumentan las necesidades eritropoyéticas. Tanto estudios en animales como las enfermedades en humanos que dan como resultado unos niveles no apropiados de hierro han ayudado a arrojar luz sobre cuáles son los mecanismos de regulación de la hepcidina, a pesar de todo aún no se conocen con exactitud.

La vía BMP6/SMAD (proteína morfogénica ósea/proteínas SMAD, son proteínas que participan en la traducción de señales celulares) es la ruta central que regula la expresión de la hepcidina (Knutson, 2010), y parece ser de gran importancia en la modulación de la respuesta que la hepcidina provoca en las reservas de hierro. Son varios miembros de la familia de las BMP, en particular la BMP 2, 6 y 9, que se ha demostrado que modulan la respuesta de la expresión de la hepcidina, sin embargo, la BMP6 parece ser la de mayor importancia fisiológica. En ratones *knockout* para el gen de la BMP6 se ha visto que tienen una expresión significativamente reducida y la posterior sobrecarga sistemática de hierro, este hecho demuestra la importancia de las BMP6 en la expresión de hepcidina (Meynard y col., 2009). La BMP6 pertenece a la familia de los factores de crecimiento transformante β y es secretada por los hepatocitos en proporción al estado del hierro. La BMP6 se une al complejo receptor BMP I/II en los hepatocitos, lo que conduce a la fosforilación mediada por receptores de las SMADs 1, 5 y 8. Esta fosforilación permite que estas proteínas interactúen con Smad 4, estos complejos heteroméricos resultantes pasan al núcleo donde estimulan la transcripción del gen que codifica la hepcidina, HAMP. El complejo receptor de la BMP6 incluye a un co-receptor llamado hemojuvelina (HJV) que es crítico para que esta vía pueda funcionar (Knutson, 2010; Pietrangelo y col., 2011). Las personas con un defecto congénito que no producen HJV tienen bajos niveles de hepcidina y desarrollan una severa sobrecarga de hierro, padeciendo hemocromatosis juvenil (Tipo 2). La HJV se encuentra normalmente unida a la membrana plasmática de las células, pero puede producirse una forma soluble por medio de la proteasa furina. La HJV soluble puede competir con la HJV unida a membrana en la unión de la BMP y por tanto es capaz de aumentar la señalización BMP/SMAD. La matriptasa-2

(TMPRSS6, una serín-proteasa) degrada la HJV, siendo capaz de disminuir la señalización de la BMP (Finberg, 2009). La expresión de la hepcidina también se puede ver aumentada por procesos inflamatorios y por infecciones a través de la inducción de citoquinas inflamatorias como la IL-6 y la vía de señalización de JAK-STAT (Nemeth y Ganz, 2009; Knutson, 2010).

La relación entre los niveles de hierro y la hepcidina aún se desconoce, pero es probable que implique a dos vías principalmente: la regulación de hierro dependiente de BMP6 y el grado de saturación de la Tf (Nemeth y Ganz, 2009; Knutson, 2010). El receptor de la transferrina 2 (TfR2) y la proteína de la hemocromatosis hereditaria (HFE) pueden estar implicados en la detección de la saturación de la Tf. La mutación de alguna de estas proteínas puede conducir a una reducción de la producción de hepcidina, el aumento de la absorción de hierro y la posterior enfermedad por sobrecarga de hierro (mutación HFE provoca hemocromatosis tipo 1; mutación TfR2 provoca hemocromatosis tipo 3) (Babitt y Lin, 2011). El TfR2 es un parálogo del TfR1, pero, a diferencia del TfR1, que se expresa principalmente en el hígado y está regulado positivamente por los niveles de holo-Tf (transferrina saturada o transferrina diférrica). La HFE puede unirse al TfR1 en el mismo sitio que la holo-Tf, y también puede unirse al TfR2 y aumentar su estabilidad. La hipótesis de que uno de los mecanismos por los cuales HFE y el TfR2 podría detectar los niveles circulantes de hierro es que los niveles altos de holo-Tf podrían limitar la unión de HFE a TfR1, lo que conduce a un aumento de la unión de la HFE al TfR2 y la posterior estimulación de una cascada de reacciones que activan la síntesis de hepcidina (Gao y col., 2009; Knutson, 2010). Sin embargo, esto aún tiene que ser demostrado, ya que se ha visto que ratones que carecen de ambas proteínas sufren un fenotipo más grave que los ratones *knockouts* para cada gen individualmente, lo que sugiere que estas proteínas pueden tener funciones independientes (Wallace y col., 2009).

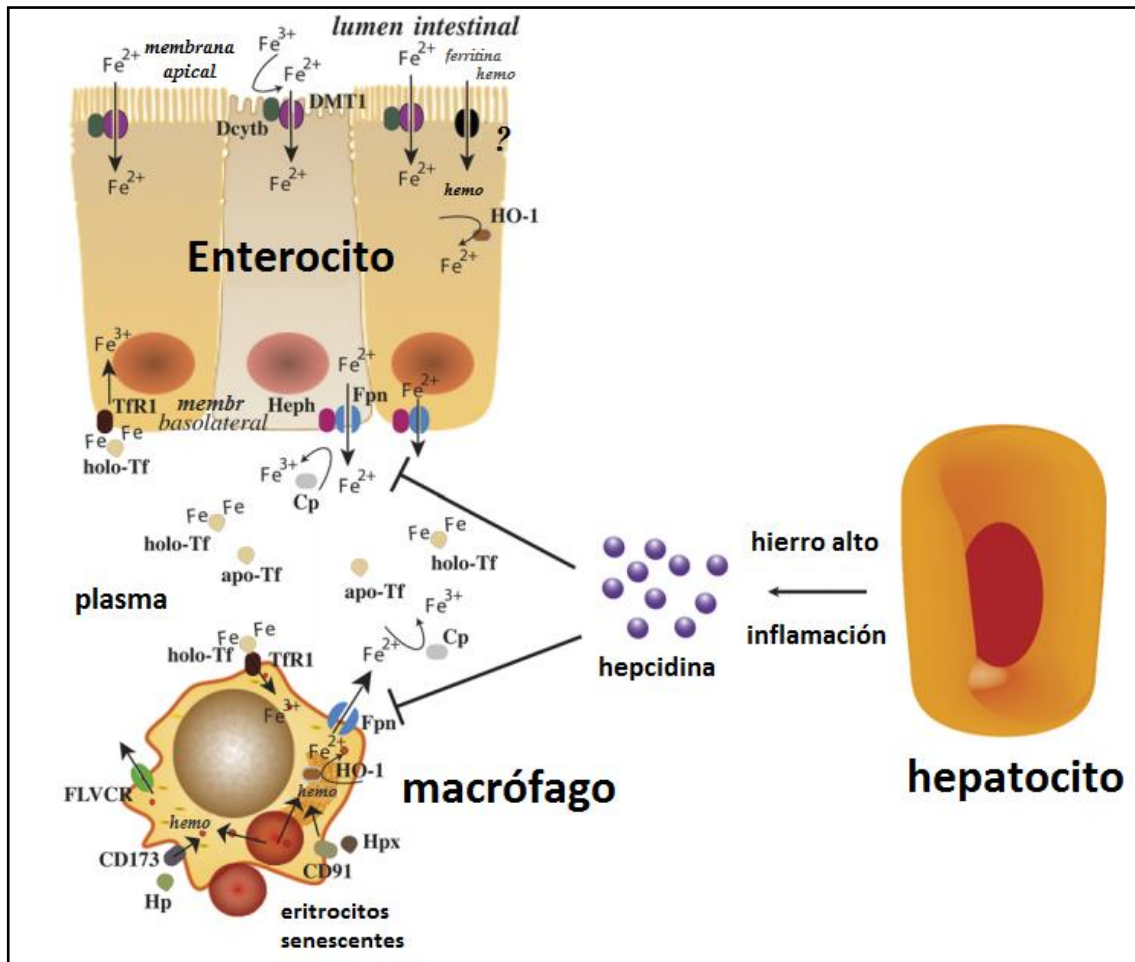


Figura nº 2: Regulación hormonal del flujo de salida de hierro desde los enterocitos y macrófagos retículoendoteliales (modificado de Wang y Pantopoulos, 2011).

Fpn: ferroportina; Heph: hefaestina; TfR1: receptor de la transferrina 1; HO-1: hemo oxigenasa 1; Cp: ceruloplasmina; Tf: transferrina; Hp: haptoglobina; Hpx: hemopexina; FLVCR: receptor del virus de leucemia felina, subgrupo C; CD91, CD173: receptores específicos.

- **Regulación local**

La absorción de hierro también está regulada a nivel local en los enterocitos por la concentración de hierro celular y la hipoxia. El que juega un papel principal en esta regulación es el sistema IRE/IRP (*Iron Responsive Element/Iron Responsive Protein*, elementos de respuesta al hierro/proteínas de respuesta al hierro), que interviene en la regulación post-transcripcional de las proteínas implicadas en el metabolismo del hierro (Wang y Pantopoulos, 2011). El ARNm que codifica para el TfR1 y dos isoformas del DMT1 tienen IREs en el extremo 3'UTR que se estabiliza en condiciones de deficiencia de hierro cuando un IRP (IRP1 o IRP2) se une a ellos. Esta estabilización aumenta la vida media del

ARNm y, por lo tanto, aumenta la cantidad de proteína traducida. El IRP1 se une reversiblemente al hierro y presenta un estado de unión al ARNm cuando los niveles celulares de hierro son bajos. IRP2 no se une al hierro, pero se degrada cuando la concentración de hierro es baja. La ferritina, la APP y una isoforma de la FPN1 presentan su ARNm con un IRE en el extremo 5'UTR. En este lugar, la estabilización del bucle que produce el IRP bloquea la traducción de estos ARNm en condiciones de baja disponibilidad de hierro. La isoforma de la FPN1 que más se sintetiza en las células intestinales, sin embargo, carece del 5'IRE de la FPN1 y por lo tanto los niveles de esta proteína se pueden mantener incluso si los niveles de hierro en la célula son bajos (Zhang y col., 2009). Esto permite que el organismo absorba el hierro cuando hay deficiencia de hierro sistémico o cuando el hierro aportado por la dieta es bajo. La ferritina de los enterocitos, que almacena la mayor parte del hierro de la célula cuando no está en el *pool* de hierro lábil, también puede ser importante para la regulación de la absorción de hierro, se ha visto que ratones *knockout* para la cadena H de la ferritina específica de enterocitos presentan una aumentada la absorción de hierro que es inapropiadamente alta para el estado del hierro que presenta el animal (Vanoaica y col., 2010). Aún queda por determinar si en condiciones fisiológicas normales la ferritina tiene un papel activo en el flujo de hierro de los enterocitos.

La hipoxia es un gran estimulador de la absorción de hierro y por lo tanto las proteínas que participan en su absorción están reguladas transcripcionalmente por el hierro y el estado del oxígeno, por medio del factor inducible por hipoxia 2α (HIF- 2α) (Mastrogiannaki y col., 2009; Shah y col., 2009). El HIF- 2α forma parte de un complejo factor de transcripción que se une a promotores que contiene elementos de respuesta al HIF (HRE) para inducir su transcripción. Entre los genes que contienen HREs se incluyen el *Dcytb*, *DMT1* y *FPN1*. El HIF- 2α es sintetizado constitutivamente por las células, pero es ubiquitinizado y degradado rápidamente en el proteosoma después de una hidroxilación por medio de la proteína prolil-hidroxilasa (PHD, *Prolyl Hydroxylase Domain-containing protein*) dependiente de hierro u oxígeno. Los niveles de HIF- 2α , y por lo tanto la transcripción de los genes sobre los que actúa, aumentan cuando la concentración de hierro y oxígeno disminuyen y la actividad de las PHDs está limitada. Estudios en ratones modificados genéticamente que tienen aumentada la expresión del HIF- 2α en intestino presentan una mayor expresión de *DMT1* y *Dcytb* y un aumento de la absorción de hierro, mientras que en ratones *knockout* para HIF- 2α presentan bajos niveles de *DMT1*, *Dcytb* y *FPN1* y deficiencia de

hierro sistémico a pesar de las bajas presencia de hepcidina (Mastrogiannaki y col., 2009; Shah y col., 2009). Estos datos dan un rol muy importante al HIF-2 α en la regulación local de la absorción de hierro.

2.1.4.3. Distribución y captación celular

El hierro que es exportado de las células (enterocitos, macrófagos, hepatocitos, etc.) por la FPN1 se une a la Tf plasmática, una glicoproteína β_1 globulina de 80 kDa codificada en el cromosoma 3. Es sintetizada en el retículo endoplasmático de las células parenquimatosas del hígado y, en menor medida, en el sistema nervioso central, células de Sertoli y los macrófagos del tejido linfoide. Su vida media es de 8 días (De Domenico y col., 2008). Existen otros dos tipos de Tf, la lactoferrina y la ovoferrina, que en las infecciones fijan el hierro e impiden que esté disponible para los agentes microbianos (García y col., 2010).

La función principal de la Tf es transportar hierro férrico (Fe^{3+}), al que se une de forma fuerte pero reversible. La unión es favorecida por un pH alcalino que se logra con la presencia de un anión, carbonato o bicarbonato. La Tf tiene la capacidad de unir dos átomos de Fe^{3+} , y esto provoca un cambio conformacional en la proteína. Normalmente, la saturación con hierro de la Tf circulante es un tercio de su capacidad total, pero no en forma homogénea. La proteína que permanece insaturada (apo-Tf es del 70%) actúa como buffer ante la posibilidad de que el hierro absorbido o liberado en abundante cantidad quedase en estado libre y resultase tóxico para el organismo (De Domenico y col., 2008).

Cuando la capacidad de saturación de la Tf es superada, puede aparecer en el plasma hierro no unido a Tf (NTBI: *non-transferrin-bound serum iron*). Esta fracción de hierro es biológicamente tóxica y dentro de la misma se encuentra el hierro plasmático lábil (LIP: *labile iron plasma*), que es el de mayor toxicidad. NTBI penetra en las células independientemente del TfR, así lo hace el hígado, corazón y otros órganos por difusión pasiva o por un transportador no conocido aún (Kohgo y col., 2008). El hierro libre tiene una actividad redox ilimitada, capaz de generar especies reactivas del oxígeno en una cantidad tal que supere la capacidad del organismo para procesarlo. Estos radicales libres, como hidroxilo (HO^{\cdot}), atacan macromoléculas y promueven la peroxidación de lípidos de membrana. También las estructuras intracelulares son susceptibles a la peroxidación dependiente de hierro. En las células con sobrecarga de este metal los lisosomas se vuelven frágiles y pueden liberar su contenido de proteasas, causando aún mayor daño y en últimas instancia llevando a la muerte celular. Este proceso conduce al

severo daño observado en hígado, corazón, articulaciones, páncreas, gónadas, etc. de los pacientes con desórdenes por sobrecarga de hierro (Nathan y Oski, 2009).

Una forma de medir la Tf del plasma es cuantificar el hierro que se une a ella. La suma de la ferritina y la capacidad de transporte de la Tf insaturada (UIBC: *unsaturated iron-binding capacity*), es la capacidad total de fijación de hierro de la Tf (TIBC; *total iron-binding capacity*), equivalente a la concentración de esta proteína en el plasma. La TIBC aumenta en la deficiencia de hierro y en el embarazo, y disminuye en los procesos inflamatorios, infecciosos y renales (Sheftel y col., 2009).

La holo-Tf puede unirse a dos tipos de receptores, TfR1 y TfR2.

El TfR1 es un homodímero, que consta de dos subunidades transmembrana idénticas unidas por puentes disulfuro (De Domenico y col., 2008). Se expresa en gran cantidad en todas las células en división, en linfocitos activados y en los precursores eritroides con mayor demanda de hierro. Se une selectivamente a la holo-Tf para internalizarla en la célula (endocitosis mediada por receptor) (Andrews, 2008).

El TfR2 es un homólogo del TfR1, cuya expresión está restringida a hepatocitos, células duodenales y eritroides, lo que sugiere un rol más especializado en el metabolismo del hierro (Gisbert y Gomollón, 2009; Nemeth, 2010). Se une a la holo-Tf con menor afinidad que el TfR1, y su papel principal es como molécula de señalización (De Domenico y col., 2008). Cuando la Tf circulante se encuentra saturada, el TfR2 interactúa con la proteína HFE para que aumente la síntesis de hepcidina.

Ciclo de la transferrina

Durante el desarrollo celular los eritrocitos, así como en la mayoría de las células, captan el hierro de la Tf plasmática. La holo-Tf cargada de hierro tiene una gran afinidad por el TfR1 de la superficie celular (Ponka y col., 1998), este complejo sufre endocitosis por efecto de las clatrininas (Figura nº 3). Una bomba de protones acidifica el endosoma a pH 5.5, provocando la liberación del Fe^{3+} de la Tf que permanece unida al TfR1. La ferrirreductasa Steap3 reduce el Fe^{3+} a Fe^{2+} (Ohgami y col., 2005), que es transportado a través de la membrana del endosoma por el DMT1 hasta el citosol o, posiblemente, de forma directa a la mitocondria en eritrocitos (Richardson y col., 2010). Después de liberar el hierro, la afinidad de la Tf y el TfR1 disminuye unas 500 veces, como resultado se produce la disociación. En el último paso del ciclo de la transferrina, la apo-Tf es secretada al torrente sanguíneo para volver a captar más Fe^{3+} .

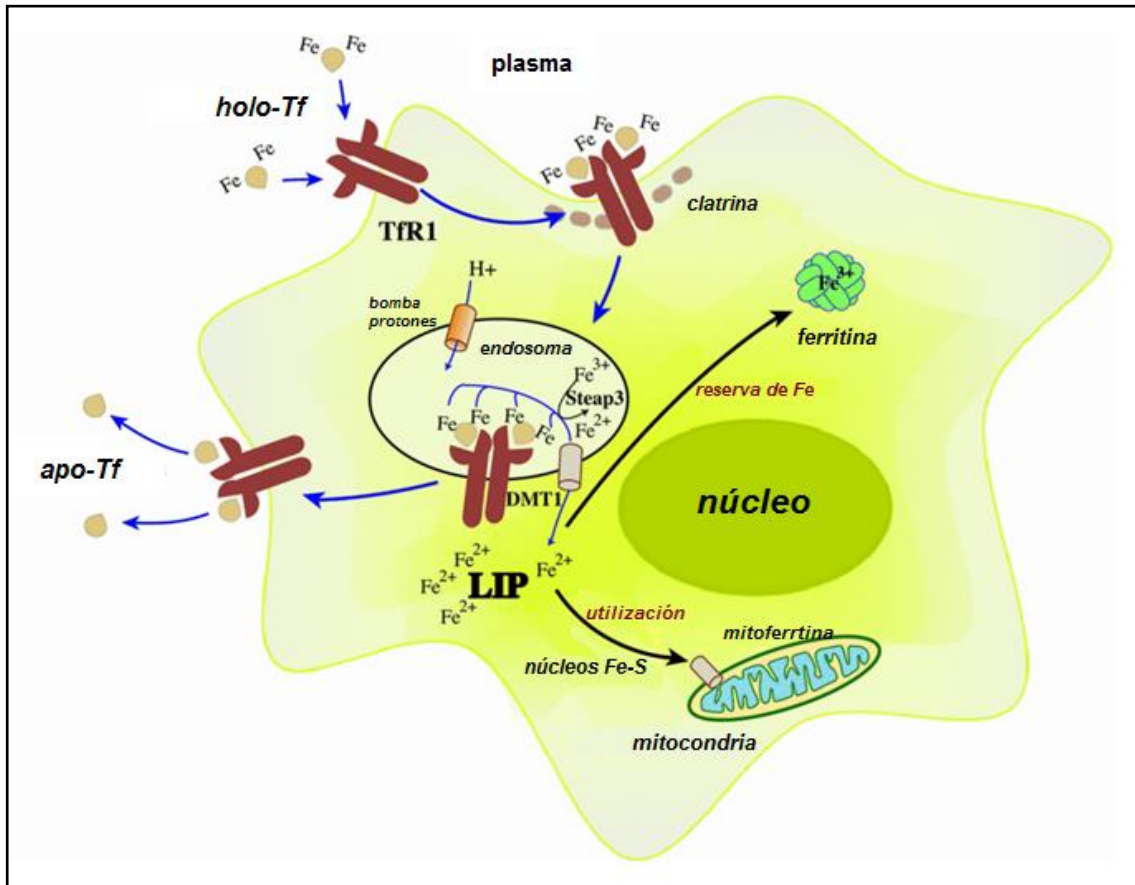


Figura n° 3: Captación celular de hierro vía ciclo de la transferrina (modificado de Wang y Pantopoulos 2011).

Los enterocitos absorben el hierro inorgánico o hemo de la dieta y los macrófagos fagocitan los glóbulos rojos senescentes cargados de hierro, o captan hierro por otros mecanismos. Ambos tipos de células liberan Fe^{2+} al plasma vía FPN, que es incorporado a la apo-Tf después de ser oxidado a Fe^{3+} vía hefaestina o ceruloplasmina. Los hepatocitos segregan hepcidina en respuesta a los altos niveles de hierro o en respuesta a procesos inflamatorios, que inhiben el flujo de hierro vía FPN y promueve la retención de hierro en enterocitos y macrófagos.

La importancia del ciclo de la Tf en la entrada de hierro en los eritrocitos está demostrada por la letalidad que se produce en ratones con disrupción dirigida del Tfr1, y la anemia microcítica hipocrómica de los animales Tfr1 +/- (heterocigotos) (Levy y col., 1999). Por otra parte, el *hpx* (hipotransferrinemia) en ratones con fallo en la expresión apropiada de Tf debido a un defecto de “*splicing*” también desarrolla anemia microcítica hipocrómica, que se asocia, paradójicamente, con la sobrecarga de hierro hepático (Trenor y col., 2000). Estos hallazgos proporcionan una fuerte evidencia de que el ciclo de la Tf es indispensable para la captación de hierro por los eritrocitos, y la Tf es el único donante de hierro para la eritropoyesis (Wang y Pantopoulos, 2011).

El DMT1 no sólo actúa en la absorción de hierro de la dieta, sino que es un componente crucial en el ciclo de la Tf ya que media el transporte de Fe^{3+} a través de la membrana del endosoma. Así en ratones DMT1 -/- (homocigotos sin gen para el DMT1) no pueden absorber

ni el hierro de la dieta, ni usar eficientemente el hierro para la eritropoyesis y, consecuentemente, desarrollan anemia microcítica hipocrómica grave y mortal poco antes de nacer (Gunshin y col., 2005). Los animales con mutación parcialmente inactivada (ratones y ratas *Belgrade mk/mk*) presentan anemia severa (Fleming y col., 1997; Fleming y col., 1998; Wang y Pantopoulos, 2011).

Otros mecanismos de captación de hierro

Los macrófagos pueden usar el ciclo de la Tf para captar hierro, especialmente en cultivos celulares. Sin embargo, *in vivo*, los macrófagos adquieren una gran cantidad de hierro por medio de la fagocitosis de los glóbulos rojos senescentes (Figura nº 3). Los macrófagos también son capaces de limpiar de la circulación la hemoglobina y el grupo hemo cuando se produce hemólisis intravascular. La hemoglobina libre es limpiada por la haptoglobina (Hp), que es una proteína producida por el hígado, que a su vez es captada por los macrófagos tras la unión al receptor CD163 (Kristiansen y col., 2001). De igual forma el grupo hemo libre es recogido por la hemopexina (Hpx) plasmática y es reconocido por el receptor CD91 de los macrófagos e internalizado por endocitosis (Hvidberg y col., 2005). Este hemo internalizado, o el hemo derivado de la degradación de la hemoglobina después de su absorción directa, o en la eritrofagocitosis son degradados por la HO-1, produciendo Fe^{2+} , es liberado al plasma a través de la FPN. La Nramp1 (*natural resistance-associated macrophage protein 1*: proteína de resistencia natural de macrófagos 1), un homólogo del DMT1, que contribuye eficientemente en el reciclado del hierro de la hemoglobina, especialmente durante la anemia hemolítica (Soe-Lin y col., 2009).

La Tf plasmática cede el hierro a todos los tejidos, excepto a los que están separados del torrente sanguíneo por una capa de tejido endotelial ya que tiene una barrera física (por ejemplo el cerebro, testículos o los ojos). El cómo cruza el hierro la barrera hematoencefálica u otras barreras, que no permiten el trasiego libre de proteínas y metabolitos, se conoce parcialmente. Al parecer las células endoteliales de los capilares en estos lugares expresan TfR1 y captan el hierro de la Tf plasmática (Zecca y col., 2004; Rouault y col., 2009). La liberación de hierro desde las células endoteliales (también neuronas y astrocitos) en el espacio cerebral probablemente involucre a una FPN acoplada a una ferroxidasa, por analogía con el mecanismo de transporte de la membrana basolateral del epitelio intestinal. La actividad ferroxidasa la pueden aportar las proteínas que interactúan con la FPN como pueden ser la hefaestina, GPI-ceruloplasmina (glucosilfosfatidilinositol-ceruloplasmina, una isoforma de ceruloplasmina asociada a membrana) (Jeong y David, 2003) o la β -APP (*β -amyloid precursor protein*, proteína precursora amiloidea β) (Duce y col., 2010). En el interior, en el fluido intersticial, el hierro es captado por la Tf del cerebro que es secretada por los oligodendrocitos.

Antes, se creía que la Tf plasmática se recuperaba de forma sustancial durante la filtración en el riñón (Smith y Thévenod, 2009). Posteriormente, se ha establecido que las células polares del epitelio renal de los túbulos proximales pueden captar hierro de la Tf por medio de los receptores de endocitosis, cubilina, que actúan en conjunto con el receptor megalina (Kozyraki y col., 2001). La cubilina (pero no el TfR1) se expresa en la membrana apical de las células del túbulo proximal, que también contienen gran cantidad de DMT1, esto sugiere que al menos una fracción de Tf se filtra en el riñón y se recupera del filtrado glomerular por la unión a la cubilina (Smith y Thévenod, 2009). Se supone que el flujo de hierro desde la membrana basolateral de las células del túbulo proximal al torrente sanguíneo puede involucrar a la FPN y hefaestina/ceruloplasmina.

La lipocalina 2 (Lcn2) es una proteína de mamíferos que fue identificada por su capacidad para interactuar con el sideróforo de enterobacterias (Goetz y col., 2002), está implicada en las vías de captación de hierro en el riñón durante el desarrollo, en lesiones e inflamaciones (Devireddy y col., 2005). La Lcn2 cargada de hierro es internalizada por los receptores 24p3R (receptores específicos de Lcn2) (Devireddy y col., 2005) y la megalina (Hvidberg y col., 2005). Se ha demostrado recientemente que los animales sintetizan el sideróforo 2,5-DHBA (ácido dihidroxibenzoico), que es un isómero del 2,3-DHDA, el componente de unión al hierro de enterobacterias (Devireddy y col., 2010). Es muy importante destacar, que una depleción de 2,5-DHBA provoca una mala regulación del metabolismo del hierro en células de mamíferos y en embriones de pez cebra, destacando, la gran importancia biológica del mecanismo dependiente de Lcn2. En ratones Lcn2 *-/-* (homocigoto) se muestra un metabolismo aparentemente normal; sin embargo, presentan una falta de respuesta inmunitaria innata contra infecciones bacterianas, lo que sugiere que el Lcn2 sirve para privar a las bacterias de hierro (Flo y col., 2004).

En condiciones fisiológicas la Tf plasmática está hipoinsaturada (entorno al 30%) y muestra una alta capacidad de fijación de hierro, para impedir la acumulación de NTBI. Sin embargo, en la hemocromatosis hereditaria y otras enfermedades que cursan con sobrecarga de hierro, el nivel de hierro en plasma excede de la capacidad de saturación de la Tf, y un *pool* de NTBI se acumula contribuyendo significativamente a la carga de hierro en hígado (Breuer y col., 2000). La naturaleza exacta del NTBI sigue siendo difícil de aclarar, pero su capacidad redox y su toxicidad se conocen bien. Este puede formar libremente quelatos de hierro con la albúmina u otras pequeñas moléculas orgánicas, como puede ser el citrato (Hider, 2002). El mecanismo por el cual las células captan NTBI no se conoce con exactitud, pero se sabe que la Lcn2 no tiene este papel (Huang y col., 2009). El transportador de zinc Zin14 (también

conocido como SLC39A) parece ser que es capaz de mediar la captación de NTBI (Liuzzi y col., 2006) así como la asimilación de Tf unida a hierro (Zhao y col., 2010).

La ferritina, la proteína que almacena el hierro está también implicada en las vías de transporte de hierro, que puede predominar en estados patológicos, cuando los tejidos dañados ricos en ferritina la liberan. La proteína de membrana TIM-2 (*T-cell immunoglobulin-domain and mucin-domain 2*) funciona como receptor de ferritina en roedores (Chen y col., 2005). Recientemente, se ha demostrado que la ferritina puede ser captada por Scara5 (*scavenger receptor class A, member 5*) y donar el hierro para el ser utilizado en el desarrollo del riñón (Li y col., 2009), mientras que la Ferritina-H (ferritina que solo tiene cadenas H) puede ser internalizada por las células tras la unión específica con el TfR1 (Li y col., 2010).

2.1.4.4. Metabolización

Metabolismo mitocondrial del hierro

La mayoría de las células usan el hierro mitocondrial para la síntesis del grupo hemo y núcleos de Fe-S (ISC: *iron-sulfur clusters*). El mecanismo por el que se produce el trasiego de hierro en la mitocondria no se conoce en su totalidad. Estudios de microscopía de eritrocitos han ayudado a dar evidencias científicas y se ha propuesto la hipótesis “besa y corre” (*kiss-and-run*), que postula la entrega del hierro del derivado mitocondrial de la Tf a través del contrato transitorio con el endosoma, sin llegar a fusionarse las membranas (Richardson y col., 2010). En otros tipos de células, en general, se acepta que el hierro adquirido durante el ciclo de la Tf se libera primero en el citosol y después se dirige a la mitocondria. Las glutaredoxinas citosólicas más conservadas, Grx3 y Grx4, parece que desempeñan un papel esencial en la detección y trasiego intracelular de hierro, se sabe que el agotamiento de las mismas en levaduras conduce a un mal transporte de hierro a la mitocondria y efectos adversos en las rutas dependientes de hierro (Mühlenhoff y col., 2010). Es conocido que la entrada de hierro a la mitocondria requiere del transportador SLC mitoferritina (también llamado SLC25A37), localizado en la membrana interior de la mitocondria (Shaw y col., 2006). La mitoferritina-1 se presenta en alta concentración en los eritroblastos y se estabiliza una vez maduros, la siguiente interacción se produce con el transportador específico de los eritrocitos, el transportador ABC Abcb10 (*ATP-binding cassette, subfamily B, member 10*: proteína de unión al ATP, subfamilia B, miembro 10) (Chen y col., 2009), mientras que la mitoferritina-2 se expresa de forma ubicua y su vida media no está regulada (Paradkar y col., 2009). Ambas isoformas de mitoferritina son homólogas; sin embargo, no presentan redundancia funcional, se sabe que la sobreexpresión de

mitoferritina-2 no puede suplir la asimilación de hierro en eritrocitos deficientes de mitoferritina-1. La falta de mitoferritina-1 funcional en el pez cebra mutante está asociada con defectos severos en la eritropoyesis, síntesis del grupo hemo y la síntesis de ISC (Shaw y col., 2006). Curiosamente, el agotamiento en mamíferos del sideróforo 2,5-DHBA también conduce a defectos en la asimilación de hierro en la mitocondria y la síntesis del grupo hemo (Devireddy y col., 2010), dando a entender la importancia que tiene la vía de la Lcn2 del hierro para la mitocondria.

Todos los organismos sintetizan el anillo tetrapirrólico porfirínico del grupo hemo a partir de su precursor universal ALA (ácido 5-aminolevulínico) por medio de una ruta muy conservada de ocho pasos (Ponka, 1997; Rytter y Tyrrell, 2000; Severance y Hamza, 2009). La mayoría de los eucariotas (excepto plantas), generan el ALA en la mitocondria mediante condensación de succinil-CoA y glicina, que está sintetizado por las ALAS (ALA sintasa). En mamíferos se expresan dos isoformas ALAS1 y ALAS2 (específica de eritrocitos). El precursor ALA se exporta al citosol y es transformado en los intermediarios porfobilinógeno, hidroximetilbilano, uroporfirinógeno III y coproporfirinógeno III. Después es oxidado a protoporfirinógeno IX e importado a la mitocondria, donde es además oxidado a protoporfirina IX. Al final de la ruta de reacciones de síntesis del grupo hemo, la ferroquelatasa cataliza la inserción del Fe^{2+} a la protoporfirina IX. Este nuevo hemo sintetizado se exporta al citosol para incorporarse a las hemoproteínas. El transporte del grupo hemo y de los metabolitos a través de la membrana mitocondrial puede implicar a miembros de la familia de transportadores ABC (Severance y Hamza, 2009) y del transportador SLC, SLC25A39 (Nilsson y col., 2009). En las células distintas de eritrocitos, la reacción limitante en la ruta de síntesis del anillo porfirínico es la síntesis de ALA. Por el contrario, en la síntesis del anillo porfirínico en eritrocitos depende del suministro de hierro, limitando la reacción (Ponka, 1997).

El ensamblaje y reparación de los ISCs está mediado por complejas vías. Se conoce la función de varias proteínas que actúan en estas vías, pero siguen apareciendo nuevos componentes (Johnson y col., 2005; Lill, 2009; Ye y Rouault, 2010). Las proteínas mitocondriales Isu1/2 (también conocidas como ISCU: *iron-sulfur cluster assembly enzyme*) y Isa1/2 (nombrada también como ISCA: *iron-sulfur cluster assembly protein*), proporcionan los cimientos para poder comenzar con la biosíntesis del ISC. La desulfurasa de cisteína Nfs1 (*nitrogen fixation homologue*, también se nombra como ISCS) junto con ISD11 (interviene en la biogénesis de proteínas Fe-S, proteína de interacción con la desulfurasa), generan azufre elemental, mientras las proteínas de unión al hierro, frataxina, parece que actúa como donador de hierro. La proteína mitocondrial Grx5 (glutaredoxina 5) y el transportador Abcb7 participan en la maduración de los ISCs; sin embargo, su forma de actuación no está totalmente clara. La

biosíntesis de proteínas ISC citosólicas requiere de precursores mitocondriales de ISC, que son procesados por un mecanismo denominado CIA (*cytosolic ISC assembly*: ensamblaje citosólico de ISC) (Lill, 2009); se han identificado varios componentes CIA, como son la NTPasa Cfd1 (*cytosolic Fe-S cluster-deficient protein 1*: proteína deficiente de núcleos Fe-S), Nar1 (*nuclear architecture-related protein 1*: proteína relacionada con la arquitectura nuclear 1)/IOP1 (*iron-only hydrogenase-like protein 1*: proteína hidrogenasa de hierro 1), Cia1, Dre2 y Tah18. La Cfd1 interactúa con Nbp35 (*nucleotide-binding protein 35*: proteína de unión a nucleótidos 35), este complejo se ha propuesto como el posible “cimiento” o “andamio” para el ensamblaje citosólico de ISCs (Netz y col., 2007). Una alternativa a este modelo postula que el citosol está equipado con una compleja maquinaria de ensamblaje de ISCs de nueva formación (*de novo*), consistente en homólogos citosólicos de los factores mitocondriales de ensamblaje de ISCs, como son Isu/ISCU y Nfs1/ISCS (Ye y Rouault, 2010). Es importante destacar que defectos en la biosíntesis de ISCs están asociados con la mala regulación del metabolismo del hierro citosólico y celular (Richardson y col., 2010; Ye y Rouault, 2010).

Exceso de hierro

Las células pueden eliminar el exceso de hierro intracelular por secreción de Fe^{2+} vía ferroportina o por secreción del grupo hemo por un supuesto exportador del grupo hemo FLVCR (*feline leukaemia virus, subgroup C, receptor*: receptor del virus de la leucemia felina, subgrupo C) (Keel y col., 2008). Las células también pueden acumular y detoxificar el exceso intracelular de hierro metiéndolo en la ferritina citosólica, una proteína conservada que consta de 24 subunidades H y L, codificadas por genes distintos (Arosio y col., 2008). La ferritina se ensambla en una estructura cóncava con una capacidad de $\pm 80 \text{ \AA}$ que proporciona un reservorio para unos 4500 iones de Fe^{3+} en forma de hidróxido férrico. El hierro puede entrar en la ferritina con la ayuda de la PCBP1 (*poly(rC)-binding protein 1*: proteína de unión al poly-rC 1), que parece ser que funciona como un acompañante y donador de hierro (Shi y col., 2008). La incorporación de hierro a la holo-ferritina también requiere de la actividad ferroxidasa que está en las cadenas H, sin embargo, las cadenas L proporcionan un centro de concentración de hierro. La proporción de las cadenas H y L de la ferritina difieren dependiendo de los tejidos; las H están más requeridas por el corazón, mientras que las L en el hígado. Los depósitos intracelulares de hierro también se han detectado dentro de la hemosiderina, una estructura formada por ferritina degradada y núcleos de óxido de hierro.

El hierro acumulado en la ferritina se considera que es biodisponible y puede ser movilizado cuando la actividad lisosomal lo requiera (Zhang y col., 2010) y, probablemente, también para la reestructuración dinámica de las subunidades de la ferroportina (Takagi y col., 1998). Sin embargo, la ferritina falla a la hora de donar hierro para la síntesis endógena del

grupo hemo en cultivos de macrófagos (Mikhael y col., 2010). La activación de la ferroportina, promueve la movilización y exportación de hierro derivado de la ferroportina, seguido de una ubiquitinación (única) y la posterior degradación de la ferritina en el proteosoma (De Domenico y col., 2006). De este modo, la ferritina puede ser degradada por dos vías distintas, por medio del lisosoma o por medio del proteosoma, al parecer se requiere la liberación total de su hierro para ello (De Domenico y col., 2009).

Las reservas de hierro de la ferritina son cruciales para la salud. Así, la pérdida del gen que codifica para las cadenas H de la ferritina conduce a la muerte fetal prematura (Ferreira y col., 2000), mientras que la alteración condicional de este gen provoca daño en el hígado por estrés oxidativo (Darshan y col., 2009). Por otra parte, la alteración en intestino del gen que codifica para las cadenas H de la ferritina hace perder la regulación de la absorción del hierro dietario (Vanoaica y col., 2010). Por otro lado, la mutación del gen que codifica para las cadenas L de la ferritina cursan con neuroferritinopatías, un raro trastorno hereditario del movimiento, al parecer, de carácter autosómico dominante, se caracteriza por una acumulación en el cerebro de hierro con alta actividad redox (Levi y col., 2005).

Las mitocondrias contienen material hereditario en su núcleo para codificar una isoforma de ferritina (Levi y Arosio, 2004). La ferritina mitocondrial deriva de un raro gen sin intrones y se sintetiza en el citosol como un polipéptido precursor que se dirige a la mitocondria por una secuencia N-terminal que la guía. La proteína madura tiene actividad ferroxidasa y se ensambla como una ferritina funcional. La ferritina mitocondrial se expresa en bajos niveles y no parece tener ninguna función importante más que la utilización normal del hierro mitocondrial. Su expresión, sin embargo, está aumentada en eritroblastos cargados de hierro hemo (sideroblastos) en pacientes con anemia sideroblástica y puede servir como depósito de hierro (Cazzola y col., 2003).

Una isoforma glicosilada predominantemente de L-ferritina es secretada al torrente sanguíneo. Esta contiene muy bajas cantidades de hierro, esto sugiere que no tiene ningún papel como reserva de hierro o para el transporte del mismo, pero se usa en clínica como marcador de los niveles de depósitos de hierro en el cuerpo. Experimentos realizados en ratones sugieren que la ferritina sérica deriva de los macrófagos esplénicos y las células del túbulo proximal del riñón (Cohen y col., 2010).

LIP (pool de hierro lábil)

Varios tipos de células contiene hierro citosólico de tránsito, normalmente unidos a quelatos de baja masa molecular, como son el citrato, distintos péptidos, ATP, AMP o

pirofosfato. El LIP tiene actividad redox y puede ser monitorizado *in situ* usando productos fluorescentes como es la calceína o *Phen Green SK* (Petrat y col., 2002; Breuer y col., 2008). Otros ensayos con fluorescencia que son exclusivos para las mitocondrias también sugieren la presencia de estos quelatos de hierro en este orgánulo (Rauen y col., 2007). La ferritina y los quelatos de hierro protegen a las células de estrés oxidativo ya que reducen el LIP citosólico en cultivos (Epsztejn y col., 1999) y en animales (Kaur y col., 2003). Sin embargo, una sobreexpresión crónica de ferritina puede dar lugar a un efecto contrario en ratones, sugiriendo que el hierro secuestrado en la ferritina puede llegar a ser pro-oxidante (Kaur y col., 2009). El LIP citosólico es el reflejo del contenido de hierro celular y las fluctuaciones se tienen en cuenta para valorar la respuesta homeostática adaptativa (Wang y Pantopoulos, 2011).

2.1.4.5. Depósitos de hierro en el organismo

Un cuerpo adulto normal contiene de 3 a 4 g de hierro, la mayoría del cual está en la hemoglobina de los eritrocitos (2-3 g de hierro). Otros tejidos ricos en hierro incluyen el hígado y el bazo, los principales órganos de reserva de hierro donde el hierro se almacena en los macrófagos y hepatocitos en una proteína citoplasmática especializada, ferritina. El hierro de los músculos está predominantemente en la mioglobina, una proteína de almacenamiento de oxígeno. Todas las células contienen una pequeña cantidad de proteínas que contienen hierro esenciales para la producción de energía, el metabolismo sistémico, y otras importantes funciones. El hierro es transportado a los tejidos a través del plasma sanguíneo, que supone sólo 2-4 mg de hierro, unido a transferrina. El recambio de hierro que se produce en plasma oscila entre los 20-25 mg de hierro al día. De todas las células, los eritrocitos tienen la mayor concentración de hierro, rondando el 1 mg/ml de sangre. Aunque se recuperan pequeñas cantidades de hierro que proceden de otras células por medio de los macrófagos, la mayoría del hierro plasmático procede del reciclaje del mismo que realizan los macrófagos de los eritrocitos en el bazo y otros órganos. Como la vida media de los eritrocitos humanos es de 120 días, en torno al 0.8% (o de 15 a 25 mg) de todo el hierro de los eritrocitos es reciclado cada día. A su vez, la mayoría del hierro extraído del plasma se usa para la síntesis de hemoglobina en los precursores de eritrocitos, regulado a su vez por la eritropoyetina en respuesta a la oxigenación de los tejidos. A pesar del rápido recambio y renovación del hierro, la concentración del mismo generalmente es estable, esto indica que este trasiego de hierro desde el reciclaje de los eritrocitos por medio de los macrófagos en plasma está homeostáticamente controlado (Figura nº 4) (Ganz, 2013).

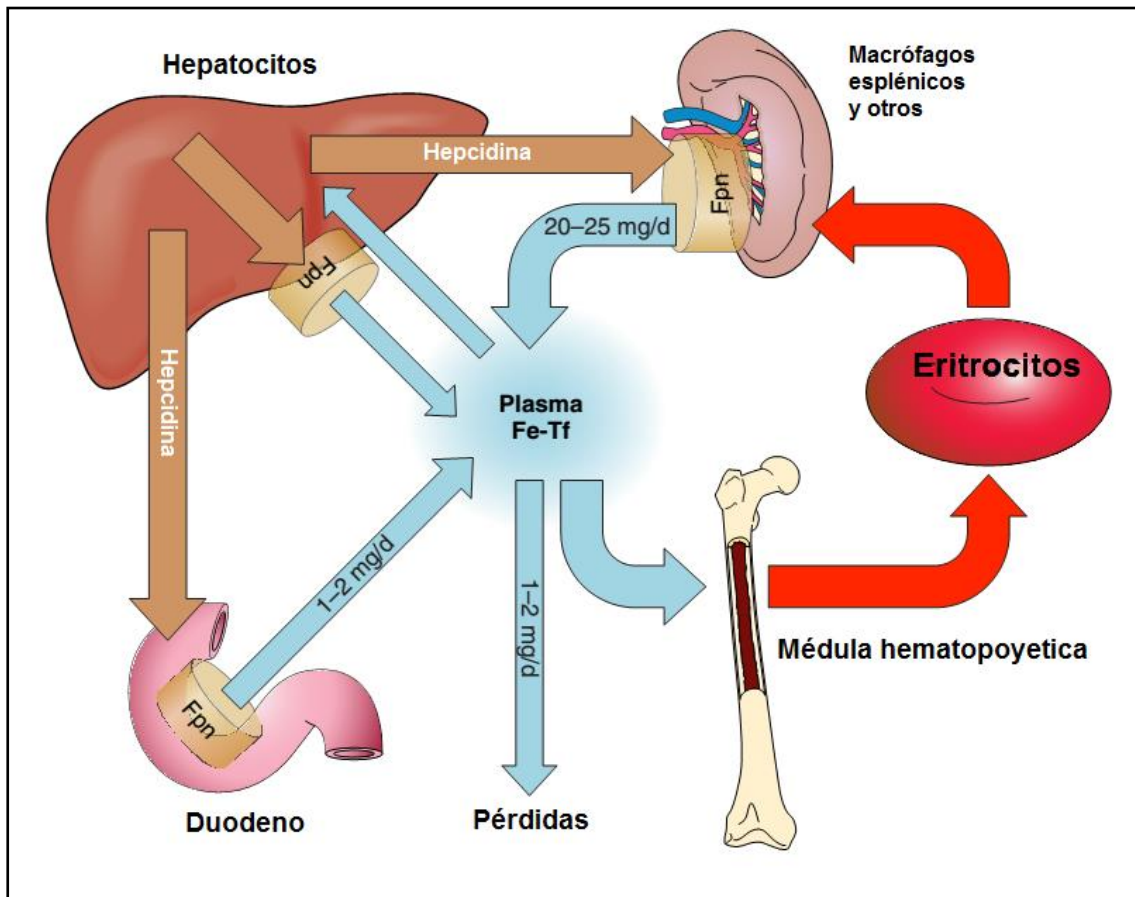


Figura nº 4: Flujos más importantes de hierro y su regulación por la hepcidina y ferroportina (modificado de Ganz, 2013).

La ferritina es una proteína esférica heteropolimérica compuesta por 24 subunidades de tipo pesado (H) o ligero (L). La ferritina citoplasmática puede almacenar grandes cantidades de hierro en su interior, pudiendo llegar hasta los 4500 átomos de Fe^{3+} aunque, en condiciones normales, contiene alrededor de 2500. Las subunidades H de la ferritina actúan como ferroxidasas que facilitan la conversión del Fe^{2+} citoplasmático a Fe^{3+} para su almacenamiento. Dependiendo del lugar donde se sintetice la ferritina, tendrán una composición variada de cadenas H y L. Así, si la ferritina se sintetiza en tejidos que almacenan hierro, tiene más cantidad de cadenas H para facilitar la captación del mismo (Theil, 2013). Una supresión dirigida de esta subunidad en intestino causa con un desorden en la regulación, cursando con un aumento de la absorción intestinal de hierro y una leve sobrecarga sistémica de hierro manifestada con un aumento del hierro sérico y hepático (Vanoaica y col., 2010). La capacidad de almacenar el hierro en la ferritina que tienen los eritrocitos puede ser necesaria para controlar el paso de este hierro a los exportadores basolaterales del mismo.

Una forma soluble de ferritina pobre en hierro se ha encontrado en plasma sanguíneo. Esta forma es un polímero de 24 subunidades compuesto principalmente por cadenas L, esta

forma procede principalmente de los macrófagos (Cohen y col., 2010). La concentración de ferritina sérica está correlacionada con el estatus del hierro en la mayoría pero no en todas las condiciones fisiológicas y patológicas (Jacobs y Worwood, 1975; Cook y col., 2003; Origa y col., 2007). Su concentración aumenta en los procesos inflamatorios y tumorales. También se observa su aumento en hepatocitopatías, insuficiencia renal e hipertiroidismo. En cambio, las únicas condiciones que pueden acompañarse de un descenso en la concentración de ferritina sérica, además de la deficiencia de hierro, son el hipotiroidismo y la deficiencia de ascorbato (vitamina C) (García y col., 2010).

Ferritina

Proteína que tiene forma de caja o jaula, está compuesta por heteropolímeros de subunidades H y L de ferritina codificadas en genes separados. El nivel de complejidad es fisiológicamente crítico porque diferentes tejidos, como bazo, hígado e intestino, sintetizan ferritinas con diferentes mezclas de subunidades. Esta distinta composición coincide con diferentes estructuras minerales (St Pierre y col., 1991) y con la accesibilidad del hierro a distintos agentes quelantes (Lal y col., 2013).

Los canales por donde entra el Fe^{2+} están formados por trímeros de 4 α -hélices, estos forman las paredes del canal y penetran hasta dentro de la ferritina. Se encuentran hasta 8 canales iónicos en las ferritinas cuya función es el almacenaje de hierro (Haldar y col., 2011; Tosha y col., 2012). Los sitios catalíticos están situados generalmente en el centro de cada subunidad con ligandos de metal con cada uno de los canales de 4 α -hélices (Chiancone y Ceci, 2010).

La actividad de la ferritina como proteína puede dividirse en dos: (1) entrada de Fe^{2+} , reacción redox catalítica con O_2 , formación de Fe^{3+}O (nucleación y crecimiento mineral) y (2) reducción/disolución del mineral con salida/quelación Fe^{2+} . Cada una de las actividades se produce en lugares diferentes de la proteína (la primera ocurre en el canal y el centro de la ferritina, el segundo en la superficie del mineral) y en tiempo (y espacio) diferentes (Leidgens y col., 2013; Theil, 2013).

En condiciones patológicas de sobrecarga de hierro, el hierro puede ser depositado en forma de partículas que se depositan en los tejidos. Esta forma de depósito de hierro se denomina hemosiderina. La hemosiderina puede ser un producto de degradación de la ferritina o puede ser formado de forma independiente. La hemosiderina tiene la cubierta proteica parcialmente degradada, lo que permite que se agreguen nuevos núcleos de hierro. Forma grupos especialmente grandes e insolubles en la célula y, en consecuencia, se visualizan fácilmente con la ayuda de un microscopio óptico como áreas de positividad del azul de Prusia

tras la tinción de cortes del tejido con ferrocianuro potásico en ácido (Allen y col., 2000; Lewis y col., 2008).

2.1.4.6. Eliminación

A pesar de que el hierro es uno de los elementos más abundantes en la corteza terrestre, la escasez es la condición predominante para la mayoría de los organismos que viven en la actualidad con una atmósfera rica en oxígeno. Este hecho está atribuido a la baja solubilidad de las formas oxidadas del hierro. Para el hombre, el hierro es ineficazmente absorbido en alimentos de origen vegetal, y esto se refleja en la alta prevalencia de deficiencia de hierro en las poblaciones humanas que consumen predominantemente dietas vegetarianas (Zimmermann y Hurrell, 2007). El hierro hemo de la carne, aves y pescado se absorbe de forma más eficiente (Fairweather-Tait, 2004), pero evolutivamente la disponibilidad de estos es reciente y social y geográficamente limitados. El hombre y otros mamíferos han evolucionado en un ambiente donde el factor común es la deficiencia de hierro, y esto se refleja en los mecanismos que poseen para la conservación eficiente y el reciclaje interno de hierro. Por ellos los procesos por los cuales se produce la eliminación de hierro son escasos (Ganz, 2013).

En condiciones fisiológicas se excreta 1-2 mg de hierro por día. Las pérdidas normales se producen por descamación de las células epiteliales del tubo digestivo (principalmente) y de la piel, el sudor y orina, la menstruación y la lactancia.

La pérdida de sangre en la menstruación normal es aproximadamente de 30 ml, pero puede llegar a 118 ml en algunas mujeres. En 100 ml de sangre hay 40-50 mg de hierro, y la pérdida menstrual excesiva suele ser causa de ferropenia en mujeres jóvenes que no tienen un aporte alimentario de hierro adecuado. Durante el embarazo se produce un considerable aumento del requerimiento de hierro. En el segundo y tercer trimestres de un embarazo normal la demanda de hierro asciende a 5 mg por día. Las alteraciones en el aporte alimentario o en la absorción intestinal, como causa de deficiencia de hierro, tienen especial importancia en la infancia y en las mujeres embarazadas (García y col., 2010).

En los adultos la causa más frecuente de ferropenia es la pérdida crónica de sangre. Las repetidas extracciones de sangre para análisis deben ser tenidas en cuenta como causa de ferropenia, especialmente en los niños. La pérdida de sangre al exterior no suele pasar desapercibida, pero en algunas circunstancias no se hace evidente y es necesario investigar la presencia de sangre oculta en heces. La hemosiderinuria, secundaria a hemólisis intravascular crónica (por ejemplo, hemoglobinuria paroxística nocturna), también debe ser investigada en el

laboratorio. En algunas condiciones patológicas, el complejo Fe-Tf se pierde con la orina por defectos en la reabsorción tubular de proteínas del filtrado glomerular. Los síndromes proteinúricos son consecuencia de la deficiencia funcional de cubilina, megalina o CIC-5 (*chloride channel 5*: canal de cloro 5). La cubilina y la megalina son receptores de proteínas, ubicados en el túbulo proximal renal para la reabsorción de nutrientes filtrados por el glomérulo. CIC-5 es un canal de iones cloruro necesario para la acidificación de las vesículas endocíticas y la liberación del hierro de la Tf (An-Sheng y Enns, 2009).

2.1.4.7. Regulación homeostática del balance de hierro

Un adulto requiere de aproximadamente 25 mg de hierro al día. La mayor parte de este hierro se obtiene a través del reciclaje de los eritrocitos senescentes por los macrófagos retículoendoteliales, mientras que se obtiene una pequeña cantidad (1-2 mg) a través de la absorción en la dieta. El hierro circula en plasma unido a transferrina. El excedente de hierro se almacena principalmente en los complejos de ferritina en el hígado y en los macrófagos retículoendoteliales. Para satisfacer la demanda de hierro, evitando el daño oxidativo que puede resultar del exceso de hierro libre, el equilibrio de hierro sistémico debe ser estrictamente regulado (Ganz y Nemeth, 2012).

2.1.4.7.1. Papel de la hepcidina en la regulación sistémica de hierro

La hepcidina, un péptido de 25 aminoácidos (2.7 kDa) producido por el hígado, es el regulador hormonal central del balance sistémico de hierro (Ganz y Nemeth, 2012). La hepcidina se une a la ferroportina, el exportador celular de hierro que está muy expresado en las células encargadas de transferir hierro al plasma, se incluyen en estas la membrana basolateral de los enterocitos y la membrana plasmática de los macrófagos. La hepcidina limita la entrada de hierro en plasma mediante la internalización y degradación de la ferroportina (Figura nº 5). En el mecanismo por el cual se produce la internalización participa la proteína JAK2 (*Janus Kinase 2*) fosforilando la ferroportina (Ward y Kaplan, 2012), sin embargo, estudios recientes sugieren que la señal más importante para que se produzca la endocitosis de la ferroportina inducida por la hepcidina es la ubiquitinación (Ross y col., 2012; Qiao y col., 2012). Una alta concentración persistente de hepcidina restringe la disponibilidad de hierro para la eritropoyesis. Por el contrario, la insuficiencia de hepcidina permite una absorción excesiva de hierro de la dieta, característica compartida por las formas recesivas de la hemocromatosis hereditaria debido a mutaciones en los genes HFE, receptor de la transferrina 2 (TFR2), hemojuvelina (HFE2, también conocido como HJV), y la hepcidina (HAMP). La expresión de hepcidina es

regulada en respuesta a la carga de hierro, la inflamación y la actividad eritropoyética (Ganz y Nemeth, 2012), por lo que estos estímulos modifican la cantidad y distribución de hierro en el organismo (Finberg, 2013).

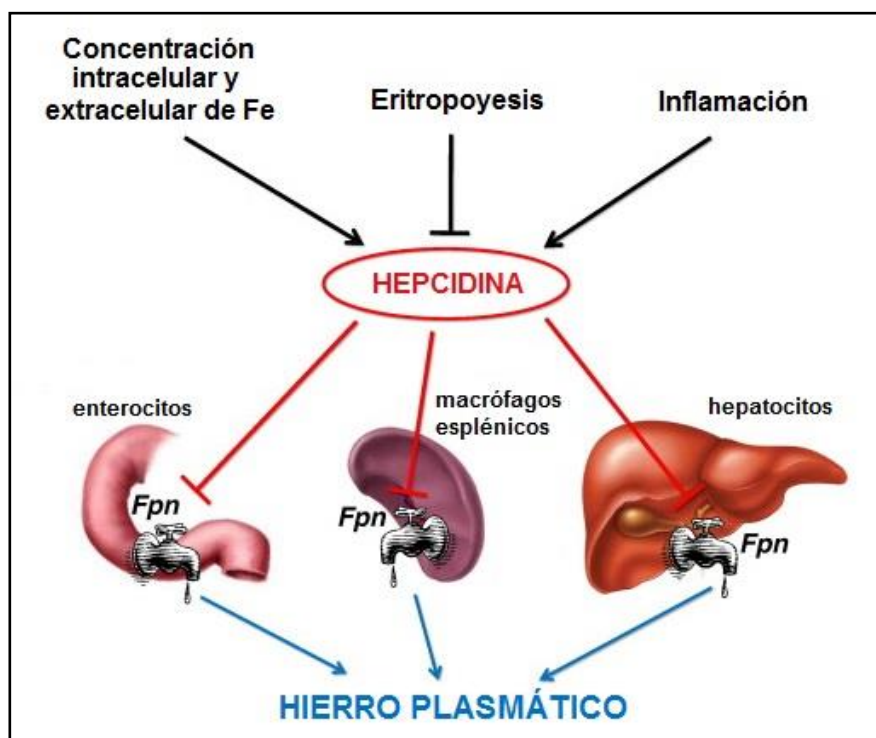


Figura nº 5: La hepcidina es el centro de la homeostasis sistémica de hierro (modificado de Ganz y Nemeth, 2012).

Producción de hepcidina mediada por BMP

La señal producida por las proteínas morfogénicas óseas (BMPs, *bone morphogenetic proteins*), pertenecientes a la familia de los factores de crecimiento transformantes (TGF), tiene un papel central en la regulación de la expresión de hepcidina en el hígado (Corradini y col., 2009; Ganz y Nemeth, 2012). La BMP se une a sus receptores BMP tipo I y II que están acoplados con una quinasa de serina/treonina, esta desencadena la fosforilación de las proteínas SMAD asociadas al receptor, que tras la unión con SMAD4 (mediador común), translocan al núcleo para modular la transcripción de genes. Las proteínas HJV, que tienen actividad glicosilfosfatidilinositol, actúan como correceptor de BMP. *In vitro*, son varias las BMPs que pueden inducir la transcripción de hepcidina, sin embargo, *in vivo*, la BMP6 es un ligando clave en la señalización de BMP. Bartnikas y col. (2012) demostraron que en ratones *knockout* para BMP6 y HJV, así como para los ratones con mutación específica del gen SMAD4, presentan una profunda supresión de la expresión de hepcidina y una sobrecarga sistémica de hierro, esto muestra la importancia esencial de estos genes en la regulación de la transcripción de hepcidina. El hallazgo de que los niveles hepáticos de ARNm codificante para BMP6 aumentan después de

la ingesta de hierro de la dieta, sugiere que existe un mecanismo autocrino o paracrino mediante el cual el hígado puede modular la producción de hepcidina en respuesta a la evolución de las reservas de hierro (Ganz y Nemeth, 2012). Sin embargo, los niveles de ARNm de BMP6 parece ser que no son modulados por cambios agudos en la saturación de la transferrina (Corradini y col., 2011).

Hay dos receptores de BMP tipo I, ALK2 y ALK3, se ha demostrado recientemente su desempeño, realizando funciones no redundantes clave en la señalización de la hepcidina. La caracterización fenotípica de ratones con interrupción específica en hígado de ALK2 o de ALK3 sugiere que ambos receptores tipo I para BMP contribuyen a las respuestas transcripcionales ante el hierro y las BMPs. Sin embargo, ALK3 parece desempeñar un papel más importante en la transcripción basal de hepcidina, cuando hay una deficiencia hepática de ALK3 provoca una supresión de la expresión de hepcidina y con ello a una sobrecarga de hierro sistémico mucho mayor (Steinbicker y col., 2011).

Regulación positiva de la ruta BMP

Los mecanismos por los que las proteínas de la hemocromatosis HFE y Tfr2 promueven la transcripción de hepcidina aún no se conocen con exactitud. En estudios previos en cultivos celulares y ratones transgénicos se ha sugerido un modelo de “detección de hierro” en el que el Tfr1, receptor unido a membrana que capta la Tf (unida a hierro), secuestra la HFE que interacciona con Tfr2. El Tfr2 es un homólogo del Tfr1 y tiene menor afinidad por la Tf, cuando aumenta la saturación de la transferrina por el aumento de hierro, el HFE se desplaza del Tfr1, permitiendo que interactúe con el Tfr2 para, así, promover la transcripción de hepcidina (Bartnikas y col., 2012; Chen y Enns, 2012) (Figura nº 6).

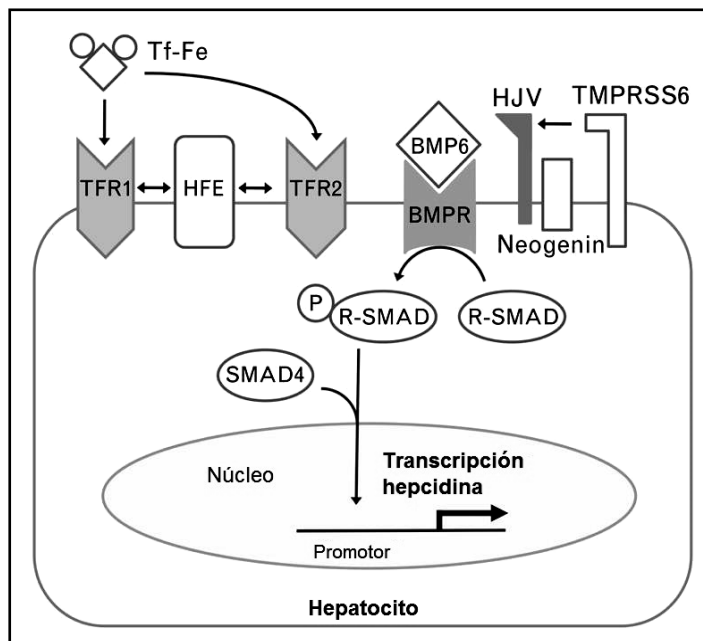


Figura nº 6: Modelo de regulación de hepcidina por el hierro (modificado de Finberg, 2013).

La unión de BMP6 al receptor de BMP tipo I y II (BMPR) en la membrana del hepatocito produce la fosforilación (P) de la proteína SMAD (R-SMAD), esta interacciona con el mediador SMAD4. El complejo R-SMAD/SMAD4 transloca al núcleo, donde se unen a elementos del promotor de la hepcidina que regula su transcripción. La HJV funciona como correceptor de BMP aumentando la señal por la vía de las BMPs. La proteína transmembrana con actividad serín-proteasa TMPRSS6 disminuye la señal por medio de la escisión de la HJV, este proceso está facilitado por la neogenin. El Tf-Fe unido a Tfr1 desplaza a HFE, que puede interactuar también con el Tfr2 para promover la transcripción de hepcidina.

Recientemente se ha mostrado que las proteínas HFE, TfR2 y HJV forman un complejo asociado a membrana en células de cáncer hepático, además, HJV se ha visto que compite con el TfR1 por la unión a HFE (D'Alessio y col., 2012). Estos hechos ayudan a explicar previos hallazgos como la HJV se requiere para la inducción de la expresión de hepcidina, ya que tanto en ratones transgénicos con sobreexpresión de HFE como en *knock-out* para HFE y TfR2 se presenta una inadecuada respuesta a la vía de señalización BMP (Corradini y col., 2011; Bartnikas y col., 2012). Sin embargo, aún queda por aclarar el mecanismo por el cual las proteínas dentro de este complejo podrían cooperar para promover la transcripción de hepcidina, y por lo tanto influir en la homeostasis del hierro. Los estudios realizados sobre ratones han demostrado que las proteínas HFE, TfR2, HJV y BMP6 son necesarias para lograr una respuesta adecuada de la hepcidina en dietas con sobrecarga aguda de hierro (Ramos y col., 2011). En ratones mutantes para HFE, TfR2 y HJV se ha visto que pueden aumentar los niveles de ARNm de BMP6 para paliar los efectos que provoca la dieta con sobrecarga de hierro crónica (Corradini y col., 2009; Ramos y col., 2011), mientras que los ratones con mutación en ambas, HFE y TfR2, muestran evidencias de una defectuosa regulación vía BMP6 ante el hierro (Corradini y col., 2011). Castoldi y col. (2011) han descubierto recientemente la presencia en hígado de una micro-ARN específico, miR-122, que es un regulador sistémico del balance de hierro y un modulador de los niveles de ARNm que codifican para la hepcidina (gen *Hamp*), HFE y HJV, esto añade un nivel adicional de complejidad en la biología de la regulación de hepcidina.

Regulación negativa de la ruta BMP

La *TMPRSS6* (también conocida como matriptasa-2, MT2), una serín proteasa transmembrana específica de hígado, es un regulador negativo de la expresión de hepcidina por la ruta de las BMPs. En mutantes humanos y ratones para *TMPRSS6* se presenta una alta concentración de hepcidina, deficiencia de hierro y anemia sistémica por restricción de hierro, esto concuerda con el hecho de que *in vitro* la *TMPRSS6* escinde la HJV de la membrana plasmática (Cau y col., 2010). Se ha visto que la *TMPRSS6* puede ser inducida por la hipoxia (Lakhal y col., 2011; Maurer y col., 2012) y por la dieta aguda pobre en hierro (Zhang y col., 2011), así como en las dietas con sobrecarga de hierro crónica y por inyección de BMP6 (Meynard y col., 2011); dado que estos procesos son muy discordantes entre sí a la hora de regular la hepcidina, se necesita seguir investigando para conseguir una mejor comprensión de la regulación de la actividad catalítica *in vivo* de la *TMPRSS6*. La neogenin (Figura 6), una proteína que se expresa de forma ubicua se sabe que interactúa con la HJV, puede relacionarse con *TMPRSS6* para facilitar la escisión de HJV (Enns y col., 2012), lo que sugiere que neogenin tiene un rol de cooperación en la represión de la hepcidina. En el estudio realizado por

Lee y col. (2010) se observa que en ratones con deficiencia en la supresión de la hepcidina por neogenin presentan una grave sobrecarga de hierro. Dado que estos descubrimientos son muy recientes, aún quedan que aclarar matices de la relación que existe entre neogenin y la ruta de las BMPs.

Además de la *TMPRSS6*, se han sugerido otras moléculas que regulan negativamente la síntesis de hepcidina por la vía de las BMPs. La “HJV soluble”, un producto generado de la escisión de HJV generado por la actividad convertasa de proteínas (distintas de la generada de *TMPRSS6*) que circula por sangre, se ha propuesto para actuar como señuelo que secuestra BMPs. La liberación de HJV soluble en músculo esquelético, donde se genera una considerable cantidad de HJV extrahepático, se sugiere como un posible modulador de la expresión de hepcidina hepática en respuesta a las necesidades metabólicas del músculo (Corradini y col., 2009). Sin embargo, recientes estudios con ratones a los que se les ha suprimido el HJV muscular no reveló el papel de la HJV soluble en la expresión hepática de hepcidina o el equilibrio sistémico de hierro (Gkouvatsos col., 2011), incluso bajo condiciones de dietas pobres o ricas en hierro (Chen y col., 2011). Este campo de estudio es muy reciente y la investigación que se está realizando intentará esclarecer las implicaciones de estas partículas en la regulación homeostática de hierro.

Regulación de la hepcidina en la respuesta inflamatoria

La expresión de hepcidina está inducida por estímulos inflamatorios. Al restringir la disponibilidad de hierro para la eritropoyesis, el aumento de la hepcidina en sangre por lo tanto contribuye a la anemia en estados adquiridos como infecciones, afecciones inflamatorias y enfermedades malignas (Drakesmith y Prentice, 2012; Ganz y Nemeth, 2012; Sun y col., 2012). El mecanismo por el cual la hepcidina es inducida por citoquinas es a través de la IL-6, que implica la cascada de señalización STAT3 (Figura nº 7). Existen cada vez más evidencias que sugieren que la respuesta inflamatoria de la hepcidina requiere de la vía de activación cooperativa de las BMPs, como se propuso inicialmente por Wang y col. (2005), donde estudiaron ratones con disrupción específica de *SMAD4*, se observó que no había expresión de hepcidina tras la administración de IL-6. En ratones *knock-out* para *HFE* y *TfR2*, que exhiben deficiencias en la respuesta de la ruta de las BMPs (Corradini y col., 2011), pueden inducir la hepcidina hepática después del tratamiento con lipopolisacárido (LPS), componente mayoritario de la pared bacteriana.

Tanto citoquinas asociadas a la respuesta inflamatoria, como moléculas derivadas de patógenos y patógenos enteros se han relacionado con la regulación de la hepcidina, lo que sugiere la existencia de la relación entre la disponibilidad de hierro y de la respuesta infecciosa al huésped (Drakesmith y Prentice, 2012). En un estudio reciente realizado por Armitage y col. (2011) se investigaron varios estímulos infecciosos y de la respuesta inmune innata en la regulación de la expresión de hepcidina; la IL-22, una citoquina que está implicada en la respuesta inmune a infecciones extracelulares, se vio que regula positivamente la síntesis de hepcidina en células de hepatoma a

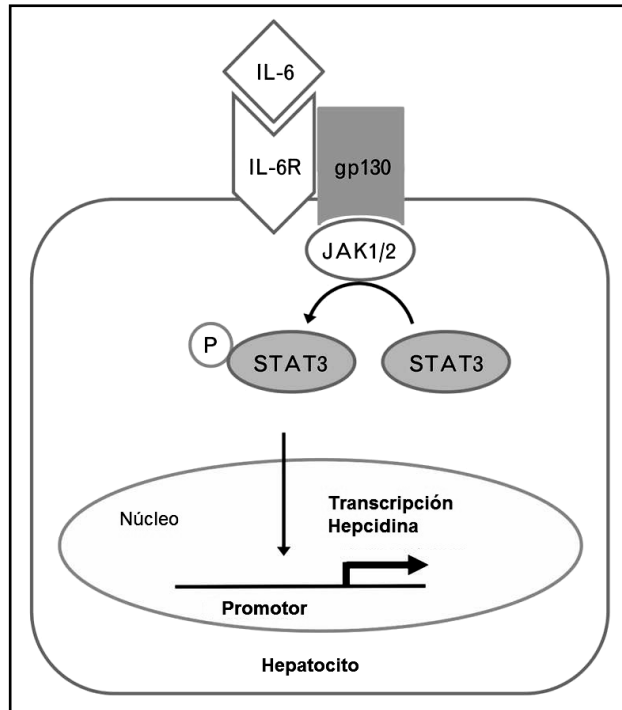


Figura n° 7: Modelo de la regulación inflamatoria de la hepcidina (modificado de Finberg, 2013).

En la señal inflamatoria, la citoquina IL-6 se une al complejo receptor (IL-6R/gp130), en la parte interna de la membrana del hepatocito se produce la fosforilación del factor de transcripción STAT3 por medio de la tirosin quinasa JAK1/2. STAT3 activo tranloca al núcleo, donde se une al promotor específico de hepcidina para aumentar su expresión.

través de la vía STAT3 con independencia de IL-6. En el mismo estudio también se halló que en la infección intravenosa con *Candida albicans* y la infección intranasal con virus de influenza A provocaba en ratones una respuesta hipoferrémica inducida por una marcada inducción de síntesis de ARNm de hepcidina en el hígado, probablemente mediada por la ruta de señalización STAT3. En un reciente estudio *in vitro* sugiere que la liberación de peróxido de hidrógeno por parte de las células inflamatorias también podría contribuir a la inducción del aumento de la hepcidina a través de STAT3 (Millonig y col., 2012).

Regulación de la hepcidina por la eritropoyesis

La producción de hepcidina está suprimida cuando aumenta la eritropoyetina (Ganz y Nemeth, 2012). El tratamiento con eritropoyetina reduce los niveles de hepcidina, por la capacidad innata eritropoyética. Se ha sugerido que son unos factores que liberan los precursores eritroides al plasma los que median la supresión de la síntesis de hepcidina. Dicha supresión contribuye con la adquisición de hierro, tal y como se observa en las anemias que presentan una eritropoyesis ineficaz, mejorando el paso del hierro a plasma. Tanto GDF15 como TWSG1, miembros de la familia de TGF- β (*Transforming growth factor*, factor de crecimiento

transformante) liberados por precursores eritroides, son los propuestos como posibles factores que contribuyen en estos trastornos bloqueando la síntesis de hepcidina (Ginzburg y Rivella, 2011). Este tema es muy reciente y aún se tiene que resolver si GDF15 y TWSG1 son o no marcadores de una ineficaz eritropoyesis o median la supresión de hepcidina *in vivo*. Los ensayos realizados por Casanovas y col. (2013) sobre ratones con delección de GDF15 no arrojan luz al tema, ya que muestran parámetros hematológicos de balance de hierro normales y no presentan ningún defecto en la supresión de la síntesis de hepcidina, hay que esperar futuros estudios que arrojen luz sobre la función de estos factores.

Aunque ya se conocía que la exposición a hipoxia bajo condiciones de laboratorio suprime la hepcidina en cultivos y ratones, no ha sido hasta 2011 que se ha podido estudiar el efecto de la exposición aguda a hipoxia en altitud elevada de seres humanos sanos. En el estudio de Piperno y col. (2011), el análisis de parámetros hematológicos sugirió que la supresión de hepcidina observada en respuesta a la altitud podría estar mediada por el propio hierro o por la cinética del uso del mismo en condiciones de hipoxia. Sin embargo, en el estudio realizado posteriormente por Talbot y col. (2012), en el que a los sujetos de estudio se les sometió a un ascenso más rápido y, además, los parámetros hematológicos se siguieron con más frecuencia tras la subida inicial, se observó que la supresión de hepcidina se produjo antes que los cambios en los índices de disponibilidad de hierro.

La supresión de hepcidina bajo condiciones de hipoxia se ha sugerido que está mediada por el factor inducible por hipoxia (HIF), es un factor de transcripción heterodimérico que modula la respuesta transcripcional a la hipoxia, incluyendo la inducción de eritropoyetina. En condiciones de normoxia, se produce la unión dependiente de hierro y oxígeno de la proteína de *von Hippel Lindau* (VHL) y la posterior hidroxilación en el proteosoma por medio de la prolil-hidroxilasa de la subunidad HIF- α . En condiciones de hipoxia o en depleción de hierro, sin embargo, la subunidad HIF- α se estabiliza y forma un dímero junto con la subunidad HIF- β para así unirse a los promotores de los genes diana. Aunque se ha propuesto que la subunidad HIF-1 α como el factor que suprime la transcripción de hepcidina por acción directa sobre su promotor, aún no está del todo claro (Hintze y McClung, 2011).

Estudios recientes, utilizando modelos de ratones modificados genéticamente, apoyan la hipótesis de que el HIF modula la transcripción de hepcidina de forma indirecta a través de la eritropoyesis inducida por eritropoyetina. En ratones, la inactivación global aguda de VHL dio como resultado un aumento en la eritropoyetina y una marcada supresión de hepcidina, esto no se ha observado en ratones deficientes de VHL y que también carecían de HIF-1 α y HIF-2 α . Los ratones con inactivación global aguda para VHL y EPO (gen que codifica para la eritropoyetina) no mostraban la supresión de hepcidina, pero podían, sin embargo, suprimirla en

respuesta a la inyección de eritropoyetina (Liu y col., 2012). Otro estudio realizado mostró que el HIF-2 α estable constitutivo en hepatocitos (realizado por medio de la eliminación específica conjunta del VHL y HIF-1 α) induce la producción de eritropoyetina y la supresión de hepcidina, y que esto se podía revertir por administración de anticuerpos que neutralizan eritropoyetina (Mastrogiannaki y col., 2012). Aunque la capacidad del HIF para suprimir la acción de hepcidina de una forma indirecta a través de la acción de la eritropoyetina, el HIF puede contribuir en la supresión local de hepcidina en el marco de otros trastornos fisiopatológicos, tal como describen Anderson y col. (2012) en sus ensayos con ratones tras la ingestión de alcohol.

Otros factores que regulan la expresión de hepcidina

En estudios recientes han ido apareciendo una variedad de factores y estímulos que pueden modular la expresión de hepcidina bajo ciertos estados fisiológicos o fisiopatológicos. Algunos, como los estrógenos (Hou y col., 2012; Ikeda y col., 2012; Yang y col., 2012), la hormona del crecimiento (Troutt y col., 2012), y la glucosa (Aigner y col., 2013), sugieren unos interesantes vínculos entre la regulación de la hepcidina y el sistema endocrino. Además, los factores de crecimiento hepático y epidérmico, dos mediadores bien caracterizados de la regeneración hepática después de una lesión, se ha visto que suprimen la expresión de hepcidina, este hallazgo puede tener una gran importancia en las hepatopatías crónicas y la sobrecarga de hierro hepático (Goodnough y col., 2012). El estrés del retículo endoplasmático, un estado celular que surge por la acumulación de proteínas plegadas incorrectamente, puede modular la expresión de hepcidina por medio de la acción de factores de transcripción, entre los que se incluyen CHOP, C/EBP α y CREBH; este hecho se ha postulado como un posible modulador de la homeostasis del hierro bajo ciertas infecciones virales (Oliveira y col., 2011). El tratamiento con heparina exógena puede reducir los niveles séricos de hepcidina en el hombre, posiblemente a través del secuestro de las BMPs (Poli y col., 2011).

Como conclusión, se puede decir que la investigación de los mecanismos moleculares que subyacen a la regulación de la hepcidina por los depósitos de hierro, la inflamación y la actividad eritropoyética han mostrado una gran complejidad biológica. No obstante, aún quedan muchas preguntas clave sobre los mecanismos que regulan la hepcidina y con ello la homeostasis del hierro.

2.1.5. Deficiencia de hierro

Según la OMS/WHO la deficiencia de hierro es el trastorno nutricional más común y extendido en el mundo. Además de afectar a un gran número de niños y mujeres en los países en desarrollo, es la única deficiencia de nutrientes que también es significativamente más frecuente en los países industrializados. Las cifras que se manejan son alarmantes: 2000 millones de personas (más del 30% de la población mundial) son anémicas, muchas debido a la deficiencia de hierro, y en zonas de pocos recursos, esto se ve a menudo aumentado por las enfermedades infecciosas. La malaria, el VIH/SIDA, la anquilostomiasis, la esquistosomiasis y otras afecciones como la tuberculosis son de gran importancia a la hora de valorar la alta prevalencia de anemia en algunas áreas.

Para poder dar una correcta definición de anemia debemos utilizar la concentración plasmática de hemoglobina (Hb), y rechazar otros parámetros como por ejemplo el hematocrito, el hierro sérico o la saturación de la transferrina. Los puntos de corte empleados son específicos de género y se basan en la distribución estadística de las cifras de Hb de una población “aparentemente” sana. En función de la muestra empleada para obtener dichos puntos de corte disponemos de diferentes criterios diagnósticos de los cuales, los más conocidos y utilizados son los de la OMS/WHO que datan de 1958, aunque existen otros (Tabla nº 4). En los criterios de anemia más recientes obtenidos de bases de datos americanas como NHANES III (the third US National Health and Nutrition Examination Survey), Scripps-Kaiser y Mayo Clinic las cifras de Hb son discretamente más elevadas que en los de la OMS/WHO (Urrutia y col., 2010).

Tabla nº 4: Criterios diagnósticos de anemia (g/dl) (modificado de Steensma y Tefferi, 2007).

	Hombres	Mujeres
OMS/WHO (1958)	13.0	12.0
NHANES III (1994)	13.8	12.2
Scripps-Kaiser (2006)	13.7	12.2
Mayo Clinic (2007)	13.2	12.0

En estudios recientes sobre epidemiología, se estima que a nivel mundial más de 2000 millones de personas están en riesgo por deficiencia en vitamina A, yodo y/o hierro, a pesar del esfuerzo que se está realizando en materia de prevención y control de estas deficiencias. La prevalencia es especialmente alta en el sudeste asiático y África subsahariana (Bhutta y Salam, 2012).

La anemia, una de las principales preocupaciones nutricionales a nivel mundial, es causada no sólo por la deficiencia de hierro, sino que también se asocia con otras deficiencias de

nutrientes, como la vitamina A, B6, B12, riboflavina y ácido fólico. Además de las deficiencias nutricionales, las infecciones en general, enfermedades crónicas, la malaria y la infección de helmintos también conducen a la anemia. En los países desarrollados, la deficiencia de hierro es la causa principal de anemia, mientras que en los países en desarrollo (aparte de hierro), la vitamina A, zinc y ácido fólico son también factores nutricionales de gran importancia (Morais y col., 1993; Olivares y col., 1999; Bhutta y Salam, 2012).

2.1.5.1. Causas de la anemia ferropénica

La anemia por falta de hierro surge cuando el equilibrio de la ingesta de hierro, las reservas del mismo, y la pérdida corporal son insuficientes para apoyar plenamente la producción de eritrocitos (Miller, 2013). A continuación se explican las causas más comunes de la anemia ferropénica.

Pérdida de sangre

En cada mililitro de concentrado de hematíes (en torno a 2.5 ml de sangre total) contiene sobre 1.0 mg de hierro. Cada día, se absorbe en la dieta 1.0 mg de hierro y 20 mg de este de los eritrocitos senescentes, que quedan disponibles para su uso en la eritropoyesis. Una vez que las reservas de hierro se agotan, el hierro de la dieta y el corpuscular no son suficientes para compensar la pérdida aguda de sangre (Miller, 2013).

En todos los casos de deficiencia de hierro, la pérdida de sangre es una de las causas que más se deben tener en cuenta. La hemorragia en sí es el mecanismo más común de pérdida aguda de hierro y anemia. Las hemorragias disminuyen la tasa de glóbulos rojos, bajando el suministro de hierro para la eritropoyesis, y, por consiguiente, aumenta la demanda de hierro. La pérdida crónica de sangre de la menstruación o la anquilostomiasis son los procesos que tienen mayor impacto en todo el mundo. Sobre 2 ml de sangre se pierden todos los días en las heces del adulto sano (Ahlquist y col., 1985). La pérdida de sangre oculta en heces debe detectarse a partir de pruebas específicas. El sangrado en el tracto intestinal puede ocurrir a lo largo de múltiples sitios del mismo, aunque lo más normal es que sea en el tracto intestinal superior e inferior (Lanas y col., 2009). Entre las causas de pérdida de sangre que suelen ser olvidadas por los pacientes se encuentran la donación de sangre y las hemorragias nasales. En la hemólisis intravascular con hemoglobinuria, como ocurre en la malaria, se produce una pérdida de hierro con ausencia de hemorragia. Después de un esfuerzo físico crónico, el hierro baja

significativamente ya que se pierde por el sudor y puede contribuir al estado de deficiencia (Reinke y col., 2012).

Deficiencia de hierro materno-fetal

Los requerimientos de hierro son mayores cuando se aproxima el momento del nacimiento. Durante el embarazo, se estima que se requiere alrededor de 1200 mg de hierro desde la concepción hasta el parto (Lee y Okam, 2011). Tanto la ingesta como las reservas de la madre deben satisfacer las necesidades del feto, y también las pérdidas que se producen durante el parto. Además, la masa eritrocitaria materna debería aumentar durante el embarazo de 350 a 450 ml. Por el contrario, las mujeres embarazadas sin suplementación de hierro sólo aumentan su masa corpuscular de 180 a 250 ml (Pedersen y Milman, 2003). La explicación de esta deficiencia de hierro es que las demandas fetales del mismo tienen prioridad sobre la masa de glóbulos rojos de la madre. Después del parto, el hierro se pierde en forma de lactoferrina en la leche materna. Estas pérdidas están compensadas con la ausencia de menstruación en las mujeres en período de lactancia (Miller, 2013).

La anemia por deficiencia de hierro materna durante el embarazo y el período perinatal tiene efectos devastadores sobre la madre y el niño. Además de los efectos directos de la anemia, se produce una disminución de la maduración del cerebro fetal, defectos cognitivos del niño, y la depresión materna son algunas de las consecuencias de la deficiencia de hierro. Por tanto, es importante señalar que la deficiencia de hierro sin tratar en las mujeres embarazadas se pasará al bebé. Es más, si esta anemia de la madre al hijo no es tratada durante la infancia y adolescencia, la anemia y los defectos cognitivos asociados con el hierro pueden ser pasados entre generaciones como si de un rasgo genético se tratara (Black y col., 2011).

Malaria

La anemia por deficiencia de hierro y la malaria coexisten en la mayoría de las regiones tropicales del mundo. El paludismo contribuye a la anemia por deficiencia de hierro ya que causa hemólisis intravascular con la consiguiente pérdida de hierro de la hemoglobina en orina. Este síntoma fue descrito en 1898 como las fiebres de aguas negras (Connolly, 1898). La malaria también provoca una respuesta inmune que suprime la eritropoyetina, así como efectos directos sobre la eritropoyesis (Skorokhod y col., 2010). El huésped también aumenta los niveles de hepcidina para protegerse frente a la malaria en la fase hepática. Por supuesto, el aumento de hepcidina restringe el hierro y puede retrasar la recuperación de los niveles de glóbulos rojos (Portugal y col., 2011).

Anquilostomiasis

Al igual que la anemia por deficiencia de hierro, la anquilostomiasis afecta a cientos de millones de seres humanos en todo el mundo (Bungiro y Cappello, 2011). En estudios epidemiológicos realizados se ha visto que existe una superposición considerable de las regiones afectadas por malaria y anquilostomiasis (Figura nº 8). A nivel mundial, existen dos especies de anquilostomas que infectan a los seres humanos. Ambos se encuentran en las regiones tropicales ya que el parásito requiere de tierra húmeda para su supervivencia. El parásito adulto se introduce en la tierra vía fecal en las regiones donde no hay un buen saneamiento. Desde el suelo, el parásito accede al duodeno de un nuevo huésped por vía oral directamente, o indirectamente a través de la piel. Una vez en el intestino, el anquilostoma puede conservarse durante varios años, ya que libera los huevos en las heces. El anquilostoma se alimenta de 0.3-0.5 ml de sangre diariamente extravasada de la mucosa intestinal. Los pacientes fuertemente parasitados simplemente son incapaces de mantener las reservas de hierro y desarrollar anemia (Sminth y Brooker, 2010). Incluso sin suplementos de hierro adicionales, los antihelmínticos pueden revertir la anemia por deficiencia de hierro (Radhika y col., 2011).

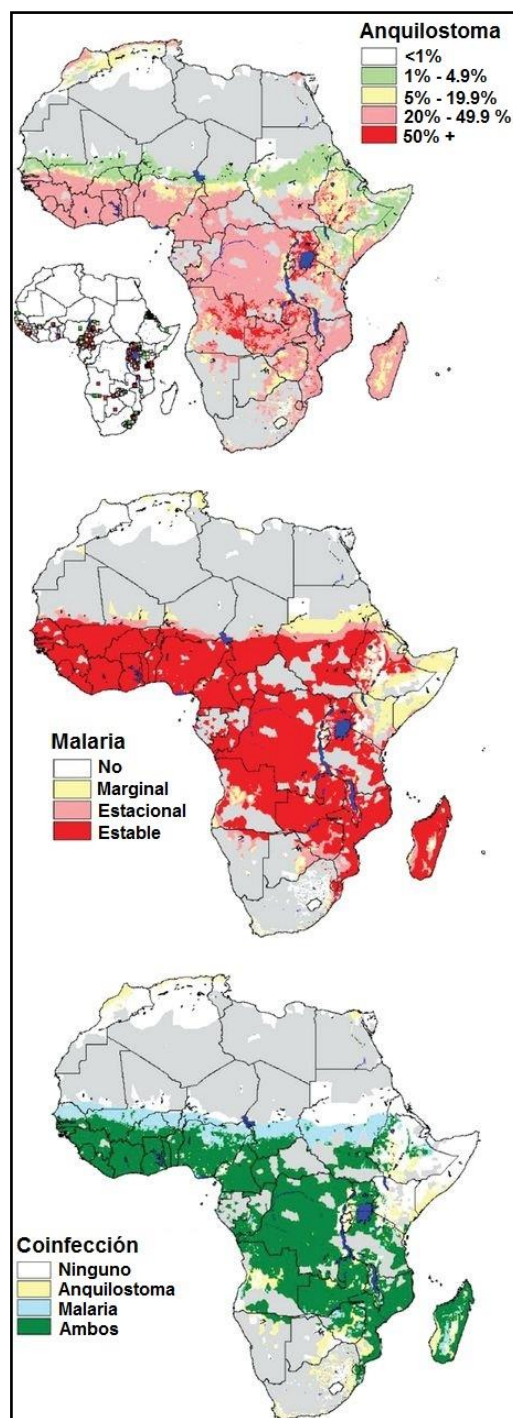


Figura nº 8: Distribución de anquilostoma y *Plasmodium falciparum* en África, 2006 (modificado de Miller, 2013).

Dieta y malabsorción de hierro

La economía, en general, determina el nivel de nutrición en todo el mundo. La dieta, por sí misma, con frecuencia causa anemia por deficiencia de hierro con ausencia de desnutrición o de forma simultánea. Una dieta vegetariana es generalmente suficiente para prevenir la anemia a

pesar de que las reservas de hierro pueden ser bajas. La dieta adquiere mayor relevancia cuando las reservas de hierro caen, o la anemia ya está instaurada, y el paciente requiere de una absorción adicional de hierro para la recuperación. Estas situaciones ocurren, como se ha expuesto antes, por la pérdida de sangre, por el crecimiento rápido o por la parasitación. En estos casos, los suplementos dietarios de hierro se vuelven críticos para mantener la disponibilidad de este. Además del contenido de hierro en sí, la biodisponibilidad del mismo depende de los componentes de la dieta (Sharp, 2010). El hierro en forma de hemo es más biodisponible, así las dietas que contiene carne son más beneficiosas (López y Martos, 2004). La vitamina C mejora la biodisponibilidad de hierro en la dieta, así como evitar tomar té u otras sustancias quelantes de hierro (Thankachan y col., 2008).

Además de los componentes de la dieta, el intestino debe ser capaz de absorber el hierro para prevenir o tratar la anemia por deficiencia de hierro. La absorción de hierro inorgánico requiere de múltiples mecanismos de entrada y salida de las células epiteliales del duodeno y el yeyuno. En los casos en los que se sospecha malabsorción, una simple prueba de absorción de hierro vía oral puede prevenir o dirigir los exámenes más profundos (Alleyne y col., 2008). Si aumenta la expresión de hepcidina del paciente, el hierro inorgánico de la dieta no se absorbe de forma óptima. Ya que el hierro es atrapado en las células epiteliales sin pasar a sangre, y estas por descamación se pierden por las heces (Anderson y col., 2009). Por lo tanto, las infecciones, la inflamación u otros factores que regulan la expresión de hepcidina inhiben la absorción de hierro no hemo aunque haya una alta biodisponibilidad en la dieta. Otras enfermedades, como la infección por helicobacter (Vitale y col., 2011), la cirugía bariátrica (Shankar y col., 2010), o la disminución de la gastrina (Kovac y col., 2011) pueden inhibir la absorción de hierro. Por último, la enfermedad celíaca es una causa común de anemia debido a la baja absorción de hierro desde el intestino (Presutti y col., 2007).

2.1.5.2. Consecuencias de la ferropdeficiencia

La anemia por deficiencia de hierro rara vez causa la muerte, pero el impacto en la salud humana es significativo (Miller, 2013).

La deficiencia de hierro es una condición en la que hay insuficiencia del mismo para mantener la función normal de los tejidos y órganos. Se pueden diferenciar tres etapas en el desarrollo de la misma: (1) agotamiento de las reservas de hierro, (2) disminución del hierro disponible para la eritropoyesis y (3) agotamiento de las proteínas y enzimas que contienen y funcionan con hierro (Tussing-Humphreys y col., 2012).

El papel biológico mejor descrito del hierro viene a través de su unión a la Hb. Estudios clásicos en humanos demuestran claramente que a medida que disminuyen los niveles de Hb, se reduce la capacidad de transporte de oxígeno, lo que resulta en una disminución del consumo máximo de oxígeno, que afecta a la capacidad de trabajo aeróbico y al rendimiento físico (Woodson y col., 1978; Dallman, 1986; McClung y Murray-Kolb, 2013).

Al igual que la Hb, el hierro también está en la mioglobina, la proteína que se encarga del transporte y almacenamiento de oxígeno en el músculo. Son pocos los estudios en humanos que demuestran los resultados en el rendimiento con baja concentración de mioglobina, sin embargo, en modelos animales se ha visto que se ve disminuida la cantidad de mioglobina del músculo esquelético con condiciones de ferropenia (Finch y col., 1976; McKay y col., 1983). En el estudio de Finch y col. (1976), la disminución de la mioglobina se asocia con la disminución del rendimiento, se observó que los animales sometidos a una carrera en cinta rodante disminuían drásticamente su rendimiento, incluso después de la restauración de la Hb.

Es importante tener en cuenta que la anemia por deficiencia de hierro afecta tanto a la capacidad de transporte de oxígeno como a la capacidad oxidativa de los tejidos, la deficiencia de hierro afecta sólo a la capacidad oxidativa del tejido (Haas y Brownlie, 2001). Los efectos de la deficiencia de hierro en la capacidad oxidativa de los tejidos se producen a través de la disminución en deshidrogenasas, que actúan en la oxidación de sustratos tales como al acetil-CoA en la mitocondria y citocromos, que participan en la transferencia de electrones. Aunque existe un número muy limitado de estudios en humanos que reflejen los efectos fisiológicos de la deficiencia de hierro en el rendimiento físico (Gaffney-Stomberg y McClung, 2012), existen estudios más recientes que utilizan mujeres premenopáusicas voluntarias y han demostrado que hay efectos sobre la resistencia (Zhu y Haas, 1997; Hinton y col., 2000; Brownlie y col., 2002; DellaValle y Haas, 2011, 2012), la adaptación aeróbica y respuesta metabólica (Zhu y Haas, 1998; Brownlie y col., 2002) y la fatiga muscular (Brutsaert y col., 2003; McClung y Murray-Kolb, 2013).

Existe una distribución heterogénea del hierro en la mayoría de los cerebros de las distintas especies estudiadas hasta la fecha (Aoki y col., 1989; Benkovic y Connor, 1993; Erikson y col., 1997; Pinero y col., 2000), con la concentración más alta a nivel de la materia gris, los núcleos cerebrales profundos, el núcleo rojo, el núcleo *accumbens*, y en varias porciones del hipocampo (Hill, 1988; Aoki y col., 1989; Roskams y Connor, 1994). El hierro cerebral se encuentra sobre todo en la microglía, así como en los oligodendrocitos (Connor y col., 1987; Hill, 1988; Larkin y Rao, 1990; Mash y col., 1990; Beard y col., 1993). La acumulación de hierro en distintas regiones del cerebro es una función que se presenta en la etapa de desarrollo cerebral, y no todas las zonas del mismo parecen ser igualmente sensibles a

los cambios en el estado sistémico del hierro (Elwood y Hughes, 1970; McClung y Murray-Kolb, 2013).

Al igual que en otros órganos, el cerebro obtiene hierro principalmente a través de los receptores de la transferrina. La deficiencia de hierro no parece aumentar la expresión de este en las células endoteliales de la barrera hematoencefálica (Moos y col., 1988), pero sí que aumenta la tasa de ciclos de los endosomas, aumentando de este modo la tasa de absorción de hierro (Crichton y col., 2011).

Hay evidencias de que para el óptimo desarrollo y funcionamiento del cerebro se requieren unos niveles adecuados de hierro cerebral (Beard y Connor, 2003). El hierro es necesario para la adecuada mielinización cerebral y es también un cofactor para numerosas enzimas necesarias para la síntesis de neurotransmisores, tales como triptófano y la tirosina hidroxilasa, así como para su catabolismo (McClung y Murray-Kolb, 2013).

Numerosos estudios a lo largo de estos últimos 40 años (Elwood y Hughes, 1970; Foley y col., 1986; Groner y col., 1986; Kretsch y col., 1998; Fordy y Benton, 1994; Beard y col., 2005; Murray-Kolb y Beard, 2007; Khedr y col., 2008; Blanton y col., 2012) señalan que existe una relación directa entre los niveles de hierro y el rendimiento cognitivo (memoria, atención, aprendizaje, habilidad espacial y funcionamiento ejecutivo).

También se han descrito defectos afectivos como consecuencia de una deficiencia de hierro, los pacientes informan de síntomas tales como irritabilidad, apatía, fatiga, depresión y dificultad para concentrarse (Duport y col., 2003; Ando y col., 2006; Grondin y col., 2008; McClung y col., 2009; Albacar y col., 2011).

Por lo general, la anemia es de instauración lenta y progresiva, por lo que suele ser bien tolerada, sobre todo en pacientes jóvenes, y muchas veces es un hallazgo casual. Existen otros síntomas que generalmente sólo aparecen ante un proceso muy prolongado y que, actualmente, sólo se ven raramente: pica (deseo irresistible de comer o lamer sustancias no nutritivas, como tierra o tiza, específica de la ferropenia) y pagofagia (deseo compulsivo de comer hielo), trastorno tróficos epiteliales (caída del cabello, coiloniquia, glositis atrófica, estomatitis angular), disfagia (síndromes de Plummer-Vinson o de Paterson-Kelly), escleróticas azules, “beeturia” (orina roja tras la ingesta de remolacha), infecciones de repetición, etc. (González de Villambrosia y col., 2012).

Según González de Villambrosia y col. (2012) la deficiencia de hierro provoca los siguientes cambios en los índices hematológicos:

- Ferritina sérica: Es un excelente indicador de la reserva de hierro en adultos sanos, habiendo sustituido al estudio de médula ósea como prueba estándar para el diagnóstico de déficit de hierro. La concentración de ferritina varía entre los 40 y 200 ng/ml en los sujetos sanos, y se encuentra disminuida cuando existe un déficit de hierro, no existe otra causa de tal déficit. Hay que tener en cuenta que la ferritina sérica es un reactante de fase aguda, y puede verse incrementado en situaciones de infección, inflamación y cáncer.
- Sideremia, capacidad total de fijación de hierro e índice de saturación de la transferrina: En los estados de déficit de hierro, la sideremia está reducida y los niveles de Tf, generalmente valorados por la CTFH (TIBC), están elevados. Por lo tanto, el índice de saturación de la transferrina (sideremia/CTFH x 100) estará muy disminuido.
- Receptor soluble de la transferrina: El receptor soluble de la transferrina (sTfR) proporciona una medida cuantitativa del total de la actividad eritropoyética, dado que su concentración en suero es directamente proporcional a la actividad eritropoyética e inversamente proporcional a la disponibilidad del hierro en el tejido. Por tanto, los pacientes con deficiencia de hierro tienen incrementados los niveles.
- Índices eritrocitarios: Principalmente, el volumen corpuscular medio (VCM) y la hemoglobina corpuscular media (HCM) que estarán disminuidos, y el índice de amplitud de distribución eritrocitaria (ADE) que estará elevado. El análisis morfológico de sangre periférica confirma la anisocitosis, la microcitosis e hipocromía.

2.1.5.3. Tratamiento de la anemia ferropénica

El tratamiento de la anemia ferropénica incluye el tratamiento etiológico, que es fundamental, el tratamiento sustitutivo con hierro y, en caso de anemia grave, la posibilidad de corregir rápidamente la anemia mediante la transfusión de hematíes. En este último aspecto, hay que destacar que la indicación no la marca la cifra de hemoglobina sino la clínica del paciente. Es muy frecuente que pacientes jóvenes, especialmente mujeres, se presenten con cifras muy bajas de hemoglobina (por ejemplo de 5 a 8 g/dl) pero con una tolerancia clínica buena, y en estos casos no está indicada la transfusión. Sí está indicada en casos con inestabilidad

hemodinámica o signos de isquemia, que generalmente corresponden a sangrado activo (González de Villambrosia y col., 2012).

La fortificación de alimentos con hierro sigue siendo el pilar fundamental para la prevención y tratamiento de la anemia por deficiencia de hierro. Son las mujeres en edad fértil y embarazadas, junto con los niños los grupos de mayor riesgo de anemia. En países en desarrollo, el hierro puede ir acompañado de otros micronutrientes para reducir la anemia en los niños (Maldonado Lozano y col., 2007; Ahmed y col., 2010; Best y col., 2011; Miller, 2013).

Los alimentos funcionales están siendo una buena alternativa para intentar prevenir diferentes carencias nutricionales, como la deficiencia de hierro (Hurrell, 2002). La fortificación con hierro es la más común en los alimentos infantiles industriales (Troesch y col., 2009). También se añade hierro a los cereales durante el molido de la harina. Todavía de un modo experimental, también se ha logrado enriquecer otros alimentos como el azúcar, la sal y la salsa de soja, que pueden ser buenos vehículos para el hierro (Hurrell, 2002; Hilty y col., 2009; Roe y col., 2009).

Uno de los principales problemas a los que se enfrenta la industria agroalimentaria a la hora de fortificar los alimentos con compuestos de hierro es el riesgo de que sufran modificaciones organolépticas que hagan que el consumidor no los acepte (Hurrell, 2002), por lo que la investigación en los últimos años se ha centrado en optimizar los compuestos de hierro utilizados en la fortificación favoreciendo su inclusión en el alimento a la vez que se mejora la biodisponibilidad de este micronutriente (Hurrell, 2002; Moretti y col., 2006; Hilty y col., 2009; Roe y col., 2009). Se han obtenido éxitos notables mediante la micro encapsulación de las sales de hierro (Moretti y col., 2006; Hilty y col., 2009; Roe y col., 2009) o combinando dichas sales con otros compuestos protectores como las fitasas (Troesch y col., 2009).

El contenido de hierro en los alimentos fortificados suele situarse por encima del 15% de la ingesta diaria recomendada por porción o cada 100 g del alimento, y puede llegar hasta de 100% de la ingesta recomendada (Flynn y col., 2009). No hay límites máximos de fortificación como los existentes para otros minerales (Hernández Ruiz y col., 2010), hay recomendaciones para que no se pierdan las propiedades organolépticas de los alimentos.

Hay algunos principios simples que rigen su uso (Goddard y col., 2011; González de Villambrosia y col., 2012), y que se indican a continuación:

-
- El hierro se absorbe mejor en el duodeno y el yeyuno proximal. Por lo tanto, las cápsulas entéricas recubiertas de liberación sostenida son fuentes menos eficientes de hierro.
 - Las sales de hierro no se deben administrar con alimentos, porque numerosos factores presentes en la dieta perjudican su absorción, como los fosfatos, fitatos y tanatos. También el uso de ciertos antibióticos, como quinolonas o tetraciclinas, y los antiácidos dificultan su absorción. Por ello, se recomienda la administración del hierro una hora antes o dos horas después de la ingesta, y el doble de tiempo respecto a la toma de antiácidos. Sí es cierto que el zumo de naranja no perjudica y puede favorecer la absorción del hierro, al igual que la vitamina C.
 - El hierro se absorbe mejor como sal ferrosa (Fe^{2+}), por lo que deben evitarse los preparados con sal férrica (Fe^{3+}).

Las preparaciones disponibles en el mercado que contiene hierro varían ampliamente en la dosificación, la sal, y el estado químico del hierro (forma ferrosa o férrica) que contiene la preparación, así como la forma galénica (liberación rápida y lenta). Sin embargo, en la práctica son las sales bivalentes como el sulfato ferroso, gluconato ferroso y fumarato ferroso las que más se utilizan y son preferibles a los preparados férricos, según lo que recomienda la OMS/WHO (De Maeyer y col., 1989). Las fórmulas de sulfato ferroso generalmente presentan una buena biodisponibilidad (entre el 10 y 15%), mientras que las preparaciones de hierro férrico son de 3 a 4 veces menor (Nagpal y Choudhury, 2004). Esto es debido a la pobre solubilidad del Fe^{3+} en medio alcalino y el hecho de que este necesita ser transformado en Fe^{2+} antes de ser absorbido. Entre los tratamientos ferrosos, el sulfato ferroso sigue siendo el más usado y el tratamiento estándar de la deficiencia de hierro, dada su tolerancia aceptable, alta efectividad y bajo costo (Palacios, 2012).

Los avances en la preparación de comprimidos orales han llevado al desarrollo de preparaciones de liberación prolongada con nuevas formulaciones galénicas que pueden mejorar la tolerancia gastrointestinal y mejorar la biodisponibilidad. Estas fórmulas están compuestas por complejos poliméricos que rodean a los núcleos iónicos de Fe^{2+} que forman parte de la matriz del fármaco. Estos complejos controlan la disponibilidad de Fe^{2+} entre las distintas partes del tracto gastrointestinal, con conformidad a su capacidad de absorción. Después de su absorción, los niveles de hierro en sangre alcanzan un máximo después de aproximadamente 7 horas y permanecen elevados durante 24 horas (Kaltwasser y col., 1991; Palacios, 2012).

También existe en el mercado fórmulas orales de Fe^{3+} unido a azúcares. Este tipo de estructuras dan al compuesto de hierro férrico una mejor estabilidad y portabilidad de los iones

a través de la mucosa intestinal en condiciones fisiológicas, en comparación con los compuestos ferrosos más convencionales. Se han realizado numerosos estudios clínicos comparando la eficacia de los tratamientos con fórmulas ferrosas y férricas, se ha visto que estas últimas dan resultados comparables a los que dan los compuestos ferrosos. Dentro de estos complejos trivalentes más usados nos encontramos los compuestos de polimaltosa férrica (Palacios, 2012).

La principal desventaja del hierro oral reside en la elevada frecuencia de efectos adversos gastrointestinales (10-40%, en forma de dolor abdominal, pirosis, náuseas/vómitos, estreñimiento o diarrea), con tasas de incumplimiento terapéutico >10-20% (Bodemar y col., 2004; Kulnigg y col., 2008; Rozen-Zvi y col., 2008). La eficacia del tratamiento depende de su tasa de absorción, condicionada por la cantidad, posología, estado de los depósitos biológicos, actividad eritropoyética y factores intraluminales que interfieran en su absorción (Andrews, 2008). La absorción oral de hierro representa un proceso que frecuentemente no puede compensar las pérdidas continuas (Rozen-Zvi y col., 2008). Debido al efecto de la hepcidina (regulador clave del metabolismo férrico), la absorción intestinal y la movilización de los depósitos de hierro desde los macrófagos del sistema retículoendotelial se encuentran profundamente inhibidas en caso de anemia por enfermedad crónica, justificando la ineficacia de la ferrotterapia oral en su tratamiento y la necesidad de recurrir en numerosas ocasiones a vías alternativas de administración (hierro parenteral, transfusión sanguínea) (Andrews, 2008, Coyne, 2008, Rozen-Zvi y col., 2008). El tratamiento con hierro oral (2-3mg/kg/día o 50-400mg/día) incrementa las cifras de hemoglobina a partir de la 1^a-2^a semana de tratamiento, normalizando las cifras de hemoglobina en 1-4 meses. Es necesario prolongar su administración varios meses (3-6 meses) para rellenar los depósitos biológicos (Madrado-González y col., 2011).

Desde 1998 el hierro parenteral se ha convertido en un pilar básico del tratamiento de los pacientes con insuficiencia renal crónica en programas de sustitución renal (Coyne, 2008). Comparada con la ferrotterapia oral e hierro endovenoso resulta superior en términos de corrección de la anemia de origen renal, neoplásica, anemia por enfermedad crónica y perioperatoria (Coyne, 2008, Novak y Szczech, 2008). Esta interdependencia sinérgica se basa en el requerimiento de unos depósitos férricos adecuados a fin de mantener la saturación de transferrina necesaria para una eritropoyesis hiperestimulada. Su óptimo perfil de seguridad (prevalencia de efectos adversos graves de 2.2-5 casos/millón de dosis) y su contrastada eficacia confieren a las actuales formulaciones de hierro parenteral un enorme potencial como arma terapéutica en medicina transfusional, constituyendo una alternativa a la transfusión sanguínea alogénica sumamente útil (Kulnigg y col., 2008). Globalmente, el hierro endovenoso es más efectivo, predecible, mejor tolerado y mejora más rápidamente la calidad de vida en

comparación con los suplementos ferrosos orales (Novak y Szczech, 2008). La deficiencia funcional de hierro, característico de la anemia por deficiencia de hierro, responde satisfactoriamente a la administración de hierro parenteral (Rozen-Zvi y col., 2008).

Actualmente se consideran indicadores de hierro endovenoso: intolerancia, incumplimientos, ineficacia o imposibilidad de ferrotterapia oral, enfermedades malabsortivas o inflamatorias intestinales, deficiencia funcional de hierro y la necesidad de reposición férrica inmediata para una eritropoyesis eficaz (anemia peri-operatoria, tratamiento concomitante con agentes estimulantes de la eritropoyesis, programas de donación autóloga, anemia asociada a neoplasias y quimioterapia, pacientes en programas de tratamiento renal sustitutorio y anemia asociada al embarazo o puerperio) (Gasché y col., 1997; Coyne, 2008; Kulnigg y col., 2008; Rozen-Zvi y col., 2008; Madrazo-Gonzalez y col., 2011).

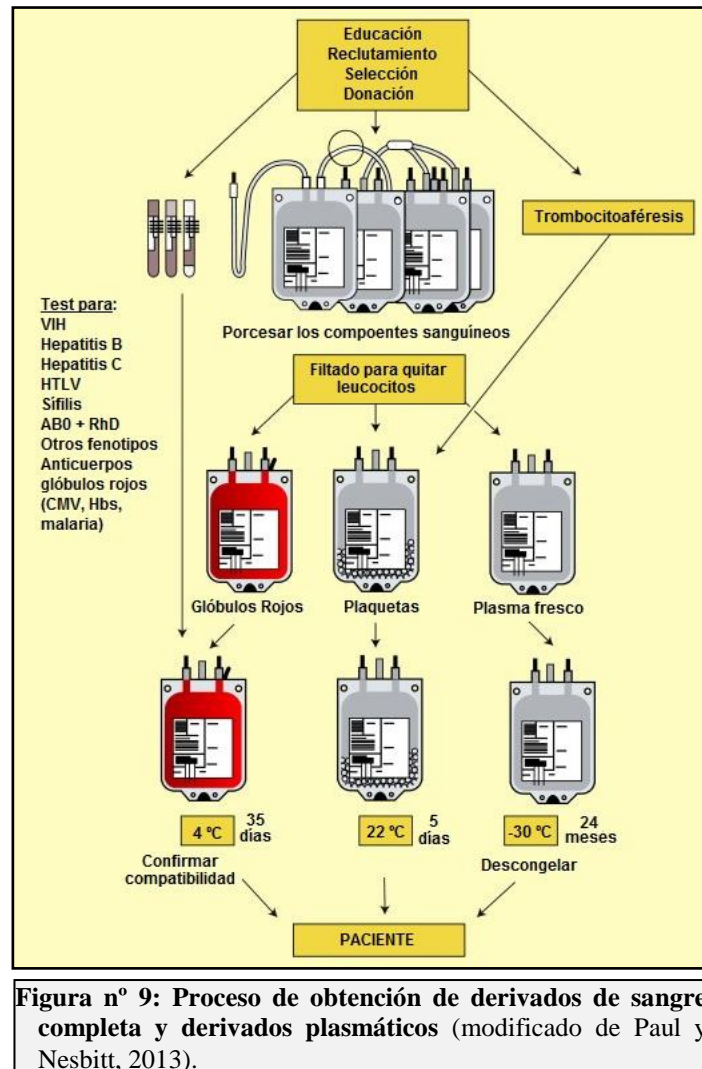
La transfusión sanguínea es el tipo de tratamiento que más controversia presenta, ya que para su uso es necesario hacer un estudio en profundidad del paciente de forma individual. Existen numerosas interacciones y efectos adversos de la transfusión sanguínea. Aun existiendo estas complicaciones existe una regla que dice que a pocos pacientes adultos se les debe suministrar una transfusión con niveles de hemoglobina superiores a 10 g/dl, y a pocos pacientes se les debe negar la transfusión con un nivel de hemoglobina por debajo de 6 g/dl (Wang y Klein, 2010; Shander y col., 2011; Paul y Nesbitt, 2013).

Hasta finales de la década de 1970, la mayor parte de la sangre que se transfundía era sangre completa sin separar sus componentes. Si bien esto sigue siendo una práctica común en algunos países, en la mayoría de ellos casi todas las donaciones son procesadas (Figura nº 9) en glóbulos rojos, plaquetas y plasma después de la detección de agentes infecciosos y la eliminación de las células blancas (leucodepleción) (McClelland, 2007).

Glóbulos rojos. Está especialmente indicado para aumentar los niveles de hemoglobina. Este producto contiene aproximadamente 20 ml de plasma y 100ml de solución de almacenamiento. Su volumen total oscila entre 180 y 350 ml, esto supone un 57% de valor de hematocrito. Los glóbulos rojos se almacenan entre 2 y 6 °C durante un máximo de 35 días y el producto debe ser compatible con el grupo ABO y, por lo general, con RhD del destinatario (McClelland, 2007).

Plaquetas. Están prescritas para la prevención y el tratamiento de la hemorragia en pacientes con trombocitopenia o en aquellos que presentan disfunción plaquetaria. Se almacenan a 22 °C con agitación para asegurar que se mantiene su función, se debe asegurar la compatibilidad de los grupos sanguíneos ABO y RhD, debido a la presencia de plasma (McClelland, 2007).

Plasma fresco congelado. Está indicado para el reemplazo de los factores de coagulación en circunstancias especiales y para la púrpura trombocitopenia trombótica. Se debe corresponder el grupo sanguíneo ABO del receptor, para evitar hemólisis, pero no es necesaria la compatibilidad con RhD. Se puede almacenar congelado hasta 2 años. Una vez descongelado, el plasma se puede almacenar a temperatura ambiente durante 4 horas, o durante 5 días a 1-6 °C (McClelland, 2007).



2.1.6. Sobrecarga de hierro

Como se mencionó anteriormente, aunque el hierro es un nutriente esencial para el ser humano un exceso en el organismo implica una amenaza para células y tejidos.

En condiciones fisiológicas, la cantidad total de hierro en el organismo es dependiente de la absorción de dicho elemento y en ella intervienen mecanismos genéticamente regulados. En numerosas enfermedades, genéticas o adquiridas, se puede producir acumulación del micronutriente.

Hemocromatosis

La hemocromatosis se puede definir como una enfermedad donde hay un incremento de almacenes de hierro, causando cambios patológicos. Hay dos tipos de hemocromatosis: idiopática primaria (o hereditaria) y secundaria (Beutler y col., 2003).

En base a las alteraciones clínicas y genéticas, según la *Online Mendelian Inheritance in Man Database* (OMIM), se han identificado 4 tipos de hemocromatosis hereditarias, siendo la tipo 1 la más frecuente y la tipo 2 la más grave, tal como se observa en la Tabla nº 4.

Tabla nº 4: Tipos de hemocromatosis hereditaria (modificado de Toxqui y col., 2010).

Tipos de hemocromatosis hereditaria				
Tipo de hemocromatosis	Transmisión	Gen alterado	Situación cromosómica	Severidad
Tipo 1 Hereditaria o clásica	Autosómica recesiva. Mayor prevalencia en hombres	HFE	Alteración en el cromosoma 6p21,3110	Moderada
Tipo 2 Juvenil	Autosómica recesiva Ambos sexos afectados de igual manera	Subtipo A: HJV	Alteración en la porción cromosómica 1q21 que codifica la hemojuvelina	Muy severa
		Subtipo B: HAMP	Alteración en la posición cromosómica 19q13.1 que codifica la hepcidina	Muy severa
Tipo 3 Relacionada con el receptor de transferrina	Autosómica recesiva	TfR2	Alteración situada en la porción cromosómica 7q22	Severa
Tipo 4 Enfermedad de la ferroportina	Autosómica dominante	SLC40A1	Situado en la fracción génica 2q32, que codifica para la ferroportina	Suave

Según Wolff y col. (2004), a medida que transcurre el tiempo y aumenta la sobrecarga férrica, los pacientes con hemocromatosis pasan por las siguientes fases:

1. Fase genética, con predisposición a la enfermedad, pero sin anomalía bioquímica, ni histológica, ni manifestaciones clínicas.
2. Fases de sobrecarga férrica asintomática, con acumulación de hierro (depósito férrico 2-5 g) y sin síntomas.
3. Fases de sobrecarga férrica con síntomas precoces, con acumulación de hierro y síntomas como astenia, letargia, artralgia.
4. Fases de sobrecarga férrica con lesión orgánica, en que destaca especialmente la cirrosis hepática.

En etapas avanzadas es posible observar la tríada clásica descrita desde sus primeras definiciones que contempla cirrosis hepática, hiperpigmentación cutánea y diabetes. También se pueden observar síntomas menos frecuentes e inespecíficos como dolor abdominal, debilidad, letargia y pérdida de peso. El cuadro clínico puede incluir, además, manifestaciones dependientes de diversos órganos y sistemas, según el grado de daño producido por el depósito de hierro. En general, en estos casos el contenido total de hierro en el organismo llega a ser superior a 5 g. (Wolff y col., 2004).

En todos los tipos de hemocromatosis (a excepción de la hemocromatosis tipo 4) se presenta una desproporcionada bajada de los niveles de hepcidina para los niveles de hierro que se observan. Esto es debido a anomalías en los genes que codifican para la hemocromatosis (HFE, Hemocromatosis tipo 1), hemojuvelina (HJV, hemocromatosis juvenil 2a), y en el receptor de transferrina 2 (TfR2, hemocromatosis tipo 3); estas hemocromatosis producen una mala regulación de los niveles de hepcidina. Las excepciones se presentan en las mutaciones propias en la hepcidina (hemocromatosis juvenil 2b) o en la ferroportina (hemocromatosis tipo 4) (Muñoz y col., 2010).

Unos bajos niveles de hepcidina en plasma conducen a altos niveles de ferroportina, que permiten un aumento de la absorción de hierro, una sobrecarga de hierro hepático y poco hierro almacenado en macrófagos (Greer y col., 2009; Lee y Beutler, 2009; Pietrangelo, 2010). Además, la transferrina está saturada de hierro (en estados de sobrecarga, aparece hierro no unido a transferrina). Parte del hierro lábil plasmático es muy reactivo, puede inducir la formación de radicales libres. Estos radicales libres son los responsables de las lesiones que se producen en las células del parénquima asociados a síndromes de sobrecarga de hierro (Muñoz y col., 2010).

Aunque hay descritas al menos 32 mutaciones del gen HFE, la forma más común de hemocromatosis es la de tipo 1, que es una mutación sin sentido del gen Cys282Tyr. La hemocromatosis tipo 1 es una enfermedad de penetrancia variable y una considerable heterogeneidad, pero la gran mayoría de los pacientes con hemocromatosis tipo 1 son homocigotos para la mutación de la proteína Cys282Tyr (Adams y Barton, 2007). La proteína mutante Cys282Tyr de la HFE es incapaz de unirse a la β_2 microglobulina y no llega a la membrana celular, lo que da como resultado es una proteína que está mal plegada y no funcional (Feder y col., 1997). Las mutaciones del gen de la ferroportina (hemocromatosis tipo 4) pueden dar como resultado la pérdida de la capacidad de exportar hierro, con una hiperferritinemia, pero sin que se observe saturación de la transferrina, y sobrecarga de hierro en macrófagos, o en una pérdida de la capacidad de unión a la hepcidina, que se asocia con la sobrecarga de hierro (Bach y col., 2006; Lee y Beutler, 2009).

En contraposición, dando lugar a niveles altos de hepcidina, bajo una sobrecarga de hierro secundaria debido a una terapia crónica transfusional (como por ejemplo ocurre en las talasemias *major* o en anemia aplásica, etc.), los niveles de hepcidina en plasma son elevados, lo que produce una degradación de ferroportina. Los niveles de transferrina saturada (diférrica), que están aumentados en la sobrecarga de hierro, aumenta la expresión del TfR2 en la membrana del hepatocito. Unida la transferrina diférrica al TfR2 bloquea la escisión de la HJV por la furina, así, inhibe la liberación de HJV soluble dando como resultado en las células superficiales una respuesta aumentada a la BMP por la HJV y aumentan los niveles de hepcidina (Lee y Beutler, 2009; Pietrangelo, 2010). Sin embargo, niveles bajos de ferroportina limitan la absorción de hierro en el intestino, reducen la exportación del mismo de los macrófagos y aumenta el almacenamiento de hierro.

En la anemia con sobrecarga de hierro, como en la anemia hemolítica crónica (por ejemplo, talasemia intermedia, deficiencia en piruvato quinasa, etc.) o en anemia con eritropoyesis ineficaz (como ocurre en la anemia deseritropoyética congénita, anemia sideroblástica, síndromes mielodisplásicos de bajo grado, etc.), la sobrecarga de hierro está causada por bajos niveles de hepcidina. Los pacientes con estos tipos de anemia rara vez se transfunden (Tamary y col., 2008). A pesar del aumento de las reservas de hierro, al estar aumentada la eritropoyesis se liberan numerosos factores de crecimiento y diferenciación, que a su vez suprimen la producción de hepcidina hepática por inhibición inflamatoria y por vías de detección de hierro (Tamary y col., 2008). Esta jerarquía de estímulos individuales determina los niveles circulantes de hepcidina (Huang y col., 2009).

Tratamiento de la hemocromatosis

Con la instauración temprana de medidas terapéuticas se puede conseguir una esperanza de vida normal, sin disminución de la calidad de vida. Con el tratamiento disminuyen la hiperpigmentación y las transaminasas, y pueden desaparecer las artralgias; sin embargo, no desaparecen las alteraciones endocrinas y el riesgo de hepatocarcinoma si la cirrosis está ya instaurada, por lo que, en este caso, se recomiendan controles para detectar su aparición (González de Villambrosia y col., 2012).

- **Flebotomías:** Constituyen la principal medida terapéutica para reducir la sobrecarga férrica (Adams y Barton, 2010; Bacon y col., 2011). Están indicadas en todos los pacientes con ferritina superior a 300 ng/ml. El tratamiento consta de:

- Fase inicial: una a dos flebotomías semanales hasta alcanzar una ferritina de 50-100 ng/ml, acompañadas de controles mensuales de la hemoglobina, índice de saturación de la transferrina y ferritina.
- Fase de mantenimiento: flebotomías cada 1-4 meses, según las necesidades del paciente, para mantener el objetivo de ferritina de 50-100 ng/ml. Se recomienda monitorizar la hemoglobina y la ferritina cada dos flebotomías.
- **Tratamiento con quelantes del hierro**: Es una alternativa en pacientes que no pueden ser tratados con flebotomías, que incluyen pacientes anémicos dependientes de transfusiones (por ejemplo, la talasemia, anemia de células falciformes, síndrome mielodisplásico) y pacientes no anémicos que no toleran las flebotomías (por ejemplo, afectación cardíaca grave y/o una situación hemodinámica inestable). Disponemos de tres quelantes aprobados en Europa: deferoxamina, deferiprona y deferasirox (González de Villambrosia y col., 2012).

2.2. IMPORTANCIA NUTRICIONAL DE LOS FOLATOS

2.2.1. Introducción

El folato es una vitamina que recientemente se ha visto su gran importancia más allá de su papel esencial en el metabolismo, sobre todo por su relevancia en la etiología de enfermedades crónicas y en defectos de nacimiento. Los folatos se hallan en la mayoría de los alimentos, especialmente en el hígado, las verduras de hoja verde (como las espinacas) y las nueces, que contienen concentraciones elevadas (> 100 µg/ 100 g). El contenido total de ácido fólico en la dieta occidental es de alrededor de 250 µg diarios, pero la cantidad varía según el tipo de alimento ingerido y el método de cocción, porque se destruye por el calor, especialmente en grandes volúmenes de agua (Tabla nº 5). El contenido de ácido fólico total en el organismo de los adultos es de alrededor de 10 mg, y el hígado tiene la reserva más grande. Las necesidades diarias en los adultos son de unos 100 µg (Cabré-Roure, 2010).

El déficit de folato frecuentemente se presenta en personas que no tienen el hábito de comer suficiente alimentos de origen vegetal. El folato está íntimamente relacionado con las vitaminas B₁₂ y B₆, además de con aminoácidos, por lo que es bastante complicado evaluar una deficiencia subclínica, no obstante queda todavía por aclarar cuál es el alcance de las relaciones del folato con las distintas vitaminas y aminoácidos (Mitchell y col., 2012).

Tabla nº 5: Alimentos ricos en ácido fólico (aporte expresado en µg /100 g de alimento)
(modificado de Farran y col., 2004; Cabré-Roure, 2010; Moreiras y col., 2013).

Verduras			
Berro crudo	214	Nuez cruda	155
Cebollino crudo	130	Pipas de girasol sin sal	227
Col de Bruselas cruda/hervida	132/87	Pistacho tostado salado	97
Endibia cruda	115	Sésamo, semilla	97
Escarola cruda	110	Alimentos de origen animal	
Espárrago blanco en conserva	113	Leche de vaca desnatada/semi/entera UHT	4/3/6
Espárrago verde hervido/pelado crudo	110/128	Leche de cabra	1
Espinaca cruda/cocida	192/140	Leche de oveja	5
Lechuga	59	Yogur desnatado/entero natural	4/4
Nabo crudo	50	Queso fresco tipo Burgos	14
Zanahoria cruda/hervida	30/22	Queso Brie	150
Cebolla blanca cruda/hervida	14/17	Queso azul	94
Puerro crudo/cocido	96/55	Queso de cabra semicurado	125
Alcachofa cruda/hervida	28/47	Cerdo, chuleta, a la plancha	6
Berenjena cruda/hervida/frita	19/14/5	Ternera, filete a la lancha	10
Brócoli crudo/cocido	110/73	Vaca/buey, entrecot, con grasa a la parrilla	16
Calabacín crudo/cocido	50/24	Vaca/buey parte s/e, bistec a la plancha	15
Coliflor cruda/hervida	83 / 59	Vaca/buey, redondo, asado	14
Judía verde cruda/hervida	66 / 45	Pollo, muslo, con piel, asado	7
Tomate maduro crudo	29	Hígado crudo de pollo/ternera/cordero	560/441/240
Tomate ensalada pelado	11	Foie-gras	566
Pimiento rojo crudo/cocido	23/13	Paté campaña / de hígado de cerdo	160/103
Pimiento verde crudo/cocido	30/17	Huevo de gallina pasado por agua/hervido/frito	88/60/42
Champiñón crudo/en conserva	27/11	Bacalao fresco al horno/vapor	12/3
Fruta		Lenguado al horno/vapor	7/8
Plátano crudo	22	Atún al horno/enlatado al natural	16/7
Melón/melón tipo Cantaloupe crudo	3/73	Féculas	
Naranja	39	Guisante fresco hervido/crudo	56/70
Mango crudo	51	Judía blanca seca cruda/seca remojada hervida	308/80
Fresas crudas	62	Judía negra seca remojada hervida	74
Uva negra / verde cruda	227 / 17	Garbanzo seco y crudo / seco y remojado hervido	185/100
Grosella negra cruda	40	Lenteja seca remojada hervida / conserva	60/11
Kiwi crudo	32	Soja seca remojada hervida	54
Fruta desecada, seca y/u oleaginosa		Batido de fermentado de soja	19
Aguacate crudo	54	Harina de soja	300
Aceitunas en salmuera negra/verde	11/3	Tofu	15
Dátil seo	28	Patata horno/hervida/frita con aceite de girasol	10/13/40
Melocotón seco	14	Boniato	52
Ciruela/pasa	7/9	Arroz blanco hervido/integral hervido	3/10
Almendra tostada/frita salada	36/70	Germen de trigo	350
Avellana cruda	113	Harina de centeno/trigo	70/24
Cacahuete crudo/frito salado	110/168	Pasta alimentaria cruda/hervida	28/5
Castaña cruda/tostada	141 / 85	Pan integral/blanco de barra/blanco de molde	22/23/27
Chufa cruda	141	Galleta tipo María/de mantequilla	8/13

Existen evidencias que muestran que la ingesta marginal de folato puede dar soporte “normal” aparente al metabolismo del carbono aunque este se encuentre limitado. Este hecho sugirió que el déficit de folato tiene un papel importante en la etiología de la homocisteinemia (incremento de la homocisteína en sangre), que ha sido identificado como un factor de riesgo para la enfermedad oclusiva vascular, cáncer y defectos de nacimiento, particularmente defectos en el tubo neural. La *Food and Drug Administration* de los Estados Unidos, en 1998, ordenó que el ácido fólico fuera agregado a todos los productos enriquecidos derivados de los cereales (pan, pasta, harinas de trigo, cereales del desayuno, arroz) para así reducir la prevalencia de los

defectos del tubo neural. Más de una década después, se ha podido comprobar que ha disminuido la prevalencia de defectos en el tubo neural, considerándose esta estrategia como exitosa. Sin embargo, aún persiste la preocupación acerca de los riesgos potenciales que puede suponer para las personas que no presentan deficiencia de ácido fólico. Uno de los riesgos es el enmascaramiento prospectivo de anemia macrocítica por deficiencia de vitamina B₁₂, lo que conduciría a una neuropatía si no se corrige. Otras preocupaciones se han ido añadiendo en los últimos años, como la creciente duda sobre el papel de la homocisteinemia como agente causal de enfermedades cardiovasculares, el posible aumento del deterioro cognitivo, o el riesgo de cáncer colorrectal, son algunos ejemplos de las posibles consecuencias de suplementación con folato de los alimentos que se están estudiando (Mitchell y col., 2012).

2.2.2. Estructura química y nomenclatura

El término folato hace referencia al ácido fólico y sus derivados, son compuestos que actúan como coenzimas para el metabolismo celular del carbono y en consecuencia para la síntesis de pirimidina y purina, así como en el metabolismo de varios aminoácidos, por ejemplo, la homocisteína (Said, 2011).

La molécula de ácido fólico se compone de un anillo de pteridina unida por la mitad por medio de un puente de metileno a un ácido p-aminobenzoico. Al extremo carboxílico de este radical ácido se pueden unir de 1 a 7 restos de L-glutamato unidos por enlace peptídico (Figura nº 10) (Wagner, 1996; Cabré-Roure, 2010).

El anillo de pteridina puede encontrarse en forma no reducida, parcialmente reducida (dihidrofolato) (DHF) o totalmente reducida, como el tetrahidrofolato (THF), y es esta última la forma biológicamente activa, capaz de aceptar diferentes fragmentos de un carbono (metilo). Estos fragmentos se encuentran unidos al N⁵, al N¹⁰ o conjuntamente a ambos formando los coenzimas del ácido fólico, los cuales pueden sufrir interconversiones en el interior de las células mediante cambios en la cadena lateral (Cabré-Roure, 2010).

Los folatos actúan como coenzimas en la transferencia de unidades de carbono simple (metilo). Dos de estas reacciones están involucradas en la síntesis de purina y pirimidina, necesaria para la replicación del ADN y ARN. El folato también es una coenzima para la síntesis de metionina, en la que también participa la metilcobalamina y el THF en el que se regenera. THF es el único aceptor de unidades de carbono de reciente entrada activa a través de la conversión de serina a glicina. Metionina, el otro producto de la reacción de la metionina

sintetasa, es el precursor de la S-adenosil metionina (SAM), el donante universal de metilo que participa en más de 100 reacciones metiltransferasa. Durante la síntesis de timidilato, 5,10-metileno-THF se oxida a DHF. La enzima DHF reductasa convierte a este en THF. El metotrexato, pirimetamina y (sobre todo en las bacterias) trimetoprim inhiben la DHF reductasa y así evitan la formación de las coenzimas activas THF de DHF (Cabré-Roure, 2010).

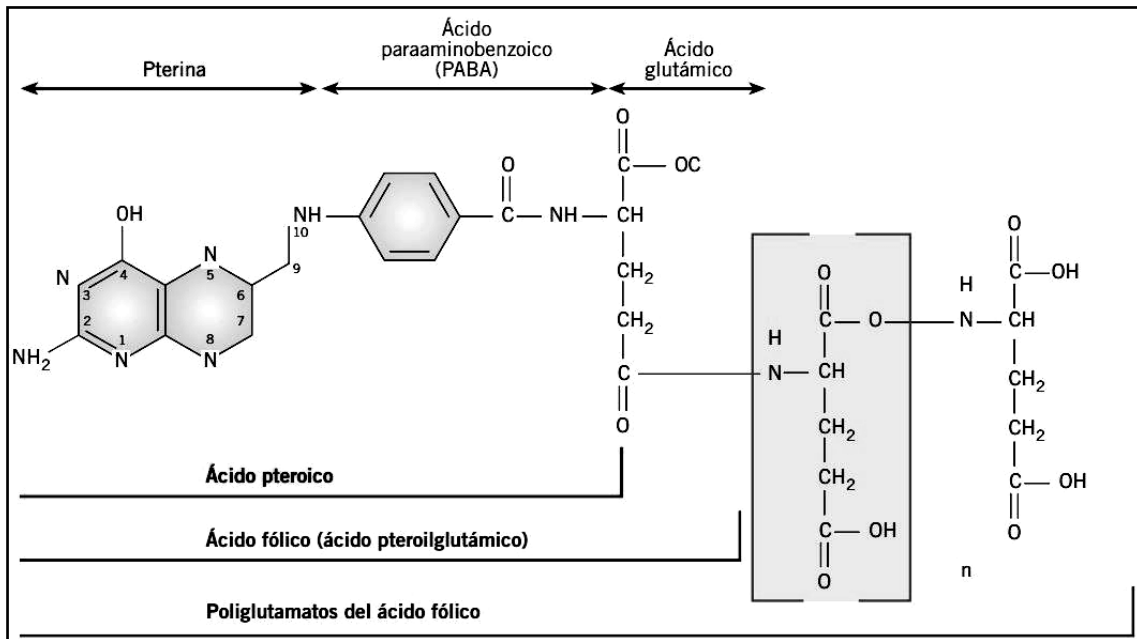


Figura n° 10: Estructura del fólico (modificado de Cabré-Roure, 2010).

2.2.3. Los folatos en la salud humana

Después del déficit de hierro, la deficiencia de vitamina B₁₂ y especialmente de folatos, son las causas más importantes de anemia nutricional (Thorpe, 2010). Las manifestaciones de deficiencia derivan de una disminución de la síntesis de ácidos nucleicos alterando la maduración nuclear y afectando preferentemente a células con rápida proliferación. Los signos y síntomas se observan principalmente a nivel neurológico. Sin embargo, la sintomatología es más probable de ocurrir en deficiencias muy severas (Brito y col., 2012).

La anemia megaloblástica ocurre cuando el déficit de folato y/o B₁₂ es severo. La asincronía de la maduración nuclear es evidenciada morfológicamente por la aparición de cambios megaloblásticos. A nivel sanguíneo aparece anemia macrocítica (volumen corpuscular medio > 100 fL en adultos y macroovocitos) con índice reticulocitario disminuido acompañado de neutropenia e hipersegmentación nuclear de los neutrófilos y menos frecuentemente de trombocitopenia. En la médula ósea hay hiperplasia de los precursores

eritroides, mieloides y de megacariocitos. La aparición de metamielocitos gigantes es otro cambio característico (Olivares, 1995; Aslinia y col., 2006).

Después de la gestación, los neonatos generalmente presentan suficiencia vitamínica a expensas de depósitos maternos. Un pobre estado nutricional de folatos se relaciona con embarazos de mala evolución, riesgo de parto prematuro, bajo peso al nacer; por consiguiente mayor riesgo de morbilidad infantil (Dror y Allen, 2008; Molloy y col., 2008).

El mayor beneficio de la suficiencia de folatos durante el período periconcepcional es la prevención en el cierre del tubo neural; segunda malformación congénita más prevalente en el mundo después de defectos cardiacos, siendo los más predominantes la anencefalia, espina bífida abierta y encefalocele. Estudios aleatorizados controlados en mujeres en edad fértil, han demostrado que el aumento de la ingesta de ácido fólico disminuye el riesgo de padecer defectos en el tubo neural. Algunos estudios sugieren que esta protección puede extenderse a otros defectos de nacimiento (Czeizel y Dudás, 1992; Berry y col., 1999). En la actualidad existe gran interés en identificar polimorfismos que contribuyan con los defectos del tubo neural (Lindenbaum y col., 2009).

Las deficiencias de folatos y/o B₁₂ incrementan los niveles de homocisteína plasmática. Numerosos estudios asocian hiperhomocisteinemia y enfermedad cardiovascular, accidente vascular cerebral, riesgo de eclampsia, preeclampsia, nacimientos de pretérmino, cáncer y deterioro cognitivo (Clifford y col., 1990; Duthie y col., 2002).

La deficiencia de folato afecta a la biosíntesis de ADN y a la distribución de los grupos metilo de este, estos dos hechos con cruciales en relación con la carcinogénesis (Choi y Mason, 2002). El primer mecanismo que afecta a la estabilidad del ADN es una metilación alterada. La metilación de los pares guanina-citosina es determinante en la expresión génica y tiene un papel fundamental en el mantenimiento de la estabilidad del ADN. Una hipermetilación de las regiones de genes promotores provoca la pérdida de la función de los genes, tanto tumorales como supresores de tumores, mientras que la reducción de la metilación total da como resultado una inestabilidad cromosómica y un aumento de las mutaciones (Eden y col., 2003). La deficiencia a largo plazo de folato en la dieta resulta en una hipometilación que, subyacentemente, provoca una disminución de la metilación de la homocisteína a metionina, lo que lleva a un aumento en los niveles de homocisteína que a su vez se traduce en altos niveles de S-adenosilhomocisteína, un inhibidor de la metilación (Nazki y col., 2014).

El segundo mecanismo por el cual la deficiencia de folato puede alterar la integridad del ADN y promover la carcinogénesis es en una disminución de la síntesis de timidilato que

conduce a la incorporación errónea de uracilo. La eliminación de una base de uracilo provoca un corte en la hebra de ADN, si esto ocurre con dos bases de uracilo enfrentadas y adyacentes, aparece un corte en la doble cadena de ADN, hecho difícil de reparar que se asocia con un aumento del riesgo de cáncer (McKinnon y Caldecott, 2007). Esto se puede revertir si se restaura el estado adecuado de folato (Blount y col., 1997).

Las enfermedades vasculares se han asociado comúnmente con los factores de riesgo más tradicionales como la hipertensión arterial sistémica, diabetes mellitus y el tabaquismo, pero en la última década también se han identificado otros factores de riesgos, siendo uno de ellos la homocisteína. Brustolin y col., (2010) han identificado la homocisteína como un factor de riesgo independiente para la enfermedad arterial crónica. También en los estudios desarrollados por Trabetti (2008) se pudo comprobar la severidad de la enfermedad coronaria en pacientes tras una cirugía de revascularización coronaria, en pacientes que presentaban una enfermedad arterial crónica se vio que presentaban niveles significativamente mayores de homocisteína con respecto a los controles, que no presentaban enfermedad crónica vascular. Asociándose este hecho a la falta de folato y por extensión a un alto riesgo para esta patología.

2.2.4. Metabolismo

El metabolismo de los folatos tiene un papel vital en el síntesis de ácidos nucleicos, en la regeneración de metionina, en el transporte y reacciones redox de unidades de un átomo de carbono (grupos metilo) necesarias para un metabolismo y regulación adecuados (Bailey y Gregory, 1999).

2.2.4.1. Absorción

En el intestino se pueden presentar dos fuentes de folatos, de la dieta (que se procesa y se absorbe principalmente en el intestino delgado) y de las bacterias (donde la vitamina la producen la flora del intestino grueso y se absorbe en esta región del intestino) (Wrong y col., 1981).

- **Folatos de origen dietético.** La eficacia de absorción de los folatos dietéticos parece ser del 50% aproximadamente, pero resulta muy variable (10-90%) (Mitchell y col., 2012). En una dieta normal, los folatos se pueden encontrar en forma de mono y poliglutamatos. Los poliglutamatos son hidrolizados a folato

monoglutamato antes de absorberse. Este proceso digestivo se produce principalmente en la parte proximal del intestino delgado e implica a la enzima folilpoli- γ -glutamato carboxipeptidasa.

- **Folatos de origen bacteriano.** La contribución relativa en la nutrición corporal de la fuente bacteriana de folato no está clara, pero la presencia de un transportador con gran eficiencia de captación en los colonocitos humanos (Dudeja y col., 1997; Kumar y col., 1997), junto con un contenido y tiempo abundantes en el intestino grueso, sugiere que esta fuente de folato contribuye notablemente con la nutrición, especialmente en la nutrición celular de los colonocitos locales (Said, 2011, Mitchell y col., 2012).

Se han descrito varios sistemas de transporte del folato que podemos dividir en dos: sistemas transportadores de membrana y sistemas mediados por proteínas de unión al folato (receptores de folato).

- **Transportadores de membrana**

Se han podido caracterizar químicamente varios transportadores de membrana de folato en tejidos y células de mamíferos; los cuales, posteriormente, se han aislado sus genes de expresión en los tejidos específicos (Zhao y col., 2009).

1. **Transportador reductor de folato**

El gen del transportador de folato reducido (RFC1) codifica para una cadena polipeptídica que es activo a pH fisiológico e inactivo por debajo de pH 6.5. Es un facilitador, y transporta folato a la célula activado por altos niveles intracelulares de aniones orgánicos (como nucleótidos de adenina), mientras que la alta concentración de estos extracelularmente lo inhabilita (Matherly y Goldman, 2003; Matherly y col., 2007). La relativa concentración intracelular de aniones hace que este transportador actúe de forma unidireccional. Los otros dos miembros de la familia del RFC1 son transportadores de tiamina y no transportan folato. Mientras que el RFC1 no transporta tiamina, una alta concentración de tiamina pirofosfato estimula la entrada de folato a la célula (Sirotnak y Tolner, 1999). El RFC1 es el transportador de folato más estudiado. Se ha visto que se expresa en cultivos de tejidos, en células tumorales y tejidos fetales, y está ubicuamente expresado en tejidos normales adultos, aunque puede que no sea el transportador que mueva más folato en todos los tejidos. El RFC1 es fácilmente saturado ya que su afinidad por el folato presenta unos valores de saturación del orden del micromolar

(3 μM aproximadamente) para el folato reducido y una afinidad similar para el metotrexato antifolato (un antagonista del folato) (Zhao y col., 2002; Matherly y Goldman, 2003). El transportador tiene mayor afinidad por el ácido fólico (índice de saturación de 200 μM aproximadamente), esto explica porque la mayoría de los cultivos celulares requiere para su crecimiento de una mayor concentración de ácido fólico comparado con folatos reducidos (Shane, 2010).

2. Transportador de folato acoplado a protones

El transportador de folato protón-dependiente (PCFT: *Proton Coupled Folate Transporter*) se descubrió más recientemente. Es un transportador transmembrana que actúa a pH ácido y que, por el contrario, reduce su actividad a pH 7.4, dependiendo la forma de folato. Al principio fue identificado como un supuesto transportador de hemo. A diferencia del RFC1, este transportador presenta una afinidad similar por los folatos reducidos tanto como por el ácido fólico (valores de saturación 0.5–0.8 μM a pH 5.5). A pH 6.5, el 5-metil-THF es transportado más eficientemente que el ácido fólico. El PCFT está altamente expresado en intestino delgado, sobre todo en el yeyuno y duodeno, riñón, hígado, placenta y cerebro, también se expresa en otros tejidos. Al presentarse el transporte de folato acoplado a los protones, permite que aumente la concentración del mismo a pH ácido (Qiu y col., 2006; Zhao y col., 2009).

3. Proteínas asociadas a resistencia a múltiples fármacos

La familia de proteínas transmembrana con baja afinidad al folato (proteínas asociadas a la resistencia a múltiples fármacos, MRP: *Multidrug Resistance-associated Protein*), pueden funcionar como transportadores de folato en distintos tejidos. Estas proteínas fueron identificadas originalmente como responsables de la resistencia a fármacos de las células ante agentes quimioterápicos (Kruh y Belinsky, 2003; Assaraf, 2006). La afinidad de estos por el folato es muy baja (valores de saturación de 0.2–2 mM), pero presentan una alta capacidad para transportarlo. Otros transportadores, como son el SLC21 y SLC22, pueden jugar un papel muy importante en el flujo orgánico de folato (Zhao y col., 2009).

4. Transportador mitocondrial de folato

El transportador transmembrana que capta el folato en la mitocondria es distinto de otros (Titus y Moran, 2000). Es específico para folato reducido, por lo que no transporta ácido fólico ni metotrexato (Horne y col., 1992; Kim y col., 1993). Las células de mamíferos con defectos en

este transportador son auxótrofos para glicina y presentan defectos en el metabolismo del carbono tanto a nivel mitocondrial como citosólico (Lin y Shane, 1994).

5. Transportador lisosomal de folato

Este transportador es responsable de la captación de poliglutamato metotrexato en los lisosomas (Barrueco y col., 1992), aunque aún no se conoce toda su importancia, sí se sabe que tiene un pH óptimo de 4.5-5.0 y un peso de 75KDa (Mitchell y col., 2012). Aún queda por determinar su función como transportador de folato o su implicación en la recambio del mismo.

- **Receptores de folato**

Es una familia formada por tres receptores de alta afinidad al folato (FRs) estrechamente relacionados (α , β y γ), también llamados proteínas de unión al folato, se expresan en algunas células epiteliales (Kamen y Smith, 2004). En tejidos normales, la distribución de los receptores de folato α (FR- α) tienen una distribución limitada normalmente a la membrana apical, donde puede que no contacte con la circulación general (Zhao y col., 2009). Se ha visto que hay una gran presencia de estos en los plexos coroides (membrana basolateral). También se ha visto la presencia de esta proteína en los túbulos proximales del riñón, en células eritropoyéticas, en los conductos deferentes, ovarios, en trompas de Falopio, en las células trofoblásticas de la placenta, en los alveolos pulmonares, en las células acinares mamarias, en la glándula salival submandibular y en las células epiteliales pigmentadas de la retina (membrana basolateral) (Chancy y col., 2000). Se ha encontrado baja presencia de FR- α en la glándula tiroidea, y menor presencia aún en la mucosa duodenal. El FR- α se expresa tanto en tejidos fetales como adultos y en algunos tumores. El FR- β se encuentra principalmente en placenta, bazo y timo, y en algunos monocitos. Este se expresa durante la mielopoyesis, y se han encontrado altos niveles en algunas leucemias mieloblásticas agudas. También se expresa este en tejidos fetales. En cuando a los FR- γ , son los menos conocidos y aún no se conoce con exactitud su localización o su implicación en el transporte de folato (Shane, 2010).

El transporte realizado por medio de los receptores de folato es un proceso relativamente más lento si lo comparamos con la vía de los transportadores de transmembrana, también se reconoce el papel que juega este transporte en la reabsorción de folato en el riñón (Birn y col., 1993), pero aún no está bien establecido como está involucrado en el trasiego orgánico de folato.

Los FRs originalmente se identificaron como una proteína plasmática soluble de alta afinidad unida a folato, también detectada en la leche (Wagner, 1986). Normalmente, los FRs

están unidos a la membrana celular por medio del glicosilfosfatidilinositol y puede ser liberado de la membrana por medio de la fosfolipasa C específica (Lee y col., 1992). Los FRs muestran una alta afinidad de unión en el rango del nanomolar por diversos folatos. La afinidad por el ácido fólico presenta una saturación de 1–10 nM, mientras que la afinidad por el 5-metil-THF es ligeramente menor. En cambio el metotrexato muestra una pobre afinidad por estas proteínas (Zhao y col., 2009).

El transporte de folato por la vía de las proteínas de unión al folato ocurre en un proceso mediado por un receptor, pero este mecanismo no se conoce totalmente. En algunos estudios con tejidos y células, las proteínas de unión al folato presentan una internalización no mediada por clatras, una clásica endocitosis donde no están involucrados los lisosomas (Rothberg y col., 1990). El folato es liberado del endosoma al citosol, y las proteínas de unión se reciclan rápidamente volviendo a la membrana plasmática. El mecanismo por el cual el folato se libera del endosoma no se conoce con exactitud. Se ha sugerido que la acidificación del endosoma provoca la liberación del folato de las proteínas de unión y que estas vesículas también contendrían transportadores PCFT con actividad a pH bajo (Zhao y col., 2009). Como el folato puede ser acumulado en los endosomas, esto podría permitir un eficiente transporte por medio de los PCFT. Este plausible mecanismo permitiría que los tejidos y células la acumulación de folato exógeno que sería ineficientemente transportado si las células dependieran sólo de los transportadores transmembrana de baja afinidad. Sin embargo, si están involucrados los PCFT en el transporte de folato en el endosoma, pero esto no está claro ya que en niños que padecen malabsorción de folato hereditaria, que tienen un defecto en el gen para el PCFT (Geller y col., 2002), no presentan anomalías fetales asociadas con la delección del gen para el FR- α (Shane, 2010).

- **Transporte y absorción intestinal**

La mayoría de los folatos de la dieta son derivados del poliglutamato y se hidrolizan a monoglutamato en el intestino antes de su absorción a través de la mucosa intestinal. La hidrólisis del folilpoliglutamato de la dieta, que está catalizado por γ -glutamil hidrolasa (γ -GH, glutamato carboxipeptidasa II, GCPII) del ribete en cepillo del intestino humano. El gen de la GCPII codifica para una proteína idéntica al antígeno prostático de membrana (PSMA), que se produce en cáncer de próstata, y a la dipeptidasa ácida N-acetil α (NAALADasa, *N-acetylated α -linked acidic dipeptidase*), un enzima que regula la neurotransmisión del glutamato (Devlin y col., 2000). Hasta donde se conoce, las funciones del PSMA y de la NAALADasa no tienen relación con el metabolismo del folato. En otras especies, como la rata, la actividad hidrolasa es

secretada en la bilis. Esta actividad es parecida a la encontrada en la γ -GH de los lisosomas de todos los tejidos.

El mecanismo por el cual el folato cruza las células de la mucosa intestinal y es liberado a través de la membrana basolateral a la circulación portal no está totalmente claro, aunque algunas características se han aclarado hace poco. El metabolismo extensivo del ácido fólico y el folato reducido a 5-metil-THF puede que se produzca durante este proceso, pero el metabolismo no requiere del transporte para que se realice. La actividad metabólica de la mucosa intestinal va a depender del aporte de folato. Cuando se administran dosis farmacológicas de varios folatos, la mayoría de la vitamina transportada aparece sin cambios en la circulación portal (Herbert y Das, 1994). Alguno de estos folatos pueden ser metabolizado a 5-metil-THF en el hígado, pero otros pueden aparecer intactos en circulación periférica (Shane, 2010).

Tanto el PCFT como el RFC1 se expresan en la membrana apical de la mucosa intestinal, su expresión se ve aumentada en condiciones de bajos niveles de folato (Zhao y col., 2009). Sin embargo, el transporte a las células mucosas aparentemente ocurre principalmente por vía de los PCFT. Las células mucosas están en un microambiente ácido, por lo que el transporte de folato ocurre a un pH de 5.5, el ácido fólico es transportado tan eficientemente como el folato monoglutamato reducido. Todo este folato parece que se transporta por medio de los PCFT, ya que los RFC1 podrían no ser unos de transportadores más eficientes bajo estas condiciones. La Malabsorción Hereditaria de Folato (HFM) es una rara enfermedad autosómica recesiva que impide la absorción de folato cursando con una severa deficiencia sistémica del mismo y con un deficiente transporte al cerebro, se observan bajos niveles de folato en líquido cefalorraquídeo (Geller y col., 2002). La concentración de folato en el líquido cefalorraquídeo normalmente es mayor que plasma. En estudios posteriores se vio que esta enfermedad venía producida por la pérdida de la función del gen que codifica para el PCFT (Zhao y col., 2007). Los síntomas aparecen varios meses después del nacimiento cursando con anemia, defectos en el desarrollo mental y convulsiones. Estos niños pueden tratarse con bajas dosis de folato parenteral o con altas dosis de metil-THF oral, sugiriendo que algo del transporte intestinal está llevado a cabo por la vía de los RFC1, pero también nos indica que el PCFT es el responsable del transporte de folato en intestino. La recuperación de los niveles de folato en líquido cefalorraquídeo requiere de altos niveles de folato plasmático (Shane, 2010).

Los transportadores RFC1 y PCFT no se expresan en la membrana basolateral de las células de la mucosa intestinal, por lo que el paso del folato a la circulación porta se cree que sería mediado por el transportador MRP3, de baja afinidad y capacidad de transporte (Rost y col., 2002).

2.2.4.2. Transporte

Los pteroilmonoglutamatos, principalmente el 5-metil-THF, son las formas circulantes de folato en plasma, las células de mamíferos probablemente no transporten poliglutamatos de longitud de cadena de tres o mayor. Después de la absorción y el paso a la circulación portal, la mayoría del folato puede ser captado por el hígado, donde es también metabolizado en los distintos derivados del poliglutamato y ser retenido, o liberado en sangre o bilis. Se ha descrito una circulación enterohepática de folato en la cual está involucrado el 5-metil-THF hepático en la bilis que vía MRP2 (Masuda y col., 1997) es reabsorbido en el intestino delgado (Zhao y col., 2009). La presencia mayoritaria en plasma de 5-metil-THF probablemente refleja que es este el principal folato citosólico en tejidos de mamíferos y, por lo tanto, es la principal forma que se libera. El plasma contiene la actividad γ -GH, y todo el poliglutamato liberado en plasma se hidroliza a monoglutamato (Shane, 2010).

Una proporción variable del folato plasmático se une a proteínas, principalmente albúmina, este representa alrededor del 50% del folato unido a proteínas. Esta proporción está elevada bajo condiciones de deficiencia de folato (Ratnam y Freisheim, 1990). El plasma también contiene bajas concentraciones de una forma soluble de la FR. Los niveles de esta proteína de alta afinidad se incrementan en el embarazo y son muy altos en algunos pacientes con leucemia (Ratnam y Freisheim, 1990). El aumento de la concentración de FR puede reflejar un daño tisular o una liberación accidental de los tejidos, el cómo afecta la presencia de estas proteínas de alta afinidad en la disponibilidad de folato sigue siendo una cuestión abierta (Shane, 2010).

Los glóbulos rojos contienen una mayor concentración de folato que el plasma, y prácticamente todo el folato de estos está en forma de 5-metil-THF. Los eritrocitos maduros poseen una capacidad insignificante para transformar y acumular folato, sus reservas de folato comienzan durante la eritropoyesis y aparentemente también es acumulado, probablemente como resultado de la unión a la hemoglobina, durante la vida de la célula. Debido a este hecho, la concentración de folato de los eritrocitos se usa para medir el estado del mismo a largo plazo. Los niveles plasmáticos (en ayunas) son también un buen indicador del estado del folato, aunque la concentración plasmática puede verse alterada por una ingesta dietética reciente (Shane, 2010).

Los tejidos de mamíferos parece que poseen una amplia gama de transportadores de folato con diferente afinidad para las distintas formas del mismo. El transporte de folato en los

hepatocitos es dependiente de energía y acoplado a componentes saturables y no saturables (Horne y col., 1978). La membrana basolateral (sinusoidal) de hígado de ratas y humanos, que transportan el folato de la circulación portal, expresan altos niveles de PCFT (Zhao y col., 2009) y poseen un cotransportador folato- H^+ (eléctricamente neutro) para las formas reducidas y oxidadas de folato y para el metotrexato (Horne y col., 1993). El transporte es mínimo a pH 7.4, y parece que es el PCFT responsable de la absorción de folato por los hepatocitos. Cómo afecta el gradiente de portones al transporte de folato aún se está estudiando (Shane, 2010).

Los tejidos periféricos usan principalmente el RFC1 (Zhao y col., 2009). Como tanto el RFC1 como el PCFT tienen afinidad por el folato reducido en el rango del micromolar, y la concentración plasmática de folato está en el rango del nanomolar, los transportadores no estarían saturados bajo condiciones fisiológicas del mismo. Esto ocurriría incluso cuando la ingesta de folato sea muy elevada, y la gran afluencia de folato a los tejidos debería ser captada a cualquier concentración, aunque se hayan administrado suplementos farmacéuticos de folato. Sin embargo, los tejidos dependientes del RFC1 en el transporte de folato serían ineficientes en la absorción del folato circulante en el plasma (Shane, 2010).

Los plexos coroideos, que suministran folato al líquido cefalorraquídeo (LCR), expresan altos niveles de FR- α y PCFT en su membrana basolateral y RFC1 en la membrana apical (Zhao y col., 2009), en lactantes con HFM se observan bajos niveles de folato en LCR (Geller y col., 2002). Los transportadores PCFT y RFC1 también se expresan en la barrera hematoencefálica, que suministra folato para el parénquima cerebral. En un principio, se pensó que el FR- α mediaba en la absorción de folato en cerebro pero este transportador no se ha llegado a encontrar en la barrera hematoencefálica ni en cerebro (Weitman y col., 1994). No se sabe aún si es el PCFT o RFC1 el responsable de la absorción de folato en el cerebro, aunque la absorción se ve inhibida por los bajos niveles de 5-metil-THF o ácido fólico, lo que sugiere la participación del PCFT. Por otro lado el pH neutro que se presenta en esta zona es más consonante con el transporte del RFC1 (Shane, 2010).

Normalmente el folato es eficientemente reabsorbido en los túbulos proximales del riñón, y poco o nada de folato se pierde en orina cuando se realizan ingestas normales. Esta reabsorción está mediada por FR- α (Birn y col., 1993), la tasa de aclaramiento de folato es inversamente proporcional a su afinidad por el FR- α (Selhub y col., 1987). Debido a la alta afinidad de este receptor por el ácido fólico, esta vitamina puede acumularse en gran cantidad en riñón (Shane, 2010).

2.2.4.3. Excreción

El folato se filtra libremente en el glomérulo y es reabsorbido en el túbulo proximal de la nefrona (Williams y Huang, 1982; Whitehead, 1986). El efecto neto es que la mayor parte del folato secretado es reabsorbido. El aclaramiento renal de los derivados de folato es inversamente proporcional a la afinidad por la proteína de unión al folato en los tubos proximales de riñón (Selhub y col., 1987). Se ha reportado que en sujetos alcohólicos un aumento de la excreción de folato, aunque no está totalmente claro si esto es debido a un aumento de la excreción en sí o como un problema de reabsorción, y si esta excesiva pérdida provoca una disminución de las reservas orgánicas (Eisenga y col., 1989). La orina contiene algunos derivados del folato, la mayor parte de estos productos de excreción en humanos son derivados del catabolismo del folato (Scott, 1984).

La excreción biliar de folato se ha estimado en hasta 100 µg/día en el hombre (Whitehead, 1986; Herbert y Das, 1994). Gran parte del mismo es reabsorbido en el intestino delgado, pero la pérdida de folato a través de esta ruta podría ser significativa en los individuos con síndromes malabsortivos. La excreción fecal de folato es variable y no se debe confundir con la disponibilidad de folato como consecuencia de la biosíntesis del mismo por parte de la flora intestinal (Shane, 2010).

2.3. LECHE DE CABRA

2.3.1. Introducción

La leche y los productos lácteos son muy importantes para la dieta. En cuanto a los países en desarrollo, la cría de ganado caprino tiene un papel clave en la producción de ganado, de hecho, se estima que más del 80% de la población de cabras se encuentra en Asia y África. La domesticación de la cabra se conoce desde la antigüedad, se cree que surgió hace unos 10.000 años en las montañas de Irán (Haenlein, 2007). Hace un tiempo las cabras fueron consideradas como especies marginales para la agricultura de subsistencia de las poblaciones pobres, subestimando su potencial y gran papel económico. En la actualidad, la cabra no se considera sinónimo de subdesarrollo y pobreza, tanto es así que la leche de cabra tiene una importancia vital en la nutrición humana en la zona reconocida como la cuna de la civilización moderna. Lo que hace que la cabra tenga tal importancia es su capacidad de adaptación a ambientes extremos y cambiantes (Silanikove, 2000). Aunque puede no representar gran importancia en ciertas partes del mundo, es innegable la contribución que ha hecho la leche de cabra en el bienestar

nutricional y económico en países en desarrollo, especialmente en el Mediterráneo, Oriente Medio, Europa del Este y en países de América de Sur. En los últimos años, el interés de la leche de cabra ha aumentado y se ha centrado en la explotación de las razas locales. En los países desarrollados de Europa, Oceanía, Norteamérica y Sudamérica, la leche de cabra está cobrando cada vez más relevancia en la economía, sobre todo debido a la selección de quesos de forma que se ha convertido en un alimento “*gourmet*”, adquiriendo estos un precio más elevado en el mercado (Park y col., 2007).

El consumo de leche de cabra y la producción de sus lácteos también se asocia con efectos beneficiosos para la salud. Entre las nuevas aplicaciones y estrategias de márketing en que se está comercializando la leche de cabra, por ejemplo, como base de alimentos “*nutracéuticos*” e infantiles. Estos productos lácteos se usan como vehículos para otros compuestos funcionales, tales como fitoesteroles, ácidos grasos de pescado y numerosas bacterias probióticas. Otro aspecto que también aumenta la demanda de leche de cabra se deriva del aumento del número de personas con alergias a la leche de vaca y diversas enfermedades gastrointestinales. La alergia a la leche de vaca es la alergia más frecuente en los primeros años de vida. En ausencia de leche materna, las personas alérgicas necesitan una alternativa proteica, que normalmente está basada en proteínas de la leche de vaca hidrolizadas (caseína y proteínas del suero) o fórmulas a base de soja. Se ha sugerido que la leche de otros mamíferos (cabras, burros y caballos) pueden ser una posible alternativa a la leche de vaca incluso en fórmulas de alimentos infantiles (Selvaggi y col., 2014).

2.3.2. Características organolépticas

Las principales propiedades organolépticas que caracterizan a la leche de cabra, desde un punto de vista comercial, son el color, el olor y el sabor. Estas características tienen una importancia vital en los productos de origen animal, ya que el consumidor al apreciarlas tiene en cuenta, sobre todo, aquellas particularidades del mismo que él es capaz de percibir con los sentidos. Tal es así, que a veces el consumidor rechaza productos lácteos excelentes por su composición pero que, sin embargo, no ofrecen el color o el sabor característicos (Quiles y Hevia, 2000).

La leche de cabra tiene un color más blanco que la de vaca, a causa de no contener β -carotenos, que la amarillea, en su lugar contiene vitamina A (Boza y Sanz Sampelayo, 1997).

La definición del olor y sabor de un producto natural complejo, como es el caso de la leche de cabra, es bastante difícil, tanto si se trata de olores y sabores normales o anormales. En los últimos años, han sido mucho los avances en la química de los olores y sabores, gracias fundamentalmente a técnicas analíticas como la cromatografía gaseosa, apoyada por la espectrofotometría de masas. De esta manera, se han podido identificar gran cantidad de sustancias sápidas, presentes en pequeñas cantidades (Quiles y Hevia, 2000).

El olor de la leche de cabra recién ordeñada suele ser un olor neutro, pero por factores como el periodo de la lactación (en el final fundamentalmente), la presencia de machos en los lugares de ordeño, la mala higiene de los establos que favorecen la absorción de compuestos aromáticos, el manejo inadecuado, los propios materiales del ordeñador (Villalobos, 2005), etc., aparece un olor característico llamado “cáprico”. La intensidad de este olor característico tiene una correlación positiva con la presencia de ácidos grasos de cadena ramificada tipo 4-metiloctanoico y 4-etiloctanoico (Kim Ha y Lindsay, 1991). También se sabe que el olor es debido a la presencia los ácidos grados caproico, cáprico y caprílico (de 6, 8 y 10 átomos de carbono, respectivamente) (Boza y Sanz Sampelayo, 1997; Quiles y Hevia, 2000).

El sabor de la leche de cabra suele ser dulzón (por la lactosa), agradable y muy particular, lo cual hace que sea bastante fácil su identificación. Este sabor, *sui generis*, depende igualmente de los ácidos grasos anteriormente señalados (caproico, cáprico y caprílico), así como, del mirístico y palmítico fundamentalmente. Tal es así que el sabor desaparece en la leche desnatada. También se ha señalado que compuestos como el orto y metacresol, que son exclusivos de la leche de cabra, como los que confieren ese sabor característico (Quiles y Hevia, 2000).

Tabla nº 6: Algunas propiedades físicas de la leche de cabra, oveja y vaca (modificado de Kurkdjian y Gabrielian, 1962; Jenness y col., 1974; Juárez y Ramos, 1986; Haenlein y Wendorff, 2006; Park y col., 2007).

Propiedades	Leche de cabra	Leche de oveja	Leche de vaca
Densidad (g/cm ³)	1.029 – 1.039	1.035 – 1.038	1.023 – 1.398
Viscosidad (cps)	2.12	2.86 – 3.93	2.0
Tensión superficial (dyn/cm)	52.0	44.94 – 48.70	42.3 – 52.1
Conductividad (Ω ⁻¹ cm ⁻¹)	0.0043 – 0.0139	0.0038	0.0040 – 0.0055
Índice de refracción	1.450 ± 0.39	1.3492 – 1.3497	1.451 ± 0.35
Punto de congelación (- °C)	0.540 – 0.573	0.570	0.530 – 0.570
Acidez (% ácido láctico)	0.14 – 0.23	0.22 – 0.25	0.15 – 0.18
pH	6.50 – 6.80	6.51 – 6.85	6.65 – 6.71

Por último, la dieta de la cabra también constituye un elemento clave en las características organolépticas de la leche. Diversos tipos de alimentos vegetales como ciertas especies de los géneros *Brassica spp.*, *Lupinus spp.*, *Verbena spp.*, *Xanthium spp.*, *Digital spp.*, *Eupatorium spp.*, *Capsella spp.*, así como diversas plantas aromáticas o la pulpa de la remolacha, le confieren sabores y olores característicos (Arbiza, 1986; Quiles y Hevia, 2000; Villalobos, 2005).

2.3.3. Características nutricionales de la leche de cabra

Las enormes propiedades nutricionales de la leche de cabra eran ya admiradas y reconocidas desde la antigüedad; así por ejemplo, Hipócrates (2500 a.C.) recomendaba su consumo en exceso.

Sin embargo, también han sido mucho los detractores de este alimento; basta con echar una mirada a principios del siglo pasado, la *Royal Society* la consideraba como el vehículo transmisor de la brucelosis o Fiebre de Malta (*Brucella melitensis*). Por otra parte, en Alemania en 1920, se la responsabilizó de la anemia de los niños lactantes por su carencia en hierro; pero no se percataron o no quisieron apreciar que la leche de la mayoría de los animales domésticos son deficitarias en hierro, comparadas con la leche de la mujer y, que por lo tanto, todos aquellos niños que hubiesen consumido durante los primeros meses de vida leche exclusivamente de hembras domésticas (principalmente vaca y oveja), también se varían afectados por esta anemia ferropénica (Quiles y Hevia, 2000).

Hoy en día, todos estos tabúes se han superado, y la leche de cabra poco a poco ha ido recobrando su prestigio como alimento. Gracias por una parte a las mejoras zootécnicas, y por otra, a las mejoras tecnológicas, que han hecho posible que la leche de cabra obtenida de animales sanos, bajo óptimas condiciones de manejo y alimentación, y tratada con los adecuados procedimientos tecnológicos, pueda competir con la leche de vaca y oveja, tanto en calidad como en sabor (Quiles y Hevia, 2000).

La leche de cabra presenta ciertas características que la diferencian de la de otras especies que hacen de sus productos una excelente opción en la dieta de niños, adultos y alérgicos a la leche de vaca. Comparada con la leche de cabra, vaca y humana, las diferencias más importantes son: mejor digestibilidad, alcalinidad, capacidad de tamponar, valor nutricional y terapéutico (Park y col., 2007). Dentro de sus características nutricionales, destacan sus proteínas de alto valor nutritivo e hipoalérgicas (Olalla y col., 2009; Santillo y col., 2009),

además de estar a menudo recomendada como el mejor sustituto de la leche de vaca (Luiz y col., 1999).

Existen varias razones que están relacionadas con la mejor digestibilidad de la leche de cabra. La lactosa pasa más rápido por el sistema digestivo, con menor tiempo para la fermentación adecuada en el colon, lo que causa menos problemas de intolerancia (Haenlein, 2002). Por otro lado, un menor contenido en α 1-caseínas genera una estructura altamente hidratada, más abierta y menor firme, facilitando la digestión del coágulo en un menor tiempo de tránsito gástrico (Haenlein, 2002; Veja y León y col., 2005; García y Travassos, 2012).

Tabla nº 7: Porcentaje de los nutrientes básicos en leche de cabra, oveja, vaca y humana (modificado de Park, 2008; Bedoya y col., 2012).

Composición	Leche de cabra	Leche de oveja	Leche de vaca	Leche humana
Grasa %	3.8	7.9	3.6	4
Sólidos no grasos %	8.9	12	9	8.9
Lactosa %	4.1	4.9	4.7	6.9
Proteína %	3.4	6.2	3.2	1.2
Caseína %	2.4	4.2	2.6	0.4
Albúmina, globulina %	0.6	1	0.6	0.7
Nitrógeno no proteico %	0.4	0.8	0.2	0.5
Cenizas %	0.8	0.9	0.7	0.3
Calorías/100 ml	70	105	69	68

Otro aspecto de su buena digestibilidad está relacionado con su mayor contenido de ácidos grasos de cadena corta y menor diámetro de sus micelas de grasa. Estos glóbulos de grasa menores y más dispersos, presentan una mayor superficie específica, por lo que la actuación de la lipasa es más rápida, así los ácidos butírico, caproico, caprílico, cáprico, láurico y mirístico proporcionan energía directamente en lugar de ser depositados en el tejido adiposo (Haenlein, 2004). Por calentamiento de la leche se puede aumentar la digestibilidad de la misma, y con ellos disminuir la hipoalergenicidad (Frazier, 1995; García y Travassos, 2012).

Varios autores han considerado a la leche de cabra como un alimento funcional por su valor nutricional, su capacidad de mantener estable la salud, por reducir los riesgos de padecer

enfermedades crónicas y de modular las funciones fisiológicas de forma positiva (García y Travassos, 2012).

Existen evidencias científicas que sugieren que ácidos grasos específicos tienen efectos beneficiosos para la salud humana y pueden contribuir con la prevención de muchas enfermedades crónicas (Lee y col., 2005; Bertolino y col., 2006). De estos ácidos grasos, los ácidos linoleicos conjugados presentan un mayor potencial funcional y de manipulación en la grasa de la leche de cabra. En los estudios realizados por Parodi (2003) en animales *in vivo*, se demostró que los isómeros C18:2 cis-9, trans-11 tienen propiedades anticancerígenas y antioxidantes.

Las siguientes propiedades de la leche de cabra la hacen un alimento funcional: el tamaño de las micelas de grasa (65% con un diámetro inferior a 3 μm) y sus ácidos grasos de cadena corta, facilitan la absorción de la mucosa intestinal debido a la rápida acción enzimática al hidrolizar las cadenas lipídicas; sus proteínas de alto valor biológico ayudan a combatir la desnutrición; la leche de cabra puede ser una opción en el tratamiento de la alergia a la lactoalbúmina bovina; su alto contenido en vitamina A, que se libera poco después de su ingesta, restaura los niveles de la misma en el cuerpo, evitando enfermedades de la vista, en la reproducción, la piel y la pérdida de funciones en el organismo; su contenido de minerales, como calcio, fósforo, potasio y magnesio, actúan previniendo la osteoporosis, el mantenimiento de los huesos y dientes y en funciones metabólicas y fisiológicas importantes (Laguna, 2003; García y Travassos, 2012).

Algunas de las propiedades positivas de la leche de cabra para la fabricación de medios nutritivos y para fórmulas nutricionales pueden conseguirse a través del estudio de su composición. Sin embargo, como se trata de un medio complejo, probablemente, hay compuestos que se desconocen que le otorgan atributos ventajosos o no, pero ello es preciso realizar estudios que revelen dichas propiedades, usando los modelos animales apropiados (Silanikove y col., 2010; García y Travassos, 2012).

2.3.3.1. Proteína de la leche de cabra

La leche es una secreción de las glándulas mamarias de mamíferos, cuya composición y características físicas varía entre especies. Se trata de una emulsión compleja de aceite en agua, proteína, lactosa, minerales, así como azúcares, células, hormonas e inmunoglobulinas. Las dos fracciones proteicas principales son: proteínas insolubles (de la familia de la caseína) y

proteínas solubles (proteínas del suero o lactosuero). Por consiguiente, dentro de las caseínas se incluyen las α_1 , α_2 , β y κ , mientras que las proteínas del suero son la α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina (Tabla nº 8). La leche de cabra también contiene importantes proteínas en menor proporción, tales como la albúmina del suero, inmunoglobulinas, lactoferrina, transferrina, proteínas de unión al calcio, prolactina, proteínas de unión al fosfato y las proteosas-peptonas. El contenido en nitrógeno de las distintas fracciones de la leche de cabra varía en función de la raza, la genética, la estación del año, la fase de la lactancia y la alimentación. La fracción proteica (caseína, fundamentalmente) con respecto al suero es de 20/80. La cantidad de nitrógeno no proteico es de aproximadamente 5.8% del total. Los compuestos que forman parte del nitrógeno no proteico son la urea, aminoácidos libres, nucleósidos, nucleótidos, y poliaminas (Park y col., 2007; Prosser y col., 2008; Selvaggi y col., 2014).

Tabla nº 8: Concentración de las distintas fracciones proteicas de la leche de cabra (modificado de Jenness, 1980; Mora-Gutiérrez y col., 1987; Barth y Behnke, 1997; Park y col., 2007; Selvaggi y col., 2014).

Proteína total (g/Kg)	37.20
Caseína total (g/Kg)	24.00
α_1 -caseína (% del total de caseína)	5.60
α_1 -caseína (% del total de caseína)	19.20
β -caseína (% del total de caseína)	54.80
κ -caseína (% del total de caseína)	20.40
Proteína del suero (g/Kg)	7.40
α -lactoalbúmina (% del total de proteínas)	24.00
β -lactoglobulina (% del total de proteínas)	53.70
Proteínas minoritarias (% del total de proteínas)	22.30
Nitrógeno no proteico x 6.38 (g/Kg)	5.80

Las caseínas son una familia de fosfoproteínas sintetizadas en la glándula mamaria en respuesta a las hormonas lactogénicas y otros estímulos y secretadas como grandes coloides denominados micelas, que son las responsables de la mayor parte de las propiedades físicas únicas de la leche. Su gran importancia en la industria láctea en todo el mundo, han convertido a las caseínas en el blanco de numerosos estudios, llegando a ser las proteínas alimentarias más estudiadas. Inicialmente, las caseínas se consideraron como una sustancia homogénea. A

principios del siglo XX, Linderstrom-Lang y Kodama (1925) demostraron que están compuestas de dos fracciones: una que precipita en presencia de calcio (caseínas sensibles al calcio) y otra fracción que actúa en contra de dicha precipitación (caseínas no sensibles al calcio). Posteriormente, Mellander (1939) demostró la presencia de tres componentes diferentes designados como α , β y γ -caseínas. En estudios adicionales se descubrió que existían un mayor número de componentes menores (Wake y Baldwin, 1961). Sin embargo, con el desarrollo de la biología molecular, ahora es posible afirmar que sólo existen cuatro tipos de caseínas y que la heterogeneidad anterior era debida a los distintos polimorfismos genéticos de las caseínas (Ng-Kwai Hang y Grosclaude, 1992). En 1984, el comité *American Dairy Science Association Committee on Nomenclature and Classification* propuso que la nomenclatura usada para las caseínas bovinas sería α s1, α s2, β y κ -caseínas, que se adoptaría para la investigación de proteínas de la leche de otras especies.

Las caseínas son la fracción proteica principal de la leche en muchas especies y su función es el transporte de fosfato de calcio en la leche y por lo tanto proporcionar a los recién nacidos una fuente de calcio y fósforo para la formación de los huesos, así como contribuir con las necesidades de aminoácidos (Stewart y col., 1987). Las caseínas, siendo proteínas secretadas, poseen péptidos señal en el extremo N-terminal que dirigen el orden de los polipéptidos recién sintetizados, después de este proceso los péptidos señal se eliminan de los productos primarios de la traducción para dar lugar a las proteínas maduras. Las caseínas sensibles al calcio presentan similitudes en su masa molecular (en torno a 24 KDa), en las regiones promotoras, secuencia líder de péptidos y en los sitios de fosforilación. Estos datos apoyan la hipótesis de un origen evolutivo común de estos genes, que a día de hoy presentan duplicaciones y modificaciones de lo que sería un gen ancestral común (Rijnkels, 2002). En la cabra, se han encontrado numerosos polimorfismos para los cuatro genes con varios alelos asociados con reducida o nula expresión de sus proteínas. Además del nitrógeno de las caseínas (corresponde con un 76% del contenido total de nitrógeno), el contenido del mismo en la leche también se distribuye entre las proteínas del suero (18%) y el nitrógeno no proteico (6%). La principal fuente de proteína del suero de la leche se llama “suero ácido”, también se conoce como dulce o cuajo del suero (Morr, 1989). A diferencia de la caseína, las proteínas del suero de la leche no tienen fósforo y se caracterizan por su alto contenido en aminoácidos que contienen azufre, principalmente metionina y cisteína. Esto es muy importante para los requerimientos de los recién nacidos, ya que necesitan del 4 al 6% de aminoácidos que contengan azufre (en contenido total de aminoácidos) para un correcto crecimiento (Foldager y col., 1977; Oftedal, 2012).

Las proteínas del suero de la leche son moléculas globulares con un contenido sustancial en dominios α -hélice, en el que los aminoácidos ácidos/básicos e hidrófobos/hidrófilos se distribuyen de una manera bastante equilibrada a lo largo de las cadenas polipeptídicas (Evans, 1982). Alrededor del 75% de todas las proteínas del suero de la leche son albúminas (α -lactoalbúminas y β -lactoglobulinas), que son una valiosa fuente de péptidos bioactivos con actividad fisiológica. Desde un punto de vista nutricional, las proteínas del suero de la leche se han considerado superiores a la caseína en varios aspectos. Tienen un mejor perfil de aminoácidos, siendo similares a los de la leche humana. Por lo tanto, se recomiendan las proteínas del suero de la leche para la formulación de productos lácteos que reemplacen la leche bovina en la nutrición infantil (Hamraeus, 1982). Sindayikengeru y Xia (2006) observaron que las caseínas tienen peor digestión y absorción que las proteínas del suero. Las proteínas del suero se utilizan como ingredientes de distintos alimentos debido a importantes propiedades funcionales, tales como la solubilidad, viscosidad, capacidad de retención de agua, gelificación, adhesión, emulsificación y formación de espuma (Stănciuc, 2009).

Dentro de las caseínas sensibles al calcio, la α 1-caseína es la que mayor solubilidad tiene en presencia del mismo. Es una proteína altamente fosforilada y es un componente estructural de las micelas de caseína que juega un papel clave en la formación de la cuajada de queso (Walstra, 1990; Farrell y col., 2004; Horne, 2006).

Las α 2-caseínas son un grupo más dispar que las α 1-caseína y se han ido identificando a partir de un amplio grupo de especies como ovina, caprina y bovina (Boisnard y Pètrissant, 1985; Stewart y col., 1987; Bouniol, 1992). La α 2-caseína es la proteína menos investigada probablemente debido a su difícil aislamiento y purificación. Sin embargo, se ha encontrado en la leche de muchos mamíferos y, en algunos casos especiales, constituye hasta el 29% de la caseína total. Además, se encuentra en mayor concentración en micelas grandes de leche caprina (Tziboula y Horne, 1999; Horne, 2006). Las α 2-caseínas, al igual que las α 1-caseínas, son péptidos altamente fosforilados (Horne, 2006).

Las β -caseínas se describen como “sensibles al calcio”, ya que precipitan en presencia de bajas concentraciones de este catión. Contribuyen de forma importante en las propiedades de la superficie de las micelas de caseína en la formación de la cuajada cuando la leche coagula por la acción de la enzima quimosina o rennina (Pearse y col., 1986). Las β -caseínas son particularmente ricas en glutamina y tienen un menor número de lugares de fosforilación y, con ello, menor grado de fosforilación comparado con las α 1 y α 2-caseínas. En la leche de cabra, la β -caseína es la proteína más abundante (Jenness, 1980).

La κ -caseína representa alrededor del 15% del total de caseínas. La secuencia de nucleótidos y aminoácidos se conoce para muchas especies de mamíferos placentarios (Furet y col., 1990). Esta caseína es la única que se ha demostrado que contiene restos de carbohidratos, se concluye, así, que no está relacionada con las caseínas sensibles al calcio (Jollés y col., 1978; Bonsing y Mackinlay, 1987; Mercier y Vilotte, 1993).

En cuanto a las proteínas del suero de la leche, la α -lactoalbúmina es una metaloproteína con un solo sitio de unión al Ca^{2+} , lo que representa una de las proteínas más importantes en la leche de los rumiantes (Jenness, 1982; Permyakov y Berliner, 2000). Esta proteína es necesaria para la producción de lactosa y para el trasiego del agua en las vesículas secretoras mamarias, por lo cual la α -lactoalbúmina es crucial para la secreción de la leche (Hayssen y Blackburn, 1985). La α -lactoalbúmina es rica en aminoácidos esenciales y es la proteína predominante en la leche humana (Brew y Grobler, 1992). En su composición destaca su alto contenido en lisina y cisteína y una cantidad particularmente alta de triptófano (Heine y col., 1991).

Otro de los componentes proteicos del suero es la β -lactoglobulina. Ésta es una proteína globular que pertenece a la familia de las lipocalinas, que son unas pequeñas proteínas con infinidad de propiedades, tales como la capacidad de unirse a pequeñas moléculas hidrófobas. A día de hoy aún no están claras sus funciones fisiológicas, más allá de proporcionar aminoácidos a la descendencia y actuar como transportador de ácidos grasos y retinol (Pérez y Calvo, 1995; Flower, 1996; Selvaggi y col., 2014). La β -lactoglobulina está presente en la leche de muchas especies, principalmente en los rumiantes, mientras que la leche humana está libre de la misma (Businco y Bellanti, 1993; Prez y Calvo, 1995).

En la fracción proteica de la leche también se incluyen otras proteínas en menor proporción, como son las inmunoglobulinas, lactoferrina, ferritina, transferrina, glicomacropéptidos, calmodulina, lactoperoxidasa, lisozimas, prolactina y la proteína de unión al folato junto con varios factores de crecimiento. El contenido de estas proteínas es similar en la leche de cabra y de vaca, pero el contenido de la proteína de unión al folato se presenta en mayor cantidad en la leche de cabra (12 frente a 8 g/ml) (Park y col., 2007). La proteína de unión al folato es una glicoproteína con alrededor del 22% de carbohidratos (Jenness, 1980). La lactoferrina es una glicoproteína presente en la leche de todas las especies de vertebrados. Esta es la principal proteína de unión al hierro en la leche humana, mientras que la transferrina es más abundante en la leche de roedores (Renner y col., 1989).

Aunque están presentes en menor concentración, estas proteínas minoritarias de la leche pueden influir mucho en el metabolismo, en la inmunología y en los procesos fisiológicos y

contribuir así en las principales ventajas que posee la leche de cabra. Y son estas las que se usan para el desarrollo de productos nutricionales (Silanikove y col., 2010; Selvaggi y col., 2014).

2.3.3.2. Carbohidratos de la leche de cabra

Al igual que en la leche de las hembras bovinas y ovinas, la lactosa es el mayor carbohidrato presente en la leche de cabra, y su valor promedio se encuentra en el orden del 4.1%, menor que el valor reportado en bovinos, puede estar por el 4.7% (Silanikove y col., 2010). La glucosa es sintetizada en la glándula mamaria con la participación activa de la proteína lactoalbúmina y favorece la absorción intestinal de calcio, magnesio y fósforo, y la utilización de vitamina D. Sin embargo, la importancia de este carbohidrato radica en el mantenimiento del equilibrio osmótico entre el torrente sanguíneo y las células alveolares de la glándula mamaria durante la síntesis de la leche, razón por la cual es un componente que varía según el nivel de producción láctea y por efecto directo del tipo de dieta suministrada (Chilliard y col., 2005; Bedoya y col., 2012).

Por otro lado, los oligosacáridos de la leche caprina, al igual que la lactosa, las cantidades que están presentes en la leche de caprinos fluctúan en un rango de 250 a 300 mg/l, lo cual representa 4 o 5 veces más que los valores encontrados en la leche de vaca, pero menos que los presentes en la leche humana (Tabla nº 9). Los oligosacáridos de la leche se cree que son beneficiosos para la nutrición del hombre debido a sus propiedades probióticas y anti-infecciosas (Martínez Férrez y col., 2006).

Tabla nº 9: Cantidad total de oligosacáridos y lactosa en leche de cabra, vaca, oveja y humana (modificado de Martínez Férrez y col., 2004; Bedoya y col., 2012).

Origen	Oligosacáridos (g/l)	Lactosa (g/l)
Leche caprina	0.25 – 0.30	45
Leche bovina	0.03 – 0.06	46
Leche ovina	0.02 – 0.04	48
Leche humana	0.5 – 0.8	68

Los oligosacáridos de la leche tienen propiedades antigénicas considerables y son valiosos en la promoción del crecimiento de la flora intestinal del recién nacido (Park y Haenlein, 2007). La leche de cabra es un alimento de gran interés nutricional, especialmente en relación con los oligosacáridos altamente bioactivos (Boehm y Stahl, 2007). Se han llevado a cabo estudios que apoyan esta observación, donde se pone de manifiesto las propiedades

antiinflamatorias de los oligosacáridos de la leche de cabra en modelos con roedores (Daddaoua y col., 2006; Lara-Villoslada y col., 2006; Martínez-Férez y col., 2006). Gopal y Gill (2000) también vieron la positiva contribución de los oligosacáridos en el desarrollo cerebral neonatal.

2.3.3.3. Composición lipídica de la leche de cabra

La grasa de la leche es el componente más variable de la misma, cualitativa y cuantitativamente hablando, en términos económicos, en la nutrición, en características físicas y sensoriales; este hecho provoca un impacto en los productos lácteos que van a depender del estado de la lactancia, temporada, raza, genotipo y la alimentación del animal. Las características de la grasa de la leche de cabra que tienen más importancia en la fabricación de productos lácteos son: tamaño de los glóbulos de grasa, que en la cabra son más pequeños comparados con la leche de vaca (Jeness, 1980), y el perfil de ácidos grasos de la leche de cabra, que contiene mayor contenido de ácidos grasos de cadena corta (Haenlein, 1992).

Tanto en la leche de vaca como de cabra, el rango de tamaños de los glóbulos de grasa oscila entre 1 a 10 μm , pero la proporción de glóbulos menores de 5 μm en la leche de vaca es del 60%, mientras que en la leche de cabra ronda el 80%. Esta diferencia da como resultado una textura más suave en los productos de leche de cabra, mientras que provoca una gran dificultad a la hora de producir mantequilla caprina (Silanikove y col., 2010). A parte de la diferencia de tamaño, los glóbulos de grasa de leche de cabra están mejor distribuidos en la emulsión láctea que los de la leche bovina. Estos pequeños glóbulos de grasa se dispersan mejor, presentando así una homogenización natural, y proporcionan una mayor superficie de acción de las lipasas favoreciendo la digestión en el hombre (Zervas y Tsiplakou, 2013).

Los principales ácidos grasos de cadena corta, caproico (C6:0), caprílico (C8:0) y cáprico (C10:0), que están relacionados positivamente con el intenso sabor “cáprico”, corresponden con el 15-18% de los ácidos grasos de la leche de cabra, mientras que en la leche de vaca sólo representan el 5-9% (Chilliard y col., 2006). Son numerosos los estudios realizados donde se comparan los perfiles de ácidos grasos entre la leche de cabra y oveja (Tabla nº 10) y entre cabra y vaca (Park y col., 2007; Sanz Ceballos y col., 2009; Slaćanac y col., 2010; Zervas y Tsiplakou, 2011). En los estudios de Sanz Ceballos y col. (2009) se encontraron con una alta proporción de ácidos grasos de cadena corta (C6 – C14) en la leche de cabra frente a la de vaca, pero también un alto porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados n-3 y n-6, con un marcado ratio inferior de n-6. Haenlein (2004) y Park y col. (2007) vieron que la grasa de la leche de cabra tiene un alto contenido de ácidos grasos monoinsaturados. De forma parecida como

ocurre con los ácidos grasos de cadena corta, Haenlein (1992) hizo hincapié en los beneficios para la salud humana de ácidos grasos mono y poliinsaturados de la leche de cabra, especialmente para las enfermedades cardiovasculares.

Tabla nº 10: Perfil de ácidos grasos (%) comparativo normal, mínimo/máximo de leche de oveja y cabra (modificado de Park y col., 2007; Zervas y Tsiplakou, 2013).

Ácidos grasos	LECHE DE OVEJA		LECHE DE CABRA	
	Media	Mín./Máx.	Media	Mín./Máx.
C4:0	3.51	3.07–3.93	2.18	1.97–2.44
C6:0	2.90	2.68–3.44	2.39	2.03–2.70
C8:0	2.64	2.10–3.27	2.73	2.28–3.04
C10:0	7.82	5.54–9.73	9.97	8.85–11.0
C10:1	0.26	0.23–0.31	0.24	0.19–0.38
C12:0	4.38	3.48–4.92	4.99	3.87–6.18
C12:1	0.04	0.03–0.05	0.19	0.10–0.40
C13:0	0.17	0.13–0.22	0.15	0.06–0.28
C14:0	10.4	9.58–10.7	9.81	7.71–11.2
<i>iso-C15:0</i>	0.34	0.26–0.43	0.13	0.12–0.15
<i>anteiso-C:15:0</i>	0.47	0.33–0.60	0.21	0.17–0.24
C14:1	0.28	0.19–0.50	0.18	0.17–0.20
C15:0	0.99	0.89–1.11	0.71	0.46–0.85
<i>iso-C16:0</i>	0.21	0.17–0.26	0.24	0.17–0.40
C16:0	25.9	22.5–28.2	28.2	23.2–34.8
<i>iso-C17:0</i>	0.53	0.44–0.59	0.35	0.24–0.52
<i>anteiso-C17:0</i>	0.30	0.26–0.36	0.42	0.30–0.50
C16:1	1.03	0.74–1.27	1.59	1.00–2.70
C17:0	0.63	0.58–0.70	0.72	0.52–0.90
C17:1	0.20	0.17–0.22	0.39	0.24–0.48
C18:0	9.57	8.51–11.0	8.88	5.77–13.2
C18:1 total	21.1	17.8–23.0	19.3	15.4–27.7
C18:2 total	3.21	2.89–3.57	3.19	2.49–4.34
C20:0	0.45	0.36–0.52	0.15	0.08–0.35
C18:3	0.80	0.52–1.04	0.42	0.19–0.87
C18:2 conjugado total	0.74	0.56–0.97	0.70	0.32–1.17

En la actualidad, existe un gran interés por aumentar la proporción de ácidos grasos poliinsaturados y el ácido linoleico conjugado (CLA) cuyo principal isómero, el ácido ruménico (C18:2 cis9, trans11) con alrededor del 85% de los isómeros, está relacionado con efectos antiaterogénico, anti-carcinogénico, anti-inflamatorio, inmunestimulante y de modulación de la resistencia a la insulina. El t10, c12-CLA con alrededor del 2% de los isómeros del CLA, posee propiedades beneficiosas anti-carcinogénicas y anti-obesidad (Köhler Osmari, 2007). El contenido en ácido linoleico de la leche de cabra es normalmente mayor que en la leche bovina,

esto puede ser debido a la forma de crianza semi-intensiva que se lleva a cabo de las cabras. Comparando las cabras y ovejas, sometidas a una misma dieta, la leche de oveja presenta mayor contenido en los ácidos linoleico y vacénico que la cabra (Tsiplakou y Zervas, 2008a). También se pudo ver que, cuando se alimentan los animales con dieta de olivo (que tiene alto contenido en C18:3), u orujo de uva (con alto contenido en C18:2), el resultado de la composición en ácido linoleico de la leche de oveja y cabra, fue diferente (Tsiplakou y Zervas, 2008b), a favor del ganado ovino. Estas diferencias en la respuesta de la cabra y oveja al contenido en CLA y en el perfil de ácidos grasos, bajo las mismas condiciones dietéticas, puede explicarse ya que se han encontrado diferencias entre las dos especies, en concreto, en el ARNm de la enzima esteroil coenzima A desaturasa de los adipocitos mamarios (Tsiplakou y col., 2009). El método más extendido para aumentar el contenido de CLA en la leche consiste en añadir aceites o granos oleaginosos ricos en ácidos grasos poliinsaturados a la dieta de la cabra. La cantidad y tipo de estos complementos influye en el metabolismo lipídico ruminal y en la producción de CLA en la leche. Además, la composición lipídica de la leche de cabra es fundamentalmente para su rendimiento en quesos, para la textura, sabor y olor de los derivados (Chilliard y col., 2003; Chilliard y Ferlay, 2004; Bedoya y col., 2012)

También se han encontrado ácidos grasos de cadena ramificada en la leche de cabra (Alonso y col., 1999), que le dan un sabor característico a los productos lácteos. La mayoría del colesterol en la leche de cabra, como en la leche de vaca, se presenta en forma libre (52 mg/100g de grasa), y en menor proporción en forma de ésteres de colesterol, que representa menos del 4% del total de colesterol (Jenness, 1980; Chandan y col., 1992; Zervas y Tsiplakou, 2013)

La estructura de los triacilglicéridos (TAG) de la leche es la responsable de las propiedades reológicas de la grasa de la misma y su comportamiento durante la fusión y la cristalización. La composición de TAG es de gran interés, ya que puede ser utilizada para verificar el origen de la grasa de la leche. Los TAG están invariablemente acompañados de pequeñas cantidades de di- y monoacilglicéridos, principalmente en la posición 1 y 2, siendo intermediarios de la biosíntesis de TAG (Park y col., 2007). En la Tabla nº 11 se muestra la composición promedio de TAG de la grasa de la leche oveja, cabra y vaca. Los TAG de las tres especies presentan una amplia gama de pesos moleculares y de longitudes de cadena. El contenido de TAG en la leche de oveja tiene una distribución bimodal con un máximo de 36 – 38 átomos de carbono (C36 – C38) y C50 – C52, y un mínimo de C44 – C46 (Partidario y col., 1998; Goudjil y col., 2003). Los perfiles de TAG de la leche oveja y vaca son similares. En la leche de cabra el contenido de TAG presenta un mayor número de átomos de carbono, alcanzando un máximo en C40 – C42 (Park y col., 2007).

Tabla nº 11: Composición de triacilglicéridos de la grasa de la leche de cabra, oveja y vaca (% en peso) (modificado de Precht, 1992; Fontecha y col., 1998; Goudjil y col., 2003; Park y col., 2007).

Triacilglicéridos	Leche de cabra	Leche de oveja	Leche de vaca
C26	0.49	0.72	0.22
C28	1.23	1.6	0.57
C30	2.47	2.52	1.13
C32	4.06	3.63	2.56
C34	6.20	6.03	5.95
C36	9.40	9.64	10.8
C38	12.1	12.8	12.5
C40	12.6	12.0	9.87
C42	12.5	9.02	6.87
C44	11.6	8.08	6.47
C46	8.1	6.77	7.32
C48	5.84	6.67	9.12
C50	5.85	7.63	11.3
C52	4.92	8.43	10.0
C54	2.01	4.48	4.99

Los esteroides conforman una pequeña fracción de los lípidos totales en la leche, siendo el colesterol el esteroide principal (300 mg/ 100 g de grasa, equivalente a 10 mg/ 100 ml de leche de vaca). Se han podido ver otros esteroides en la leche de vaca, incluso esteroides vegetales (Jensen, 2002). La fracción de esteroides de la leche es de gran interés nutricional porque los altos niveles en plasma están asociados con un mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares (Park y col., 2007).

El contenido de colesterol en la grasa de la leche de cabra y oveja varían considerablemente debido a las diferentes razas y a la distinta técnica analítica. En la Tabla nº 12 se muestran los valores obtenidos en los estudios realizados por Fraga y col. (2000) y Goudjil y col. (2003), donde se compara el contenido de esteroides de la leche de cabra y de oveja. Podemos observar que los esteroides de menor importancia representan el 3–5% de la fracción total de esteroides.

Tabla nº 12: Concentración de los diferentes esteroides en la grasa de la leche de cabra y oveja (mg/ 100 g de grasa) (modificado de Fraga y col., 2000; Goudjil y col., 2003).

Tipo de esteroide	Leche de cabra (media ± EEM)	Leche de oveja (media ± EEM)
Colesterol	344.8 ± 15.6	288.4 ± 42.2
Latosterol	1.47 ± 0.35	1.81 ± 0.82
Desmosterol	1.39 ± 0.49	0.41 ± 0.30
Dihidrolanosterol	2.25 ± 0.38	4.15 ± 2.40
Lanosterol	9.76 ± 1.64	6.86 ± 1.88

2.3.3.4. Composición mineral de la leche de cabra

La leche es la principal fuente de calcio dietario para el ser humano, sin importar si es de cabra, vaca u otra especie. Comparativamente, la leche de cabra aporta el 13% más de calcio en relación a la leche de vaca (Chacón Villalobos, 2005). No es un alimento fuente de nutrientes como el hierro, cobre, cobalto y magnesio (Tabla nº 13), sin embargo, estudios realizados por nuestro grupo de investigación (AGR-206) ponen de manifiesto que la leche caprina presenta más propiedades beneficiosas que la vacuna, entre ellas la prevención de la anemia ferropénica, por falta de hierro y la desmineralización ósea por deficiencia de calcio, osteomalacia (Alfárez y col., 2006; Campos y col., 2007; Nestares y col., 2008; Díaz-Castro y col., 2009, 2011; López-Aliaga y col., 2009; Ramírez y col., 2010; Díaz-Castro y col., 2013; García y col., 2013)

Es interesante notar que los requerimientos diarios de calcio y magnesio de grupos de alta sensibilidad como es el caso de mujeres embarazadas y lactantes (ingesta recomendada de 1.000 mg), así como adolescentes (ingesta recomendada de 1.000 mg), son apenas cubiertos por tres vasos de leche de vaca, mientras que la leche de cabra cubre ampliamente estos requerimientos con solo dos porciones del mismo tamaño (Chacón Villalobos, 2005).

La leche de cabra contiene menos sodio y menos minerales de cobalto y molibdeno que la leche de vaca, pero más potasio (134% más) y cloro (0.151% total), siendo los demás muy similares entre ambas leches (Maree, 1978; Chacón Villalobos, 2005; Park y col., 2007).

Con el consumo de leche de cabra, el organismo aumenta la absorción y la utilización del hierro y el cobre, gracias a los altos contenidos de triglicéridos de cadena media y a los aminoácidos cistina y lisina. Las dietas con adecuados niveles de hierro, son de mayor viabilidad cuando se consume leche caprina. Los niños que se alimentan con leche de cabra alcanzan mayor peso, mayor estatura, más mineralización de los huesos, y en plasma sanguíneo, mayor densidad de las vitaminas A, tiamina, riboflavina y niacina, así como del calcio y de la hemoglobina. En resumen, esta leche contiene la mayoría de las vitaminas y de los minerales que requiere el desarrollo de los niños (Solis y Castro, 2007).

Sin embargo, hay que destacar, que la leche de cabra, al igual que la leche de otros pequeños rumiantes, es sensible a los tratamientos térmicos, que será más acusado a mayor impacto térmico. Así, la estabilidad de la leche va a depender de los factores que afectan a la estabilidad del calcio, por ejemplo, el tratamiento con frío (- 4 °C), muy aplicado en la industria láctea, provoca una disociación de la β -caseína y el fosfato de calcio en disolución, provocando una disminución drástica en su estabilidad térmica y con ello de la biodisponibilidad mineral de

la misma (Raynal-Ljutovac y col., 2004; Bouhallab y Raynal-Ljutovac, 2005; Raynal-Ljutovac y col., 2007).

Por el contrario, en estudios realizados por Güler (2007), donde se comprobó el estado de 24 minerales en la leche y yogurt de cabra, se demostró que ciertas fermentaciones favorecen la biodisponibilidad de dichos minerales, contribuyendo considerablemente con la suplementación de elementos mayoritarios y traza en la dieta humana.

Tabla n° 13: Concentración de minerales y vitaminas de la leche de cabra, vaca, oveja y humana (cantidad en 100 g de leche) (modificado de Jenness, 1980; Debski y col., 1987; Park y Chukwu, 1988, 1989; Coni y col., 1999; Park y col., 2007).

	Leche de cabra	Leche de vaca	Leche de oveja	Leche humana
Minerales				
Ca (mg)	134	122	193	33
Mg (mg)	16	12	18	4
Na (mg)	41	58	44	15
K (mg)	181	152	136	55
P (mg)	121	119	158	43
Cl (mg)	150	100	160	60
S (mg)	28	32	29	14
Fe (mg)	0.07	0.08	0.08	0.20
Zn (mg)	0.56	0.53	0.57	0.38
Cu (mg)	0.05	0.06	0.04	0.06
Mn (mg)	0.032	0.002	0.007	0.07
I (mg)	0.022	0.020	0.020	0.007
Se (µg)	1.33	0.96	1.00	1.52
Al (mg)	-	-	0.05 – 0.18	0.06
Vitaminas				
Vitamina A (IU)	185	126	146	190
Vitamina D (IU)	2.30	2.0	0.18 µg	1.4
Vitamina C (mg)	4.16	0.94	4.16	5.00
Tiamina (B₁) (µg)	68	45	8	17
Riboflavina (B₂) (mg)	0.21	0.16	0.376	0.02
Niacina (mg)	0.27	0.08	0.416	0.17
Ácido pantoténico (mg)	0.31	0.32	0.408	0.20
Biotina (µg)	1.50	2.0	0.93	0.4
Vitamina B₁₂ (µg)	0.065	0.36	0.712	0.03
Ácido fólico (µg)	1.29	5.0	5.0	5.5

2.3.3.5. Composición vitamínica de la leche de cabra

La leche de cabra y oveja tienen mayor concentración de vitamina A que la leche de vaca (Tabla nº 13). Debido a que las cabras convierten todo el β -caroteno en vitamina A, por este motivo, la leche de cabra es más blanca que la de vaca (Amigo y Fontecha, 2011). El suministro de cantidades adecuadas de leche de cabra en las dietas de niños puede suministrar cantidades adecuadas de vitamina A y niacina, y un exceso de tiamina, riboflavina y pantotenato (Parkash y Jenness, 1968; Ford y col., 1972; Park y col., 2007). Un niño alimentado exclusivamente con leche de cabra tiene un exceso de aporte de proteína, Ca, P, vitamina A, tiamina, riboflavina, niacina y pantotenato en comparación de los consejos de la FAO-OMS (Jenness, 1980). Los niveles de vitamina B en la leche de cabra y vaca son el resultado de la síntesis en el rumen, y no dependen tanto de la dieta que sigue el animal (Haenlein y Caccase, 1984; Mann, 1988; Park y col., 2007).

La leche de cabra comparada con la de vaca tiene deficiencias significativas de ácido fólico y vitamina B₁₂, que son las causantes de la “anemia de la leche de cabra” (Park y col., 1986). Los niveles de ácido fólico y vitamina B₁₂ son cinco veces mayores en la leche de vaca, el ácido fólico es necesario para la síntesis de hemoglobina. La deficiencia de vitamina B₁₂ puede causar anemia megaloblástica en lactantes, pero la causa de esta anemia se atribuye principalmente a la deficiencia de folato en la leche de cabra. Tanto la leche de cabra como la de vaca son deficitarias en piridoxina (B₆), vitamina C y D, con lo cual deben complementarse con otras fuentes alimentarias (Park y col., 2007).

2.3.3.6. Otros componentes minoritarios de la leche de cabra

Dentro de los compuestos nitrogenados no proteicos nos encontramos con los nucleótidos, estos aparecen en la leche para facilitar la maduración inmune de la descendencia lechal y, a menudo, también se añaden a las fórmulas de alimentos infantiles (Schallera y col., 2007). Los nucleótidos son los principales componentes del ARN y del ADN, y participan como mediadores en el trasiego de energía obtenida en el metabolismo, en la transducción de señales y en la regulación del crecimiento celular. Los nucleótidos también participan en el metabolismo de lipoproteínas, el aumento del HDL (*High Density Lipoprotein*: lipoproteína de alta densidad) en plasma, así como en el aumento de la síntesis de apolipoproteína (Apo) A1 y Apo A1 V en lactantes prematuros, y en la regulación positiva de la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en neonatos (Schallera y col., 2007). Los ribonucleótidos se consideran esenciales para el correcto desarrollo de los recién nacidos, debido a que la síntesis

de *novo* y los mecanismos de reciclaje endógenos son insuficientes para el funcionamiento óptimo de los tejidos intestinales y linfoides, que están en rápido crecimiento, a pesar de que los requerimientos son bajos pueden dar lugar a una deficiencia de los mismos (Schallera y col., 2007). Una de las principales razones por las cuales se usan nucleótidos para enriquecer las fórmulas de alimentos infantiles y de continuación, es la presencia de altas cantidades de estos en la leche materna (Schallera y col., 2007). La leche de cabra, a diferencia de la de vaca, también contiene adecuados niveles de nucleótidos (Prosser y col., 2008). El contenido de nucleótidos en las fórmulas infantiles basadas en leche de cabra se acercan más a los niveles que se presentan en la leche materna sin necesidad de adicionarlos externamente (Prosser y col., 2008; Silanikove y col., 2010).

Las poliaminas, otro componente de la fracción no proteica de la leche, se ha demostrado que son de gran importancia para el crecimiento óptimo, la función celular del tracto gastrointestinal, la maduración de las enzimas digestivas (Pegg y McCann, 1982) y también se ha observado que están implicados en la reducción de la incidencia de alergias alimentarias en los lactantes (Dandrifosse y col., 2000). A finales de los años noventa, Ploszaj y col. (1997) descubrieron que el calostro y la leche de cabra son ricos en poliaminas, mucho más alta comparada con la de otros mamíferos (por ejemplo, humana, ratas, cerdos y vacas). Aunque posteriormente Prosser y col. (2008) vio que la leche y los preparados infantiles con base de leche de cabra presentaban mayor contenido de poliaminas que la leche y fórmulas lácteas con base de leche de vaca; aunque ninguna de las dos especies llega a los niveles de poliaminas que presenta la leche materna.

En resumen, la leche de cabra parece ser una excelente fuente de nucleótidos para lactantes y preparados de continuación, y tiene el potencial de ser una buena fuente de poliaminas. El contenido y la disponibilidad de nucleótidos y ribonucleótidos dependen de la actividad de una serie de fermentos lácteos (Silanikove, 2008), pero aún no se conoce con exactitud. También se necesita investigar adicionalmente sobre el origen de estos nucleótidos de la leche, si son derivados del ARN o ADN, y seguir investigando sobre los potenciales beneficios de la nucleótidos y poliaminas presentes en la leche de cabra (Silanikove y col., 2010).

Material y Métodos



3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

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

Tras el destete, las ratas son divididas en dos grupos experimentales. La ferropdeficiencia es inducida en uno de los grupos por la técnica desarrollada previamente por nuestro grupo de investigación (Pallarés y col., 1993): las ratas son sometidas a un periodo pre-experimental (PPE) de 40 días, en los cuales se les suministra dieta estándar AIN-93G (Reeves y col., 1993), con contenido normal de hierro (45 mg/Kg de dieta) al grupo control (Reeves y col., 1993) y con bajo contenido en hierro (5 mg/Kg de dieta) al grupo anémico. La dieta baja en hierro utilizada para inducir la anemia se obtuvo omitiendo el hierro del suplemento mineral de la dieta. Durante este período, la dieta y el agua bidestilada estaba disponible “*ad libitum*” para todas las ratas.

Desde el comienzo del estudio, las ratas fueron distribuidas en células individuales de metabolismo. Estas células se encuentran situadas en una habitación aireada y termorregulada (21 ± 2 °C) con fotoperiodo controlado de 12 horas (luz–oscuridad) y un 55-60% de humedad. En el día 40 del PPE, previa anestesia por inyección intraperitoneal con pentobarbital sódico (Sigma Diagnostics, St Louis, Misuri, USA), en 10 ratas de cada grupo se procede a la extracción de sangre periférica de la vena caudal en tubos que contienen EDTA como anticoagulante para el control hematológico de la anemia.

Tras el PPE, ambos grupos de animales (control y anémico) se someten a un periodo experimental (PE) en el cual son divididos en ocho 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 hierro (450 mg/Kg dieta) y contenido normal (2 mg/Kg dieta) o suplemento de ácido fólico (40 mg/Kg dieta). La dosis de 450 mg de Fe/Kg de dieta es la más común para inducir la sobrecarga crónica de hierro en estudios animales (Raja y col., 1994) y la dosis de 40 mg ácido fólico/Kg de dieta es la más comúnmente empleada en estudios de suplementación (Achón y col., 2000).

Durante este PE, el agua bidestilada estaba disponible “*ad libitum*” mientras que la dieta se controla “*pair feed*”, de manera que los animales ingieren el 80% de la ingesta media de cada período al día, para evitar las diferencias debidas a la cantidad de dieta ingerida.

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

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, Misuri, USA) a una dosis de 5 mg/100 g de peso corporal por vía intraperitoneal y tras laparatomía media, las ratas son desangradas mediante canulación de la aorta abdominal. La sangre obtenida, una alícuota se conserva con EDTA como anticoagulante, que será empleado para el control hematológico de la anemia. La otra alícuota se conserva sin anticoagulante, para obtener suero tras centrifugar a 1500 g, 10 minutos y posteriores determinaciones hematológicas (hierro, TIBC, saturación de transferrina, ferritina) y parámetros bioquímicos (hepcidina, transaminasas (ALT y AST), creatinina y creatina quinasa MB).

Obtenidas las muestras sanguíneas, se extrae el hígado. Se lava con solución salina (NaCl al 0.9 %). Las fracciones citosólicas de hígado se obtienen por centrifugación diferencial sometida a hemólisis hipotónica el mismo día del sacrificio y son conservadas en congelación a -80 °C hasta la posterior determinación de DMT1 hepático y contenido en hierro.

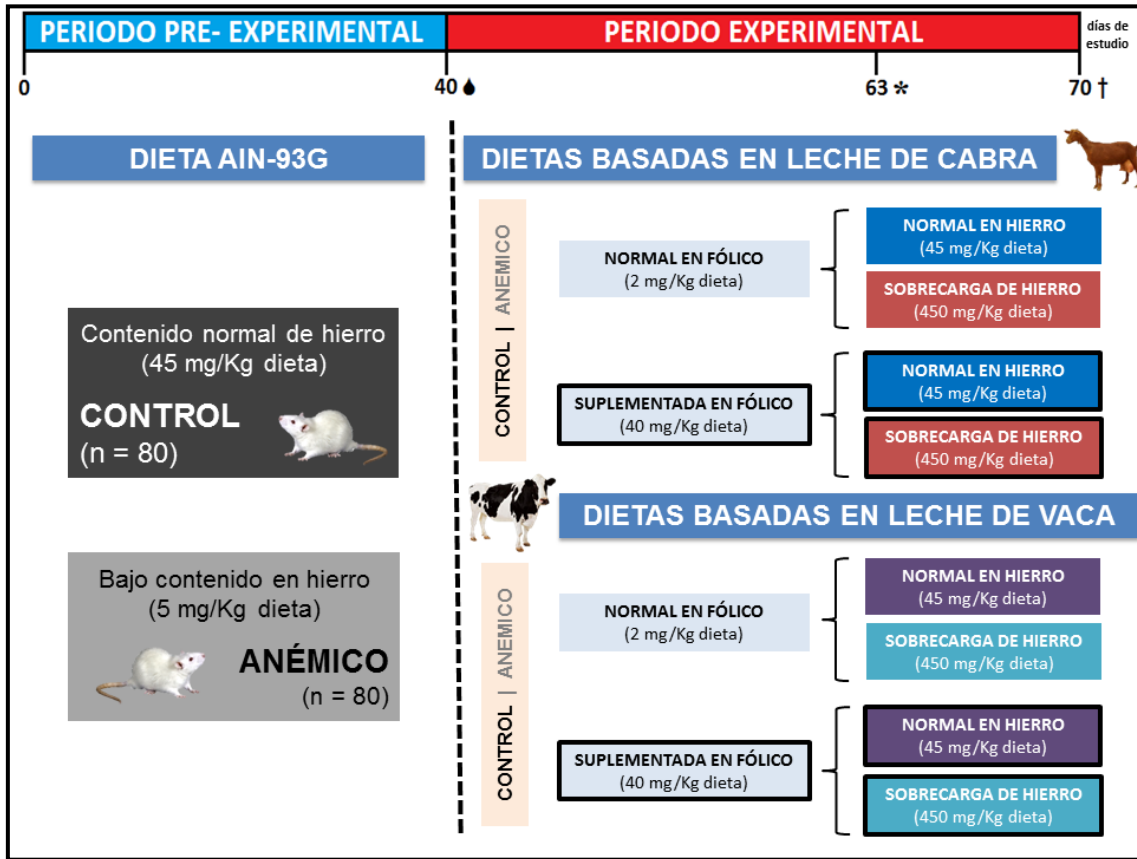


Figura nº 11: Diseño experimental del estudio

- ◆ Toma de sangre de la vena caudal para el control hematológico de la anemia.
- * Técnica de Thomas y Mitchel: recogida de heces y orina por separado en células individuales de metabolismo para su posterior análisis.
- † Sacrificio de los animales para la obtención de sangre y la extracción de hígado.

3.2. DIETAS ENSAYADAS

En la siguiente tabla se muestra la composición de las dietas ensayadas durante el periodo pre-experimental y experimental.

Tabla nº 14: Dietas ensayadas durante el PPE y PE.

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

Levenda de la Tabla:

- a. Contenido de hierro en la dieta durante el periodo pre-experimental: 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 hierro: 45 mg/Kg dieta) y con bajo contenido en hierro para las ratas anémicas (5 mg/Kg dieta) (Pallarés y col., 1993).
- b. Los ingredientes constantes (g/Kg dieta) fueron: fibra (celulosa micronizada) 50 g, sacarosa 100 g, cloruro de colina 2.5 g, L-cistina 3 g, corrector mineral 35 g, corrector vitamínico 10 g.
- c. Para las dietas basadas en leche de cabra y vaca empleadas en el periodo experimental 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 de hierro (450 mg/Kg dieta) para los grupos de sobrecarga de hierro (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 el mismo (40 mg/Kg dieta) para las suplementadas (Achón y col., 2000).

La dieta estándar AIN-93G del periodo pre-experimental 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 del 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 hierro empleada fue citrato férrico. El contenido en hierro por análisis en las dietas ensayadas durante el periodo pre-experimental fue de 44.71 mg/Kg en la dieta para los animales control y 6.31 mg/Kg en la dieta que se ministró a 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 funden al baño maría y después se centrifuga a 300 g (Hetticj, Universal 30 RF, Alemania) durante 15 minutos a 4 °C, para separar el sobrenadante que constituye la grasa pura. El contenido en hierro (mg/Kg dieta) en las dietas usadas durante el periodo experimental, es el siguiente:

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

A la cantidad de minerales y vitaminas que aporta la leche en polvo desnatada se le añade un corrector mineral y vitamínico específicos que cubran las recomendaciones del AIN-93G. La suplementación en ácido fólico de las dietas basadas en leche se obtiene mediante la adición a la misma de este nutriente hasta alcanzar el grado de suplementación requerido en el corrector mineral específico. El contenido de ácido fólico de las dietas se determina por inmunoanálisis quimioluminiscente (Jacobs y col., 2001).

3.3. TÉCNICAS ANALÍTICAS

3.3.1. Materia seca

Es determinada como la parte de sustancia que no desaparece al someter la muestra a una temperatura de 105 ± 2 °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 hidroclicónica por extracción con éter de petróleo (Sanderson, 1986).

3.3.3. Contenido proteico

El contenido en nitrógeno de las leche 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, Alemania) a la muestra, tantas veces como sea necesario hasta la aparición de vapores blanquecinos. En ese momento se comienza a añadir 10 ml de mezcla nitrito/perclórico (4:1 v/v) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) en alícuotas de 2 ml cada vez, hasta completar la mineralización.

Finalizada la mineralización, se deja enfriar, se filtra en papel Whatman del nº 41, libre de cenizas (Whatman International Ltd, Maidstone, Reino Unido) 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 hierro.

3.3.4.1. Determinación de hierro

La concentración de hierro en las dietas se determinan por espectrofotometría de absorción atómica (PERKIN ELMER 1100B, Norwalk, Estados Unidos) 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 problema. Los estándar primarios son de dos tipos: propios de cada determinación y sueros controles liofilizados (BCR certified reference material BCR 185; Community Bureau of Reference, Bruselas, Bélgica). El valor derivado del análisis de este material de referencia es: hierro: 210 ± 6 mg/Kg (valor certificado: 214 ± 6 mg/Kg).

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

3.3.5. Hemoglobina, recuento de hematíes, volumen corpuscular medio, hematocrito, y plaquetas

Se realizan en el día 40 y 70 del estudio 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, Japón).

3.3.6. Hierro sérico, TIBC (Capacidad total de unión al hierro), porcentaje de saturación de la transferrina

Para calcular la tasa de saturación de transferrina, primero se determina el TIBC colorimétricamente y los niveles de hierro sérico enzimáticamente, usando un kit comercial *SIGMA Iron and total iron-binding capacity* (Sigma Diagnostics, St. Louis, Misuri, Estados Unidos). El ensayo se adapta a microplacas, usando 50 µl de suero en 250 µl de tampón más 5 µl 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, Estados Unidos). El porcentaje de saturación de la transferrina se calcula usando la siguiente ecuación:

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

3.3.7. Ferritina sérica

Los niveles de ferritina sérica se determinan usando el kit comercial Rat Ferritin ELISA (Biovendor GmbH, Heidelberg, Alemania). 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 horas a temperatura ambiente, procedimiento después a la aspiración y lavado de los pocillos. Tras este paso, se adiciona la solución enzimática que se une 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 450nm, usando un lector de microplacas Bio-Rad microplate reader (Bio-Rad Laboratories Inc., California, Estados Unidos) en un plazo de 30 minutos. La intensidad de color desarrollado es inversamente proporcional a la concentración de ferritina sérica.

3.3.8. Hepcidina sérica

La concentración de hepcidina-25 se determinó usando el kit ELISA DRG (DRG Instruments GmbH, Marburgo, Alemania). Los pocillos de la placa *microtiter* se recubren con

un anticuerpo monoclonal (de ratón). Estos anticuerpos reconocen específicamente una parte de la molécula de hepcidina-25. La hepcidina-25 de la muestra endógena compite con el conjugado de hepcidina-25-biotina por la unión al anticuerpo del pocillo. Después de la incubación, el conjugado no unido se elimina mediante lavados. Posteriormente se añade un enzima conjugado, estreptavidina-peroxidasa, al pocillo. Después de incubar, se elimina mediante lavado el complejo enzimático no unido para continuar añadiendo la solución con el sustrato. La reacción colorimétrica se detiene después de un corto periodo de incubación, se observa un viraje de color de azul a amarillo. La microplaca se lee a 450 nm en un lector de *microtiter* (Bio-Rad Laboratories Inc.) y la intensidad de color desarrollado es inversamente proporcional a la concentración de hepcidina en la muestra. Los resultados se expresan como ng/ml de suero.

3.3.9. DMT1 hepático

Se usaron muestras de hígado conservadas en congelación a -80°C , estas muestras se homogenizan en hielo por medio de un Potter-Elvehjem. Para la extracción de células enteras se realizó el ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA), se homogeniza en 500 μl de tampón (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Nonidet P-40 y 0.1% de SDS) mezclado con inhibidor de proteasa (dilución 1:200, Sigma-Aldrich). El homogenado se centrifuga a 1000 g durante 5 minutos a 4°C .

La concentración total de proteína del tejido homogenado fue determinado usando el kit *Scientific Pierce BCA Protein Assay* (Thermo Scientific Inc., Hanover Park, Illinois), después de extraer las proteínas. Se tomaron 12 μg de extracto de proteínas del homogenado (30 μl del volumen total), se vierten un gel de poliacrilamida prefabricados de 4 a 20% (Criterion TGX Stain-Free Precast Gel, 30 μl ; Bio-Rad Laboratories Inc.). Se realiza una electroforesis de 250 a 300 V en una cubeta de electroforesis vertical (Criterion; Bio-Rad Laboratories Inc.) durante 25 minutos. Posteriormente, las proteínas separadas se transfieren a un gel *Trans-Blot Turbo Mini PVDF Transfer Packs* (Bio-Rad Laboratories Inc.) con un *Trans-Blot Turbo Transfer System* (Bio-Rad Laboratories Inc.) durante 6 minutos. El software usado (Image Lab Software; Bio-Rad Laboratories Inc.) en este equipo nos permitió cuantificar la eficacia de la transferencia. El rendimiento de la transferencia fue de aproximadamente 99.9%. Antes de la transferencia a membrana, se incuba en una solución de bloqueo (5% leche en polvo en solución salina tamponada Tris (TBS) con Tween-20 (TTBS) (0.8% NaCl 0.242% y 2-amino-2-hidroximetil-2, 2-propanodiol) y 1% de Tween-20; Bio-Rad Laboratories Inc.) durante 1 hora a temperatura ambiente, después se lava 3 veces con TBS, y finalmente se incuba con el anticuerpo primario (DMT1) en TTBS durante la noche a 4°C en agitación suave y continua.

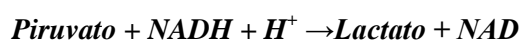
La inmunodetección se realizó con un anticuerpo policlonal para DMT1 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California) diluido a 1:500 y un anticuerpo monoclonal de conejo específico para β -actina (Rabm and Abcam) diluido 1:1200 en TTBS, que se usó como control para la proteína total cargada en la transferencia y también se utilizó para determinar las proporciones del complejo DMT1 en comparación del contenido proteico total hepático. Estos transferidos se lavan 3 veces con TTBS durante 5 minutos y se incuban con el anticuerpo secundario conjugado apropiado (Immun-Star Goat Anti-Mouse (GAM)-HRP; Bio-Rad Laboratories Inc.; 1:130,000) en TTBS durante una hora a temperatura ambiente. A continuación, las membranas se lavan dos veces con TTBS durante 15 minutos y un lavado final con TBS durante 15 minutos. Tras la incubación de los anticuerpos apropiados, se observan manchas por quimioluminiscencia.

Los anticuerpos unidos a la membrana se visualizan con el sustrato *Clarity Western ECL* (Bio-Rad Laboratories Inc.). La señal de cada banda se cuantifica y guarda y es procesada con equipos Fujifilm. Estos resultados fueron analizados con el software Imagen J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Además, la cantidad total de proteína transferida a membrana se determinó con el software Image Lab (Bio-Rad Laboratories Inc.). Estos resultados se usaron para normalizar todos los resultados.

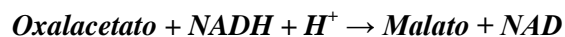
3.3.10. Transaminasas: ALT y AST

Se determinaron mediante técnica colorimétrica (Spinreact, Barcelona, España) (Bergmeyer y col., 1978). Las transaminasas catalizan la transferencia del grupo amino del aspartato (GOT) o de la alanina (GPT) al α -cetoglutarato. El cetoácido formado, oxalacético o pirúvico respectivamente, en presencia de 2,4-Dinitrofenilhidrazina (DNFH) de la hidrazina correspondiente con una coloración medible en medio alcalino a 505 nm en un espectrofotómetro de UV-Vis (Thermo Spectronic, Rochester, Nueva York, Estados Unidos).

La alanina aminotransferasa (ALT) inicialmente llamada transaminasa glutámico pirúvica (GPT) cataliza la transferencia reversible de un grupo amino de la alanina al α -cetoglutarato con formación de glutamato y piruvato. El piruvato producido es reducido a lactato en presencia de lactato deshidrogenasa (LDH) y NADH:



La aspartato aminotransferasa (AST) inicialmente llamada transaminasa glutamato oxaloacética (GOT) cataliza la transferencia reversible de un grupo amino del aspartato al α -cetoglutarato con formación de glutamato y oxalacetato. El oxalacetato producido es reducido a malato en presencia de malato deshidrogenasa (MDH) y NADH:



La velocidad de disminución de la concentración de NADH en el medio, determinada fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de ALT y AST en las muestras ensayadas.

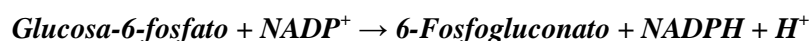
3.3.11. Creatinina y creatina quinasa MB

Creatinina

Se determinó mediante la técnica colorimétrica (Spinreact, Barcelona, España). El ensayo de la creatinina está basado en la reacción de la creatinina con el picrato alcalino (Murray y col., 1984). La creatinina reacciona con el picrato alcalino formando un complejo rojizo. El intervalo de tiempo escogido para las lecturas permite eliminar gran parte de las interferencias conocidas del método. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de creatinina en la muestra ensayada. El producto formado produce una coloración medible a 490 nm en un espectrofotómetro de UV-Vis (Thermo Spectronic, Rochester, Nueva York, Estados Unidos).

Creatina quinasa MB (CK-MB)

Se determinó mediante técnica colorimétrica (Spinreact, Barcelona, Spain). La CK-MB cataliza la transferencia reversible de un grupo fosfato de la fosfocreatina al ADP (Gerhardt y col., 1979; Abbot y col., 1984). Esta reacción se acopla con otras catalizadas por la hexoquinasa (HK) y por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6F-DH):



La velocidad de formación de NADPH, determinado fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de CK-MB en la muestra ensayada, determinándose la intensidad de

color a 340 nm en un espectrofotómetro de UV-Vis (Thermo Spectronic, Rochester, Nueva York, Estados Unidos).

3.4. ÍNDICES BIOLÓGICOS

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

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

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

$$A = I - F$$

Retenido (R):

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

Ratio retención frente a ingesta (R/I):

$$\% R/I = \frac{R}{I} \times 100$$

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

- A = Absorbido
- I = Ingerido
- F = Excreción fecal
- U = Excreción urinaria
- R = Retenido

Eficacia de regeneración de la Hemoglobina (E.R.H.) (Mahoney y Hendricks, 1982):

$$\% E.R.H. = \frac{mg\ Fe\ Hb\ Final - mg\ Fe\ Hb\ Inicial}{mg\ Fe\ ingerido} \times 100$$

$$mg\ Fe\ Hb\ Final = Peso\ Final \times 0.067 \times \frac{Hb\ Final}{100} \times 3.35$$

$$mg\ Fe\ Hb\ Final = Peso\ Final \times \frac{ml\ sangre}{g\ Peso\ corporal} \times \frac{Hb\ Final}{100} \times \frac{mg\ Fe}{g\ Hb}$$

$$mg\ Fe\ Hb\ Inicial = Peso\ Inicial \times 0.067 \times \frac{Hb\ Inicial}{100} \times 3.35$$

Se asume que $ml\ de\ sangre / g\ de\ Peso\ corporal = 0.067$ y que $mg\ Fe / g\ Hb = 3.35$, de manera que las ecuaciones quedan:

$$mg\ Fe\ Hb\ Inicial = Peso\ Inicial \times 0.067 \times \frac{Hb\ Inicial}{100} \times 3.35$$

$$mg\ Fe\ Hb\ Final = Peso\ Final \times 0.067 \times \frac{Hb\ Final}{100} \times 3.35$$

3.5. 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 ($2 \times 2 \times 2 \times 2$), 2 (tipo de dieta: leche de cabra frente a leche de vaca) \times 2 (grupo de animal: controles frente a anémicas) \times 2 (contenido de hierro en la dieta: normal frente a sobrecarga) \times 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 hierro y contenido de ácido fólico en las dietas. Cuando los términos de la interacción no son 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 hierro 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 $P < 0.05$.

Tablas y Figuras



4. TABLAS Y FIGURAS

Tabla I: Parámetros hematológicos de ratas controles y anémicas en el día 40 de la ferropdeficiencia.

Parámetros	Grupo Control 45 mg Fe/Kg dieta (n = 80)	Grupo Anémico 5 mg Fe/Kg dieta (n = 80)
Concentración de Hb (g/l)	128.9 ± 2.8	73.5 ± 2.7 *
Hematíes (10 ¹² /l)	7.1 ± 0.1	6.1 ± 0.2 *
VCM (fl)	55.6 ± 0.2	38.9 ± 0.6 *
Hematocrito (%)	39.8 ± 0.7	27.5 ± 0.5 *
Plaquetas (10 ⁹ /l)	723 ± 25.1	1388 ± 67.8 *
Hierro sérico (µg/l)	1375 ± 119	703 ± 55 *
TIBC (µg/l)	2852 ± 198	17642 ± 725 *
Saturación de la transferrina	47.0 ± 3.1	3.9 ± 0.3 *
Ferritina sérica (µg/l)	83.0 ± 2.5	49.9 ± 1.3 *
Hepcidina sérica (µg/l)	17.0 ± 0.44	13.2 ± 0.6 *

Los valores están expresados como medias ± error estándar de la media

Hb, hemoglobina; VCM, volumen corpuscular medio. TIBC, capacidad total de fijación del hierro.

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

Tabla II: Parámetros bioquímicos de ratas controles y anémicas en el día 40 de la ferropdeficiencia.

Parámetros	Grupo Control 45 mg Fe/Kg dieta (n = 80)	Grupo Anémico 5 mg Fe/Kg dieta (n = 80)
ALT (UI/l)	21.02 ± 3.2	54.99 ± 5.5 *
AST (UI/l)	112.7 ± 18.6	223.7 ± 23.3 *
Creatinina (µmol/l)	21.25 ± 3.1	24.32 ± 3.4
Creatina quinasa MB (U/l)	1523 ± 187.0	1391 ± 111.9

Los valores están expresados como medias ± error estándar de la media

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

Tabla III: Relación hepatosomática y contenido de hierro en hígado de ratas controles y anémicas en el día 40 de la ferropdeficiencia.

Parámetros	Grupo Control 45 mg Fe/Kg dieta (n = 80)	Grupo Anémico 5 mg Fe/Kg dieta (n = 80)
Peso corporal (g)	235.38 ± 0.70	217.63 ± 0.50 *
Peso del hígado (g)	6.05 ± 0.21	5.91 ± 0.60
Peso hígado/Peso corporal (%)	2.57 ± 0.06	2.77 ± 0.09 **
Hierro en hígado (µg/g)	401.16 ± 19.43	284.02 ± 21.12*

Los valores están expresados como medias ± error estándar de la media

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

** Valores significativamente diferentes ($P < 0.01$) con respecto al grupo control mediante el test de la *t de Student*.

Tabla IV. Parámetros hematológicos de ratas controles y anémicas alimentadas durante 30 días con dietas basadas en leche de cabra o vaca, con contenido normal o sobrecarga de hierro y contenido normal o suplemento de ácido fólico.

Parámetros	DIETAS BASADAS EN LECHE DE CABRA				DIETAS BASADAS EN LECHE DE VACA				NIVEL DE SIGNIFICACIÓN				
	Grupo Control		Grupo Anémico		Grupo Control		Grupo Anémico		Efectos principales ¹		Efectos principales ¹		
	Fólico normal (n=20)	Fólico suplementado (n=20)	Fólico normal (n=20)	Fólico suplementado (n=20)	Fólico normal (n=20)	Fólico suplementado (n=20)	Fólico normal (n=20)	Fólico suplementado (n=20)	DER ²	Anemia	Dieta	Contenido de hierro	Contenido de fólico
Hb (g/l)	Normal	130.80	134.00 ^E	125.8	129.30 ^F	127.60	130.25	120.50	124.43 ^E	2.345	NS ³	NS	< 0.05
	Sobrecarga	131.30	150.80 ^{abDE}	148.0 ^{ADC}	151.00 ^{AD}	130.10	142.00 ^{BD}	130.80 ^{BD}	131.13 ^{BCD}	2.984	< 0.05	< 0.05	< 0.05
Hemáties (10¹²/l)	Normal	7.40	8.01 ^{aE}	7.20	8.04 ^{AE}	7.05	7.74 ^{BE}	7.07	7.68 ^{BE}	0.183	NS	< 0.05	< 0.001
	Sobrecarga	8.03 ^{abD}	7.87 ^a	7.10	7.98 ^{ADDE}	6.92 ^b	7.17 ^b	7.20	7.49 ^b	0.127	NS	< 0.01	< 0.05
VCM (fl)	Normal	57.25	52.62 ^E	55.04	53.44 ^E	57.68	53.77 ^E	55.34	52.48 ^E	0.386	NS	< 0.01	< 0.001
	Sobrecarga	56.44	52.39 ^E	56.15 ^A	52.00 ^E	56.79	53.33 ^E	53.18 ^B	50.56 ^E	0.402	NS	< 0.05	< 0.001
Hematocrito (%)	Normal	42.38 ^a	44.08 ^{aE}	39.54 ^A	42.48 ^E	40.82 ^b	38.52 ^{bE}	38.94 ^B	43.04 ^E	0.568	NS	NS	< 0.01
	Sobrecarga	45.38 ^{abD}	48.54 ^{abDE}	45.36 ^D	42.32	39.21 ^b	40.23 ^b	45.28 ^D	42.59 ^E	0.593	NS	NS	< 0.05
Plaquetas (10⁹/l)	Normal	926.00	928.00	939.33	963.67	934.00	903.00	964.00	944.89	29.53	NS	NS	NS
	Sobrecarga	909.67	936.56	968.00	984.12	940.25	916.75	968.50	913.25	32.21	NS	< 0.05	NS
Hierro sérico (µg/l)	Normal	1352	1347	1326	1345	1346	1364	1355	1353	58.65	NS	NS	NS
	Sobrecarga	1456 ^D	1445 ^D	1476 ^D	1489 ^D	1491 ^D	1478 ^D	1487 ^D	1454	61.87	NS	NS	NS
TIBC (µg/l)	Normal	2785	2821	2789	2776	2787	2765	2798	2776	156.43	NS	NS	NS
	Sobrecarga	3251 ^D	3285 ^D	3195 ^D	3156 ^D	3145 ^D	3321 ^D	3254 ^D	3128 ^D	189.54	NS	NS	NS
Saturación transferrina (%)	Normal	46.65	47.34	46.37	46.25	45.98	46.21	45.32	45.18	1.543	NS	NS	NS
	Sobrecarga	49.59 ^D	48.95 ^D	48.96 ^D	48.85 ^D	47.76 ^D	48.59 ^D	47.88 ^D	47.76 ^D	1.885	NS	NS	NS
Ferritina sérica (µg/l)	Normal	84.33	83.60	82.34	80.26	83.25	83.87	82.97	82.60	1.925	NS	NS	NS
	Sobrecarga	87.91 ^D	88.40 ^D	86.65 ^D	87.53 ^D	87.73 ^D	88.06 ^D	86.87 ^D	88.71 ^E	2.322	NS	NS	NS
Hépcidina sérica (µg/l)	Normal	12.90 ^a	12.30 ^a	9.78 ^{AC}	9.13 ^{AC}	10.31 ^b	9.85 ^b	7.75 ^{BC}	7.12 ^{BC}	0.648	< 0.01	< 0.01	NS
	Sobrecarga	10.82 ^a	10.77 ^a	9.64 ^{AC}	9.40 ^{AC}	9.75 ^b	9.87 ^b	7.67 ^{BC}	6.54 ^{BC}	0.747	< 0.05	< 0.05	NS

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

^{ab} Valores entre grupos de animales controles con distinto superíndice minúscula en la misma fila indican diferencia significativa mediante one-way ANOVA (*test de Tukey*).

^{A,B} Valores entre grupos de animales anémicos con distinto superíndice mayúscula en la misma fila indican diferencia significativa mediante one-way ANOVA (*test de Tukey*).

^C Valores estadísticamente diferentes del correspondiente grupo de animales controles (comparación entre ratas controles y anémicas) mediante test de la *t de Student*.

^D Valores estadísticamente diferentes del correspondiente grupo de animales alimentados con dietas con contenido normal de Fe (comparación entre dietas con contenido normal y con sobrecarga de Fe) mediante test de la *t de Student*.

^E Valores estadísticamente diferentes del correspondiente grupo de animales alimentados con dietas con contenido normal de ácido fólico (comparación entre dietas con contenido normal y con sobrecarga de ácido fólico) mediante test de la *t de Student*.

Tabla V. Parámetros bioquímicos de ratas controles y anémicas alimentadas durante 30 días con dietas basadas en leche de cabra o vaca, con contenido normal o sobrecarga de hierro y contenido normal o suplemento de ácido fólico.

Parámetros	DIETAS BASADAS EN LECHE DE CABRA				DIETAS BASADAS EN LECHE DE VACA				NIVEL DE SIGNIFICACIÓN				
	Grupo Control		Grupo Anémico		Grupo Control		Grupo Anémico		Efectos principales ¹				
	Fólico normal (n=20)	Fólico suplementado (n=20)	Fólico normal (n=20)	Fólico suplementado (n=20)	Fólico normal (n=20)	Fólico suplementado (n=20)	Fólico normal (n=20)	Fólico suplementado (n=20)	DER ²	Anemia Dieta	Contenido de hierro	Contenido de fólico	
ALT (U/l)	Normal	37.59	24.57 ^{abD}	33.55	26.82 ^{AD}	40.38	37.22 ^b	35.24	32.20 ^B	1.537	NS ³	< 0.05	< 0.01
	Sobrecarga	39.81 ^a	27.39 ^{abD}	36.43 ^A	29.42 ^{AD}	50.99 ^{bc}	53.15 ^{bc}	44.52 ^{BC}	43.12 ^{BC}	1.675	NS	< 0.001	< 0.01
AST (U/l)	Normal	108.15	98.87 ^{abD}	109.23	94.66 ^{AD}	110.25	109.92 ^b	108.73	107.65 ^B	3.922	NS	< 0.05	< 0.01
	Sobrecarga	112.20 ^a	101.17 ^{abD}	111.52 ^A	95.19 ^{AD}	124.32 ^{bc}	122.57 ^{bc}	123.41 ^{BC}	124.08 ^{BC}	4.129	NS	< 0.001	< 0.01
Creatinina (µmol/l)	Normal	20.51	27.32 ^D	21.32	28.32 ^D	21.35	29.30 ^D	23.45	29.22 ^D	1.107	NS	NS	< 0.001
	Sobrecarga	20.32	29.53 ^D	20.59	29.54 ^D	21.98	29.32 ^D	22.34	30.18 ^D	1.113	NS	NS	< 0.001
CK-MB (U/l)	Normal	71.81	95.93 ^D	74.81	99.56 ^D	73.95	101.23 ^D	72.76	98.87 ^D	3.243	NS	NS	< 0.001
	Sobrecarga	72.12	101.91 ^D	73.07	103.42 ^D	76.86	100.57 ^D	73.97	103.11 ^D	3.389	NS	NS	< 0.001

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

^{ab} Valores entre grupos de animales controles con distinto superíndice minúscula en la misma fila indican diferencia significativa mediante one-way ANOVA (*test de Tukey*).

^{AB} Valores entre grupos de animales anémicos con distinto superíndice mayúscula en la misma fila indican diferencia significativa mediante one-way ANOVA (*test de Tukey*).

^C Valores estadísticamente diferentes del correspondiente grupo de animales alimentados con dietas con contenido normal de Fe (comparación entre dietas con contenido normal y con sobrecarga de Fe) mediante test de la *t de Student*.

^D Valores estadísticamente diferentes del correspondiente grupo de animales alimentados con contenido normal de ácido fólico (comparación entre dietas con contenido normal y con sobrecarga de ácido fólico) mediante test de la *t de Student*.

Tabla VI: Relación hepatosomática y contenido de hierro en hígado de ratas controles y anémicas alimentadas durante 30 días con dietas basadas en leche de cabra o vaca, con contenido normal o sobrecarga de hierro y contenido normal o suplemento de ácido fólico.

Parámetros	DIETAS BASADAS EN LECHE DE CABRA				DIETAS BASADAS EN LECHE DE VACA				NIVEL DE SIGNIFICACIÓN ¹				
	Contenido de hierro	Grupo Control		Grupo Anémico		Fólico normal (n=20)	Fólico suplementado (n=20)	Fólico normal (n=20)	Fólico suplementado (n=20)	Efectos principales ¹		Contenido de hierro	Contenido de fólico
		Fólico normal (n=20)	Fólico suplementado (n=20)	Fólico normal (n=20)	Fólico suplementado (n=20)					DER ²	Anemia Dieta		
Peso corporal (g)	Normal	240.92	270.50	276.56	283.90	251.02	270.63	264.30	284.14	13.17	NS ³	NS	NS
	Sobrecarga	272.93	288.29	282.78	291.23	246.60	271.56	254.85	300.59	15.49	NS	NS	NS
Peso de hígado (g)	Normal	8.15	7.82	8.23	8.61	8.25	8.45	8.73	8.21	0.022	NS	NS	NS
	Sobrecarga	7.20	7.54	7.52	7.21	8.32	8.09	8.41	8.61	0.029	NS	NS	NS
Peso hígado/Peso corporal (%)	Normal	3.38	2.90	2.98	3.03	3.29	3.12	3.31	2.889	NS	NS	NS	NS
	Sobrecarga	2.64	2.62	2.66	2.48	3.28	2.98	3.31	2.864	NS	NS	NS	NS
Hierro en hígado (µg/g)	Normal	618.35 ^a	642.15 ^a	455.12 ^{AC}	447.01 ^{AC}	558.95 ^b	642.23 ^b	416.92 ^{BC}	407.16 ^{BC}	32.43	< 0.001	< 0.05	NS
	Sobrecarga	1086.85 ^{AD}	795.35 ^{AE}	788.15 ^{ACD}	727.46 ^{AD}	1000.35 ^{BD}	719.92 ^{BE}	714.26 ^{BCD}	703.14 ^{BD}	43.89	< 0.001	< 0.05	< 0.05

¹ Efectos principales: Anemia, efecto principal de la ferrodificiencia; Dieta, efecto principal del tipo de dieta; Contenido de hierro, efecto principal de la sobrecarga de hierro; Contenido de ácido fólico, efecto principal del contenido de ácido fólico en las dietas.

² DER, Desviación estándar residual.

³ NS, no significativo.

^{a,b} Valores entre grupos de animales controles con distinto superíndice minúscula en la misma fila indican diferencia significativa mediante one-way ANOVA (*test de Tukey*).

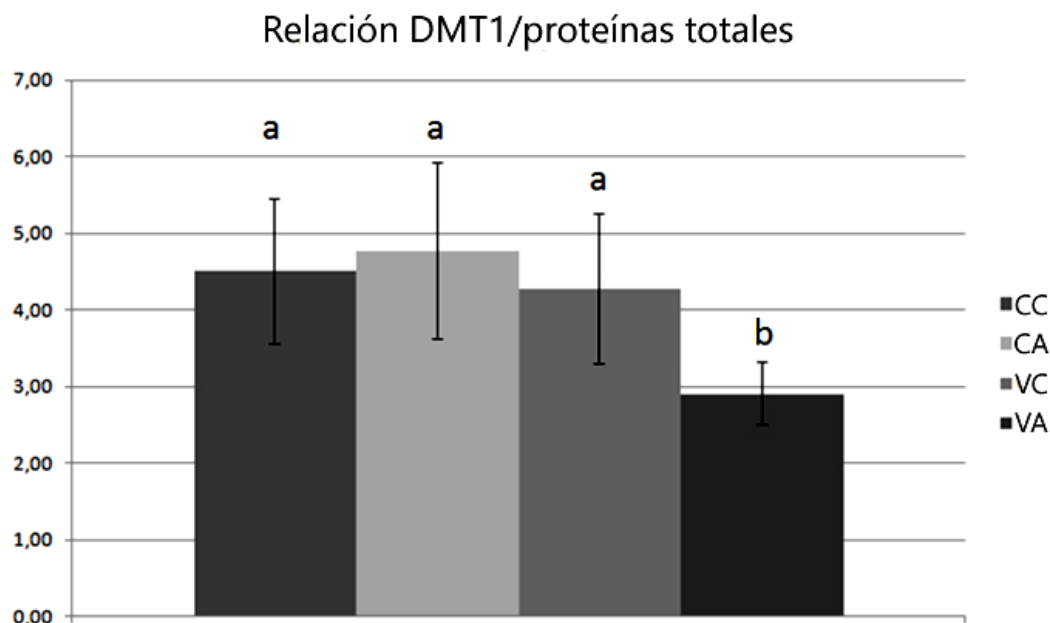
^{A,B} Valores entre grupos de animales anémicos con distinto superíndice mayúscula en la misma fila indican diferencia significativa mediante one-way ANOVA (*test de Tukey*).

^C Valores estadísticamente diferentes del correspondiente grupo de animales controles (comparación entre ratas controles y anémicas) mediante test de la *t de Student*.

^D Valores estadísticamente diferentes del correspondiente grupo de animales alimentados con dietas con contenido normal de Fe (comparación entre dietas con contenido normal y con sobrecarga de Fe) mediante test de la *t de Student*.

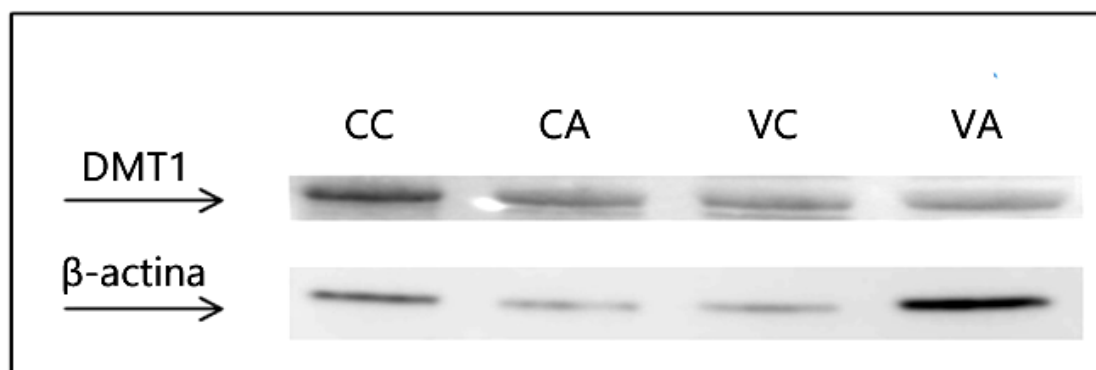
^E Valores estadísticamente diferentes del correspondiente grupo de animales alimentados con dietas con contenido normal de ácido fólico (comparación entre dietas con contenido normal y con sobrecarga de ácido fólico) mediante test de la *t de Student*.

Figura I. Expresión hepática del transportador de metales divalentes 1 (DMT1) de ratas controles y anémicas alimentadas durante 30 días con dietas basadas en leche de cabra o vaca.



Valores presentados como media \pm error estándar de la media, $n = 10$. Las medias con letra distinta, son diferentes, $P < 0.05$.

Figura II. Inmunoblots representativos de DMT1 y β -actina de ratas controles y anémicas alimentadas durante 30 días con dietas basadas en leche de cabra o vaca.



CC: ratas controles alimentadas con dieta basada en leche de cabra.
CA: ratas anémicas alimentadas con dieta basada en leche de cabra.
VC: ratas controles alimentadas con dieta basada en leche de vaca.
VA: ratas anémicas alimentadas con dieta basada en leche de vaca.

Tabla VII. Utilización nutritiva de hierro de ratas controles y anémicas alimentadas durante 30 días con dietas basadas en leche de cabra o vaca, con contenido normal o sobrecarga de hierro y contenido normal o suplemento de ácido fólico.

Parámetros	DIETAS BASADAS EN LECHE DE CABRA				DIETAS BASADAS EN LECHE DE VACA				NIVEL DE SIGNIFICACIÓN					
	Grupo Control		Grupo Anémico		Grupo Control		Grupo Anémico		Efectos principales ¹		Contenido de hierro		Contenido de fólico	
	Fólico normal (n=20)	Fólico suplementado (n=20)	Fólico normal (n=20)	Fólico suplementado (n=20)	Fólico normal (n=20)	Fólico suplementado (n=20)	Fólico normal (n=20)	Fólico suplementado (n=20)	DER ²	Anemia	Dieta	Contenido de hierro	Contenido de fólico	
SS ingerida (g/d)	Normal	15.04	15.56	15.04	15.56	15.04	15.45	15.04	15.45	NS ³	NS	NS	NS	
	Sobrecarga	15.12	15.61	15.12	15.61	15.12	15.53	15.12	15.53	NS	NS	NS	NS	
Hierro ingerido (µg/rata/día)	Normal	609.12	640.20	609.12	640.20	598.75	651.37	598.75	651.37	NS	NS	NS	NS	
	Sobrecarga	7203.16 ^D	6510.33 ^D	7203.16 ^D	6510.33 ^D	7246.27 ^D	6464.00 ^D	7246.27 ^D	6464.00 ^D	NS	NS	< 0.001	NS	
Hierro fecal (µg/rata/día)	Normal	354.08 ^a	241.02 ^{aE}	308.44 ^C	221.07 ^{ACE}	425.86 ^b	284.10 ^{bE}	304.92 ^C	293.29 ^B	15.13	< 0.05	< 0.01	< 0.01	
	Sobrecarga	3005.30 ^D	1513.03 ^{DE}	3100.14 ^D	676.44 ^{ACDE}	2852.00 ^D	1442.00 ^{DE}	2778.44 ^D	1633.00 ^{BCDE}	65.93	< 0.05	< 0.05	< 0.001	
Hierro absorbido (µg/rata/día)	Normal	263.04 ^a	379.18 ^F	318.68 ^C	419.13 ^{ACE}	172.89	367.26 ^E	277.83 ^C	358.08 ^{BE}	14.97	< 0.05	< 0.05	< 0.01	
	Sobrecarga	4197.86 ^D	4997.30 ^{DE}	4603.02 ^D	5833.89 ^{ACDE}	4393.39 ^D	5022.00 ^{DE}	4467.83 ^C	4831.00 ^{BCDE}	60.13	< 0.05	< 0.05	< 0.01	
CDA (%)	Normal	42.18 ^a	59.25 ^E	52.32 ^{AC}	65.47 ^{ACE}	28.88 ^b	59.45 ^E	46.40 ^{BC}	54.97 ^{BCE}	1.31	< 0.05	< 0.05	< 0.001	
	Sobrecarga	58.28 ^D	76.76 ^{DE}	63.93 ^D	89.61 ^{ACDE}	60.63 ^D	77.69 ^{DE}	61.66 ^D	74.73 ^{BCDE}	1.04	< 0.05	< 0.05	< 0.001	
Hierro urinario (µg/rata/día)	Normal	3.66	4.90 ^a	3.81	5.80 ^{AC}	4.24	2.34 ^b	3.07 ^C	2.81 ^B	0.24	< 0.05	< 0.05	NS	
	Sobrecarga	3.03	6.41	3.24	6.29	4.42	4.46	3.53 ^C	3.45 ^C	0.26	< 0.05	NS	NS	
Hierro retenido (µg/rata/día)	Normal	259.38 ^a	374.28 ^E	314.87 ^{AC}	413.33 ^{ACE}	168.65 ^b	365.61 ^E	274.76 ^{BC}	355.27 ^{BCE}	9.79	< 0.05	< 0.05	< 0.01	
	Sobrecarga	4194.83 ^D	4990.89 ^{DE}	4599.78 ^D	5827.59 ^{ACDE}	4388.96 ^D	5018.00 ^{DE}	4464.29 ^D	4827.50 ^{BCDE}	49.63	< 0.05	< 0.05	< 0.01	
R/A (%)	Normal	98.59	97.88	98.80	98.59	97.55	99.45	98.91	99.21	0.11	NS	NS	NS	
	Sobrecarga	99.93	99.87	99.92	99.89	99.90	99.91	99.92	99.93	0.01	NS	NS	NS	
R/I (%)	Normal	42.58 ^a	58.19 ^E	51.69 ^{AC}	64.19 ^{ACE}	28.17 ^b	56.12 ^E	45.89 ^{BC}	54.54 ^{BCE}	1.30	< 0.05	< 0.05	< 0.001	
	Sobrecarga	58.24 ^D	76.66 ^{DE}	63.92 ^D	89.51 ^{ACDE}	60.57 ^D	77.74 ^{DE}	61.61 ^D	74.78 ^{BCDE}	0.98	< 0.05	< 0.05	< 0.001	

¹ Efectos principales: Anemia, efecto principal de la ferrodificiencia; Dieta, efecto principal del tipo de dieta; Contenido de hierro, efecto principal de la sobrecarga de hierro; Contenido de ácido fólico, efecto principal del contenido de ácido fólico en las dietas. ²DER, Desviación estándar residual. ³NS, no significativo.

^{a,b} Valores entre grupos de animales controles con distinto superíndice minúscula en la misma fila indican diferencia significativa mediante one-way ANOVA (*test de Tukey*).

^{A,B} Valores entre grupos de animales anémicos con distinto superíndice mayúscula en la misma fila indican diferencia significativa mediante one-way ANOVA (*test de Tukey*).

^C Valores estadísticamente diferentes del correspondiente grupo de animales controles (comparación entre ratas controles y anémicas) mediante *t de Student*.

^D Valores estadísticamente diferentes del correspondiente grupo de animales alimentados con dietas con contenido normal de Fe (comparación entre dietas con contenido normal y con sobrecarga de Fe) mediante *t de Student*.

^E Valores estadísticamente diferentes del correspondiente grupo de animales alimentados con dietas con contenido normal de ácido fólico (comparación entre dietas con contenido normal y con sobrecarga de ácido fólico) mediante *t de Student*.

Tabla VIII. Eficacia de regeneración de hemoglobina (E.R.H.) de ratas controles y anémicas alimentadas durante 30 días con dietas basadas en leche de cabra o vaca, con contenido normal o sobrecarga de hierro y contenido normal o suplemento de ácido fólico.

Parámetros	DIETAS BASADAS EN LECHE DE CABRA				DIETAS BASADAS EN LECHE DE VACA				NIVEL DE SIGNIFICACIÓN				
	Grupo Control		Grupo Anémico		Grupo Control		Grupo Anémico		Efectos principales ¹				
	Fólico normal (n=20)	Fólico suplementado (n=20)	Fólico normal (n=20)	Fólico suplementado (n=20)	Fólico normal (n=20)	Fólico suplementado (n=20)	Fólico normal (n=20)	Fólico suplementado (n=20)	DER ²	Anemia	Dieta	Contenido de hierro	Contenido de fólico
Peso inicial (g)	Normal	222.95	245.66 ^E	217.94	236.39 ^E	227.17	242.23 ^E	214.25	243.81 ^E	12.31	NS ³	NS	< 0.05
	Sobrecarga	225.00	256.77 ^E	230.20	225.90 ^E	216.60	249.48 ^E	197.00	259.84 ^E	13.08	NS	NS	< 0.05
Hb inicial (g/l)	Normal	129.10	132.10	76.50 ^C	71.33 ^C	131.60	133.10	78.50 ^C	72.53 ^C	5.27	< 0.001	NS	NS
	Sobrecarga	128.30	134.50	74.50 ^C	72.33 ^C	129.40	132.70	77.50 ^C	73.02 ^C	4.38	< 0.001	NS	NS
Peso final (g)	Normal	240.92	270.50	276.56	283.90	251.02	270.63	264.30	284.14	13.17	NS	NS	NS
	Sobrecarga	272.93	288.29	282.78	291.23	146.60	271.56	254.85	300.59 ^C	15.49	NS	NS	NS
Hb final (g/l)	Normal	130.80	134.00 ^E	125.80	129.30 ^E	127.60	130.25	120.50	124.43 ^E	2.35	NS	NS	< 0.05
	Sobrecarga	131.30	150.80 ^{abD}	148.00 ^{acd}	151.00 ^{ad}	130.10	142.00 ^{bd}	130.80 ^{bd}	131.13 ^{bcd}	2.98	< 0.05	< 0.05	< 0.05
Hierro ingerido (mg/30 días)	Normal	18.18 ^a	59.25 ^E	52.32 ^{ac}	65.47 ^{ace}	28.88 ^b	59.45 ^E	46.40 ^{bc}	54.97 ^{bce}	0.17	< 0.05	< 0.05	< 0.01
	Sobrecarga	58.28 ^d	76.67 ^D	56.96	89.61 ^{acd}	60.63 ^d	77.69 ^D	61.66 ^d	74.73 ^{bd}	0.98	< 0.05	< 0.05	< 0.001
E.R.H. (%)	Normal	33.53 ^a	44.35 ^{abE}	222.55 ^{ac}	231.94 ^{ace}	26.67 ^b	34.56 ^{be}	187.80 ^{bc}	202.98 ^{bce}	0.67	< 0.001	< 0.001	< 0.01
	Sobrecarga	7.24 ^{abD}	10.27 ^{abDE}	25.66 ^{acd}	31.81 ^{acde}	4.19 ^{bd}	6.31 ^{bde}	18.65 ^{bcd}	23.66 ^{bcdE}	0.08	< 0.001	< 0.001	< 0.001

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

^{a,b} Valores entre grupos de animales controles con distinto superíndice minúscula en la misma fila indican diferencia significativa mediante one-way ANOVA (*test de Tukey*).

^{A,B} Valores entre grupos de animales anémicos con distinto superíndice mayúscula en la misma fila indican diferencia significativa mediante one-way ANOVA (*test de Tukey*).

^C Valores estadísticamente diferentes del correspondiente grupo de animales controles (comparación entre ratas controles y anémicas) mediante test de la *t de Student*.

^D Valores estadísticamente diferentes del correspondiente grupo de animales alimentados con contenido normal de Fe (comparación entre dietas con contenido normal y con sobrecarga de Fe) mediante test de la *t de Student*.

^E Valores estadísticamente diferentes del correspondiente grupo de animales alimentados con contenido normal de ácido fólico (comparación entre dietas con contenido normal y con sobrecarga de ácido fólico) mediante test de la *t de Student*.

Figura III. Concentración de hemoglobina (g/l) de ratas controles y anémicas alimentadas durante 30 días con dietas basadas en leche de cabra o vaca, con contenido normal o sobrecarga de hierro y contenido normal o suplemento de ácido fólico.

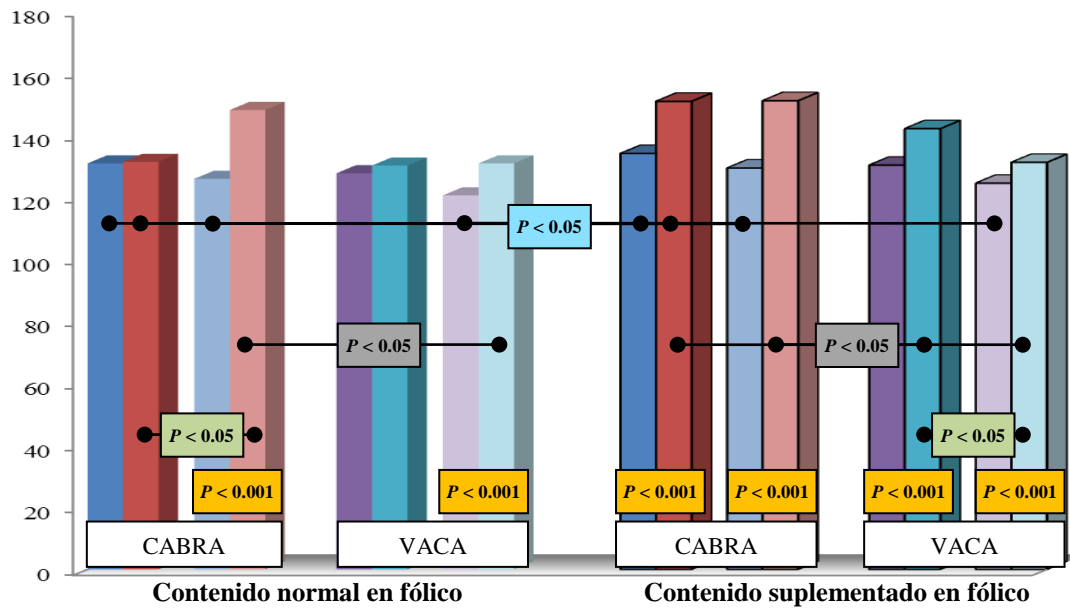


Figura IV. Recuento de hematíes ($10^{12}/l$) de ratas controles y anémicas alimentadas durante 30 días con dietas basadas en leche de cabra o vaca, con contenido normal o sobrecarga de hierro y contenido normal o suplemento de ácido fólico.

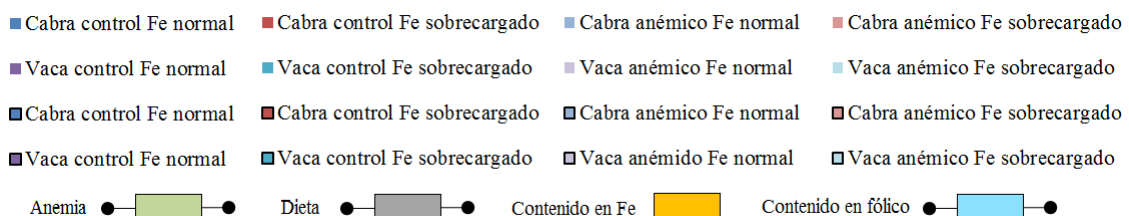
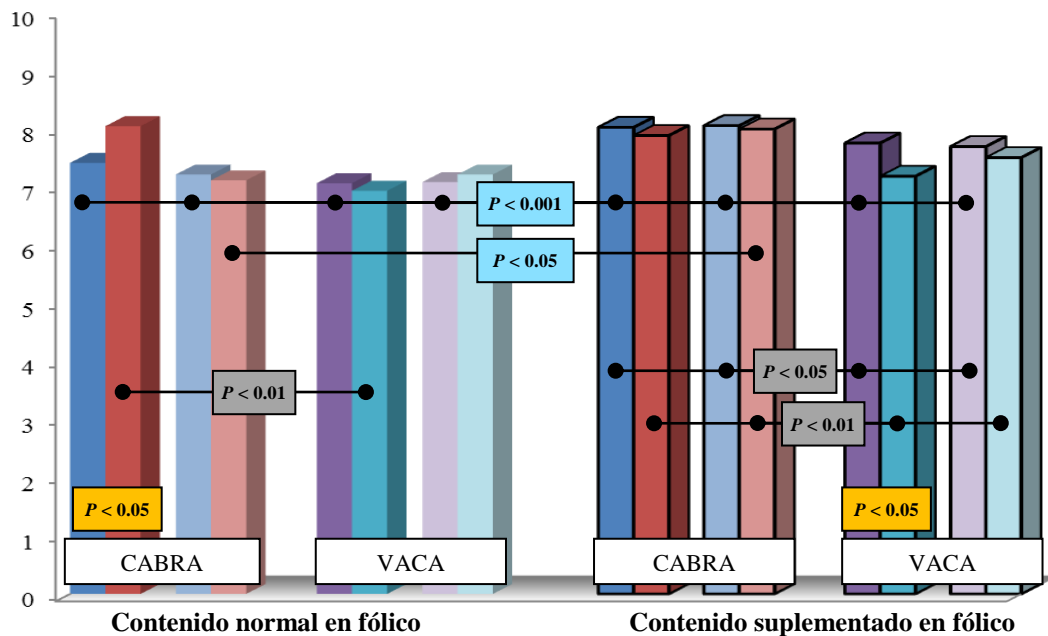


Figura V: Volumen corpuscular medio (fl) de ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche de cabra o vaca, con contenido normal o sobrecarga de hierro y contenido normal o suplemento de ácido fólico.

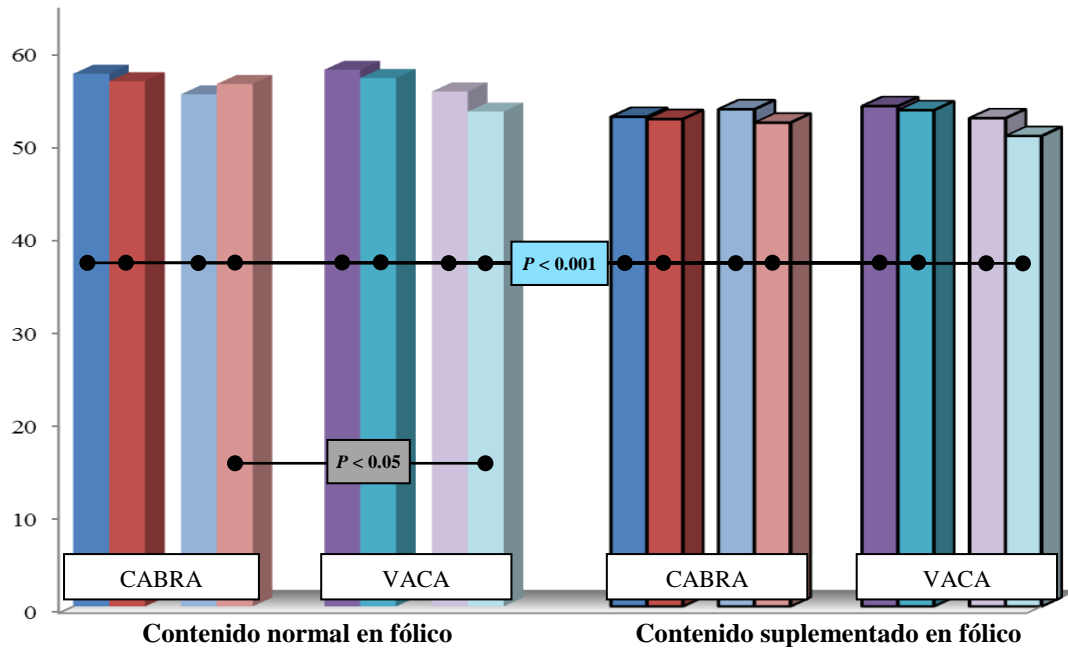


Figura VI. Hematocrito (%) de ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche de cabra o vaca, con contenido normal o sobrecarga de hierro y contenido normal o suplemento de ácido fólico.

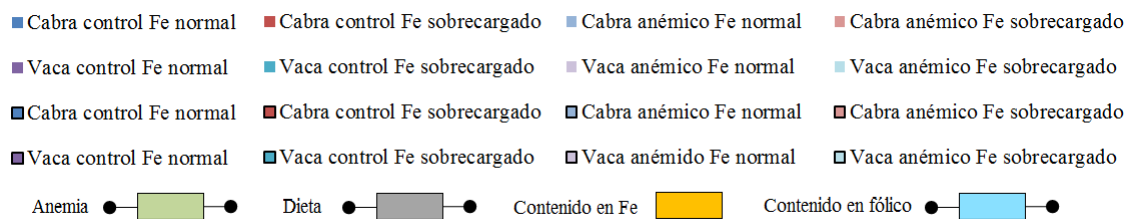
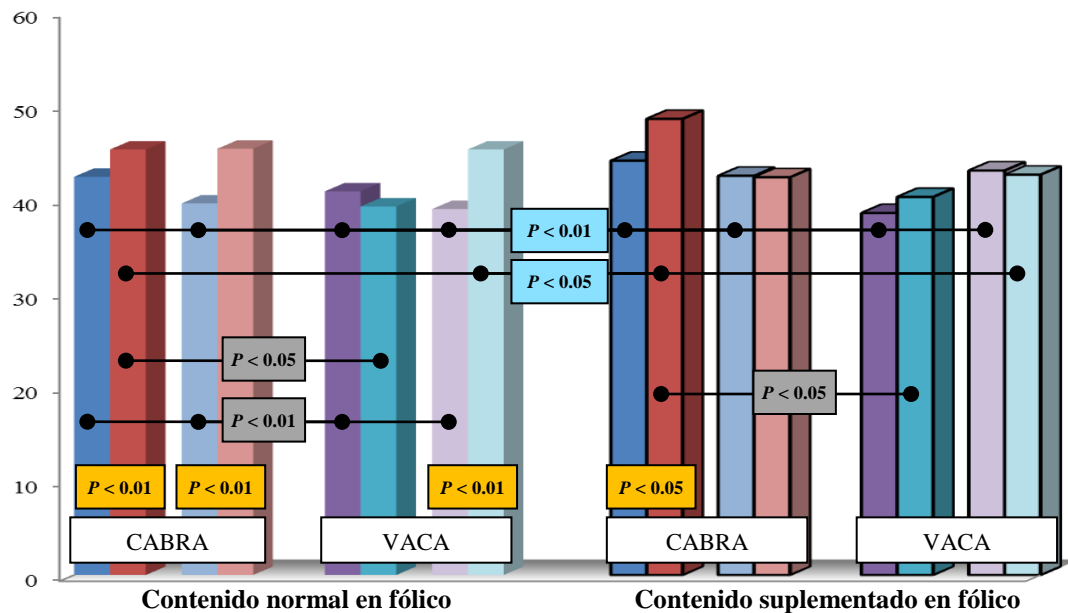


Figura VII. Capacidad total de fijación del hierro ($\mu\text{g/l}$) de ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche de cabra o vaca, con contenido normal o sobrecarga de hierro y contenido normal o suplemento de ácido fólico.

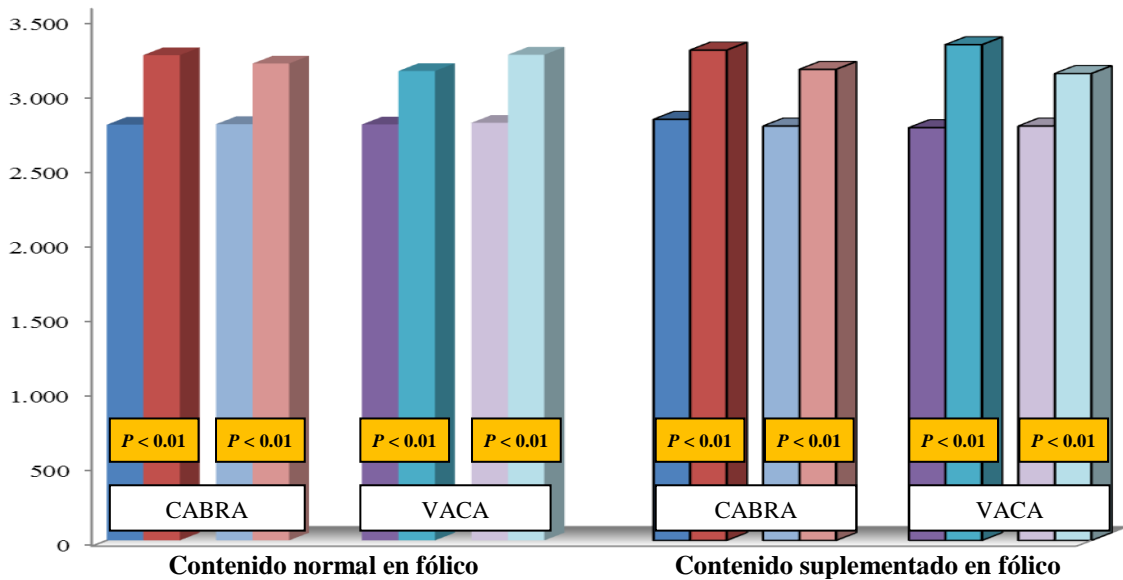


Figura VIII. Saturación de la transferrina (%) de ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche de cabra o vaca, con contenido normal o sobrecarga de hierro y contenido normal o suplemento de ácido fólico.

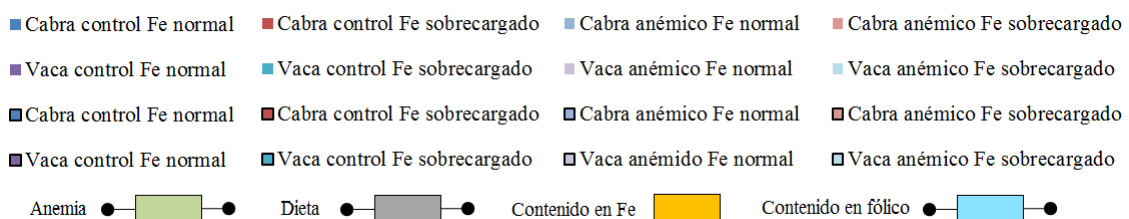
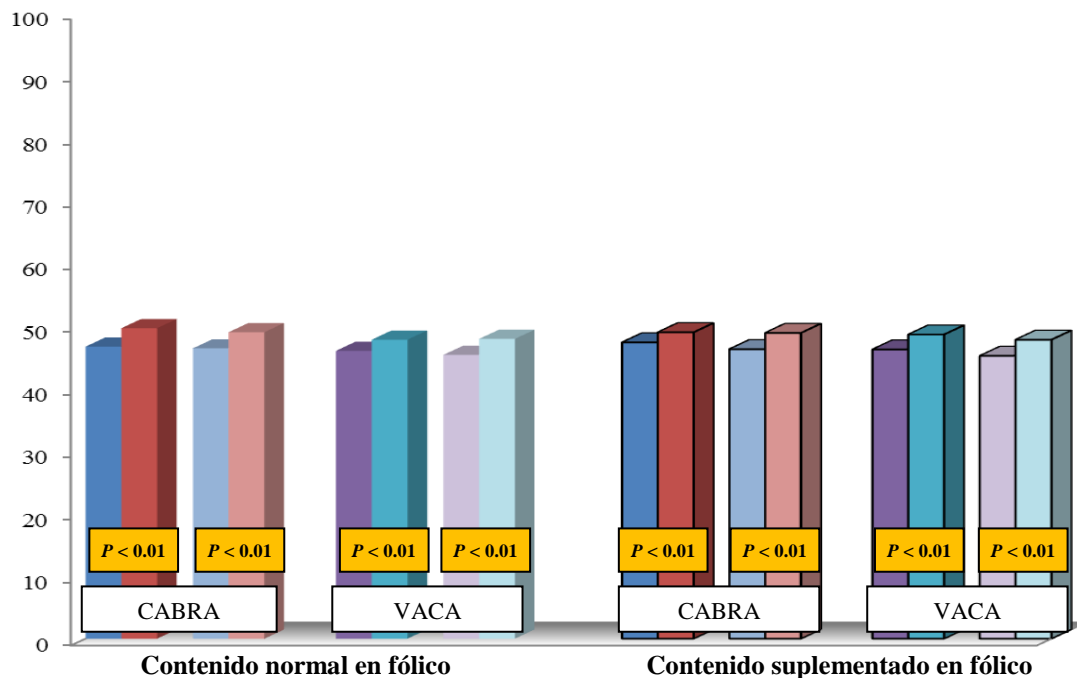


Figura IX. Ferritina sérica ($\mu\text{g/l}$) de ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche de cabra o vaca, con contenido normal o sobrecarga de hierro y contenido normal o suplemento de ácido fólico.

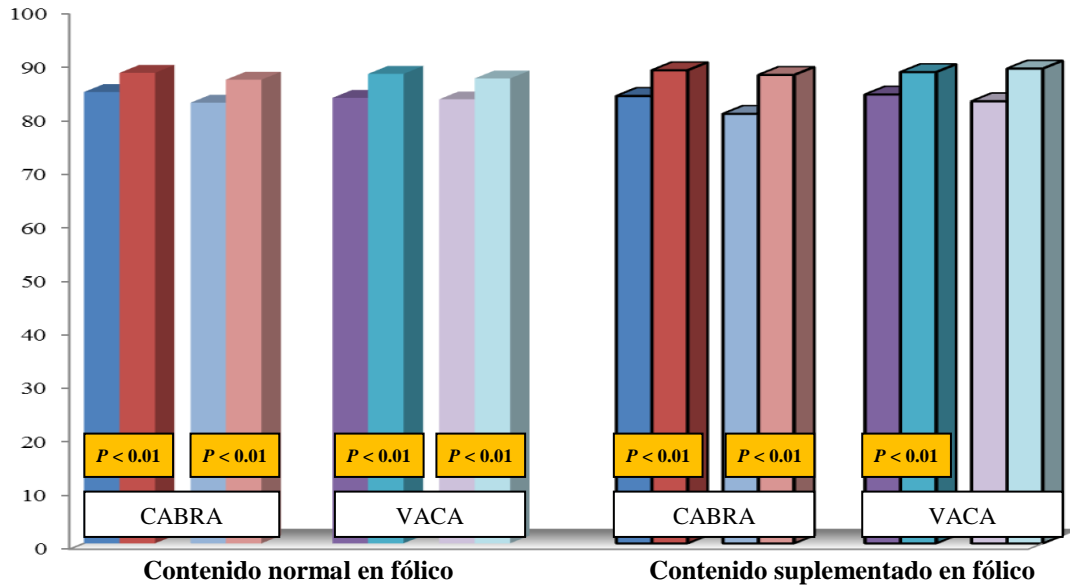


Figura X. Concentración de hepcidina sérica ($\mu\text{g/l}$) de ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche de cabra o vaca, con contenido normal o sobrecarga de hierro y contenido normal o suplemento de ácido fólico.

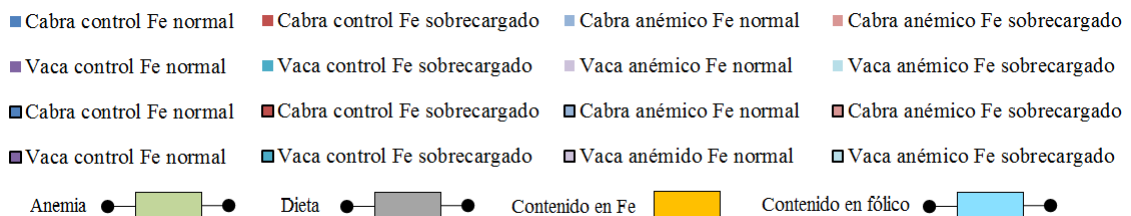
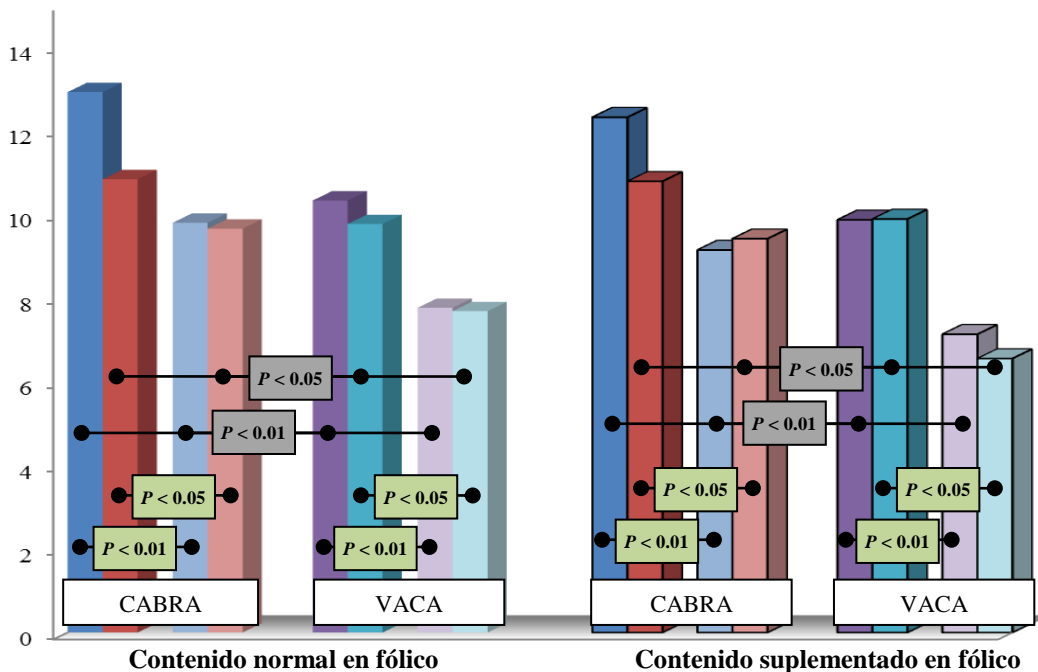


Figura XI. Concentración de alanina aminotransferasa (UI/l) de ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche de cabra o vaca, con contenido normal o sobrecarga de hierro y contenido normal o suplemento de ácido fólico.

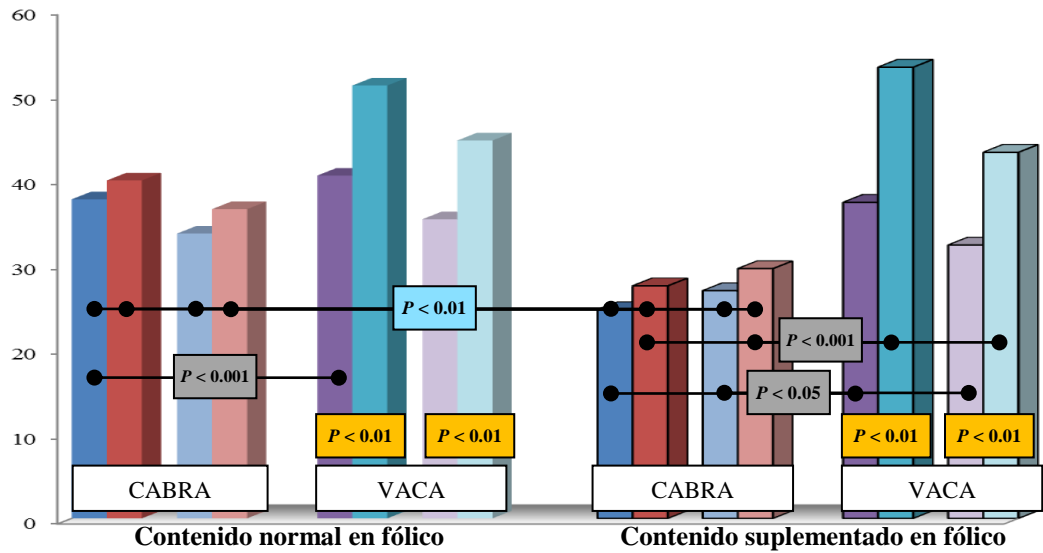


Figura XII. Concentración de aspartato aminotransferasa (UI/l) de ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche de cabra o vaca, con contenido normal o sobrecarga de hierro y contenido normal o suplemento de ácido fólico.

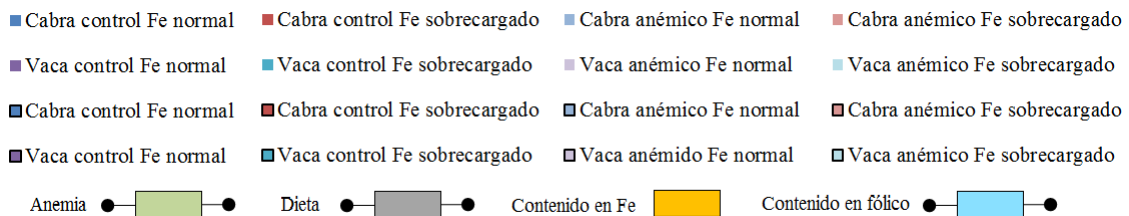
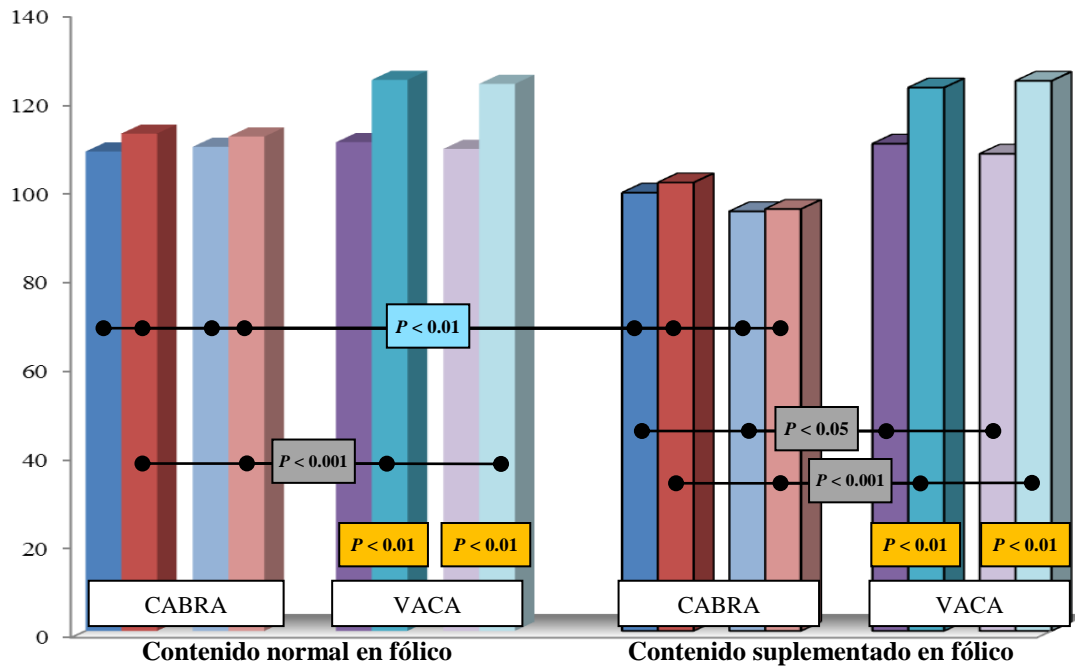


Figura XIII. Concentración de creatinina ($\mu\text{mol/l}$) de ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche de cabra o vaca, con contenido normal o sobrecarga de hierro y contenido normal o suplemento de ácido fólico.

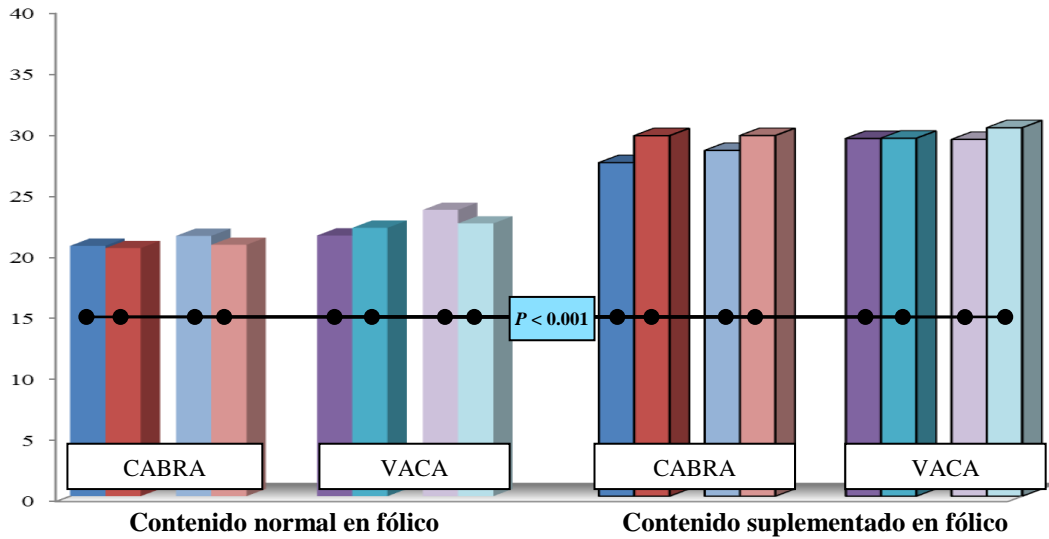


Figura XIV. Concentración de creatina quinasa MB (U/l) de ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche de cabra o vaca, con contenido normal o sobrecarga de hierro y contenido normal o suplemento de ácido fólico.

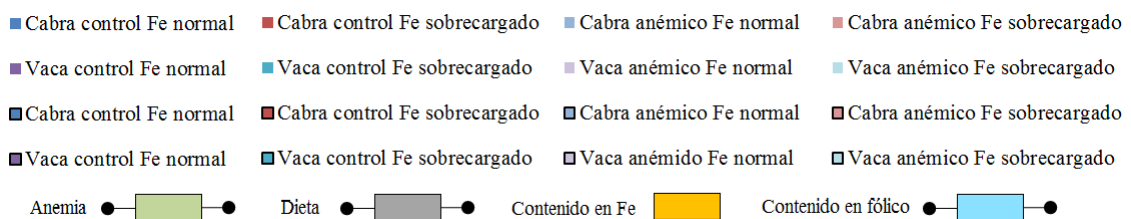
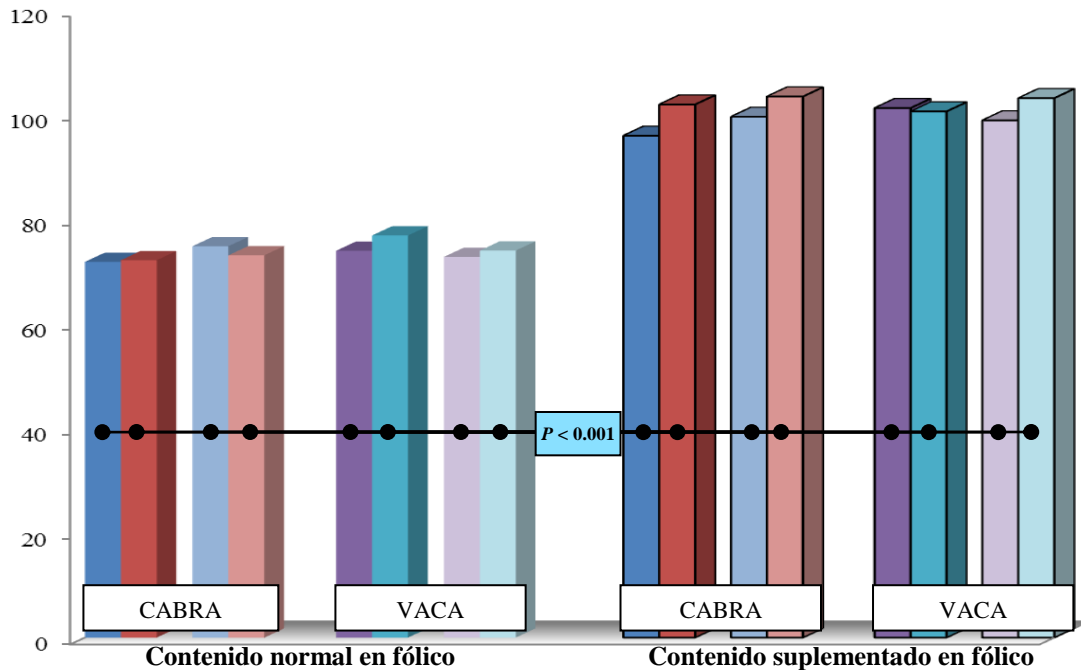


Figura XV. Concentración de hierro en hígado ($\mu\text{g/g}$) de ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche de cabra o vaca, con contenido normal o sobrecarga de hierro y contenido normal o suplemento de ácido fólico.

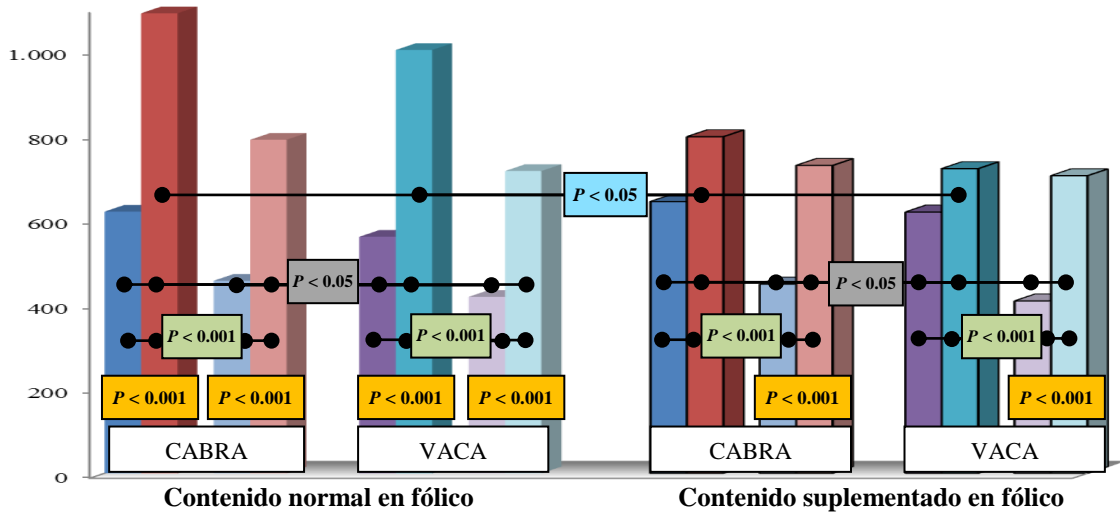


Figura XVI. Coeficiente de digestibilidad aparente (%) de ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche de cabra o vaca, con contenido normal o sobrecarga de hierro y contenido normal o suplemento de ácido fólico.

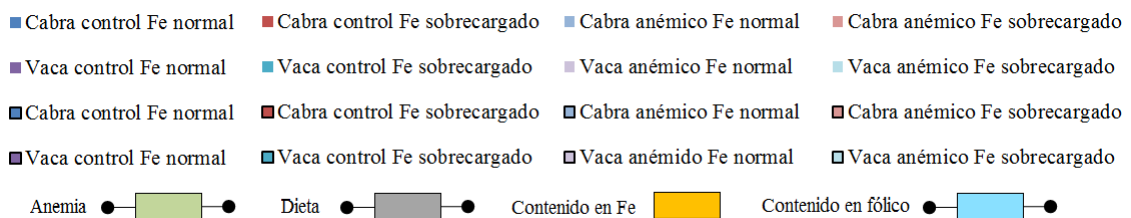
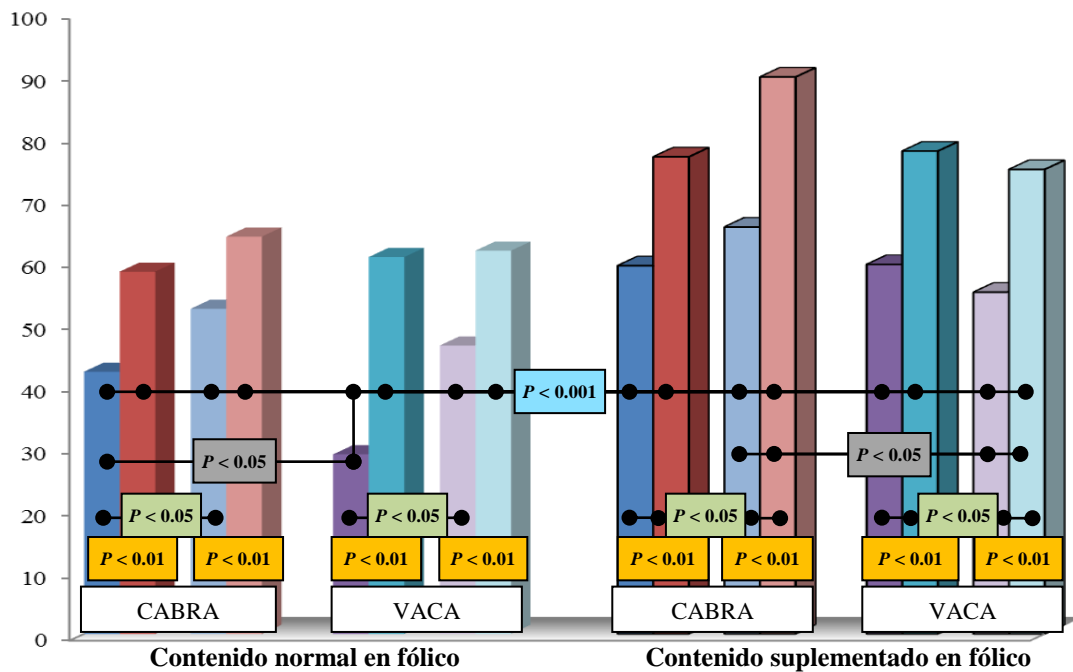


Figura XVII. Relación del hierro retenido con respecto al hierro ingerido (%) de ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche de cabra o vaca, con contenido normal o sobrecarga de hierro y contenido normal o suplemento de ácido fólico.

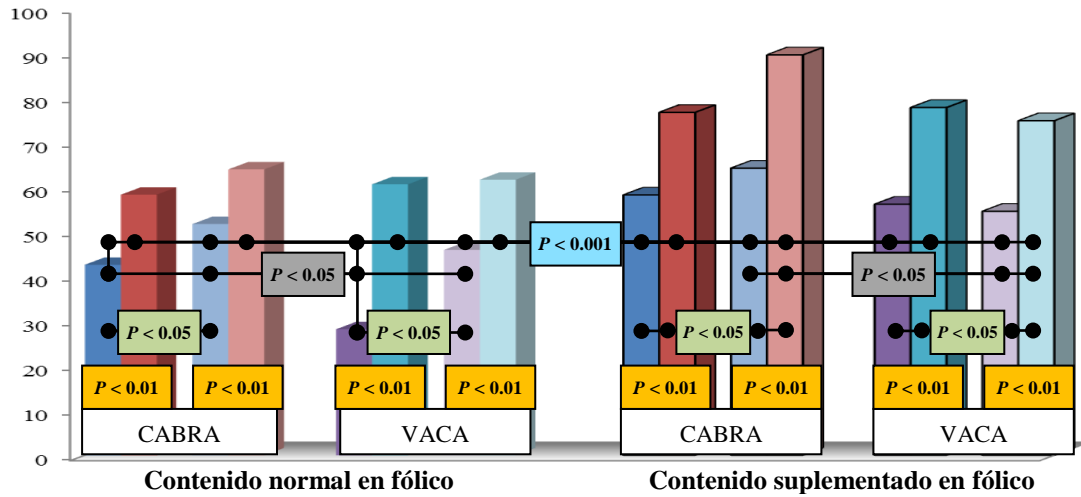
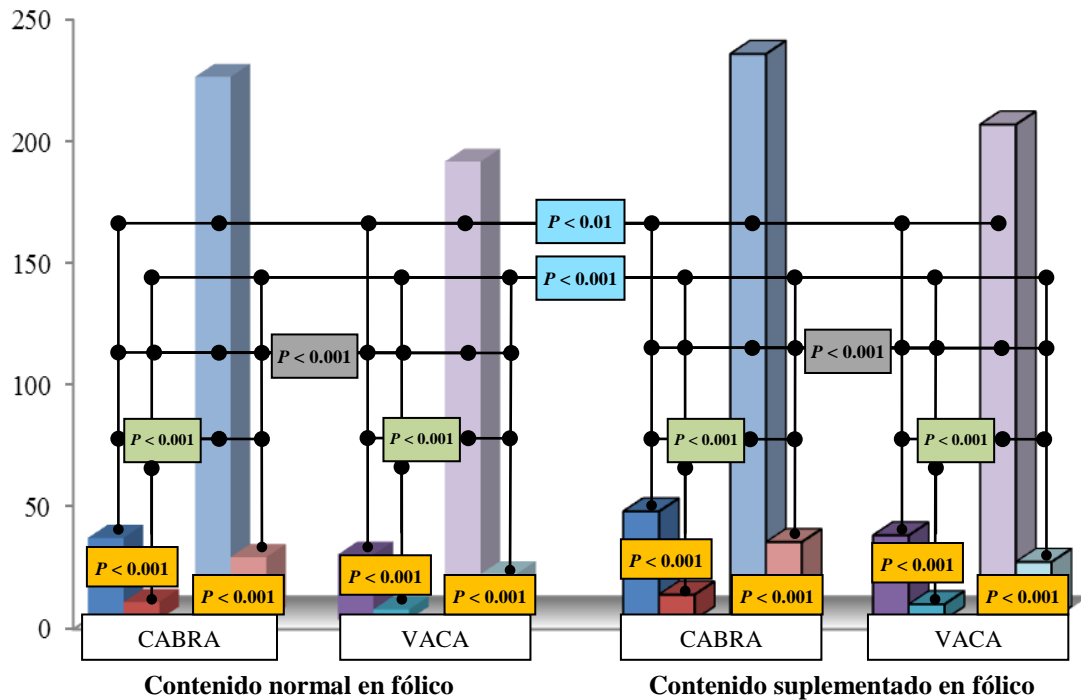


Figura XVIII. Eficacia de regeneración de la hemoglobina (%) de ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche de cabra o vaca, con contenido normal o sobrecarga de hierro y contenido normal o suplemento de ácido fólico.



- Cabra control Fe normal ■ Cabra control Fe sobrecargado ■ Cabra anémico Fe normal ■ Cabra anémico Fe sobrecargado
- Vaca control Fe normal ■ Vaca control Fe sobrecargado ■ Vaca anémico Fe normal ■ Vaca anémico Fe sobrecargado
- Cabra control Fe normal ■ Cabra control Fe sobrecargado ■ Cabra anémico Fe normal ■ Cabra anémico Fe sobrecargado
- Vaca control Fe normal ■ Vaca control Fe sobrecargado ■ Vaca anémico Fe normal ■ Vaca anémico Fe sobrecargado
- Anemia ● —■— ● Dieta ● —■— ● Contenido en Fe ■ Contenido en fólico ● —■— ●

Resultados y Discusión



5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. PERIODO PREEXPIMENTAL

5.1.1. Parámetros hematológicos

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

Bajo nuestras condiciones experimentales, tras 40 días de restricción de hierro en la dieta, se induce una anemia ferropénica nutricional severa como se corrobora con los parámetros hematológicos mostrados en la Tabla I. La evaluación del estado del hierro radica en el conocimiento del ciclo interno de hierro resultado de la retirada y reemplazamiento cada día de 30-40 mg de hierro-hemoglobina de las células rojas senescentes. Durante la captación por parte de los macrófagos de las células rojas más viejas en bazo y médula ósea, el hierro es extraído de la hemoglobina y posteriormente se une estrechamente a su transportador, la transferrina, en plasma. A continuación, el hierro se liga en la médula ósea a la superficie de receptores específicos de precursores de células rojas. Este ciclo se completa cuando los eritrocitos recién formados pasan a la circulación sanguínea general en los siguientes días. Existen otras importantes vías de comunicación entre el hierro plasmático y el hígado o la mucosa intestinal, si bien son menos relevantes que la anteriormente mencionada (Brissot y Loreal, 2015; Yun y Vincelette, 2015).

El déficit de hierro se produce como consecuencia de una gran pérdida de las reservas corporales que preceden a la caída en los niveles de hemoglobina. El parámetro más utilizado en la evaluación de la anemia por deficiencia de hierro es el porcentaje de saturación de la transferrina plasmática, el cual es bajo en esta patología (Thomas y Thomas, 2002), algo que está en concordancia con los resultados obtenidos en este estudio al demostrarse que estos niveles están bajos durante el PPE y se recuperan tras los 30 días de aporte normal de hierro en la dieta.

La introducción de analizadores hematológicos automáticos mejoró sustancialmente la precisión de los índices de medida de las células rojas, por lo que el VCM pasó a ser el marcador biológico de células rojas más importante para la detección de anemia ferropénica en células rojas sanguíneas (Cook, 2005). Por su parte, la ferritina sérica ha sido el parámetro más útil en la evaluación del estado del hierro ya que se trata de un indicador bien estandarizado que ofrece importantes ventajas en el examen de médula ósea para identificar la ferropenia. Una de sus principales características es que su concentración está relacionada directamente con los depósitos corporales de hierro (Finch y col., 1986).

Durante la ferropenia, varios factores reguladores de la hepcidina se ven alterados, así aumenta la demanda eritropoyética al disminuir los parámetros hematológicos, hay un menor aporte de oxígeno a los tejidos y se deplecionan los depósitos corporales, alterándose el metabolismo de hierro. Todos estos hechos conducen a una disminución de la hepcidina, lo cual se traducirá en una menor interacción con la FPN1 (Tselepis y col., 2010), evitando su internalización y degradación, de manera que aumenta el flujo de salida de Fe^{2+} desde los hepatocitos y consecuentemente se reduce su depósito en dicho órgano.

5.1.2. Parámetros bioquímicos

En relación a los parámetros bioquímicos estudiados, aunque todos ellos están dentro del rango de normalidad para esta especie, tanto en animales controles como anémicos, se encuentran algunas diferencias significativas para los valores de transaminasas ($P < 0.001$) mayor para el grupo anémico (Tabla II).

Estos resultados coinciden con los de Urso y col. (2013), que indicaron un incremento en la actividad respiratoria mitocondrial en respuesta al déficit de hierro, lo cual implicaría una sobreexpresión de varios genes que codifican enzimas que participan en el metabolismo intermediario (transaminasas y amilasa), para incrementar la producción de energía a través de la fosforilación oxidativa, en un mecanismo compensatorio que intenta mantener el flujo de moléculas monocarbonadas bajo condiciones de disminución del flujo electrónico en la cadena respiratoria mitocondrial debido a la anemia.

5.1.3. Relación hepatosomática y contenido de hierro en hígado

El peso corporal de las ratas anémicas fue significativamente menor ($P < 0.001$), mientras que el peso hepático descendió ligeramente en comparación con los animales controles, y en consecuencia la relación hepatosomática (peso hígado/peso corporal) fue significativamente más alta ($P < 0.01$) en los animales ferrodeficientes (Tabla III).

El grado de ferrodeficiencia producido por la dieta restrictiva en hierro es lo suficientemente severo como para afectar al peso corporal, lo cual coincide con los resultados de otros autores (Strube y col., 2002) y se puede atribuir a los menores niveles de hormonas tiroideas encontrados en esta patología (Beard y col., 1998). Por otra parte, puesto que en situación de ferrodeficiencia la hemoglobina y recuento de hematíes se reducen, el suministro de oxígeno a las células se limita, incidiendo de manera negativa en la síntesis de ATP y en el incremento de peso. Estos hallazgos coinciden con los descritos por Schneider y col. (2008), quienes indicaban que en niños de entre 12 y 36 meses, los bajos niveles de hemoglobina perjudicaban significativamente la ganancia de peso, explicando por tanto la asociación encontrada en el presente estudio entre el menor peso y la ferrodeficiencia.

Las ratas en el momento del nacimiento tienen un nivel alto de hierro sérico, pero durante las primeras semanas de vida muchos eritrocitos se hemolizan, en un proceso fisiológico para normalizar el elevado recuento de glóbulos rojos que se presenta en este periodo, el hierro liberado, en condiciones normales, se almacena principalmente en el hígado. Ya que la leche materna es una fuente pobre de hierro, esta reserva es utilizada durante los primeros días de vida para ayudar a sintetizar Hb y aumentar el número de glóbulos rojos, hecho que adquiere gran importancia conforme el animal crece, para satisfacer las demandas de oxígeno y el metabolismo oxidativo. El hierro de los depósitos corporales de un animal recién nacido, junto con la baja cantidad que suministra la leche materna es suficiente durante un período corto de tiempo, pero a partir de este momento es necesario que la dieta proporcione un nivel adecuado de hierro (Iannotti y col., 2006; Domellöf y col., 2009). En nuestro estudio, puesto que la ferrodeficiencia ha sido inducida en las ratas en crecimiento, el exceso de hierro sérico en el momento del nacimiento, no es almacenado en el hígado, sino que es utilizado en un intento infructuoso de replecionar los depósitos corporales agotados debido al consumo de una dieta con bajo contenido en hierro, disminuyendo por tanto el hierro almacenado en los depósitos corporales, intentando mantener los niveles de hierro sérico dentro del rango fisiológico.

El menor contenido de hierro en hígado observado en situación de anemia ferropénica se atribuye a la disminución de la hepcidina hepática descrita en esta patología (Theurl y col., 2009) y encontrada en este estudio. La hepcidina es un péptido hepático, que resulta clave en el

metabolismo del hierro. Hay varios factores que regulan la síntesis de esta hormona peptídica, y entre los estímulos con mayor capacidad reguladora de la hepcidina destacan la inflamación, ciertas infecciones, demanda eritropoyética, hipoxia y de manera especial el estatus de hierro corporal (Zhang y Enns, 2009). Estudios de deficiencia de hierro observada en ratones *knockout* para el gen de la hepcidina, sugieren que este péptido interviene regulando el almacenamiento del mineral, atenuando tanto la absorción intestinal de hierro como la liberación de hierro de los macrófagos. La expresión disminuida de la hepcidina en respuesta a la hipoxia anémica, y su expresión aumentada en ratones y humanos con inflamación, sugiere que esta hormona peptídica 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 hierro directamente actuando recíprocamente con la FPN1, conduciendo a la internalización y degradación de la misma cuando los niveles de hierro son altos y por consiguiente bloqueando la liberación de hierro en los sitios de almacén tales como hepatocitos, enterocitos y macrófagos (Nemeth y Ganz, 2006b).

A la vista de los resultados, podemos afirmar que la ferropdeficiencia severa inducida experimentalmente provoca una depleción de los niveles hepáticos de hierro debido a la disminución de la hepcidina, junto con una ligera disminución del tamaño del hígado, hecho que incide de manera negativa en la ganancia de peso de animales en crecimiento, ya que la hipoxia inducida por la ferropdeficiencia limita la producción de ATP.

5.1. PERIODO EXPERIMENTAL

5.2.1. Parámetros hematológicos

Posteriormente, tras los 30 días de alimentación con las dietas basadas en leche de cabra o vaca, los parámetros hematológicos (Tabla IV) en ratas anémicas se recuperaron completamente con ambos tipos de dietas, con contenido normal o con sobrecarga de hierro y normal o con suplemento de ácido fólico. Resalta el mayor recuento de hematíes (Figura IV), hematocrito (Figura VI) ($P < 0.01$) y niveles séricos de hepcidina (Figura X) ($P < 0.01$ dieta con contenido normal de hierro, $P < 0.05$ dieta con sobrecarga de hierro) en animales alimentados con las dietas elaboradas con leche de cabra.

La sobrecarga de hierro aumentó el contenido de hierro sérico, como era de esperar, ($P < 0.01$), la hemoglobina (Figura III) ($P < 0.001$), el TIBC (Figura VII) ($P < 0.01$), el porcentaje de saturación de transferrina (Figura VIII) ($P < 0.01$) y la ferritina sérica (Figura IX)

($P < 0.01$). En general, la suplementación en ácido fólico incrementó los niveles de hemoglobina en los grupos con contenido normal y sobrecarga de hierro ($P < 0.05$), el recuento de hematíes (Figura IV) en los grupos con contenido normal de hierro ($P < 0.01$) y redujo el VCM (Figura V) en ambos grupos (normal y con sobrecarga de hierro) ($P < 0.001$).

La mejora significativa de los parámetros hematológicos con la sobrecarga de hierro revela una eficacia en la repleción de los depósitos, lo que coincide con los resultados de otros autores (Langstaff y col., 1993).

La suplementación de ácido fólico en la dieta aumentó el recuento de células rojas sanguíneas, algo que puede ser explicado gracias al importante papel del fólico en el crecimiento y diferenciación celular (Gursu y col., 2004). La reducción del VCM en los grupos con suplementación de ácido fólico puede ser atribuida al incremento en la producción celular en estos grupos dando lugar a un mayor número de células, pero de menor tamaño.

Es un hecho aceptado la secuencia cronológica de eventos que tienen lugar durante el tratamiento de la anemia ferropénica, primero se normalizan los niveles de Hb, y posteriormente se restauran los depósitos de hierro (Nemeth y Ganz, 2006). Nuestros resultados sugieren que las ratas anémicas responden adecuadamente a la repleción dietaria con hierro en lo que respecta a los parámetros hematológicos, cuando se suministran dietas basadas en leche con niveles normales de hierro.

La elevación de hepcidina encontrada tras el consumo con dieta basada en leche de cabra revela un mayor contenido de hierro en hígado (Theurl y col., 2009) hecho que ha ocurrido en el presente estudio. Por tanto, la elevación de la hepcidina revela que los principales sitios de almacén en el organismo (hepatocitos, enterocitos y macrófago) se han replecionado tras el consumo de dietas basadas en leche de cabra.

5.2.2. Parámetros bioquímicos

En relación a los parámetros bioquímicos estudiados (Tabla V), todos ellos están dentro del rango de normalidad para esta especie, tanto en animales controles como anémicos. Resalta un aumento de las transaminasas (ALT y AST) (Figuras XI y XII, respectivamente) para aquellos animales, controles y anémicos, alimentados con dietas de leche de vaca ($P < 0.05$ para dieta con contenido normal de hierro y $P < 0.001$ para dieta con sobrecarga de hierro). La sobrecarga de hierro en general aumenta los niveles de transaminasas ($P < 0.01$) y el suplemento de ácido fólico los disminuye ($P < 0.01$).

Los niveles plasmáticos de creatinina (Figura XIII) y CK-MB (Figura XIV) no se vieron afectados por la anemia, el tipo de leche empleado, ni por el contenido de hierro. Sin embargo la suplementación con ácido fólico aumentó significativamente los niveles de creatinina y CK-MB con ambos tipos de leche y en todas las condiciones experimentales ensayadas ($P < 0.001$).

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

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

La creatina incrementa la masa muscular y la síntesis de ATP. En las 4-6 horas posteriores a dicha síntesis, el nivel de ácido tiodiglicólico aumenta rápidamente, lo que origina la disminución del *pool* de glutatión poniendo en peligro las vías metabólicas dependientes de este compuesto (Navrátil y col., 2010). Esto refleja lo perjudicial que puede llegar a ser el aumento de la síntesis de creatina, ya que la oxidación de xenobióticos deriva también en la formación de ácido tiodiglicólico. No obstante, en un estudio realizado por Serrano-Reina y col. (2015) y en las mismas condiciones experimentales, se observó que la suplementación con ácido fólico reduce el consumo de glutatión y mejora asimismo la capacidad antioxidante del hígado neutralizando el exceso de radicales libres generados en el metabolismo de la creatina.

5.2.3. Relación hepatosomática y contenido de hierro en hígado

Tras 30 días de suministro de dietas basadas en leche no se aprecian diferencias significativas en el peso corporal y hepático de los animales objeto de estudio y por tanto

tampoco en la relación hepatosomática para todas las condiciones experimentales ensayadas. Por el contrario, es mayor el depósito de hierro (Figura XV) en animales controles que en anémicos ($P < 0.001$), debido a la severa ferropénica inducida en las ratas durante el desarrollo de la anemia ferropénica nutricional. Además, sí se aprecian diferencias significativas en el contenido de hierro hepático siendo mayor el contenido de hierro en hígado en las ratas alimentadas con la dieta con leche de cabra ($P < 0.05$) que con la de vaca para todas las condiciones experimentales del estudio. Los efectos de la sobrecarga de hierro se aprecian al final del periodo experimental favoreciéndose los depósitos hepáticos de este mineral ($P < 0.001$) (Tabla VI).

Por otra parte, el contenido de hierro hepático es mayor en ratas controles ya que los depósitos estaban deplecionados en ratas anémicas, lo que coincide con los resultados de Muñoz y col. (2009). El menor contenido de hierro en hígado, observado en situación de anemia ferropénica puede deberse, como se ha mencionado anteriormente, a la disminución de la hepcidina hepática (Theurl y col., 2009), lo cual se traducirá en una menor interacción con la FPN1 (Tselepis y col., 2010), evitando su internalización y degradación, de manera que aumenta el flujo de salida de Fe^{2+} desde los hepatocitos, reduciéndose su depósito en dicho órgano. El mayor contenido de hierro en hígado encontrado tras el consumo de la dieta basada en leche de cabra puede ser debido a la elevación de la hepcidina con este tipo de leche.

Hay aumento de los depósitos hepáticos de hierro como consecuencia de la sobrecarga, a pesar de que no se haya observado un aumento paralelo en los niveles de hepcidina en este estudio. Esto pone de manifiesto que aunque se han utilizado dietas con sobrecarga de hierro, quizás habría que alargar el tiempo del suministro de estas dietas para alcanzar una sobrecarga crónica de hierro.

5.2.4. Expresión proteica hepática del transportador de metales divalentes (DMT1)

Para confirmar la respuesta homeostática a la repleción crónica con hierro se ha analizado la expresión del transportador de metales divalentes 1 (DMT1) en ratas controles y anémicas tras el consumo de dietas basadas en leche de cabra o vaca (Figuras I y II). La expresión de DMT1 en hígado fue distinta en respuesta a las dietas basadas en leche, aumentando significativamente en ratas anémicas alimentadas con dieta de leche de cabra en comparación con la de vaca ($P < 0.01$). La expresión del DMT1 de ratas controles y anémicas alimentadas con leche de cabra fue respectivamente un 105.99% y 145.26% de la expresión del DMT1 en ratas alimentadas con leche de vaca ($P < 0.05$).

La mayor expresión de DMT1 y la mayor cantidad de hepcidina sérica encontrada en el presente estudio mejoran los depósitos hepáticos de hierro y por tanto favorece la recuperación de los parámetros hematológicos tras 30 días de suministro de la dieta basada en leche de cabra.

El DMT1 está localizado tanto en la membrana celular como a nivel intracelular en los hepatocitos (Trinder y col., 2000). Además de su papel en el eflujo endosomal de hierro, la presencia de DMT1 en el borde en cepillo o microvellosidades de los hepatocitos sugiere que el hígado absorbe hierro no hemo no unido a transferrina de la circulación sanguínea. A diferencia del DMT1 intestinal, el DMT1 hepático refleja fielmente el estado del metabolismo de hierro (Trinder y col., 2000), sugiriendo que DMT1 juega un papel clave en la protección celular del exceso de hierro, regulando la homeostasis hepática del mismo. Por lo tanto, los niveles hepáticos aumentados de DMT1 reflejan fielmente un mayor almacén de hierro hepático tras la repleción crónica con hierro (Kelleher y Lönnerdal, 2005), y por consiguiente el aumento de DMT1 en animales anémicos alimentados con leche de cabra revela que la repleción de hierro después de la anemia inducida es más eficiente cuando se suministra leche de cabra, hallazgo que está apoyado y corroborado por el mayor depósito de hierro hepático en ratas alimentadas con leche de cabra en comparación con los que consumen leche de vaca.

Por otra parte, la leche de cabra mejora el metabolismo de calcio, debido a su mayor contenido de vitamina D, que aumenta el transporte transcelular dependiente de energía y tiene más lisina y cisteína, sustancias nutritivas que mejoran la absorción de calcio por transporte pasivo (Alfárez y col. 2006). Además, Díaz-Castro y col. (2011) han encontrado que la leche de cabra disminuye la tasa de secreción de parathormona, mejorando la utilización de calcio y su depósito en órganos diana y todos estos factores conducirían a la alta eficacia en la capacidad transportadora de hierro del DMT1. La concentración intracelular de calcio elevada, aumenta la captación de hierro no unido a transferrina mediante un sistema indefinido de transporte que tiene características distintas del DMT1 (Kaplan y col. 1991) y además, el calcio tiene un papel importante y ubicuo en la señalización celular. Una adecuada homeostasis de calcio disminuye el defecto de transporte de hierro causado por la inactivación del DMT1 en ratones con anemia microcítica (ratones y ratas *Belgrade mk*) en el intestino, hígado o en precursores eritroides (Xu y col., 2004). El ciclo de transferrina es esencial para la captación de hierro por las células precursoras eritroides y el DMT1 controla la transferencia de hierro desde los endosomas al citoplasma (Fleming y col. 1998; Touret y col. 2003). Una mejor homeostasis de calcio, como ya se ha mencionado, acelera la captación de hierro por el ciclo de la transferrina, al parecer por la activación de proteína quinasa C (Ci y col. 2003). Así, a la luz de estas consideraciones, podemos hipotetizar que la mejora de metabolismo de calcio tras el consumo de leche de cabra

podría potenciar la actividad hepática y expresión del DMT1, aumentando el depósito de hierro hepático, apoyando y explicando los resultados de este estudio.

Además, la grasa de la leche de cabra es más rica en triglicéridos de cadena media que son oxidados en las mitocondrias, proporcionando una fuente de energía rápida que puede ser usada en varias rutas metabólicas (Alfárez et al., 2006) y así contribuyen al aumento de la síntesis de proteínas transportadoras tales como el DMT1, mejorando la absorción de hierro. Por otra parte, un bajo consumo de vitamina A reduce la expresión de la proteína DMT1 por regulación post-transcriptional por una disminución de la transducción o aumento de la degradación de la proteína, afectando negativamente al metabolismo de hierro (Kelleher y Lönnerdal, 2005). En este sentido, la leche de cabra aumentaría la expresión de DMT1, dado el alto contenido de vitamina A, dos veces superior al de la leche de vaca (Alfárez et al., 2006).

5.2.5. Utilización nutritiva de hierro

La anemia, en general, aumenta la utilización nutritiva de hierro independientemente del tipo de leche, del contenido en hierro y en ácido fólico ($P < 0.05$) (Tabla VII).

El suministro durante 30 días de las dietas basadas en leche de cabra, con contenido normal o sobrecarga de hierro y con contenido normal o suplemento de ácido fólico conduce a un efecto positivo sobre la utilización digestiva (CDA) (Figura XVI) y metabólica (R/I) (Figura XVII) de hierro, en animales con anemia en relación a los que consumen dietas elaboradas con leche de vaca, ($P < 0.05$).

La sobrecarga de hierro aumenta la utilización nutritiva de hierro (CDA y R/I) en ambos grupos de animales y en todas las condiciones experimentales ensayadas ($P < 0.01$).

El suplemento de ácido fólico incrementa la utilización nutritiva de hierro en ratas controles y anémicas, alimentadas con ambos tipos de leche, con contenido normal o sobrecarga de hierro ($P < 0.001$).

La mayor utilización nutritiva de hierro encontrada con la dieta basada en leche de cabra es debida a varios factores nutricionales que se encuentran en la leche de cabra. La proteína aportada por la leche de cabra, puede favorecer la absorción de hierro, debido a su elevada solubilidad y origen animal (Sharp y col., 2003). Además, la calidad lipídica de la grasa es distinta, la leche de cabra posee un alto contenido en triglicéridos de cadena media (Alfárez y col., 2001) que son rápidamente absorbidos a nivel intestinal y metabolizados para obtener

energía (García-Unciti, 1996), lo cual contribuiría a incrementar la síntesis de proteínas transportadoras y por tanto la absorción de hierro. Mayor contenido en ácido ascórbico, lisina y cisteína (Alfárez y col., 2006), todos ellos capaces de reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} (Wienk y col., 1999; Glahn y Van Campen, 1997). La leche de cabra contiene casi dos veces más vitamina A que la de vaca (Alfárez y col., 2006), vitamina que puede movilizar el hierro disponible desde los depósitos, para su posterior utilización en la síntesis de hemoglobina (Bloem, 1995). Por otra parte, el β -caroteno mejora la absorción de hierro y contribuye a prevenir el efecto inhibitor que ejercen determinadas sustancias (García-Casal y col., 2000). Gargari y col. (2006) han demostrado que un incremento en la ingesta de vitamina A puede ser considerado como un método eficaz para incrementar la biodisponibilidad de hierro, y así combatir de manera simultánea el déficit de hierro y vitamina A. Además, la leche de cabra tiene mayor contenido en vitamina D que la de vaca (Alfárez y col., 2006). El papel positivo de la vitamina D como promotora del componente activo en el proceso de absorción del hierro ha sido demostrado previamente por nuestro grupo de investigación (Gómez-Ayala y col., 1998).

El ácido fólico dado su carácter reductor antioxidante podría mantener durante mayor tiempo el hierro en estado ferroso, que es el sustrato preferencial del DMT1 facilitando su absorción a nivel intestinal y por tanto su utilización en la síntesis de hemoglobina (Rezk y col., 2003; Rezk y col., 2009, Ibrahim y col., 2012).

5.2.6. Eficacia de regeneración de la hemoglobina (ERH)

Como era de esperar la ERH (Figura XVII) es muy superior, del orden de 3 a 4 veces, en animales anémicos que en sus controles independientemente del tipo de dieta suministrada ($P < 0.001$). En nuestras condiciones experimentales, el porcentaje de ERH es más elevado en ratas controles y anémicas alimentadas con las distintas dietas basadas en leche de cabra respecto a las de leche de vaca ($P < 0.001$). La sobrecarga de hierro disminuye drásticamente el porcentaje de ERH ($P < 0.001$), mientras que el suplemento de fólico lo aumenta en ambos grupos de animales y con ambos tipos de leche ($P < 0.001$) (Tabla VIII).

La ERH en animales controles es similar a la que muestran otros autores (Miller y Nnanna, 1983; Matsumoto y col., 2003). Estudios previos han puesto de manifiesto que la mayor utilización digestiva de hierro en las ratas anémicas se refleja en la ERH, la cual se incrementa de forma acusada (Pallarés y col., 1993).

El consumo de la dieta basada en leche de cabra con contenido normal o sobrecargada en hierro y contenido normal o suplementada en ácido fólico eleva la ERH lo cual puede ser debido, en parte, a los mayores niveles de hierro sérico y hemoglobina, y a la mejor utilización digestiva y metabólica de hierro en los animales que consumen la dieta basada en leche de cabra observada en este estudio y otros previos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación (Alfárez y col, 2001; 2006).

El ácido fólico, junto al hierro y la vitamina B₁₂, es un componente esencial de la eritropoyesis humana. El ácido fólico interviene en la fase de síntesis de la división celular y, en el proceso de maduración de la médula ósea, induce la normal división de los eritrocitos, normalizando los valores de VCM y Hb, y con ello el aumento de la ERH (Haro Vicente, 2006).

Resumen y Conclusiones



6. RESUMEN Y CONCLUSIONES

La investigación llevada a cabo estudia parámetros hematológicos relacionados con el estatus de hierro, parámetros bioquímicos relacionados con la homeostasis hepática de hierro, biodisponibilidad de hierro y eficacia de regeneración de la hemoglobina durante la recuperación de la anemia ferropénica nutricional tras el consumo de dietas basadas en leche de cabra o vaca con un contenido normal o con sobrecarga crónica de hierro y suplementadas o no en ácido fólico.

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

Posteriormente, ambos grupos de animales, controles y anémicos, se someten a un periodo experimental (PE) en el que son alimentados “*pair feed*” durante 30 días con dietas basadas en leche de cabra o vaca (elaboradas con un 10% de grasa y un 20% de proteína, aportada por cada tipo de leche), con un contenido normal (45 mg/kg dieta) o sobrecarga de hierro (450 mg/Kg dieta) y contenido normal (2 mg/Kg dieta) o suplemento de ácido fólico (40 mg/Kg dieta). En los últimos 7 días de este PE se recogen por separado heces y orina para la determinación de la utilización digestiva y metabólica de hierro.

Al final del PE los animales son sacrificados previa anestesia y se procede a la obtención de sangre por canulación de la aorta abdominal para la determinación de parámetros hematológicos (hemoglobina, hematíes, VCM, hematocrito, plaquetas, hierro sérico, TIBC, saturación de transferrina, ferritina sérica, hepcidina sérica), parámetros bioquímicos (ALT, AST, creatinina, creatina-quinasa MB), y extracción del hígado para determinar la relación hepatosomática, contenido de hierro en hígado y expresión proteica hepática del transportador de metales divalentes (DMT1), y por último eficacia de regeneración de la hemoglobina (ERH).

Tras el análisis de los resultados obtenidos se ha llegado a las siguientes CONCLUSIONES:

PRIMERA CONCLUSIÓN

La ferropenia severa inducida experimentalmente provoca una depleción de los niveles hepáticos de hierro debido a la disminución de los niveles de hepcidina, que facilita la liberación del mismo desde los hepatocitos, junto con una ligera disminución del tamaño del hígado, hecho que incide de manera negativa en la ganancia de peso de animales en crecimiento, ya que la hipoxia inducida por la ferropenia limita la producción de ATP.

SEGUNDA CONCLUSIÓN

La leche de cabra aumenta la expresión de la proteína transportadora de metales divalentes (DMT1) a nivel hepático y los niveles séricos de hepcidina, modulando positivamente la homeostasis de hierro durante la recuperación de la anemia ferropénica nutricional.

TERCERA CONCLUSIÓN

El suplemento de ácido fólico en la leche de cabra tiene un claro efecto hepatoprotector en condiciones basales y especialmente en condiciones de sobrecarga de hierro, al disminuir los niveles plasmáticos de transaminasas (ALT y AST), parámetros indicadores de daño hepatocelular.

CUARTA CONCLUSIÓN

El consumo de la dieta basada en leche de cabra con contenido normal o sobrecargado en hierro y contenido normal o suplementado en ácido fólico eleva la eficacia de regeneración de hemoglobina debido, en parte, a los mayores niveles séricos de hierro y concentración de hemoglobina, y a la mejor utilización nutritiva de hierro.

CONCLUSIÓN GENERAL

La leche de cabra aumenta la expresión hepática de la proteína transportadora DMT1 y los niveles séricos de hepcidina, mejorando la homeostasis de hierro. La suplementación de ácido fólico en la leche de cabra tiene un efecto protector a nivel hepático y favorece la eficacia de regeneración de la hemoglobina en tratamientos crónicos con hierro. Por tanto, sería recomendable la suplementación de ácido fólico en la leche de cabra y la inclusión de este alimento en la dieta habitual de la población general y, en especial, para una mejor y más rápida recuperación de la anemia ferropénica nutricional.

Bibliografía

In a village of La Mancha, the name of which I have no desire to call to mind, there lived not long since one of those gentlemen that keep a lance in the lance-rack, an old buckler, a brown hack, and a parchment for contract, on the whole, more beef than mutton, a solid as most households, scraps on Saturdays, drunk on Fridays, and a pigeon or so extra on Sundays, made away with three quarters of his income. The rest of it went to the purchase of the duck and rabbit hawks, and shoes to match for holidays, while on week days he made a brave figure in his best homspun. He had in his house a housekeeper and two, a steward, a

~ A ~

- **Abbot B et al.** Creatinine kinase. Kaplan LA, Pesce AJ, editors. Clin Chem. St Louis. The C.V. Mosby Co.; 1984: 1112–1116.
- **Achón M, Alonso-Aperte E, Reyes L, Úbeda N, Varela-Moreiras G.** High-dose folic acid supplementation in rats: effects on gestation and the methionine cycle. B. J. Nutr., 2000;**83**: 177–183.
- **Adams PC, Barton JC.** Haemochromatosis. Lancet, 2007;**370**: 1855–1860.
- **Adams PC, Barton JC.** How I treat hemochromatosis. Blood, 2010;**116**: 317–325.
- **Alfárez MJM, López-Aliaga I, Nestares T, Díaz-Castro J, Barrionuevo M, Ros PB, et al.** Dietary goat milk improves iron bioavailability in rats with induced ferropernic anaemia in comparison to cow milk. Int. Dairy J., 2006;**16**: 813–821.
- **Ahlquist DA, McGill DB, Schwartz S, Taylor WF, Owen RA.** Fecal blood levels in health and disease. A study using HemoQuant. N. Engl. J. Med., 1985;**312**(22): 1422–1428.
- **Ahmed F, Khan MR, Akhtaruzzaman M, Karim R, Williams G, Torlesse H, et al.** Long-term intermittent multiple micronutrient supplementation enhances hemoglobin and micronutrient status more than iron + folic acid supplementation in Bangladeshi rural adolescent girls with nutritional anemia. J. Nutr., 2010;**140**: 1879–1886.
- **Aigner E, Felder TK, Oberkofler H, Hahne P, Auer S, Soyol S, et al.** Glucose acts as a regulator of serum iron by increasing serum hepcidin concentrations. J. Nutr. Biochem., 2013;**24**: 112–117.
- **Aisen P, Enns C, Wessling-Resnick M.** Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. Int. J. Biochem. Cell Biol., 2001;**33**: 940–959.
- **Albacar G, Sans T, Martín-Santos R, García-Esteve L, Guillamat R, Sanjuan J, et al.** An association between plasma ferritin concentrations measured 48 h after delivery and postpartum depression. J. Affect. Disord., 2011;**131**(1–3): 136–142.
- **Alfárez MJ, Barrionuevo M, López-Aliaga I, Sanz-Sampelayo MR, Lisbona F, Robles JC, et al.** Digestive utilization of goat and cow milk fat in malabsorption syndrome. J. Dairy Res., 2001;**68**: 451–461.
- **Alfárez MJM, López-Aliaga I, Nestares T, Díaz-Castro J, Barrionuevo M, Ros PB, et al.** Dietary goat milk improves iron bioavailability in rats with induced nutritional ferropernic anaemia in comparison with cow milk. Int. Dairy J., 2006; **16**: 813-821.

-
- **Allen PD, St Pierre TG, Chua-anusorn W, Ström V, Rao KV.** Low-frequency low-field magnetic susceptibility of ferritin and hemosiderin. *Biochim. Biophys. Acta*, 2000;1500: 186–196.
 - **Alleyne M, Horne MK, Miller JL.** Individualized treatment for iron-deficiency anemia in adults. *Am. J. Med.*, 2008;121: 943–948.
 - **Alonso L, Fontecha J, Lozada L, Fraga MJ, Juarez M.** Fatty acid composition of caprine milk: major, branched-chain, and transfatty acids. *J. Dairy Sci.*, 1999;82: 878–884.
 - **Amigo L, Fontecha J.** Goat milk. In: Fuquay JW, Fox PF, McSweeney P, editors. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 2 ed. London: Academic Press; 2011. p. 494–502.
 - **Anderson GJ, Frazer DM, McLaren GD.** Iron absorption and metabolism. *Curr. Opin. Gastroenterol.*, 2009;25: 129–135.
 - **Anderson GJ, Vulpe CD.** Mammalian iron transport. *Cell Mol. Life Sci.* 2009;66: 3241–3261.
 - **Andrews NC.** Forging a field: the golden age of iron biology. *Blood*, 2008;112: 219–230.
 - **Ando K, Morita S, Higashi T, Fukuhara S, Watanabe S, Park J, et al.** Health-related quality of life among Japanese women with iron-deficiency anemia. *Qual. Life Res.*, 2006;15(10): 1559–1563.
 - **An-Sheng Z, Enns CA.** Molecular mechanisms of normal iron homeostasis. *Am. Soc. Hematol. Educ. Program Book*. New Orleans, Louisiana, USA. 2009. pp. 207–214.
 - **Aoki S, Okada Y, Nishimura K, Barkovich AJ, Kjos BO, Brasch RC, Norman D.** Normal deposition of brain iron in childhood and adolescence: MR imaging at 1.5 T. *Radiology*, 1989;172: 381–385.
 - **Arbiza SI.** Producción de caprinos. México: AGT Editores; 1986, p. 105–128.
 - **Armah CN, Sharp P, Mellon FA, Pariagh S, Lund EK, Dainty JR, et al.** L- α -glycerophosphocholine contributes to meat's enhancement of nonheme iron absorption. *J. Nutr.*, 2008;138: 873–877.
 - **Armitage AE, Eddowes LA, Gileadi U, Cole S, Spottiswoode N, Selvakumar TA, et al.** Hepcidin regulation by innate immune and infectious stimuli. *Blood*, 2011;118: 4129–4139.
 - **Arosio P, Ingrassia R, Cavadini P.** Ferritins: a family of molecules for iron storage, antioxidation and more. *Biochim. Biophys. Acta*, 2009;1790(7): 589–599.
 - **Aslinia F, Mazza JJ, Yale SH.** Megaloblastic anemia and other causes of macrocytosis. *Clin. Med. Res.*, 2006;4(3): 236–241.

- **Assaraf YG.** The role of multidrug resistance efflux transporters in antifolate resistance and folate homeostasis. *Drug Resist Update*, 2006;9: 227–246.
- **Ayoubi JM, Hirt R, Badiou W, Hininger-Favier I, Favier M, Zraik-Ayoubi F, et al.** Nutrición de la mujer embarazada. *EMC - Ginecología-Obstetricia*, 2012;48(2): 1–14.

~ B ~

- **Babitt JL, Lin HY.** The molecular pathogenesis of hereditary hemochromatosis. *Semin. Liver Dis.*, 2011;31: 280–292.
- **Bach V, Remacha A, Altés A, Barceló MJ, Molina MA, Baiget M.** Autosomal dominant hereditary hemochromatosis associated with two novel ferroportin 1 mutations in Spain. *Blood Cells Mol. Dis.*, 2006;36(1): 41–45.
- **Bacon BR, Adams PC, Kowdley KV, Powell LW, Tavill AS; American Association for the Study of Liver Diseases.** Diagnosis and management of hemochromatosis: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*, 2011;54(1): 328–343.
- **Bailey LB, Gregory JF 3rd.** Folate metabolism and requirements. *J. Nutr.*, 1999;129: 779–782.
- **Ballot D, Baynes RD, Bothwell TH, Gillooly M, Macfarlane J, Macphail AP, et al.** The effects of fruit juices and fruits on the absorption of iron from a rice meal. *Br. J. Nutr.*, 1987;57(3): 331–343.
- **Barth CA, Behnke U.** Nutritional significance of whey and whey components. *Nahrung*, 1997;41: 2–12.
- **Bartnikas TB, Fleming MD, Schmidt PJ.** Murine mutants in the study of systemic iron metabolism and its disorders: an update on recent advances. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012;1823(9): 1444–1450.
- **Beard JL.** Iron requirements in adolescent females. *J. Nutr.*, 2000;130(2S Suppl): 440S–442S.
- **Beard JL, Brigham DE, Kelley SK, Green MH.** Plasma thyroid hormone kinetics are altered in iron-deficient rats. *J. Nutr.*, 1998;128: 1401–1408.
- **Beard JL, Connor JR.** Iron status and neural functioning. *Annu. Rev. Nutr.*, 2003;23: 41–58.

-
- **Beard JL, Connor JR, Jones BC.** Iron in the brain. *Nutr. Rev.*, 1993;51: 157–170.
 - **Beard JL, Hendricks MK, Perez EM, Murray-Kolb LE, Berg A, Vernon-Feagans L, et al.** Maternal iron deficiency anemia affects postpartum emotions and cognition. *J. Nutr.*, 2005;135(2): 267–272.
 - **Bedoya O, Rosero R, Posada S.** Composición de la leche de cabra y factores nutricionales que afectan el contenido de sus componentes. *Corporación Universitaria Lasallista*, 2012;1: 93–110.
 - **Ben-Assa E, Youngster I, Kozer E, Abu-Kishk I, Bar-Haim A, Bar-Oz B, et al.** Changes in serum hepcidin levels in acute iron intoxication in a rat model. *Toxicol. Lett.*, 2009;189(3): 242–247.
 - **Benkovic S, Connor JR.** Ferritin, transferrin and iron in selected regions of the adult and aged rat brain. *J. Comp. Neurol.*, 1993;338: 97–113.
 - **Bergmeyer HU, Scheibe P, Wahlefeld AW.** Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. *Clin. Chem.*, 1978;24: 58–73.
 - **Berry RJ, Li Z, Erickson JD, Li S, Moore CA, Wang H, et al.** Prevention of neural-tube defects with folic acid in China. *N. Engl. J. Med.*, 1999;341(20): 1485–1490.
 - **Bertolino CN, Castro TG, Ferreira S, Cardosa MA.** Influência do consumo alimentar de ácidos graxos trans no perfil de lipídios séricos em nipo-brasileiros de Bauru, São Paulo, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, 2006;22(3): 357–364.
 - **Besarab A, Hörl WH, Silverberg D.** Iron metabolism, iron deficiency, thrombocytosis, and the cardiorenal anemia syndrome. *Oncologist.*, 2009;14: 22–33.
 - **Best C, Neufingerl N, Del Rosso JM, Transler C, van den Briel T, Osendarp S.** Can multi-micronutrient food fortification improve the micronutrient status, growth, health, and cognition of schoolchildren? A systematic review. *Nutr. Rev.*, 2011;69: 186–204.
 - **Bhutta ZA, Salam RA.** Global nutrition epidemiology and trends. *Ann. Nutr. Metab.*, 2012;61(Suppl. 1): 19–27.
 - **Birn H, Selhub J, Christensen EI.** Internalization and intracellular transport of folatebinding protein in rat kidney proximal tubule. *Am. J. Physiol.*, 1993;264: C302–310.
 - **Black MM, Quigg AM, Hurley KM, Pepper MR.** Iron deficiency and iron-deficiency anemia in the first two years of life: Strategies to prevent loss of developmental potential. *Nutr. Rev.*, 2011;69(1 Suppl): S64–S70.
 - **Blanton CA, Green MW, Kretsch MJ.** Body iron is associated with cognitive executive planning function in college women. *Br. J. Nutr.*, 2012;7: 1–8.
 - **Bloem MW.** Interdependence of vitamin A and iron: an important association for programmes of anaemia control. *Proc. Nutr. Soc.*, 1995;54(2): 501–508.

- **Blount BC, Mack MM, Wehr CM, MacGregor JT, Hiatt RA, Wang G, et al.** Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1997;94(7): 3290–3295.
- **Bocanegra A, Bastida S, Ródenas S, Benedí J, Sánchez-Muniz FJ.** Characteristics and nutritional and cardiovascular-health properties of seaweeds. *J. Med. Food*, 2009;12: 236–258.
- **Bocanegra A, Nieto A, Bastida S, Benedí J, Sánchez-Muniz FJ.** A Nori, but not a Konbu, dietary supplement decreases the cholesterolaemia, liver fat infiltration and mineral bioavailability in hypercholesterolemic growing Wistar rats. *Br. J. Nutr.*, 2008;99: 272–280.
- **Bocanegra A, Nieto A, Blas B, Sánchez-Muniz FJ.** Diets containing high percentage of Nori or Konbu algae are well accepted and efficiently used by growing rats but induce different degrees of histological changes in the liver and bowel. *Food Chem. Toxicol.*, 2003;41: 1473–1480.
- **Boddy JL.** The androgen receptor is significantly associated with vascular endothelial growth factor and hypoxia sensing via HIF1a, HIF2a and the prolyl hydroxylases in human prostate cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2005;11: 7658–7663.
- **Bodemar G, Kechagias S, Almer S, Danielson BG.** Treatment of anemia in inflammatory bowel disease with iron sucrose. *Scand. J. Gastroenterol.*, 2004;39: 454–458.
- **Boehm G, Stahl B.** Oligosaccharides from milk. *J. Nutr.*, 2007;137: 8475–8495.
- **Boisnard M, Pètrissant G.** Complete sequence of ovine alpha s2-casein messenger RNA. *Biochimie.*, 1985;67: 1043–1051.
- **Bonsing J, Mackinlay AG.** Recent studies on nucleotide sequences encoding the caseins. *J. Dairy Res.*, 1987;54: 447–461.
- **Bouhallab S, Raynal-Ljutovac K.** Heat stability of goat milks. In: *The future of the sheep and goat dairy sectors*, IDF-FIL special issue 0501. Pt. 4.2, 2005. p. 216–225.
- **Bouniol C.** Sequence of the goat as2-encoding cDNA. *Gene*, 1992;125: 235–236.
- **Boza J, Sanz Sampelayo MR.** Aspectos nutricionales de la leche de cabra. *RACVAO*, 1997;10: 109–139.
- **Breuer W, Hershko C, Cabantchik ZI.** The importance of non-transferrin bound iron in disorders of iron metabolism. *Transfus. Sci.*, 2000;23(3): 185–192.
- **Breuer W, Shvartsman M, Cabantchik ZI.** Intracellular labile iron. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2008;40(3): 350–354.

-
- **Brew K, Grobler JA.** α -lactalbumin. In: PF Fox PF, editor. Advanced dairy chemistry, Proteins. 2 ed. Vol 1. New York: Elsevier Sci. Pub. Ltd.; 1992. p. 191–229.
 - **Brissot P, Loreal O.** Iron metabolism and related genetic diseases: a cleared land, keeping mysteries [on line]. J. Hepatol., 2015 [cited 2015 November 17]: [about 28p.]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2015.11.009>.
 - **Brito A, Hertrampf E, Olivares M, Gaitán D, Sánchez H, Allen LH, et al.** Folate, vitamin B₁₂ and human health. Rev. méd. Chile, 2012;140(11): 1464–1475.
 - **Brownlie T 4th, Utermohlen V, Hinton PS, Giordano C, Haas JD.** Marginal iron deficiency without anemia impairs aerobic adaptation among previously untrained women. Am. J. Clin. Nutr., 2002;75(4): 734–742.
 - **Bruner AB, Joffe A, Duggan AK, Casella JF, Brandt J.** Randomised study of cognitive effects of iron supplementation in non-anaemic iron-deficient adolescent girls. Lancet, 1996;348: 992–996.
 - **Brustolin S, Giugliani R, Félix TM.** Genetics of homocysteine metabolism and associated disorders. Braz. J. Med. Biol. Res., 2010;43: 1–7.
 - **Bungiro R, Cappello M.** Twenty-first century progress toward the global control of human hookworm infection. Curr. Infect. Dis. Repl, 2011;13: 210–217.
 - **Businco L, Bellanti J.** Food allergy in childhood. Hypersensitivity to cow's milk allergens. Clin. Exp. Allergy, 1993;23: 481–483.
 - **Barrueco JR, O'Leary DF, Sirotnak FM.** Metabolic turnover of methotrexate polyglutamates in lysosomes derived from S180 cells. J. Biol. Chem., 1992;267: 19986–19991.

~ C ~

- **Cabré-Roure M.** El déficit de ácido fólico. FMC., 2010;17(2): 94–100.
- **Campos MS, Barrionuevo M, Alférez MJM, Gómez-Ayala AE, Rodríguez-Matas MC, López-Aliaga I, et al.** Interactions among iron, calcium, phosphorus and magnesium in nutritionally iron-deficient rats. Exp. Physiol., 1998;83: 771–781.
- **Campos MS, Barrionuevo M, Alférez MJM, Nestares T, Díaz-Castro J, Ros PB, et al.** Consumption of caprine milk improves metabolism of calcium and phosphorus in rats with nutritional ferropenic anaemia. Int. Dairy J., 2007;17: 412–419.

- **Casanovas G, Spasic MV, Casu C, Rivella S, Strelau J, Unsicker K, et al.** The murine growth differentiation factor 15 is not essential for systemic iron homeostasis in phlebotomized mice. *Hematologic*, 2013;98(3): 444–447.
- **Castoldi M, Vujic Spasic M, Altamura S, Elmén J, Lindow M, Kiss J, et al.** The liver-specific microRNA miR-122 controls systemic iron homeostasis in mice. *J. Clin. Invest.*, 2011;121(4): 1386–1396.
- **Cau M, Melis MA, Congiu R, Galanello R.** Iron-deficiency anemia secondary to mutations in genes controlling hepcidin. *Expert. Rev. Hematol.*, 2010;3: 205–216.
- **Cazzola M, Invernizzi R, Bergamaschi G, Levi S, Corsi B, Travaglio E, et al.** Mitochondrial ferritin expression in erythroid cells from patients with sideroblastic anemia. *Blood*, 2003;101(5): 1996–2000.
- **Chacón Villalobos A.** Aspectos nutricionales de la leche de cabra (*Capra hircus*) y sus variaciones en el proceso agroindustrial. *Agronomía Mesoamericana*, 2005;16(2): 239–252.
- **Chacón Villalobos A, Araya YM, Gamboa ME.** Percepciones y hábitos de consumo de la leche de cabra y sus derivados en los costarricenses. *Agronomía Mesoamericana*, 2008;19(2): 241–250.
- **Chancy CD, Kekuda R, Huang W, Prasad PD, Kuhnel JM, Sirotnak FM, et al.** Expression and differential polarization of the reduced-folate transporter-1 and the folate receptor alpha in mammalian retinal pigment epithelium. *J. Biol. Chem.*, 2000;275: 20676–20684.
- **Chandan RC, Attaie R, Shahani KM.** Nutritional aspects of goat milk and its products. In: *Proceedings of the Fifth International Conference on Goats*, 2–8 March 1992. Vol. II, Pt. II. New Delhi: Indian Council of Agricultural Research Publishers; 1992. p. 399–420.
- **Chiancone E, Ceci P.** The multifaceted capacity of Dps proteins to combat bacterial stress conditions: Detoxification of iron and hydrogen peroxide and DNA binding. *Biochim. Biophys. Acta*, 2010;1800(8): 798–805.
- **Chilliard Y, Ferlay A.** Dietary lipids and forages interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties. *Reprod. Nutr. Dev.*, 2004;44(5): 467–492.
- **Chilliard Y, Ferlay A, Rouel J, Lamberet G.** A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. *J. Dairy Sci.*, 2003;86(5): 1751–1770.
- **Chilliard Y, Rouel J, Ferlay A, Bernard L, Gaborit P, Raynal-Ljutovac K, et al.** Effects of type of forage and lipid supplementation on goat milk fatty acids and

sensorial properties of cheeses. In: Future of Sheep and Goat Dairy Sectors. Special issue of the International Dairy Federation. No. 0501, Pt. 5. Brussels: International Dairy Federation; 2005. p. 297–304.

- **Chilliard Y, Rouel J, Ferlay A, Bernard L, Gaborit P, Raynal-Ljutovac K, et al.** Optimising goat's milk and cheese fatty acid composition: effects of genotype, feeding factors and dairy technology. In: Williams G, Buttriss J, editors. Improving the Fat Content of Foods. Cambridge: Woodhead Publishing; 2006. p. 281–312.
- **Chen J, Enns CA.** Hereditary hemochromatosis and transferrin receptor 2. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012;1820: 256–263.
- **Chen TT, Li L, Chung DH, Allen CD, Torti SV, Torti FM, et al.** TIM-2 is expressed on B cells and in liver and kidney and is a receptor for H-ferritin endocytosis. *J. Exp. Med.*, 2005;202: 955–965.
- **Chen W, Huang FW, de Renshaw TB, Andrews NC.** Skeletal muscle hemojuvelin is dispensable for systemic iron homeostasis. *Blood*, 2011;117: 6319–6325.
- **Chen W, Paradkar PN, Li L, Pierce EL, Langer NB, Takahashi-Makise N, et al.** Abcb10 physically interacts with mitoferrin-1 (Slc25a37) to enhance its stability and function in the erythroid mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2009;106(38): 16263–16268.
- **Choi SW, Mason JB.** Folate status: effects on pathways of colorectal carcinogenesis. *J. Nutr.*, 2002;132: 2413S–2418S
- **Ci W, Li W, Ke Y, Qian ZM, Shen X.** Intracellular Ca²⁺ regulates the cellular iron uptake in K562 cells. *Cell Calcium*, 2003;33(4): 257–266.
- **Clifford AJ, Heid MK, Muller GG, Bills ND.** Tissue distribution and prediction of total body folate of rats. *J. Nutr.*, 1990;120(12): 1633–1639.
- **Cohen LA, Gutierrez L, Weiss A, Leichtmann-Bardoogo Y, Zhang DL, Crooks DR, et al.** Serum ferritin is derived primarily from macrophages through a nonclassical secretory pathway. *Blood*, 2010;116(9): 1574–1584.
- **Collins JF, Anderson GJ.** Intestinal iron absorption. In: Johnson LR, Ghishan FK, Kaunitz J, Merchant JL, Said HM, Wood JD, editors. Physiology of the gastrointestinal tract. 5 ed. New York: Elsevier; 2012. p. 1921–1947.
- **Connolly RM.** African Haemoglobinuric fever, commonly called Blackwater Fever. *Br. Med. J.*, 1898;2: 882–885.
- **Connor JR, Phillips TM, Lakshman MR, Barron KD, Fine RE, Csiza CK.** Regional variation in the levels of transferrin in the CNS of normal and myelin-deficient rats. *J. Neurochem.*, 1987;49: 1523–1529.

- **Cook JD.** Diagnosis and management of iron-deficiency anaemia. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.*, 2005;18: 319–332.
- **Cook JD, Flowers CH, Skikne BS.** The quantitative assessment of body iron. *Blood*, 2003;101: 3359–3363.
- **Corradini E, Babitt JL, Lin HY.** The RGM/DRAGON family of BMP co-receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2009;20: 389–398.
- **Corradini E, Garuti C, Montosi G, Ventura P, Andriopoulos B Jr, Lin HY, et al.** Bone morphogenetic protein signaling is impaired in an HFE knockout mouse model of hemochromatosis. *Gastroenterology*, 2009;137(4): 1489–1497.
- **Corradini E, Meynard D, Wu Q, Chen S, Ventura P, Pietrangelo A, et al.** Serum and liver iron differently regulate the bone morphogenetic protein 6 (BMP6)-SMAD signaling pathway in mice. *Hepatology*, 2011;54: 273–284.
- **Corradini E, Rozier M, Meynard D, Odhiambo A, Lin HY, Feng Q, et al.** Iron regulation of hepcidin despite attenuated Smad1,5,8 signaling in mice without transferrin receptor 2 or Hfe. *Gastroenterology*, 2011;141(5): 1907–1914.
- **Courville P, Chaloupka R, Cellier MF.** Recent progress in structure–function analyses of Nramp proton-dependent metal ion transporters. *Biochem. Cell. Biol.*, 2006;84: 960–978.
- **Cook JD, Flowers CH, Skikne BS.** The quantitative assessment of body iron. *Blood*, 2003;101: 3359–3363.
- **Coyne DW.** A comprehensive vision for intravenous iron therapy. *Am. J. Kidney Dis.*, 2008;52(Suppl. 6): S14–20.
- **Crichton RR, Dexter DT, Ward RJ.** Brain iron metabolism and its perturbation in neurological disease. *J. Neural Transm.*, 2011;118: 301–314.
- **Czeizel AE, Dudás I.** Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N. Engl. J. Med.*, 1992;327(26): 1832–1835.

~ D ~

- **D'Alessio F, Hentze MW, Muckenthaler MU.** The hemochromatosis proteins HFE, TfR2, and HJV form a membrane-associated protein complex for hepcidin regulation. *J. Hepatol.*, 2012;57: 1052–1060.

-
- **Daddaoua A, Puerta V, Requena P, Martínez-Férez A, Guadix E, de Medina FS, et al.** Goat milk oligosaccharides are anti-inflammatory in rats with hapten-induced colitis. *J. Nutr.*, 2006;136: 672–676.
 - **Dallman PR.** Biochemical basis for the manifestations of iron deficiency. *Annu. Rev. Nutr.*, 1986;6: 13–40.
 - **Dallman PR, Siimes MA, Stekel A.** Iron deficiency in infancy and childhood. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1980;33(1): 86–118.
 - **Dandrifosse G, Peulen O, El Khefif N, Deloyer P, Dandrifosse AC, Grandfils Ch.** Are milk polyamines preventive agents against food allergy? *Proc. Nutr. Soc.*, 2000;59: 81–86.
 - **Dao MC, Meydani SN.** Iron biology, immunology, aging, and obesity: four fields connected by the small peptide hormone hepcidin. *Adv. Nutr.*, 2013;4: 602–617.
 - **Darshan D, Vanoaica L, Richman L, Beermann F, Kühn LC.** Conditional deletion of ferritin H in mice induces loss of iron storage and liver damage. *Hepatology*, 2009;50(3): 852–860.
 - **Debski B, Picciano MF, Milner JA.** Selenium content and distribution of human, cow and goat milk. *J. Nutr.*, 1987;117: 35–46.
 - **De Domenico I, Vaughn MB, Li L, Bagley D, Musci G, Ward DM, et al.** Ferroportin-mediated mobilization of ferritin iron precedes ferritin degradation by the proteasome. *EMBO J.*, 2006;25(22): 5396–5404.
 - **De Domenico I, Ward DM, Kaplan J.** Regulation of iron acquisition and storage: consequences for iron-linked disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2008;9: 72–81.
 - **De Domenico I, Ward DM, Kaplan J.** Specific iron chelators determine the route of ferritin degradation. *Blood*, 2009;114(20): 4546–4551.
 - **De Domenico I, Ward DM, di Patti MC, Jeong SY, David S, Musci G, et al.** Ferroxidase activity is required for the stability of cell surface ferroportin in cells expressing GPI ceruloplasmin. *EMBO J.* 2009;26: 2823–2831.
 - **DellaValle DM, Haas JD.** Impact of iron depletion without anemia on performance in trained endurance athletes at the beginning of a training season: a study of female collegiate rowers. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.*, 2001;21: 501–506.
 - **DellaValle DM, Haas JD.** Iron status is associated with endurance performance and training in female rowers. *Med. Sci. Sports. Exerc.*, 2012;44(1): 552–559.
 - **Devireddy LR, Gazin C, Zhu X, Green MR.** A cell-surface receptor for lipocalin 24p3 selectively mediates apoptosis and iron uptake. *Cell*, 2005;123(7): 1293–1305.

- **Devireddy LR, Hart DO, Goetz DH, Green MR.** A mammalian siderophore synthesized by an enzyme with a bacterial homolog involved in enterobactin production. *Cell*, 2010;141: 1006–1017.
- **Devlin AM, Ling EH, Peerson JM, Fernando S, Clarke R, Smith AD, et al.** Glutamate carboxypeptidase II: A polymorphism associated with lower levels of serum folate and hyperhomocysteinemia. *Hum. Mol. Genet.*, 2000;9: 2837–2844.
- **Díaz-Castro J, Alférez MJM, López-Aliaga I, Nestares T, Campos MS.** Effect of calcium-supplemented goat or cow milk on zinc status in rats with nutritional ferropenic anaemia. *Int. Dairy J.*, 2009;19: 116–121.
- **Díaz-Castro J, Alférez MJM, López-Aliaga I, Nestares T, Campos MS.** Effect of calcium-fortified milk-rich diets (either goat's or cow's milk) on copper bioavailability in iron-deficient anemia. *Dairy Sci. Technol.*, 2011;91: 203–212.
- **Díaz-Castro J, Alférez MJM, López-Aliaga I, Nestares T, Sánchez-Alcover A, Campos MS.** Bile composition, plasma lipids and oxidative hepatic damage induced by calcium supplementation; effects of goat or cow milk consumption. *J. Dairy Res.*, 2013;80: 246–254.
- **Díaz-Castro J, Pérez-Sánchez LJ, López-Frías MR, López-Aliaga I, Nestares T, Alférez MJM, et al.** Influence of cow or goat milk consumption on antioxidant defence and lipid peroxidation during chronic iron repletion. *Br. J. Nutr.*, 2012;108: 1–8.
- **Díaz-Castro J, Ramírez López-Frías M, Campos MS, López-Frías M, Alférez MJ, Nestares T.** Goat milk during iron repletion improves bone turnover impaired by severe iron deficiency. *J. Dairy Sci.*, 2011;94(6): 2752–2761.
- **Doherty CP.** Host-pathogen interactions: the role of iron. *J Nutr.*, 2007;137: 1341–1344.
- **Domellöf M.** Iron requirements, absorption and metabolism in infancy and childhood. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metabol. Care*, 2007;10: 329–335.
- **Domellöf M, Braegger C, Campoy C, Colomb V, Decsi T, Fewtrell M, et al; ESPGHAN Committee on Nutrition.** Iron requirements of infants and toddlers. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 2014;58(1): 119–129.
- **Domellöf M, Hernell O, Abrams SA, Chen Z, Lönnerdal B.** Iron supplementation does not affect copper and zinc absorption in breastfed infants. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2009;89: 185–190.
- **Donovan A, Lima CA, Pinkus JL, Pinkus GS, Zon LI, Robine S, et al.** The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metab.*, 2005;1: 191–200.

-
- **Drakesmith H, Prentice A.** Viral infection and iron metabolism. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2008;6: 541–552.
 - **Drakesmith H, Prentice AM.** Hepcidin and the iron-infection axis. *Science*, 2012;338: 768–772.
 - **Dror DK, Allen LH.** Effect of vitamin B₁₂ deficiency on neurodevelopment in infants: current knowledge and possible mechanisms. *Nutr. Rev.*, 2008;66(5): 250–255.
 - **Duce JA, Tsatsanis A, Cater MA, James SA, Robb E, Wikhe K, et al.** Iron-export ferroxidase activity of β -amyloid precursor protein is inhibited by zinc in Alzheimer's disease. *Cell*, 2010;142: 857–867.
 - **Dudeja PK, Torania SA, Said HM.** Evidence for the existence of a carrier-mediated folate uptake mechanism in human colonic luminal membranes. *Am. J. Physiol.*, 1997;272(6 Pt. 1): G1408–G1415.
 - **Duport N, Preziosi P, Boutron-Ruault MC, Bertrais S, Galan P, Favier A, et al.** Consequences of iron depletion on health in menstruating women. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 2003;57(9): 1169–1175.
 - **Duthie SJ, Whalley LJ, Collins AR, Leaper S, Berger K, Deary IJ.** Homocysteine, B vitamin status, and cognitive function in the elderly. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2002;75(5): 908–913.

~ E ~

- **Eden A, Gaudet F, Waghmare A, Jaenisch R.** Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science*, 2003;300: 455.
- **Edward F.** Los beneficios de la catalasa para la salud. 8 de Agosto de 2011. In: *Global Healing Center [Internet]*. Houston: Global Healing Center. 2014 [consulta 15 de abril 2013]. Disponible en: <http://www.globalhealingcenter.net/salud-natural/catalasa.html>.
- **Eisenga BH, Collins TD, McMartin KE.** Effect of acute ethanol on urinary excretion of 5-methyltetrahydrofolic acid and folate derivatives in the rat. *J. Nutr.*, 1989;119: 1498–1505.
- **Elwood PC, Hughes D.** Clinical trial of iron therapy on psychomotor function in anaemic women. *Br. Med. J.*, 1970;3: 254–255.

- **Enns CA, Ahmed R, Zhang AS.** Neogenin interacts with matriptase-2 to facilitate hemojuvelin cleavage. *J. Biol. Chem.*, 2012;287: 35104–35117.
- **Epsztejn S, Glickstein H, Picard V, Slotki IN, Breuer W, Beaumont C, et al.** H-ferritin subunit overexpression in erythroid cells reduces the oxidative stress response and induces multidrug resistance properties. *Blood*, 1999;94(10): 3593–3603.
- **Erikson KM, Pinero DJ, Connor JR, Beard JL.** Regional brain iron, ferritin, and transferrin concentrations during iron deficiency and iron repletion in developing rats. *J. Nutr.* 1997;127: 2030–2038.
- **Esposito BP, Breuer W, Sirankapracha P, Pootrakul P, Hershko C, Cabantchik ZI.** Labile plasma iron in iron overload: Redox activity and susceptibility to chelation. *Blood*, 2003;102(7): 2670–2677.
- **Evans EW.** Use of milk proteins in formulated foods. In: Hudson BJB, editor. *Developments in food proteins*. London: Applied Science; 1982. pp. 342.

~ F ~

- **Fairweather-Tait SJ.** Iron nutrition in the UK: getting the balance right. *Proc. Nutr. Soc.*, 2004;63: 519–528.
- **Farrell HM Jr, Jimenez-Flores R, Bleck GT, Brown EM, Butler JE, Creamer LK, et al.** Nomenclature of the proteins of cows' milk—sixth revision. *J. Dairy Sci.*, 2004;87: 1641–1674.
- **Feder J, Tsuchihashi Z, Irrinki A, Lee V, Mapa F, Morikang E, et al.** The hemochromatosis founder mutation in HLA-H disrupts β_2 -microglobulin interaction and cell surface expression. *J. Biol. Chem.*, 1997;272: 14025–14028.
- **Feder JN, Penny DM, Irrinki A, Lee VK, Lebron JA, Watson N, et al.** The haemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95:1472–1477.
- **Farran A, Zamora R, Cervera P.** *Tablas de composición de los alimentos del CESNID (Centro d'Ensenyament Superior de Nutritió i Dietètica)*. 2 ed. Madrid: McGraw Hill Interamericana; 2004.
- **Fernández R, Phillips SF.** Components of fiber impair iron absorption in the dog. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1982;35: 107–112.

-
- **Ferreira C, Bucchini D, Martin ME, Levi S, Arosio P, Grandchamp B, et al.** Early embryonic lethality of H ferritin gene deletion in mice. *J. Biol. Chem.*, 2000;275(5): 3021–3024.
 - **Finberg KE.** Iron-refractory iron deficiency anemia. *Semin. Hematol.* 2009;46: 378–386.
 - **Finberg KE.** Regulation of systemic iron homeostasis. *Curr. Opin. Hematol.*, 2013;20: 208–214.
 - **Finch CA, Bellotti V, Stray S, Huebers HA.** Plasma ferritin determination as a diagnostic tool. *West J. Med.*, 1986;145: 657–663.
 - **Finch CA, Miller LR, Inamdar AR, Person R, Seiler K, Mackler B.** Iron deficiency in the rat. Physiological and biochemical studies of muscle dysfunction. *J. Clin. Invest.*, 1976;58(2): 447–453.
 - **Fleming MD, Romano MA, Su MA, Garrick LM, Garrick MD, Andrews NC.** Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1998;95(3): 1148–1153.
 - **Fleming MD, Trenor CCI, Su MA, Foernzler D, Beier DR, Dietrich WF, et al.** Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. *Nat. Genet.*, 1997;16: 383–386.
 - **Flo TH, Smith KD, Sato S, Rodriguez DJ, Holmes MA, Strong RK, et al.** Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature*, 2004;432: 917–921.
 - **Flower DR.** The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem. J.*, 1996;318: 1–14.
 - **Foldager J, Huber JT, Bergen WG.** Methionine and sulfur amino acid requirement in the preruminant calf. *J. Dairy Sci.*, 1977;60: 1095–1104.
 - **Foley D, Hay DA, Mitchell RJ.** Specific cognitive effects of mild iron deficiency and associations with blood polymorphisms in young adults. *Ann. Hum. Biol.*, 1986;13: 417–425.
 - **Fontecha J, Fraga MJ, Juárez M.** Triglyceride analysis by GC in assessment of authenticity of goat milk fat. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1998;75: 1893–1896.
 - **Ford JE, Knaggs GS, Salters DN, Scott KJ.** Folate nutrition in the kid. *Br. J. Nutr.*, 1972;27: 571–583.
 - **Fordy J, Benton D.** Does low iron status influence psychological functioning? *J. Hum. Nutr. Diet.*, 1994;7: 127–133.
 - **Fraga A, Ribeiro R, Medeiros R.** Hipoxia tumoral. Papel del factor inducible por hipoxia. *Actas Urol. Esp.* 2009;33(9): 941–951.

- **Fraga MJ, Fontecha J, Lozada L, Martínez-Castro I, Juárez M.** Composition of the sterol fraction of caprine milk fat by gas chromatography and mass spectrometry. *J. Dairy Res.*, 2000;67: 437–441.
- **Frazier CA.** Food allergies got your goat? A “nanny” may help wean grown-ups from milk. *Total Health*, 1995;17: 46–47.
- **Fuqua BK, Vulpe CD, Anderson GJ.** Intestinal iron absorption. *J. Trace Elem. Med. Res.*, 2012;26: 115–119.
- **Furet JP, Mercier JC, Soulier S, Gaye P, Hue-Delahaie D, Vilotte JL.** Nucleotide sequence of ovine κ -casein cDNA. *Nucleic Acids Res.*, 1990;18: 5286.

~ G ~

- **Gaffney-Stomberg E, McClung JP.** Inflammation and diminished iron status: mechanisms and functional outcomes. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.*, 2012;15(6): 605–613.
- **Gaitán D, Olivares M, Arredondo M, Pizarro F.** Biodisponibilidad de hierro en humanos. *Rev. Chil. Nutr.* [Revista en línea], 2006 [acceso 11 marzo 2014];33(2): 142–148. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182006000200003>.
- **Galaris D y Pantopoulos K.** Oxidative stress and iron homeostasis: mechanistic and health aspects. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 2008;45, 1–23.
- **Gamble MV, Liu X, Slavkovich V, Pilsner JR, Ilievski V, Factor-Litvak P, et al.** Folic acid supplementation lowers blood arsenic. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2007; 86(4): 1202–1209.
- **Ganz T.** Iron in innate immunity: starve the invaders. *Curr. Opin. Immunol.*, 2009;21: 63–67.
- **Ganz T.** Systemic iron homeostasis. *Physiol. Rev.*, 2013;93: 1721–1741.
- **Ganz T, Nemeth E.** Hepcidin and iron homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012;1823: 1434–1443.
- **Gao J, Chen J, Kramer M, Tsukamoto H, Zhang AS, Enns CA.** Interaction of the hereditary hemochromatosis protein HFE with transferrin receptor 2 is required for transferrin-induced hepcidin expression. *Cell Metab.*, 2009;9: 217–227.

-
- **García-Casal MN, Layrisse M, Solano L, Barón MA, Arguello F, et al.** Vitamin A and beta-carotene can improve nonheme iron absorption from rice, wheat and corn by humans. *J. Nutr.*, 1998;128(3): 646–650.
 - **García N, Eandi S, Feliú A, Musso AM.** Conceptos actuales sobre fisiología y patología del hierro. *Rev. Arg. Hemato.*, 2010;14(2): 48–57.
 - **García-Unciti MS.** Utilidad terapéutica de los triglicéridos de cadena media (MCT). Dietas cetogénicas en la epilepsia infantil. *Nutrición Clínica*, 1996;16: 7–35.
 - **García V, Travassos R.** Aspectos gerais sobre o leite de cabra: uma revisão. *Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes*, 2012;67: 81–88.
 - **García Y, Díaz-Castro J, López-Aliaga I, Alférez MJM, Ramos A, Campos MS.** Bioavailability of Fe, Cu, Zn and antioxidant defence in anemic rat supplemented with a mixture of heme/non-heme Fe. *Food Nutr. Res.*, 2013;52(2): 128–138.
 - **Gargari BP, Razavieh SV, Mahboob S, Niknafs B, Kooshavar H.** Effect of retinol on iron bioavailability from Iranian bread in a Caco-2 cell culture model. *Nutrition*, 2006;22: 638–644.
 - **Gasché C, Dejaco C, Waldhoer T, Tillinger W, Reinisch W, Fueger GF, et al.** Intravenous iron and erythropoietin for anemia associated with Crohn disease. A randomized, controlled trial. *Ann. Intern. Med.*, 1997;126(10): 782–787.
 - **Geller J, Kronn D, Jayabose S, Sandoval C.** Hereditary folate malabsorption: Family report and review of the literature. *Medicine (Baltimore)*, 2002;81: 51–68.
 - **Gerhardt W, Waldenström J.** Creatine kinase B-subunit activity in serum after immunoinhibition of M-subunit activity. *Clin. Chem.*, 1979;25(7): 1274–1280.
 - **Gillooly M, Bothwell TH, Torrance JD, MacPhail AP, Derman DP, Bezwoda WR, et al.** The effects of organic acids, phytates and polyphenols on absorption of iron from vegetables. *Br. J. Nutr.*, 1983;49: 331–342.
 - **Ginzburg Y, Rivella S.** β -Thalassemia: a model for elucidating the dynamic regulation of ineffective erythropoiesis and iron metabolism. *Blood*, 2011;118: 4321–4330.
 - **Gisbert J, Gomollón F.** An update on iron physiology. *World J. Gastroenterol.*, 2009;15: 4617–4626.
 - **Gkouvatsos K, Wagner J, Papanikolaou G, Sebastiani G, Pantopoulos K.** Conditional disruption of mouse HFE2 gene: maintenance of systemic iron homeostasis requires hepatic but not skeletal muscle hemojuvelin. *Hepatology*, 2011;54: 1800–1807.
 - **Glahn RP, Van Campen DR.** Iron uptake is enhanced in Caco-2 cell monolayers by cysteine and reduced cysteinyl glycine. *J. Nutr.*, 1997;127(4): 642–647.

- **Goddard AF, James MW, McIntyre AS, Scott BB.** British Society of Gastroenterology. Guidelines for the management of iron deficiency anaemia. *Gut.*, 2011;60: 1309–1316.
- **Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N, Bluhm ME, Raymond KN, Strong RK.** The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol. Cell*, 2002;10: 1033–1043.
- **Gómez-Ayala AE, Lisbona F, López-Aliaga I, Pallarés I, Barrionuevo M, Hartiti S, et al.** The absorption of iron, calcium, phosphorus, magnesium, copper and zinc in the jejunum-ileum of control and iron-deficient rats. *Lab. Anim.*, 1998;32(1): 72–79.
- **González de Villambrosia S, Núñez J, González Mesones B, Insunza A.** Trastornos del metabolismo del hierro y anemia ferropénica. *Medicine*, 2012;11(20): 1202–1211.
- **Goodnough JB, Ramos E, Nemeth E, Ganz T.** Inhibition of hepcidin transcription by growth factors. *Hepatology*, 2012;56: 291–299.
- **Gopal PK, Gill HS.** Oligosaccharides and glycoconjugates in bovine milk and colostrum. *Br. J. Nutr.*, 2000;84 Suppl 1: S69–S74.
- **Goudjil H, Fontecha J, Fraga MJ, Juárez M.** TAG composition of ewe's milk fat. Detection of foreign fats. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 2003;80: 219–222.
- **Gräslund A, Sahlin M.** Electron paramagnetic resonance and nuclear magnetic resonance studies of class I ribonucleotide reductase, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 1996;25: 259–286.
- **Groncin MA, Ruivard M, Perrève A, Derumeaux-Burel H, Perthus I, Roblin J, et al.** Prevalence of iron deficiency and health-related quality of life among female students. *J. Am. Coll. Nutr.*, 2008;27(2): 337–341.
- **Groner JA, Holtzman NA, Charney E, Mellits ED.** A randomized trial of oral iron on tests of short-term memory and attention span in young pregnant women. *J. Adolesc. Health Care*, 1986;7: 44–48.
- **Güler Z.** Levels of 24 minerals in local goat milk, its strained yoghurt and salted yoghurt (tuzlu yoğurt). *Small Ruminant Res.*, 2007;71: 130–137.
- **Gunshin H, Fujiwara Y, Custodio AO, Drenzo C, Robine S, Andrews NC.** Slc11a2 is required for intestinal iron absorption and erythropoiesis but dispensable in placenta and liver. *J. Clin. Invest.*, 2005;115: 1258–1266.
- **Gursu MF, Onderci M, Gulcu F, Sahin K.** Effects of vitamin C and folic acid supplementation on serum paraoxonase activity and metabolites induced by heat stress in vivo. *Nutr. Res.*, 2004;24: 157–164.

~ H ~

- **Haas JD, Brownlie T 4th.** Iron deficiency and reduced work capacity: a critical review of the research to determine a causal relationship. *J. Nutr.*, 2001;131(2S-2): 676S-688S.
- **Haenlein GFW.** (1992) Role of goat meat and milk in human nutrition. In: *Proceedings of the Fifth International Conference on Goats, 2-8 March 1992. Vol. II, Pt. II.* New Delhi: Indian Council of Agricultural Research Publishers; 1992; p. 575-580.
- **Haenlein GFW.** Lipids and proteins in milk, particularly goat milk. Cooperative Extension Dairy Specialist, University of Delaware [on line]. 2002 [cited 26 January 2013]: [about 10 screens] Available from: <http://users.frii.com/dawog/Goats/DCE/gm-08.htm>.
- **Haenlein GFW.** Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Res.*, 2004;51: 155-163.
- **Haenlein GFW.** About the evolution of goat and sheep milk production. *Small Ruminant Res.*, 2007;68: 3-6.
- **Haenlein GFW, Caccese R.** Goat milk versus cow milk. In: Haenlein GFW, Ace DL, editors. *Extension Goat Handbook. Vol. E-1.* Washington, DC: USDA Publ; 1984. p. 1-4.
- **Haenlein GFW, Wendorff WL.** Sheep milk - production and utilization of sheep milk. In: Park YW, Haenlein GFW, editors. *Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals.* Oxford and Ames: Blackwell Publishing Professional; 2006. p. 137-194.
- **Haldar S, Bevers LE, Tosha T, Theil EC.** Moving Iron through ferritin protein nanocages depends on residues throughout each four α -helix bundle subunit. *J. Biol. Chem.*, 2011;286(29): 25620-25627.
- **Hambraeus L.** Nutritional aspects of milk proteins. In: Fox PF, editor. *Developments in dairy chemistry. Vol. 1. Pt. Proteins.* London: Applied Science; 1982. p. 289-313.
- **Haro Vicente JF.** Biodisponibilidad de diferentes compuestos de hierro añadidos a un néctar de frutas funcional. Interacción con las vitaminas y fructo-oligosacáridos [Tesis doctoral]. Murcia: Universidad de Murcia, Facultad de Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos; 2006.
- **Hayssen V, Blackburn DG.** α -Lactalbumin and the origins of lactation. *Evolution*, 1985;39: 1147-1149.
- **Heine WE, Klein PD, Reeds PJ.** The importance of α -lactalbumin in infant nutrition. *J. Nutr.*, 1991;121: 277-283.

- **Herbert V, Das KC.** Folic acid and vitamin B₁₂. In: Shils ME, Olson JA, Shike M, editors. *Modern Nutrition in Health and Disease*. 8 Ed. Philadelphia: Lea and Febiger; 1994. p. 402–425.
- **Hermoso M, Vucic V, Vollhardt C, Arsic A, Roman-Viñas B, Iglesias-Altaba I, et al.** The effect of iron on cognitive development and function in infants, children and adolescents: A Systematic Review. *Ann. Nutr. Metab.*, 2011;59: 154–165.
- **Hernández Ruiz M, Panizo C, Navas-Carretero S, Martínez JA.** Anemia ferropénica: estrategias dietéticas para su prevención. *Act. Diet.*, 2010;14(2): 67–71.
- **Hider RC.** Nature of nontransferrin-bound iron. *Eur. J. Clin. Invest.*, 2002;32 Suppl 1: 50–54.
- **Hill JM.** The distribution of iron in the brain. In: Youdim MBH, editor. *Brain Iron: Neurochemistry and Behavioural Aspects*. London: Taylor & Francis; 1988. p. 1–24.
- **Hilty FM, Teleki A, Krumeich F, Büchel R, Hurrell RF, Pratsinis SE, et al.** Development and optimization of iron- and zinc-containing nanostructured powders for nutritional applications, [on line]. *Nanotechnology*, 2009 [cited 2013 January 1];20(47): [about 12 p.]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19875869>.
- **Hinton PS, Giordano C, Brownlie T, Haas JD.** Iron supplementation improves endurance after training in iron-depleted, nonanemic women. *J. Appl. Physiol.*, 2000;88: 1103–1111.
- **Hintze KJ, McClung JP.** Hepcidin: A critical regulator of iron metabolism during hypoxia. *Adv. Hematol.* [serial on the Internet], 2011 [cited 2013 July 17];2011: [about 7 p.]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2011/510304>.
- **Horne DS.** Casein micelle structure: Models and muddles. *Curr. Op. Coll. Interf. Sci.*, 2006;11: 148–153.
- **Horne DW, Briggs WT, Wagner C.** Transport of 5-methyltetrahydrofolic acid and folic acid in freshly isolated hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, 1978;253: 3529–3535.
- **Horne DW, Holloway RS, Said HM.** Uptake of 5-formyltetrahydrofolate in isolated rat liver mitochondria is carrier-mediated. *J. Nutr.*, 1992;122: 2204–2209.
- **Hou Y, Zhang S, Wang L, Li J, Qu G, He J, et al.** Estrogen regulates iron homeostasis through governing hepatic hepcidin expression via an estrogen response element. *Gene*, 2012;511: 398–403.
- **Huang H, Akira S, Santos MM.** Is the iron donor lipocalin 2 implicated in the pathophysiology of hereditary hemochromatosis?. *Hepatology*, 2009;49: 1012–1016.
- **Huang H, Constante M, Layoun A, Santos MM.** Contribution of STAT3 and SMAD4 pathways to the regulation of hepcidin by opposing stimuli. *Blood*, 2009;113: 3593–3599.

-
- **Huh EC, Hotchkiss A, Brouillette J, Glahn RP.** Carbohydrate fractions from cooked fish promote iron uptake by Caco-2 cells. *J. Nutr.*, 2004;134: 1681–1689.
 - **Hvidberg V, Maniecki MB, Jacobsen C, Hojrup P, Moller HJ, Moestrup SK.** Identification of the receptor scavenging hemopexin-heme complexes. *Blood*, 2005;106: 2572–2579.
 - **Hvidberg V, Jacobsen C, Strong RK, Cowland JB, Moestrup SK, Borregaard N.** The endocytic receptor megalin binds the iron transporting neutrophil-gelatinase-associated lipocalin with high affinity and mediates its cellular uptake. *FEBS Lett.*, 2005;579: 773–777.

~ I ~

- **Iannotti LL, Tielsch JM, Black MM, Black RE.** Iron supplementation in early childhood: health benefits and risks. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006;84: 1261–1276.
- **Ibrahim W, Tousson E, El-Masry T, Arafa N, Akela M.** The effect of folic acid as an antioxidant on the hypothalamic monoamines in experimentally induced hypothyroid rat. *Toxicol. Ind. Health*, 2012;28(3): 253–261.
- **Idjradinata P, Pollitt E.** Reversal of developmental delays in iron-deficient anaemic infants treated with iron. *Lancet*, 1993;341: 1–4.
- **Ikeda Y, Tajima S, Izawa-Ishizawa Y, Kihira Y, Ishizawa K, Tomita S, et al.** Estrogen regulates hepcidin expression via GPR30-BMP6-dependent signaling in hepatocytes [on line]. *PLoS One*, 2012 [cited 2013 November 3];7(7): [about 9 p.]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3394730/>.
- **Institute of Medicine.** Iron. In: *Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc.* Washington, DC: National Academy Press; 2001 p. 290–393.

~ J ~

- **Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, et al.** Targeting of HIF-alpha to the von Hippel- Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science*, 2001;292: 468–472.
- **Jacobs A, Worwood M.** Ferritin in serum. Clinical and biochemical implications. *N. Engl. J. Med.*, 1975;292: 951–956.
- **Jacobs DS, Oxley DK and DeMott WR.** *Laboratory Test Handbook*, 5th ed. Hudson (Cleveland), Ohio. LEXI-COMP, Inc.: 2001. p. 1031.
- **Jenness R.** Composition and characteristics of goat milk: review 1968–1979. *J. Dairy Sci.*, 1980;63: 1605–1630.
- **Jenness R.** Inter-species comparison of milk proteins. In: Fox PF, editor. *Developments in dairy chemistry*. Vol 1. Pt Proteins. New York: Applied Science; 1982.
- **Jenness R, Shipe WF, Sherbon JW.** In: Sebb BH, Johnson AH, Alford JA, editors. *Fundamentals of Dairy Chemistry*. Westport: A.V. Publishing Co.; 1974. p. 402.
- **Jeong SY, David S.** Glycosylphosphatidylinositol-anchored ceruloplasmin is required for iron efflux from cells in the central nervous system. *J. Biol. Chem.*, 2003;278: 27144–27148.
- **Johnson DC, Dean DR, Smith AD, Johnson MK.** Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annu. Rev. Biochem.*, 2005;74: 247–81.
- **Jollés P, Loucheux-Lefebvre MH, Henschen A.** Structural relatedness of k-casein and fibrinogen g-chain. *J. Mol. Evol.*, 1978;11: 271–277.
- **Joynson DH, Walker DM, Jacobs A, Dolby AE.** Defect of cell-mediated immunity in patients with iron-deficiency anaemia. *Lancet*, 1972;2: 1058–1059.
- **Juárez M, Ramos M.** Physico-chemical characteristics of goat milk as distinct from those of cow milk. In: International Dairy Federation, editor. *Proceedings of the IDF Seminar Production and Utilization of Ewe's and Goat's Milk*. Bulletin No. 202. Athens; 1986. p. 54–67.

~ K ~

- **Kaelin WG Jr.** Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome. *Nat. Rev. Cancer*, 2002;2: 673–682.
- **Kamen BA, Smith AK.** A review of folate receptor alpha cycling and 5-methyltetrahydrofolate accumulation with an emphasis on cell models in vitro. *Adv Drug Deliv. Rev.*, 2004;56: 1085–1097.
- **Kaplan J, Jordan I, Sturrock A.** Regulation of the transferrin-independent iron transport system in cultured cells. *J. Biol. Chem.*, 1991;266(5): 2997–3004.
- **Kaur D, Rajagopalan S, Andersen JK.** Chronic expression of H-ferritin in dopaminergic midbrain neurons results in an age-related expansion of the labile iron pool and subsequent neurodegeneration: implications for Parkinson's disease. *Brain Res.*, 2009;1297: 17–22.
- **Kaur D, Yantiri F, Rajagopalan S, Kumar J, Mo JQ, Boonplueang R, et al.** Genetic or pharmacological iron chelation prevents MPTP-induced neurotoxicity in vivo: a novel therapy for Parkinson's disease. *Neuron*, 2003;37(6): 899–909.
- **Keel SB, Doty RT, Yang Z, Quigley JG, Chen J, Knoblaugh S, et al.** A heme export protein is required for red blood cell differentiation and iron homeostasis. *Science*, 2008;319(5864): 825–828.
- **Kell DB.** Iron behaving badly: inappropriate iron chelation as a major contributor to the aetiology of vascular and other progressive inflammatory and degenerative diseases. *BMC Med. Genomics* [on line], 2009 [cited 2013 March 12];2: [about 79 p.] . Available from: <http://www.biomedcentral.com/1755-8794/2/2>.
- **Kelleher SL, Lönnerdal B.** Low vitamin an intake affects milk iron level and iron transporters in rat mammary gland and liver. *J. Nutr.*, 2005;135(1): 27–32.
- **Khedr E, Hamed SA, Elbeih E, El-Shereef H, Ahmad Y, Ahmed S.** Iron states and cognitive abilities in young adults: neuropsychological and neurophysiological assessment. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.*, 2008;258: 489–496.
- **Kim Ha J, Lindsay RC.** Contributions of cow, sheep, and goat milks to characterizing branched-chain fatty acid and phenolic flavors in varietal cheeses. *J. Dairy Sci.*, 1991;74: 3267–3274.
- **Kim J-S, Lowe KE, Shane B.** Regulation of folate and one carbon metabolism in mammalian cells. 4. Role of folylpolyglutamate synthetase in antifolate metabolism and cytotoxicity. *J. Biol. Chem.*, 1993;268: 21680–21685.

- **Kjeldahl JZ.** Neue Methode zur Bestimmung des stickstoffs in organischen Körpern. *Z. Anal. Chem.*, 1883;22: 366–382.
- **Knutson MD.** Iron-sensing proteins that regulate hepcidin and enteric iron absorption. *Annu. Rev. Nutr.*, 2010;30: 149–171.
- **Kohgo Y, Ikuta K, Ohtake T, Torimoto Y, Kato J.** Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload. *Int. J. Hematol.*, 2008;88: 7–15.
- **Köhler Osmari E.** Produção e qualidade do leite em cabras ½ boerSaanen, em lactação, suplementadas com diferentes volumosos. (Mestrado) Mestre em Zootecnia. Universidade Estadual de Maringá. Centro de ciências agrárias. 2007.
- **Koppenol WH.** The centennial of the Fenton reaction. *Free Radical Biol. Med.*, 1993;15, 645–651.
- **Kovac S, Anderson GJ, Alexander WS, Shulkes A, Baldwin GS.** Gastrin-deficient mice have disturbed hematopoiesis in response to iron deficiency. *Endocrinology*, 2011;152: 3062–3073.
- **Kozyraki R, Fyfe J, Verroust PJ, Jacobsen C, Dautry-Varsat A, Gburek J, et al.** Megalin-dependent cubilin-mediated endocytosis is a major pathway for the apical uptake of transferrin in polarized epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2001;98(22): 12491–12496.
- **Kretsch MJ, Fong AK, Green MW, Johnson HL.** Cognitive function, iron status, and hemoglobin concentration in obese dieting women. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 1998;52: 512–518.
- **Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SK, et al.** Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature*, 2001;409: 198–201.
- **Kruh GD, Belinsky MG.** The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene.*, 2003;22: 7537–7552.
- **Kulnigg S, Stoinov S, Simanenkov V, Dudar LV, Karnafel W, Garcia LC, et al.** A novel intravenous iron formulation for treatment of anemia in inflammatory bowel disease: the ferric carboxymaltose (FERINJECT) randomized controlled trial. *Am. J. Gastroenterol.*, 2008;103(5): 1182–1192.
- **Kumar CK, Moyer MP, Dudeja PK, Said HM.** A protein-tyrosine kinase regulated, pH-dependent carrier-mediated uptake system for folate by human normal colonic epithelial cell line NCM 460. *J. Biol. Chem.*, 1997;272: 6226–6231.
- **Kurkdjian V, Gabrielian T.** Physical and chemical properties and composition of ewe's milk. In: *Proceedings of the XVI Int. Dairy Congr.*, vol. AP; 1962, p. 197–208.

~ L ~

- **Laguna LE.** O leite de cabra como alimento funcional. 2003 [acceso 16 agosto 2014]. In: Capritec [en Internet]. Juazeiro. 2003. [aprox 2 pantallas]. Disponible en: http://www.capritec.com.br/artigos_embrapa030609a.htm.
- **Lakhal S, Schödel J, Townsend AR, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Mole DR.** Regulation of type II transmembrane serine proteinase TMPRSS6 by hypoxia-inducible factors: new link between hypoxia signaling and iron homeostasis. *J. Biol. Chem.*, 2011;286(6): 4090–4097.
- **Lal A, Porter J, Sweeters N, Ng V, Evans P, Neumayr L, et al.** Combined chelation therapy with deferasirox and deferoxamine in thalassemia. *Blood Cells Mol. Dis.*, 2013;50: 99–104.
- **Lanas A, García-Rodríguez LA, Polo-Tomás M, Ponce M, Alonso-Abreu I, Perez-Aisa MA, et al.** Time trends and impact of upper and lower gastrointestinal bleeding and perforation in clinical practice. *Am. J. Gastroenterol.*, 2009;104(7): 1633–1641.
- **Langstaff RJ, Geisser P, Heil WG, Bowdler MA.** Treatment of iron-deficiency anemia: a lower incidence of adverse effects with Ferrum Hausmann than ferrous sulfate. *Brit. J. Clin. Res.*, 1993;4: 191–198.
- **Lara-Villoslada F, Debras E, Nieto A, Concha A, Gálvez J, López-Huertas E, et al.** Oligosaccharides isolated from goat milk reduce intestinal inflammation in a rat model of dextran sodium sulfate-induced colitis. *Clin. Nutr.*, 2006;25: 477–488.
- **Larkin EC, Rao GA.** Importance of fetal and neonatal iron: adequacy for normal development of central nervous system. In: Dobbing J, editor. *Brain, Behavior, and Iron in the Infant Diet*. London: Springer-Verlag; 1990. p. 43–63.
- **Lavigne C, Zee JA, Simard RE, Beliveau B.** Effect of processing and storage conditions on the fate of Vitamins B₁, B₂, and C and on the shelf-life of goat's milk. *J. Food Sci.*, 1989;54: 30–34.
- **Lee AI, Okam MM.** Anemia in pregnancy. *Hematol. Oncol. Clin. North. Am.*, 2011;25(2): 241–259.
- **Lee DH, Zhou LJ, Zhou Z, Xie JX, Jung JU, Liu Y, et al.** Neogenin inhibits HJV secretion and regulates BMP-induced hepcidin expression and iron homeostasis. *Blood*, 2010;115(15): 3136–3145.
- **Lee H-C, Shoda R, Krall JA, Foster JD, Selhub J, Rosenberry TL.** Folate binding protein from kidney brush border membranes contains components of a glycoinositol phospholipid anchor. *Biochemistry*, 1992;31: 3236–3243.

- **Lee KW, Lee HJ, Cho HY, Kim YJ.** Role of the conjugated linoleic acid in the prevention of cancer. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2005;45(2): 135–144.
- **Lee PL, Beutler E.** Regulation of hepcidin and iron-overload disease. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, 2009;4: 489–515.
- **Leidel N, Popović-Bijelić A, Havelius KGV, Chernev P, Voevodskaya N, Gräslund A, et al.** High-valent [MnFe] and [FeFe] cofactors in ribonucleotide reductases. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012;1817: 430–444.
- **Leidgens S, Bullough KZ, Shi H, Li F, Shakoury-Elizeh M, Yabe T, et al.** Each member of the poly-r(C)-binding protein 1 (PCBP) family exhibits iron chaperone activity toward ferritin. *J. Biol. Chem.*, 2013;288: 17791–17802.
- **Leung AK, Chan KW.** Iron deficiency anemia. *Adv. Pediatr.*, 2001;48: 385–408.
- **Levi S, Arosio P.** Mitochondrial ferritin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2004;36: 1887–1889.
- **Levi S, Cozzi A, Arosio P.** Neuroferritinopathy: a neurodegenerative disorder associated with L-ferritin mutation. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.*, 2005;18(2): 265–276.
- **Levy JE, Jin O, Fujiwara Y, Kuo F, Andrews NC.** Transferrin receptor is necessary for development of erythrocytes and the nervous system. *Nat. Genet.*, 1999;21: 396–399.
- **Li JY, Paragas N, Ned RM, Qiu A, Viltard M, Leete T, et al.** Scara5 is a ferritin receptor mediating non-transferrin iron delivery. *Dev. Cell*, 2009;16: 35–46.
- **Li L, Fang CJ, Ryan JC, Niemi EC, Lebron JA, Bjorkman PJ, et al.** Binding and uptake of H-ferritin are mediated by human transferrin receptor-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2010;107: 3505–3510.
- **Lill R.** Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature*, 2009;460(7257): 831–838.
- **Lin BF, Shane B.** Expression of Escherichia coli folylpolyglutamate synthetase in the Chinese hamster ovary cell mitochondrion. *J. Biol. Chem.*, 1994;269: 9705–9713.
- **Linderstrom-Lang K, Kodama SCR.** Studies on casein. I. On the solubility of caseins in hydrochloric acid. *Comptes-Rendus des Travaux du Laboratoire Carlsberg*. 1925;16: 1–47.
- **Lind T, Hernell O, Lönnerdal B, Stenlund H, Domellöf M, Persson LA.** Dietary iron intake is positively associated with hemoglobin concentration during infancy but not during the second year of life. *J. Nutr.*, 2004;134(5): 1064–1070.
- **Liu Q, Davidoff O, Niss K, Haase VH.** Hypoxia-inducible factor regulates hepcidin via erythropoietin-induced erythropoiesis. *J. Clin. Invest.*, 2012;122: 4635–4644.

-
- **Liuzzi JP, Aydemir F, Nam H, Knutson MD, Cousins RJ.** Zip14 (Slc39a14) mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2006;103: 13612–13617.
 - **Lonnerdal B.** Soybean ferritin: implications for iron status of vegetarians. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2009;89(5): 1680S–1685S.
 - **López MA, Martos FC.** Iron availability: An updated review. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 2004;55: 597–606.
 - **López-Aliaga I, Díaz-Castro J, Nestares T, Alférez MJM, Campos MS.** Calcium-supplemented goat milk does not interfere with iron absorption in rats with anaemia induced by dietary iron depletion. *Food Chem.*, 2009;113: 839–841.
 - **López-Aliaga I, Alférez MJ, Barrionuevo M, Lisbona F, Campos MS.** Influence of goat and cow milk on the digestive and metabolic utilization of calcium and iron. *J. Physiol. Biochem.*, 2000;56(3): 201–208.
 - **Luiz MTB, Drunkler DA, Henn R, FETT R.** Leite de cabra: hipoalergenicidade, composição química e aspectos nutricionais. *Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes*, 1999;306(54): 23–31.

~ M ~

- **Madsen E, Gitlin JD.** Copper and iron disorders of the brain. *Annu. Rev. Neurosci.*, 2007;30: 317–337.
- **Mahoney AW, Hendricks DG.** Efficiency of hemoglobin regeneration as a method of assessing iron bioavailability in food products [on line]. In: Kies C, editor. *Nutritional Bioavailability of Iron*. Washington, DC. ACS Symposium Series. American Chemical Society; 1982 [cited 2014 September 20]. [About 10 p.]. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bk-1982-0203.ch001>.
- **Maldonado Lozano J, Baró L, Ramírez-Tortosa MC, Gil F, Linde J, López-Huertas E, et al.** Ingesta de una fórmula láctea suplementada con hierro como medida preventiva del déficit de hierro en niños de 1 a 3 años de edad. *An. Pediatr. (Barc.)*, 2007;66(6): 591–596.
- **Maree HP.** Goat milk an its use as hypo-allergenic infant food. *Dairy Goat Journal* 1978;43: 363–365.

- **Marín-García J, Goldenthal MJ.** La mitocondria y el corazón. *Rev. Esp. Cardiol.*, 2002;55(12): 1293–1310.
- **Martínez-Férez A.** Obtención de oligosacáridos de leche de diferentes especies por tecnología de membranas [tesis doctoral]. Granada: Universidad de Granada. Departamento de Ingeniería Química; 2004.
- **Martínez-Férez A, Rudloff S, Guadix A, Henkel GA, Pohlentz G, Boza JJ, et al.** Goat's milk is a natural source of lactose-derived oligosaccharides: isolation by membrane technology. *Int. Dairy J.*, 2006;16: 173–181.
- **Mash DC, Pablo J, Flynn DD, Efangé SM, Wiener WJ.** Characterization and distribution of transferrin receptors in the rat brain. *J. Neurochem.*, 1990;55: 1972–1979.
- **Masson N, Willam C, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ.** Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor- α chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J.*, 2001;20: 5197–5196.
- **Mastrogiannaki M, Matak P, Keith B, Simon MC, Vaulont S, Peyssonnaud C.** HIF-2 α , but not HIF-1 α , promotes iron absorption in mice. *J. Clin. Invest.*, 2009;119: 1159–1166.
- **Mastrogiannaki M, Matak P, Mathieu JR, Delga S, Mayeux P, Vaulont S, et al.** Hepatic hypoxia-inducible factor-2 down-regulates hepcidin expression in mice through an erythropoietin-mediated increase in erythropoiesis. *Haematologica*, 2012;97: 827–834.
- **Masuda M, I'izuka Y, Yamazaki M, Nishigaki R, Kato Y, Ni'inuma K, et al.** Methotrexate is excreted into the bile by canalicular multispecific organic anion transporter in rats. *Cancer Res.*, 1997;57: 3506–3510.
- **Matherly LH, Goldman DI.** Membrane transport of folates. *Vitam. Horm.*, 2003;66: 403–456.
- **Matherly LH, Hou Z, Deng Y.** Human reduced folate carrier: Translation of basic biology to cancer etiology and therapy. *Cancer Metastasis Rev.*, 2007;26: 111–128.
- **Matsumoto J, Mori N, Doi M, Kishida T, Ebihara K.** Evaluation of iron bioavailability from bonito dark muscle using anemic rats. *J. Agric. Food Chem.*, 2003;51(15): 4478–4482.
- **Maurer E, Gutschow M, Stirnberg M.** Matriptase-2 (TMPRSS6) is directly up-regulated by hypoxia inducible factor-1: identification of a hypoxia-responsive element in the TMPRSS6 promoter region. *Biol. Chem.*, 2012;393: 535–540.
- **McKay RH, Higuchi DA, Winder WW, Fell RD, Brown EB.** Tissue effects of iron deficiency in the rat. *Biochim. Biophys. Acta*, 1983;757(3): 352–358.

-
- **McKie A.** The role of Dcytb in iron metabolism: an update. *Biochem. Soc. Trans.*, 2008;36: 1239–1241.
 - **McKinnon PJ, Caldecott KW.** DNA strand break repair and human genetic disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 2007;8: 37–55.
 - **McClung JP, Karl JP, Cable SJ, Williams KW, Nindl BC, Young AJ, et al.** Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of iron supplementation in female soldiers during military training: effects on iron status, physical performance, and mood. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2009;90(1): 124–131.
 - **McClung JP, Murray-Kolb LE.** Iron nutrition and premenopausal women: effects of poor iron status on physical and neuropsychological performance. *Annu. Rev. Nutr.*, 2013;33: 271–288.
 - **McClelland DBL,** editor. *Handbook of transfusion medicine.* 4 ed. London: TSO (The Stationery Office); 2007.
 - **Mellander O.** Elektrophoretische untersuchung von casein. *Biochem. Z.*, 1939; 300:240.
 - **Mercier JC, Vilotte JL.** Structure and function of milk protein genes. *J. Dairy. Sci.*, 1993;76: 3079–3098.
 - **Mesías M, Seiquer I, Navarro MP.** Iron nutrition in adolescence. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2013;53(11): 1226–1237.
 - **Meynard D, Kautz L, Darnaud V, Canonne-Hergaux F, Coppin H, Roth MP.** Lack of the bone morphogenetic protein BMP6 induces massive iron overload. *Nat. Genet.*, 2009;41: 478–481.
 - **Meynard D, Vaja V, Sun CC, Corradini E, Chen S, López-Otín C, et al.** Regulation of TMPRSS6 by BMP6 and iron in human cells and mice. *Blood*, 2011;118(3): 747–756.
 - **Mitchell HK, Snell ES, Williams RJ.** Folate. In: Combs GF, author. *The vitamins.* 4th ed. San Diego: Academic Press; 2012. p. 349–375.
 - **Mikhael M, Sheftel AD, Ponka P.** Ferritin does not donate its iron for haem synthesis in macrophages. *Biochem. J.*, 2010;429(3): 463–471.
 - **Miller JL.** Iron deficiency anemia: a common and curable disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* [on line], 2013 [cited 2013 February 14];3(7): [about 13 p.]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23613366>.
 - **Miller J, Nnanna I.** Bioavailability of iron in cooked egg yolk for maintenance of hemoglobin levels in growing rats. *J. Nutr.*, 1983;113(6): 1169–1175.
 - **Molloy AM, Brody LC, Mills JL, Scott JM, Kirke PN.** The search for genetic polymorphisms in the homocysteine/folate pathway that contribute to the etiology of

- human neural tube defects. *Birth. Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.*, 2009;85(4): 285–294.
- **Molloy AM, Kirke PN, Brody LC, Scott JM, Mills JL.** Effects of folate and vitamin B₁₂ deficiencies during pregnancy on fetal, infant, and child development. *Food Nutr. Bull.*, 2008;29(2): 101–111.
 - **Min JH, Yang H, Ivan M, Gertler F, Kaelin WG Jr, Pavletich NP.** Structure of an HIF-1alpha-pVHL complex: Hydroxyproline recognition in signaling. *Science*, 2002;296: 1886–1889.
 - **Moos T, Oates PS, Morgan EH.** Expression of the neuronal transferrin receptor is age dependent and susceptible to iron deficiency. *J. Comp. Neurol.*, 1998;31: 420–439.
 - **Mora-Gutierrez A, Kumosinski TF, Farrell HM Jr.** Quantification of α s1-casein in goat milk from French-Alpine and Anglo-Nubian breeds using reversed-phase high performance liquid chromatography. *J. Dairy Sci.*, 1991;74(10): 3303–3307.
 - **Morais MB, Ferrari AA, Fisberg M.** Effect of oral iron therapy on physical growth. *Rev. Paul. Med.*, 1993;111(6): 439–444.
 - **Moreiras O, Carbajal A, Cabrera L, Cuadrado C,** editores. Ingestas diarias recomendadas de energía y nutrientes para la población española (revisadas 2013). En: *Tablas de composición de alimentos*. 16 ed. Madrid: Ediciones Pirámide; 2013. p. 248–257.
 - **Morr CV.** Whey proteins: manufacture. In: Fox PF, editor. *Developments in dairy chemistry*. Vol. 4. Pt Proteins. London: Elsevier Sci. Pub. Ltd.; 1989. p. 245–248.
 - **Mühlhoff U, Molik S, Godoy JR, Uzarska MA, Richter N, Seubert A, et al.** Cytosolic monothiol glutaredoxins function in intracellular iron sensing and trafficking via their bound iron-sulfur cluster. *Cell Metab.*, 2010;12(4): 373–385.
 - **Muñoz-Hoyos A, Molina-Carballo A.** Hierro. En: Gil A, editor. *Tratado de Nutrición*. Madrid: Acción Médica; 2005. p. 927–972.
 - **Muñoz M, García-Erce JA, Remacha AF.** Disorders of iron metabolism. Part II: iron deficiency and iron overload. *J. Clin. Pathol.*, 2011;64: 287–296.
 - **Muñoz M, Villar I, Garcia-Erce JA.** An update on iron physiology. *World J. Gastroenterol.*, 2009;15: 4617–4626.
 - **Murray-Kolb LE, Beard JL.** Iron treatment normalizes cognitive functioning in young adult women. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2007;85: 778–787.
 - **Murray RL.** Creatinine. In: Kaplan LA, Pesce AJ, editors. *Clinical Chemistry; Theory, Analysis and Correlation*. St. Louis. CV Mosby Co.; 1984. p.: 1247–1253.

~ N ~

- **Nagpal J, Choudhury P.** Iron formulations in pediatric practice. *Indian Pediatrics*. 2004;41(8): 807–815.
- **Nathan and Oski's** hematology of infancy and childhood. Saunders/Elsevier, 7th Ed. Philadelphia 2009.
- **Navrátil T, Kohlíková E, Petr M, Pelclová D, Heyrovský M, Pristoupilová K.** Supplemented creatine induces changes in human metabolism of thiocompounds and one- and two-carbon units. *Physiol. Res.*, 2010; 59(3): 431-442.
- **Nazki FH, Sameer AS, Ganaie BA.** Folate: metabolism, genes, polymorphisms and the associated diseases. *Gene*, 2014;533(1): 11-20.
- **Nelson DL, Cox MM,** editor. Fosforilación oxidativa y fotofosforilación. En: Lehninger. Principios de Bioquímica 5 ed. Barcelona: Ediciones Omega; 2008. p. 690–696.
- **Nelson DL, Cox MM,** editor. Biosíntesis de lípidos. In: Lehninger. Principios de Bioquímica 5 ed. Barcelona: Ediciones Omega; 2008. p. 798–799.
- **Nemeth E.** Targeting the hepcidin-ferroportin axis in the diagnosis and treatment of anemias. *Adv. Hematol.* [on line], 2010 [cited 2013 December 15];(2010): [about 9 p.]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2010/750643>.
- **Nemeth E, Ganz T.** Hepcidin and iron-loading anemias. *Haematologica*, 2006a;91: 727–732.
- **Nemeth E, Ganz T.** Regulation of iron metabolism by hepcidin. *Annu. Rev. Nutr.*, 2006b;26: 323–342.
- **Nemeth E, Ganz T.** The role of hepcidin in iron metabolism. *Acta Haematol.*, 2009;122: 78–86.
- **Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, et al.** Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*, 2004;306: 2090–2093.
- **Nestares T, Díaz-Castro J, Alférez MJM, López-Aliaga I, Barrionuevo M, Campos MS.** Calcium-enriched goat milk, in comparison with similarly enriched cow milk, favours magnesium bioavailability in rats with nutritional ferropernic anaemia. *J. Sci. Food Agric.*, 2008;88: 319–327.
- **Netz DJ, Pierik AJ, Stümpfig M, Mühlenhoff U, Lill R.** The Cfd1-Nbp35 complex acts as a scaffold for iron-sulfur protein assembly in the yeast cytosol. *Nat. Chem. Biol.*, 2007;3(5): 278–286.

- **Ng-Kwai Hang KF, Grosclaude F.** Genetic polymorphisms of milk proteins. In: Fox PF, editor. *Advanced dairy chemistry*. London: Elsevier; 1992. p. 405–455.
- **Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, Danaan JL, Bigard X, Devaux I, et al.** The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia and inflammation. *J. Clin. Invest.*, 2002;110: 1037–1044.
- **Nilsson R, Schultz IJ, Pierce EL, Soltis KA, Naranuntarat A, Ward DM, et al.** Discovery of genes essential for heme biosynthesis through large-scale gene expression analysis. *Cell Metab.*, 2009;10(2): 119–130.
- **Novak JE, Szczech LA.** Triumph and tragedy: anemia management in chronic kidney disease. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, 2008;17: 580–588.



- **Oftedal OT.** The evolution of milk secretion and its ancient origins. *Animal*, 2012;6: 355–368.
- **Ohgami RS, Campagna DR, Greer EL, Antiochos B, McDonald A, Chen J, et al.** Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells. *Nat. Genet.*, 2005;37: 1264–1269.
- **Olalla M, Ruiz-López MD, Navarro M, Artacho R, Cabrera C, Giménez R, et al.** Nitrogen fractions of Andalusian goat milk compared to similar types of commercial milk. *Food Chemistry*, 2009;113: 835–838.
- **Olivares M.** Anemias Nutricionales. In: Ballabriga A, Brunser O, Dobbing J, Gracey M, Senterre J, editors. *Clinical Nutrition of the Young Child*. New York: Raven Press\Nestlé Nutrition Institute; 1995. p. 561–575.
- **Oliveira SJ, de Sousa M, Pinto JP.** ER stress and iron homeostasis: a new frontier for the UPR. *Biochem. Res. Int.* [on line], 2011 [cited 2013 January 15]; 2011: [about 10 p.]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2011/896474>.
- **Omara FO, Blakley BR.** The effects of iron deficiency and iron overload on cell-mediated immunity in the mouse. *Br. J. Nutr.*, 1994;72: 899–909.
- **Online Mendelian Inheritance in Man Database (OMIMD)** [on line]. [cited 2013 November 4]. Available from: <http://www.omim.org/>.

-
- **Organización Mundial de la Salud (OMS/WHO)** [on line]. [cited 2013 April 15]. Available from: <http://www.who.int/nutrition/topics/ida/en/#>.
 - **Oppenheimer SJ.** Iron and its relation to immunity and infectious disease. *J. Nutr.*, 2001;131(2S-2): 616S-633S.
 - **Ordway GA, Garry DJ.** Myoglobin: an essential hemoprotein in striated muscle. *J. Exp. Biol.*, 2004;207: 3441-3446.
 - **Origa R, Galanello R, Ganz T, Giagu N, Maccioni L, Faa G, et al.** Liver iron concentrations and urinary hepcidin in β -thalassemia. *Haematologica*, 2007;92: 583-588.
 - **Oski FA.** Iron deficiency in infancy and childhood. *N. Engl. J. Med.*, 1993;329: 190-193.

~ P ~

- **Palacios S.** Ferrous versus ferric oral iron formulations for the treatment of iron deficiency: a clinical overview. *ScientificWorldJournal* [on line], 2012 [cited 2013 August 12];2012, [about 5 p.]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1100/2012/846824>.
- **Pallarés I, Lisbona F, López-Aliaga I, Barrionuevo M, Alférez MJM, Campos MS.** Effects of iron deficiency on the digestive utilization of iron, phosphorus, calcium and magnesium in rats. *Br. J. Nutr.*, 1993;70: 609-620.
- **Papayannopoulou T, Migliaccio AR.** Biology of erythropoiesis, erythroid differentiation, and maturation. In: Hoffman R, Benz EJ, Silberstein LE, Heslop H, Weitz J, Anastai J, editors. *Hematology: Basic Principles and Practice*. 6 ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone; 2013. p. 258-291.
- **Paradkar PN, Zumbrennen KB, Paw BH, Ward DM, Kaplan J.** Regulation of mitochondrial iron import through differential turnover of mitoferrin 1 and mitoferrin 2. *Mol. Cell Biol.*, 2009;29(4): 1007-1016.
- **Parkash S, Jenness, R.** The composition and characteristics of goat's milk: a review. *Dairy Sci. Abstr.*, 1968;30: 67-75.
- **Park YW.** Goat milk-chemistry and nutrition. In: Park YW, Haenlein GFW, editors. *Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals*. Ames: Blackwell Publishing Professional; 2008. p. 34-58.

- **Park YW, Chukwu HI.** Macro-mineral concentrations in milk of two goat breeds at different stages of lactation. *Small Rumin. Res.*, 1988;1: 157–165.
- **Park YW, Chukwu HI.** Trace mineral concentrations in goat milk from French-Alpine and Anglo-Nubian breeds during the first 5 months of lactation. *J. Food Compos. Anal.*, 1989;2: 161–169.
- **Park YW, Haenlein GFW.** Goat milk, its products and nutrition. In: Hui YH, editor. *Handbook of Food Products Manufacturing*. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc.; 2007. p. 449–488.
- **Park YW, Juárez M, Ramos M, Haenlein GFW.** Physicochemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Rumin. Res.*, 2007;68: 88–113.
- **Park YW, Mahoney AW, Hendricks DG.** Bioavailability of iron in goat milk compared with cow milk fed to anemic rats. *J. Dairy Sci.*, 1986;69: 2608–2615.
- **Parodi PW.** Anti-cancer agents in milk fat. *J. Dairy Technol.*, 2003;58: 114–118.
- **Partidario AM, Barbosa M, Vilas Boas L.** Free fatty acids, triglycerides and volatile compounds in Serra da Estella cheese - changes through ripening. *Intern. Dairy J.*, 1998;8: 873–881.
- **Paul B, Nesbitt ID.** Anaemia and blood transfusion. *Surgery*, 2013;31(2): 59–66.
- **Pearse MJ, Linklater PM, Hall RJ, Mackinlay AG.** The effect of casein composition and casein dephosphorylation on the coagulation and syneresis of artificial micelle milk. *J. Dairy Res.*, 1986;53: 381–390.
- **Pedersen LM, Milman N.** Diagnostic significance of platelet count and other blood analyses in patients with lung cancer. *Oncol. Rep.*, 2003;10(1): 213–216.
- **Pegg AE, McCann PP.** Polyamine metabolism and function. *Amer. J. Physiol.*, 1982;243: C212–C221.
- **Pérez MD, Calvo M.** Interaction of β -lactoglobulin with retinol and fatty acids and its role as a possible biological function for this protein: a review. *J. Dairy Sci.*, 1995;78: 978–988.
- **Pérez-Granados AM, Navarro MP, Vaquero MP.** The frying process. Influence on the bioavailability of dietary minerals. In: Vaquero MP, García-Arias T, Carbajar A, Sánchez-Muniz FJ, editors. *Bioavailability of minerals and minor dietary components. Metabolic and technological aspects*. Trivadrum: Research Signpost; 2003. p. 95–104.
- **Permyakov EA, Berliner L.** α -Lactalbumin: structure and function. *FEBS Lett.*, 2000;473: 269–274.
- **Petrat F, de Groot H, Sustmann R, Rauen U.** The chelatable iron pool in living cells: a methodically defined quantity. *Biol. Chem.*, 2002;383(3–4): 489–502.

-
- **Pietrangelo A.** Hereditary hemochromatosis: pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Gastroenterology*, 2010;139: 393–408.
 - **Pietrangelo A, Caleffi A, Corradini E.** Non-HFE hepatic iron overload. *Semin. Liver Dis.*, 2011;31(3): 302–318.
 - **Pinero DJ, Li NQ, Connor JR, Beard JL.** Alterations in brain iron metabolism in response to dietary iron changes. *J. Nutr.*, 2000;130: 254–263.
 - **Pinto JP, Dias V, Zoller H, Porto G, Carmo H, Carvalho F, et al.** Hepcidin messenger RNA expression in human lymphocytes. *Immunology*, 2010;130: 217–230.
 - **Piperno A, Galimberti S, Mariani R, Pelucchi S, Ravasi G, Lombardi C, et al.** Modulation of hepcidin production during hypoxia-induced erythropoiesis in humans in vivo: data from the HIGHCARE project. *Blood*, 2011;117: 2953–2959.
 - **Ploszaj T, Ryniewicz Z, Motyl T.** Polyamines in goat's colostrum and milk—a rudiment or a message? *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.*, 2000;118: 45–52.
 - **Potier De courcy G.** Conséquences d'une carence, d'un excès en vitamine B₉ et intérêt d'une supplémentation systématique. *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod.*, 1997;26: 75–83.
 - **Poli M, Girelli D, Campostrini N, Maccarinelli F, Finazzi D, Lusciati S, et al.** Heparin: a potent inhibitor of hepcidin expression in vitro and in vivo. *Blood*, 2011;117: 997–1004.
 - **Ponka P.** Tissue-specific regulation of iron metabolism and heme synthesis: distinct control mechanisms in erythroid cells. *Blood*, 1997;89(1): 1–25.
 - **Ponka P, Beaumont C, Richardson DR.** Function and regulation of transferrin and ferritin. *Semin. Hematol.*, 1998;35: 35–54.
 - **Porto G, De Sousa M.** Iron overload and immunity. *World J. Gastroenterol.*, 2007;13: 4707–4715.
 - **Portugal S, Carret C, Recker M, Armitage AE, Gonçalves LA, Epiphanyo S, et al.** Host-mediated regulation of superinfection in malaria. *Nat. Med.*, 2011;17(6): 732–737.
 - **Precht D.** Detection of foreign fat in milk fat. I. Qualitative detection by triacylglycerol formulae. *Z. Lebensm Forschg.*, 1992;194: 1–8.
 - **Prentice AM, Ghattas H, Doherty C, Cox SE.** Iron metabolism and malaria. *Food Nutr. Bull.*, 2007;28(Suppl. 4) S524–539.
 - **Presutti RJ, Cangemi JR, Cassidy HD, Hill DA.** Celiac disease. *Am. Fam. Physician*, 2007;76: 1795–1802.

- **Prosser CG, McLaren RD, Frost D, Agnew M, Lowry DJ.** Composition of the non-protein nitrogen fraction of goat whole milk powder and goat milk-based infant and follow-on formulae. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 2008;59(2): 123–133.

~ Q ~

- **Qiao B, Sugianto P, Fung E, Del-Castillo-Rueda A, Moran-Jimenez MJ, Ganz T, et al.** Hepcidin-induced endocytosis of ferroportin is dependent on ferroportin ubiquitination. *Cell Metab.*, 2012;15: 918–924.
- **Qiu A, Jansen M, Sakaris A, Min SH, Chattopadhyay S, Tsai E, et al.** Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. *Cell*, 2006;127: 917–928.
- **Quiles A, Hevia ML.** Propiedades organolépticas y nutricionales de la leche de cabra. *Agricultura: Revista Agropecuaria*, 2000;818: 600–603.

~ R ~

- **Radhika MS, Nair KM, Kumar RH, Rao MV, Ravinder P, Reddy CG, et al.** Micronized ferric pyrophosphate supplied through extruded rice kernels improves body iron stores in children: A double-blind, randomized, placebo-controlled midday meal feeding trial in Indian schoolchildren. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2011;94: 1202–1210.
- **Raja KB, Simpson RJ, Peters TJ.** Intestinal iron absorption studies in mouse models of iron-overload. *Br. J. Haematol.*, 1994;86: 156–162.
- **Ramírez L-F M, López-Frías M, Díaz-Castro J, Nestares T, López-Aliaga I, Alférez MJM, et al.** Efecto de la anemia ferropénica nutricional sobre el contenido en hueso de Ca, P y Fe. *Ars Pharm.*, 2010;51(3): 117–123.
- **Ramm GA, Ruddell RG.** Hepatotoxicity of iron overload: Mechanisms of iron induced hepatic fibrogenesis. *Semin. Liver Dis.*, 2005;25: 433–449.

-
- **Ramos E, Kautz L, Rodriguez R, Hansen M, Gabayan V, Ginzburg Y, et al.** Evidence for distinct pathways of hepcidin regulation by acute and chronic iron loading in mice. *Hepatology*, 2011;53(4): 1333–1341.
 - **Ratnam M, Freisheim JH.** Proteins involved in the transport of folates and antifolates by normal and neoplastic cells. In: Picciano MF, Stokstad ELR, Gregory JF, editors. *Contemporary Issues in Clinical Nutrition*, vol. 13, Folic Acid Metabolism in Health and Disease. New York: Wiley-Liss; 1990. p. 91–120.
 - **Rauen U, Springer A, Weisheit D, Petrat F, Korth HG, de Groot H, et al.** Assessment of chelatable mitochondrial iron by using mitochondrion-selective fluorescent iron indicators with different iron-binding affinities. *ChemBioChem.*, 2007;8(3): 341–352.
 - **Raynal-Ljutovaca K, Parkb YW, Gaucheronc F, Bouhallab S.** Heat stability and enzymatic modifications of goat and sheep milk. *Small Rumin. Res.*, 2007;68: 207–220.
 - **Raynal-Ljutovac K, Massouras T, Barbosa M.** Goat milk and heat treatment. *S. Afr. J. Anim. Sci.*, 2004;34: 173–175.
 - **Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC.** AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.*, 1993;123: 1939–1951.
 - **Reinke S, Taylor WR, Duda GN, von Haehling S, Reinke P, Volk HD, et al.** Absolute and functional iron deficiency in professional athletes during training and recovery. *Int. J. Cardiol.*, 2012;156(2): 186–191.
 - **Renner E, Schaafsma G, Scott KJ.** Micronutrients in milk. In: Renner E, editor. *Micronutrients in milk and milk—Based products*. New York: Elsevier; 1989.
 - **Rezk BM, Atteia A, Lucchesi P, Delafontane P.** Antioxidant activity of folic acid: From mechanism of action to clinical application. *FASEB J.*, 2009;103(7): 150–164.
 - **Rezk BM, Haenen GR, van der Vijgh WJ, Bast A.** Tetrahydrofolate and 5-methyltetrahydrofolate are folates with high antioxidant activity. Identification of the antioxidant pharmacophore. *FEBS Lett.*, 2003;555(3): 601–605.
 - **Richardson DR, Lane DJ, Becker EM, Huang ML, Whitnall M, Rahmanto YS, et al.** Mitochondrial iron trafficking and the integration of iron metabolism between the mitochondrion and cytosol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2010;107: 10775–10782.
 - **Rijnkels M.** Multispecies comparison of the casein gene loci and evolution of casein gene family. *J. Mammary Gland Biol.*, 2002;7: 327–345.
 - **Roe MA, Collings R, Hoogewerff J, Fairweather-Tait SJ.** Relative bioavailability of micronized, dispersible ferric pyrophosphate added to an apple juice drink. *Eur J Nutr.*, 2009;48(2): 115–119.

- **Rong N, Selhub J, Goldin BR, Rosenberg IH.** Bacterially synthesized folate in rat large intestine is incorporated into host tissue folyl polyglutamates. *J. Nutr.*, 1991;121(12): 1955–1959.
- **Roskams AJ, Connor JR.** Iron, transferrin, and ferritin in the rat brain during development and aging. *J. Neurochem.*, 1994;63: 709–716.
- **Ross SL, Tran L, Winters A, Lee KJ, Plewa C, Foltz I, et al.** Molecular mechanism of hepcidin-mediated ferroportin internalization requires ferroportin lysines, not tyrosines or JAK-STAT. *Cell Metab.*, 2012;15(6): 905–917.
- **Rost D, Mahner S, Sugiyama Y, Stremmel W.** Expression and localization of the multidrug resistance-associated protein 3 in rat small and large intestine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2002;282: G720–726.
- **Rothberg KG, Ying Y, Kolhouse JF, Kamen BA, Anderson RGW.** The glycopospholipid-linked folate receptor internalizes folate without entering the clathrin-coated pit endocytic pathway. *J. Cell Biol.*, 1990;110: 637–649.
- **Rouault TA, Zhang DL, Jeong SY.** Brain iron homeostasis, the choroid plexus, and localization of iron transport proteins. *Metab. Brain Dis.*, 2009;24: 673–684.
- **Ryter SW, Tyrrell RM.** The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radical Biol. Med.*, 2000;28: 289–309.

~ S ~

- **Said HM.** Intestinal absorption of water-soluble vitamins in health and disease. *Biochem. J.*, 2011;437(3): 357–372.
- **Said HM.** Recent advances in carrier-mediated intestinal absorption of water-soluble vitamins. *Annu. Rev. Physiol.*, 2004;66:419–446.
- **Said HM, Blair JA, Lucas ML, Hilburn ME.** Intestinal surface acid microclimate in vitro and in vivo in the rat. *J. Lab. Clin. Med.*, 1986;107(5): 420–424.
- **Said HM, Seetharam B.** Intestinal absorption of vitamins. In: Johnson LR, Barrett KE, Ghishan FK, Merchand JM, Said HM, Wood JD, editors. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, vol. 2. 4 ed. New York. Academic Press; 2006. p. 1791–1826.

-
- **Saleh L, Krebs C, Ley AB, Naik S, Huynh BH, Bollinger JM Jr.** Use of a chemical trigger for electron transfer to characterize a precursor to cluster X in assembly of the iron-radical cofactor of Escherichia coli ribonucleotide reductase. *Biochemistry*, 2004;43: 5953–5964.
 - **Sánchez-Muniz FJ, Gesteiro E, Espárrago Rodilla M, Rodríguez Bernal B, Bastida S.** La alimentación de la madre durante el embarazo condiciona el desarrollo pancreático, el estatus hormonal del feto y la concentración de biomarcadores al nacimiento de diabetes mellitus y síndrome metabólico. *Nutr. Hosp.*, 2013;28: 250–274.
 - **Sanderson P.** A New method of analysis of feeding stuffs for the determination of crude oils and fat. In: Haresing W, Cole DJA, editors. *Recent advances in animal nutrition*. London: Butter Worths; 1986. p. 77–86.
 - **San Martín CD, Garri C, Pizarro F, Walter T, Theil EC, Núñez MT.** Caco-2 intestinal epithelial cells absorb soybean ferritin by mu2 (AP2)-dependent endocytosis. *J. Nutr.*, 2008;138: 659–666.
 - **Santillo A, Kelly AL, Palermo C, Sevi A, Albenzio M.** Role of indigenous enzymes in proteolysis of casein in caprine milk. *Int. Dairy J.*, 2009;19: 655–660.
 - **Sanz Ceballos L, Ramos M, De la Torre A, Castro JD, Martínez LP, Sanz Sampelayo MR.** Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methods. *J. Food Compos. Anal.*, 2009;22: 322–329.
 - **Schaible UE, Kaufmann SH.** Iron and microbial infection. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2004;2: 946–953.
 - **Schallera JP, Bucka RH, Ruedab R.** Rib nucleotides: conditionally essential nutrients shown to enhance immune function and reduce diarrheal disease in infants. *Sem. Fetal Neonatal Med.*, 2007;12: 35–44.
 - **Schechter AN.** Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood*, 2008;112: 3927–3938.
 - **Schneider JM, Fujii ML, Lamp CL, Lönnerdal B, Dewey KG, Zidenberg-Cherr S.** The use of multiple logistic regression to identify risk factors associated with anemia and iron deficiency in a convenience sample of 12–36-mo-old children from low-income families. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2008;87: 614–620.
 - **Scientific Committee of Food.** Nutrient and energy intakes for the European Community. Opinion adopted by de Scientific Committee on Food on 11 December 1992. Reports of the Scientific Committee for Food, Thirty-First series. European Commission, Luxembourg. Available from: <http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out89.pdf>.

- **Scott JM.** Catabolism of folates. In: Blakley RL, Benkovic SJ, editors., *Folates and Pterins*, vol. 1, *Chemistry and Biochemistry of Folates*. New York: John Wiley & Sons; 1984. p. 307–327.
- **Selhub J, Emmanouel D, Stavropoulos T, Arnold R.** Renal folate absorption and the kidney folate binding protein. *Am. J. Physiol.*, 1987;252: F750–756.
- **Selvaggi M, Laudadio V, Dario C, Tufarelli V.** Major proteins in goat milk: an updated overview on genetic variability. *Mol. Biol. Rep.*, 2014;41(2): 1035–1048.
- **Semenza GL.** HIF-1 and human disease: One highly involved factor. *Genes Dev.*, 2000;14: 1983–1991.
- **Semenza GL.** Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*, 2003;3: 721–732.
- **Serrano-Reina JA, Nestares T, Alférez MJM, Díaz J, López-Aliaga I.** Eficacia de regeneración de la hemoglobina en la recuperación de la anemia ferropénica nutricional con dietas elaboradas a base de leche de cabra. *Nutr. Hosp.*, 2015;32(4): 1813–1819.
- **Severance S, Hamza I.** Trafficking of heme and porphyrins in metazoa. *Chem. Rev.*, 2009;109(10): 4596–4616.
- **Shah YM, Matsubara T, Ito S, Yim SH, Gonzalez FJ.** Intestinal hypoxia-inducible transcription factors are essential for iron absorption following iron deficiency. *Cell Metab.*, 2009;9: 152–164.
- **Shander A, Javidroozi M, Ozawa S, Hare GTM.** What is really dangerous: anaemia or transfusion?. *Br. J. Anaesth.*, 2011;107(Suppl. 1): i41–i59.
- **Shankar P, Boylan M, Sriram K.** Micronutrient deficiencies after bariatric surgery. *Nutrition*, 2010;26: 1031–1037.
- **Sharp PA.** Ctr1 and its role in body copper homeostasis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2003;35(3): 288–291.
- **Sharp PA.** Intestinal iron absorption: regulation by dietary and systemic factors. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 2010;80: 231–242.
- **Shayeghi M, Latunde-Dada GO, Oakhill JS, Laftah AH, Takeuchi K, Halliday N, et al.** Identification of an intestinal heme transporter. *Cell*, 2005;122: 789–801.
- **Shi H, Bencze KZ, Stemmler TL, Philpott CC.** A cytosolic iron chaperone that delivers iron to ferritin. *Science*, 2008;320(5880): 1207–1210.
- **Shane B.** Folate chemistry and metabolism. In: Bailey LB, editor. *Folate in health and disease*. 2 ed. New York: CRC Press; 2010. p. 1–24.
- **Shaw GC, Cope JJ, Li L, Corson K, Hersey C, Ackermann GE, et al.** Mitoferrin is essential for erythroid iron assimilation. *Nature*, 2006;440(7080): 96–100.
- **Sheftel AD, Richardson DR, Prchal J, Ponka P.** Mitochondrial iron metabolism and sideroblastic anemia. *Acta Haematol.*, 2009;122: 120–133.

-
- **Shi H, Bencze KZ, Stemmler TL, Philpott CC.** A cytosolic iron chaperone that delivers iron to ferritin. *Science*, 2008;320(5880): 1207–1210.
 - **Silanikove N.** Milk lipoprotein membranes and their imperative enzymes. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2008;606: 143–162.
 - **Silanikove N.** The physiological basis of adaptation in goats to harsh environments. *Small Rumin. Res.*, 2000;35: 181–193.
 - **Silanikove N, Leitner G, Merin U, Prosser CG.** Recent advances in exploiting goat's milk: quality, safety and production aspects. *Small Rumin. Res.*, 2010;89: 110–124.
 - **Sindayikengera S, Xia WS.** Nutritional evaluation of caseins and whey proteins and their hydrolysates from Protamex. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.*, 2006;7: 90–98.
 - **Sirotnak FM, Tolner B.** Carrier-mediated membrane transport of folates in mammalian cells. *Annu. Rev. Nutr.*, 1999;19: 91–122.
 - **Skorokhod OA, Caione L, Marrocco T, Migliardi G, Barrera V, Arese P, et al.** Inhibition of erythropoiesis in malaria anemia: Role of hemozoin and hemozoin-generated 4-hydroxynonenal. *Blood*, 2010;116: 4328–4337.
 - **Slačanac V, Bozanic R, Hardi J, Szabo JR, Lucan M, Krstanovic V.** Nutritional and therapeutic value of fermented caprine milk. *J. Dairy Technol.*, 2010;63: 171–189.
 - **Smith CP, Thévenod F.** Iron transport and the kidney. *Biochim. Biophys. Acta*, 2009;1790(7): 724–730.
 - **Smith JL, Brooker S.** Impact of hookworm infection and deworming on anaemia in non-pregnant populations: A systematic review. *Trop. Med. Int. Health*, 2010;15: 776–795.
 - **Soe-Lin S, Apte SS, Andriopoulos B, Andrews MC, Schranzhofer M, Kahawita T, et al.** Nramp1 promotes efficient macrophage recycling of iron following erythrophagocytosis in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2009;106: 5960–5965.
 - **Solís J, Castro A.** La leche cabra en la nutrición y en la terapéutica. *Revista Extensión al Campo*, 2007;4(1): 22–47.
 - **Sun CC, Vaja V, Babitt JL, Lin HY.** Targeting the hepcidin-ferroportin axis to develop new treatment strategies for anemia of chronic disease and anemia of inflammation. *Am. J. Hematol.*, 2012;87: 392–400.
 - **Stănciuc N,** editor. Milk proteins. The structure-function relationship. In: *Proteinele laptelui*. Galați: Academica Publishing; 2009. p. 282.
 - **Steinbicker AU, Bartnikas TB, Lohmeyer LK, Leyton P, Mayeur C, Kao SM, et al.** Perturbation of hepcidin expression by BMP type I receptor deletion induces iron overload in mice. *Blood*, 2011;118: 4224–4230.

- **Steel RGD, Torrie JH, Dickey D**, editors. Principles and Procedure of Statistics. A Biometrical Approach 3 ed. New York. McGraw Hill Book Co. Inc.; 1997. pp. 672.
- **Steensma DP, Tefferi A**. Anemia in the elderly: how should we define it, when does it matter, and what can be done?. *Mayo Clin. Proc.*, 2007;82(8): 958–966.
- **Stewart AF, Bonsing J, Beattie CW, Shah F, Willis IM, Mackinlay AG**. Complete nucleotide sequences of bovine α 2- and β -casein cDNAs: comparisons with related sequences in other species. *Mol. Biol. Evol.*, 1987;4: 231–241.
- **St Pierre TG, Tran KC, Webb J, Macey DJ, Heywood BR, Sparks NH, et al.** Organ-specific crystalline structures of ferritin cores in beta-thalassemia/hemoglobin E. *Biol. Met.*, 1991;4(3): 162–165.
- **Strube YN, Beard JL, Ross AC**. Iron deficiency and marginal vitamin A deficiency affect growth hematological indices and the regulation of iron metabolism genes in rats. *J. Nutr.*, 2002;132: 3607–3615.

~ T ~

- **Takagi H, Shi D, Ha Y, Allewell NM, Theil EC**. Localized unfolding at the junction of three ferritin subunits. A mechanism for iron release? *J. Biol. Chem.*, 1998;273(30): 18685–18688.
- **Talbot NP, Lakhal S, Smith TG, Privat C, Nickol AH, Rivera-Ch M, et al.** Regulation of hepcidin expression at high altitude. *Blood*, 2012;119: 857–860.
- **Tamary H, Shalev H, Perez-Avraham G, Zoldan M, Levi I, Swinkels DW, et al.** Elevated growth differentiation factor 15 expression in patients with congenital dyserythropoietic anemia type I. *Blood*, 2008;112: 5241–5244.
- **Testa U**, editor. *Proteins of Iron Metabolism: A Comprehensive Review of the Latest Research*. London: CRC Press; 2001. pp. 608.
- **Thankachan P, Walczyk T, Muthayya S, Kurpad AV, Hurrell RF**. Iron absorption in young Indian women: The interaction of iron status with the influence of tea and ascorbic acid. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2008;87: 881–886.
- **Theil EC**. Ferritin: the protein nanocage and iron biomineral in health and in disease. *Inorg. Chem.*, 2013;52(21): 12223–12233.

-
- **Theurl I, Aigner E, Theurl M, Nairz M, Seifert M, Schroll A, et al.** Regulation of iron homeostasis in anemia of chronic disease and iron deficiency anemia: diagnostic and therapeutic implications. *Blood*, 2009;113: 5277–5286.
 - **Thomas K, Mitchell HH.** A method of determining the biological value of protein. *J. Biol. Chem.*, 1923;58: 873–903.
 - **Thomas C, Thomas L.** Biochemical markers and hematologic indices in the diagnosis of functional iron deficiency. *Clin. Chem.*, 2002;48: 1066–1076.
 - **Thorpe SJ.** The development and role of international biological reference materials in the diagnosis of anaemia. *Biologicals*, 2010;38(4): 449-458.
 - **Titus SA, Moran RG.** Retrovirally mediated complementation of the *gly B* phenotype. Cloning of a human gene encoding the carrier for entry of folates into mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 2000;47: 36811–36817.
 - **Tong W, Burdi D, Riggs-Gelasco P, Chen S, Edmondson D, Huynh BH, et al.** Characterization of Y122F R2 of Escherichia coli ribonucleotide reductase by time-resolved physical biochemical methods and X-ray crystallography. *Biochemistry*, 1998;37: 5840–5848.
 - **Tosha T, Behera RK, Ng HL, Bhattasali O, Alber T, Theil EC.** Ferritin protein nanocage ion channels: gating by N-terminal extensions. *J. Biol. Chem.*, 2012;287(16): 13016–13025.
 - **Tosha T, Behera RK, Theil EC.** Ferritin ion channel disorder inhibits Fe(II)/O₂ reactivity at distant sites. *Inorg. Chem.*, 2012;51(21): 11406–11411.
 - **Touret N, Furuya W, Forbes J, Gros P, Grinstein S.** Dynamic traffic through the recycling compartment couples the metal transporter Nramp2 (DMT1) with the transferrin receptor. *J. Biol. Chem.*, 2003;278(28): 25548–25557.
 - **Toxqui L, De Piero A, Courtois V, Bastida S, Sánchez-Muniz FJ, Vaquero MP.** Deficiencia y sobrecarga de hierro; implicaciones en el estado oxidativo y la salud cardiovascular. *Nutr. Hosp.*, 2010;25: 350–365.
 - **Trabetti E.** Homocysteine, MTHFR gene polymorphisms, and cardio-cerebrovascular risk. *J. Appl. Genet.*, 2008;49: 267–282.
 - **Trenor CC, Campagna DR, Sellers VM, Andrews NC, Fleming MD.** The molecular defect in hypotransferrinemic mice. *Blood*, 2000;96: 1113–1118.
 - **Trinder D, Oates PS, Thomas C, Sadleir J, Morgan EH.** Localisation of divalent metal transporter 1 (DMT1) to the microvillus membrane of rat duodenal enterocytes in iron deficiency, but to hepatocytes in iron overload. *Gut*, 2000; 46(2): 270–276.
 - **Troesch B, Egli I, Zeder C, Hurrell RF, De Pee S, Zimmermann MB.** Optimization of a phytase-containing micronutrient powder with low amounts of highly bioavailable

- iron for in-home fortification of complementary foods. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2009;89: 539–544.
- **Troutt JS, Rudling M, Persson L, Ståhle L, Angelin B, Butterfield AM, et al.** Circulating human hepcidin-25 concentrations display a diurnal rhythm, increase with prolonged fasting, and are reduced by growth hormone administration. *Clin. Chem.*, 2012;58: 1225–1232.
 - **Tselepis C, Ford SJ, McKie AT, Vogel W, Zoller H, Simpson RJ, et al.** Characterization of the transition-metal-binding properties of hepcidin. *Biochem. J.*, 2010;427: 289–296.
 - **Tsiplakou E, Flementakis E, Kalloniati C, Papadomichelakis G, Katinakis P, Zervas G.** Sheep and goats differences in CLA and fatty acids milk fat content in relation with mRNA steroyl-CoA desaturase and lipogenic genes expression in their mammary gland. *J. Dairy Sci.*, 2009;76: 392–401.
 - **Tsiplakou E, Zervas G.** Comparative study between sheep and goats rumenic acid and vaccenic acid in milk fat under the same dietary treatments. *Livest. Sci.*, 2008a;119: 87–94.
 - **Tsiplakou E, Zervas G.** The effects of dietary inclusion of olive tree leaves and grape mark on the content of conjugated linoleic acid and vaccenic acid in the milk of dairy sheep and goats. *J. Dairy Res.*, 2008b;75: 270–278.
 - **Tussing-Humphreys L, Pusatcioglu C, Nemeth E, Braunschweig C.** Rethinking iron regulation and assessment in iron deficiency, anemia of chronic disease, and obesity: introducing hepcidin. *J. Acad. Nutr. Diet.*, 2012;112(3): 391–400.
 - **Tziboula A, Horne DS.** The role of α S1-casein in the structure of caprine casein micelles. *Int. Dairy J.*, 1999;9: 173–178.

~ U ~

- **Urrutia A, Sacanella E, Mascaro J, Formiga F.** Anemia en el anciano. *Rev. Esp. Geriatr. Gerontol.*, 2010;45(5): 291–297.
- **Urso C, Brucculeri S, Caimi G.** Marked elevation of transaminases and pancreatic enzymes in severe malnourished male with eating disorder. *Clin. Ter.* 2013;164(5): e387–391.

~ V ~

- **Vaquero MP.** Factores que intervienen en la biodisponibilidad mineral. Prevención de deficiencias. *Revista de Nutrición Práctica*, 1998;2: 15–23.
- **Van Dokkum.** The concept of mineral bioavailability. In: Vaquero MP, García-Arias T, Carbajal A, Sánchez-Muniz FJ, editors. *Bioavailability of minerals and minor dietary components. Metabolic and technological aspects.* Trivadrum: Research Signpost; 2003. p. 1–18.
- **Vanoaica L, Darshan D, Richman L, Schümann K, Kühn LC.** Intestinal ferritin H is required for an accurate control of iron absorption. *Cell Metab.*, 2010;12: 273–282.
- **Vaquero MP, Pérez-Olleros L, García-Cuevas M, Veldhuizen. Ruíz-Roso B, Requejo A.** Absorción de minerales de dietas que contienen fibra natural de algarrobas comparada con celulosa, pectina y varias combinaciones de estas fibras. *Food. Sci. Tech. Int.*, 2000;6: 463–471.
- **Vega y León S, Pérez JJ, Gutiérrez R, Unbán G, Ramírez A.** Leche de cabra: producción, composición y aptitud industrial [en internet]. 2010 [acceso 5 julio 2014]; [12 pantallas aprox.]. Disponible en: <http://goo.gl/YjDWEw>.
- **Vidal MC, Farré R.** Evaluación antropométrica del estado nutricional y estimación de las ingestas de hierro y de vitamina C de mujeres posmenopáusicas y hombres mayores de 45 años. *Nutr. Hosp.*, 2001;15: 162–169.
- **Villalobos AC.** Aspectos nutricionales de la leche de cabra (*Capra hircus*) y sus variaciones en el proceso agroindustrial. *Agronomía Mesoamericana*, 2005;16(2): 239–252.
- **Vitale G, Barbaro F, Ianiro G, Cesario V, Gasbarrini G, Franceschi F, et al.** Nutritional aspects of *Helicobacter pylori* infection. *Minerva Gastroenterol. Dietol.*, 2011;57: 369–377.
- **Vulpe CD, Kuo YM, Murphy TL, Cowley L, Askwith C, Libina N, et al.** Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the *sla* mouse. *Nat. Genet.*, 1999;21: 195–199.

~ W ~

- **Wagner C.** Proteins binding pterins and folates. In: Blakley RL, Whitehead VM, editors. *Folates and Pterins*, vol. 3, Nutritional, Pharmacological, and Physiological Aspects. New York: John Wiley & Sons; 1986. p. 251–296.
- **Wagner C.** Symposium on the subcellular compartmentation of folate metabolism. *J. Nutr.*, 1996;126 4 Suppl: 1228S–1234S.
- **Wallace DF, Summerville L, Crampton EM, Frazer DM, Anderson GJ, Subramaniam VN.** Combined deletion of Hfe and transferrin receptor 2 in mice leads to marked dysregulation of hepcidin and iron overload. *Hepatology*, 2009;50: 1992–2000.
- **Walstra P.** On the stability of casein micelles. *J. Dairy Sci.*, 1990;73: 1965–1979.
- **Wang JK, Klein HG.** Red blood cell transfusion in the treatment and management of anaemia: the search for the elusive transfusion trigger. *Vox Sang.*, 2010;98: 2–11.
- **Wang J, Pantopoulos K.** Regulation of cellular iron metabolism. *Biochem. J.*, 2011;434: 365–381.
- **Wang RH, Li C, Xu X, Zheng Y, Xiao C, Zerfas P, et al.** A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression. *Cell Metab.*, 2005;2: 399–409.
- **Ward DM, Kaplan J.** Ferroportin-mediated iron transport: expression and regulation. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012;1823(9): 1426–1433.
- **Wake RG, Baldwin RL.** Analysis of casein fractions by zone electrophoresis in concentrated urea. *Biochim. Biophys. Acta*, 1961;47: 225–239.
- **Weinstein DA, Roy CN, Fleming MD, Loda MF, Wolfsdorf JI, Andrews NC.** Inappropriate expression of hepcidin is associated with iron refractory anemia: implications for the anemia of chronic disease. *Blood*, 2002;100(10): 3776–3781.
- **Weitman SD, Frazier KM, Kamen BA.** The folate receptor in central nervous system malignancies of childhood. *J. Neurooncol.*, 1994;21: 107–112.
- **Wienk KJ, Marx JJ, Beynen AC.** The concept of iron bioavailability and its assessment. *Eur. J. Nutr.*, 1999;38(2): 51–75.
- **Whitehead VM.** Pharmacokinetics and physiological disposition of folate and its derivatives. In: Blakley RL, Whitehead VM, editors. *Folates and Pterins*, vol. 3, Nutritional, Pharmacological, and Physiological Aspects. New York: John Wiley & Sons; 1986. p. 177–205.

-
- **Widdowson EM, Southgate DA, Hey E, Lindblad BS.** Fetal growth and body composition. *Perinatal Nutrition*. New York: Academic Press; 1988. p. 3–14.
 - **Williams WM, Huang KC.** Renal tubular transport of folic acid and methotrexate in the monkey. *Am. J. Physiol.*, 1982;242: F484–490.
 - **Wolff F, Carreño N, Armas M, Caravallo A.** Hemocromatosis hereditaria. *Complicaciones Reumatológicas. Reumatología*, 2004;20: 139–148.
 - **Woodson RD, Wills RE, Lenfant C.** Effect of acute and established anemia on O₂ transport at rest, submaximal and maximal work. *J. Appl. Physiol. Respir. Environ. Exerc. Physiol.*, 1978;44(1): 36–43.
 - **Worwood M.** Anemia ferropénica y sobrecarga de hierro. En: Lewis SM, Bates I, Bain BJ, editors. *Dacie y Lewis. Hematología Práctica*. 10 ed. Londres: Elsevier; 2008. p. 161–175.
 - **Worwood M.** Anemia ferropénica y sobrecarga de hierro. En: Lewis MS, Bain BJ, Bates I, editores. *Dacie y Lewis. Hematología práctica*. 10 ed. Madrid: Elsevier España, S.A.; 2008. p. 113–137.
 - **Wrong OM, Edmonds CJ, Chadwick VS,** editors. *The large intestine: its role in mammalian nutrition and homeostasis*. Lancaster: MTP Press Ltd; 1981. pp. 217.

~ X ~

- **Xu H, Jin J, DeFelice LJ, Andrews NC, Clapham DE.** A spontaneous, recurrent mutation in divalent metal transporter-1 exposes a calcium entry pathway. *PLoS Biol.*, 2004;2(3): 378–386.

~ Y ~

- **Yang Q, Jian J, Katz S, Abramson SB, Huang X.** 17 β -Estradiol inhibits iron hormone hepcidin through an estrogen responsive element half-site. *Endocrinology*, 2012;153: 3170–3178.
- **Ye H, Rouault TA.** Human iron-sulfur cluster assembly, cellular iron homeostasis, and disease. *Biochemistry*, 2010;49(24): 4945–4956.
- **Yu F, White SB, Zhao Q, Lee FS.** HIF-1 α binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2001;98: 9630–9635.
- **Yun S, Vincelette ND.** Update on iron metabolism and molecular perspective of common genetic and acquired disorder, hemochromatosis. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2015;95(1): 12–25.

~ Z ~

- **Zecca L, Youdim MB, Riederer P, Connor JR, Crichton RR.** Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2004;5: 863–873.
- **Zervas G, Tsiplakou E.** Goat Milk. In: Park YW, Haenlein GFW, editors. *Milk and Dairy Products in Human Nutrition: Production, Composition and Health*. Oxford: John Wiley & Sons; 2013. p. 498–518.
- **Zervas G, Tsiplakou E.** The effect of feeding systems on the characteristics of products from small ruminants. *Small Rumin. Res.*, 2011;101: 140–149.
- **Zhang AS, Anderson SA, Wang J, Yang F, DeMaster K, Ahmed R, et al.** Suppression of hepatic hepcidin expression in response to acute iron deprivation is associated with an increase of matriptase-2 protein. *Blood*, 2011;117(5): 1687–1699.
- **Zhang AS, Enns C.** Iron homeostasis: recently identified proteins provide insight into novel control mechanisms. *J. Biol. Chem.*, 2009;284: 711–715.
- **Zhang DL, Hughes RM, Ollivierre-Wilson H, Ghosh MC, Rouault TA.** A ferroportin transcript that lacks an iron-responsive element enables duodenal and

-
- erythroid precursor cells to evade translational repression. *Cell Metab.*, 2009;9: 461–473.
- **Zhang Y, Mikhael M, Xu D, Li Y, Soe-Lin S, Ning B, et al.** Lysosomal proteolysis is the primary degradation pathway for cytosolic ferritin and cytosolic ferritin degradation is necessary for iron exit. *Antioxid. Redox Signaling*, 2010;13: 999–1009.
 - **Zhao N, Gao J, Enns CA, Knutson MD.** ZRT/IRT-like protein 14 (ZIP14) promotes the cellular assimilation of iron from transferrin. *J. Biol. Chem.*, 2010;285: 32141–32150.
 - **Zhao R, Gao F, Goldman ID.** Reduced folate carrier transports thiamine monophosphate: An alternative route for thiamine delivery into mammalian cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2002; 282: C1512–1157.
 - **Zhao R, Matherly LH, Goldman ID.** Membrane transporters and folate homeostasis: intestinal absorption and transport into systemic compartments and tissues. *Expert Rev. Mol. Med.* [on line], 2009 [cited 2015 February 4]; 11: [about 32 p.]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1017/S1462399409000969>.
 - **Zhao R, Min SH, Qiu A, Sakaris A, Goldberg GL, Sandoval C, et al.** The spectrum of mutations in the PCFT gene, coding for an intestinal folate transporter, that are the basis for hereditary folate malabsorption. *Blood*, 2007;110: 1147–1152.
 - **Zhu YI, Haas JD.** Iron depletion without anemia and physical performance in young women. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1997;66: 334–341.
 - **Zhu YI, Haas JD.** Altered metabolic response of iron-depleted nonanemic women doing a 15-km time trial. *J. Appl. Physiol.*, 1998;84: 1768–1775.
 - **Zimmermann MB, Hurrell RF.** Nutritional iron deficiency. *Lancet*, 2007;370(9586): 511–520.