

TESIS DOCTORAL INTERNACIONAL

INFLUENCIA DEL CONSUMO DE LECHE FERMENTADA DE CABRA SOBRE PATRONES DE EXPRESIÓN GÉNICA Y PROTEICA RELACIONADOS CON EL METABOLISMO DEL HIERRO Y ESTRÉS OXIDATIVO DURANTE LA RECUPERACIÓN DE LA ANEMIA FERROPÉNICA NUTRICIONAL



UNIVERSIDAD DE GRANADA

JORGE MORENO FERNÁNDEZ

2020

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

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

Programa de Doctorado en Nutrición y Ciencias de los Alimentos

INTERNATIONAL Ph.D. THESIS

INFLUENCE OF CONSUMPTION OF FERMENTED GOAT MILK ON GENE AND PROTEIN PATTERNS EXPRESSION RELATED TO IRON METABOLISM AND OXIDATIVE STRESS DURING IRON DEFICIENCY RECOVERY



UNIVERSITY OF GRANADA

JORGE MORENO FERNÁNDEZ

2020

FACULTY OF PHARMACY

DEPARTMENT OF PHYSIOLOGY

NUTRITION AND FOOD TECHNOLOGY INSTITUTE "JOSÉ MATAIX"

Doctoral Program in Nutrition and Food Technology

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Jorge Moreno Fernández
ISBN: 978-84-1306-602-8
URI: <http://hdl.handle.net/10481/63638>



**Esta memoria de Tesis Doctoral forma parte del
Proyecto de Investigación financiado por la Junta
de Andalucía Ref. P11-AGR-7648.**

Proyecto de Investigación de Excelencia.

Modalidad Proyectos Motrices.



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

TESIS DOCTORAL INTERNACIONAL

La presente memoria de Tesis Doctoral se ha llevado a cabo bajo la concesión de un Contrato de Formación del Profesorado Universitario (FPU 15/01428) por parte del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte. El trabajo experimental se ha realizado en el Departamento de Fisiología y en el Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos “José Mataix” de la Universidad de Granada, así como en University of Leeds y en King’s College of London, gracias a la obtención de tres ayudas para la movilidad internacional. La primera de una duración de tres meses y financiada por la Universidad de Granada (Convocatoria de Movilidad Internacional de jóvenes investigadores de Programas de doctorado Universidad de Granada y Cei Biotic Granada), y dos financiadas por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, Estancias Breves FPU, (EST17/00510), tres meses de duración, y Traslados Temporales FPU (EST18/00553), seis meses de duración.



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

INTERNATIONAL Ph.D.THESIS

This current Ph.D. Thesis has been carried out under the concession of a Contrato de Formación del Profesorado Universitario (FPU 15/01428) by the Ministry of Education, Culture and Sport. The experimental work has been carried out in the Department of Physiology and in the Institute of Nutrition and Food Technology "José Mataix" of the University of Granada, as well as in the University of Leeds and King's College of London, thanks to the obtaining three grants for international mobility. The first one for three months and it was supported by the University of Granada (Convocatoria de Movilidad Internacional de jóvenes investigadores de Programas de doctorado Universidad de Granada y Cei Biotic Granada), and the other ones supported by the Ministry of Education, Culture and Sport, Estancias Breves FPU, (EST17/00510), during three months, and Traslados Temporales FPU (EST18/00553), during six months.



UNIVERSIDAD
DE GRANADA

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA

Hazlo o no lo hagas, pero no lo intentes

Maestro Yoda. El Imperio contraataca.

Si quieres obtener resultados distintos, haz cosas distintas

Albert Einstein



ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| ÍNDICE DE FIGURAS | 1 |
| ÍNDICE DE TABLAS | 2 |
| ÍNDICE DE ABREVIATURAS | 3 |
| INDICIOS DE CALIDAD | 7 |
| 1. RESUMEN | 10 |
| 1. SUMMARY | 22 |
| 2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS | 34 |
| 2.1 EL HIERRO EN LA NUTRICIÓN | 34 |
| <i>2.1.1 Funciones</i> | <i>35</i> |
| <i>2.1.2 Requerimientos.....</i> | <i>39</i> |
| <i>2.1.3 Homeostasis del hierro.....</i> | <i>43</i> |
| 2.1.3.1 Absorción | 43 |
| 2.1.3.2 Metabolismo | 48 |
| 2.1.3.3 Almacenamiento..... | 50 |
| 2.1.3.4 Excreción | 51 |
| 2.1.4 Déficit de hierro. Anemia ferropénica nutricional | 52 |
| 2.1.4.1 Causas..... | 54 |
| 2.1.4.2 Consecuencias | 62 |
| 2.1.4.3 Tratamiento de la ferropénica..... | 65 |
| <i>2.1.5 Sobrecarga de hierro</i> | <i>78</i> |
| 2.2 ESTRÉS OXIDATIVO | 82 |



| | |
|---|-----|
| 2.2.1 <i>Radicales libres. Especies reactivas de oxígeno</i> | 83 |
| 2.2.1.1 Anión superóxido | 86 |
| 2.2.1.2 Peróxido de hidrógeno..... | 87 |
| 2.2.1.3 Radical hidroxilo | 88 |
| 2.2.2 <i>Efecto del estrés oxidativo sobre las principales biomoléculas</i> | 89 |
| 2.2.2.1 Daño a nivel lipídico..... | 89 |
| 2.2.2.2 Daño a nivel proteico..... | 94 |
| 2.2.2.3 Daño a nivel del material genético | 96 |
| 2.2.3 <i>Sistemas de defensa antioxidante</i> | 98 |
| 2.2.3.1 Sistemas antioxidantes enzimáticos..... | 100 |
| 2.2.3.1.1 Superóxido dismutasa | 100 |
| 2.2.3.1.2 Catalasa | 101 |
| 2.2.3.1.3 Glutación peroxidasa | 103 |
| 2.2.3.1.4 Glutation reductasa | 105 |
| 2.2.3.2 Sistemas antioxidantes no enzimáticos..... | 106 |
| 2.2.3.2.1 Ácido ascórbico | 106 |
| 2.2.3.2.2 Vitamina E (tocoferol) | 107 |
| 2.2.3.2.3 Carotenoides | 108 |
| 2.2.3.2.4 Coenzima Q10 | 109 |
| 2.2.3.2.5 Melatonina | 110 |
| 2.2.3.2.6 Flavonoides | 111 |
| 2.2.3.2.7 Otros antioxidantes | 112 |
| 2.3 <i>LECHE DE CABRA</i> | 112 |
| 2.3.1 <i>Composición nutricional</i> | 118 |
| 2.3.1.1 Grasa..... | 118 |



| | |
|---|------------|
| 2.3.1.2 Hidratos de carbono..... | 123 |
| 2.3.1.3 Proteínas | 126 |
| 2.3.1.4 Vitaminas..... | 133 |
| 2.3.1.5 Minerales | 135 |
| 2.3.2 <i>Leche fermentada</i> | 139 |
| 2.3.2.1 Composición de la leche fermentada..... | 147 |
| 2.3.2.1.1 Aminoácidos | 149 |
| 2.3.2.1.2 Ácidos grasos | 150 |
| 2.3.2.1.3 Minerales | 150 |
| 2.3.2.1.4 Vitaminas | 151 |
| 2.3.2.2 Valor nutritivo de las leches fermentadas | 151 |
| 2.3.2.3 Beneficios del consumo de leche fermentada de cabra | 156 |
| 2.3.2.3.1 Señalización inflamatoria | 156 |
| 2.3.2.3.1 Tejido muscular y efecto ergogénico..... | 157 |
| 2.3.2.3.1 Sistema cardiovascular | 158 |
| 3. OBJETIVOS | 162 |
| 4. MATERIAL Y MÉTODOS..... | 166 |
| 4.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN | 166 |
| 4.2 DISEÑO EXPERIMENTAL..... | 167 |
| 4.3 TOMA DE MUESTRAS..... | 169 |
| 4.3.1 <i>Orina</i> | 169 |
| 4.3.2 <i>Sangre total, plasma y suero</i> | 169 |
| 4.3.3 <i>Obtención de órganos</i> | 170 |
| 4.3.4 <i>Fracciones citosólicas y membranas</i> | 171 |



| | |
|--|-----|
| 4.4 ELABORACIÓN Y DESHIDRATACIÓN DE LAS LECHES FERMENTADAS | 171 |
| | 171 |
| 4.4.1 <i>Obtención de la leche fermentada de cabra o vaca</i> | 171 |
| 4.4.2 <i>Tratamiento previo a la fermentación</i> | 172 |
| 4.4.3 <i>Inoculación del cultivo iniciador de la fermentación (starter)</i> | 172 |
| 4.4.4 <i>Deshidratación del producto lácteo fermentado</i> | 173 |
| 4.5 DIETAS EXPERIMENTALES | 174 |
| 4.6 MÉTODOS ANALÍTICOS..... | 175 |
| 4.6.1 <i>Contenido proteico, materia grasa, lactosa, materia seca y cenizas</i> | 175 |
| 4.6.2 <i>Determinación y composición de aminoácidos</i> | 176 |
| 4.6.3 <i>Determinación y composición de ácidos grasos</i> | 178 |
| 4.6.4 <i>Determinación y composición mineral</i> | 180 |
| 4.6.5 <i>Determinación y composición vitamínica</i> | 182 |
| 4.7 PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS..... | 184 |
| 4.8 HIERRO SÉRICO, CAPACIDAD TOTAL DE FIJACIÓN AL HIERRO Y SATURACIÓN DE TRANSFERRINA..... | 184 |
| 4.9 FERRITINA Y HEPCIDINA SÉRICA..... | 185 |
| 4.10 ÍNDICE HEPATOSOMÁTICO, CONTENIDO DE HIERRO EN HÍGADO Y TRANSAMINASAS | 185 |
| 4.11 OBTENCIÓN DE CITOSOL Y MEMBRANAS DE CEREBRO, HÍGADO, MUCOSA DUODENAL, Y ERITROCITO. DETERMINACIÓN DE CONTENIDO PROTEICO | 186 |
| 4.12 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ANTIOXIDANTE Y ESTADO ANTIOXIDANTE TOTAL | 187 |



| | |
|---|------------|
| 4.13 DETERMINACIÓN DEL DAÑO OXIDATIVO A LAS PRINCIPALES BIOMOLÉCULAS | 190 |
| 4.13.1 <i>Evaluación del daño oxidativo a los lípidos</i> | 190 |
| 4.13.1.1 15-F2t-Isoprostanos | 190 |
| 4.13.1.2 Hidroperóxidos | 191 |
| 4.13.2 <i>Evaluación del daño oxidativo a las proteínas</i> | 191 |
| 4.13.2.1 Carbonilos proteicos | 191 |
| 4.13.3 <i>Evaluación del daño oxidativo al material genético</i> | 192 |
| 4.13.3.1 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina | 192 |
| 4.13.3.2 Electroforesis en gel de células aisladas (ensayo comet alcalino)..... | 193 |
| 4.14 EXTRACCIÓN DE RNA Y REACCIÓN DE RETROTRANSCRIPCIÓN | 195 |
| 4.15 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL..... | 196 |
| 4.16 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA MEDIANTE WESTERN BLOT | 198 |
| 4.17 ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 199 |
| 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 202 |
| 5.1 ARTÍCULO CIENTÍFICO I | 203 |
| 5.2 ARTÍCULO CIENTÍFICO II | 238 |
| 5.2 ARTÍCULO CIENTÍFICO III..... | 259 |
| 6. CONCLUSIONES | 299 |
| 6. CONCLUSIONS..... | 304 |
| 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 309 |
| 8. MÉRITOS INVESTIGADORES DEL DOCTORANDO | 352 |



ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|-----|
| Figura 1. Papel del HIF en diversos procesos fisiológicos y patológicos. | 36 |
| Figura 2. Mecanismos moleculares de absorción de hierro. | 46 |
| Figura 3. Cascada de transición entre las principales especies reactivas de oxígeno.... | 86 |
| Figura 4. Reacciones en el mecanismo de oxidación en cadena de radicales libres. | 91 |
| Figura 5. Resumen de los principales componentes y efectos beneficiosos de la leche de cabra..... | 117 |
| Figura 6. Actividades biológicas específicas de péptidos bioactivos de la leche..... | 130 |
| Figura 7. Diseño experimental del estudio. | 168 |



ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|-----|
| Tabla 1. Ingesta diaria recomendada para el hierro..... | 43 |
| Tabla 2. Parámetros característicos de la anemia y del estado funcional del hierro. | 65 |
| Tabla 3. Radicales libres derivados del oxígeno. | 85 |
| Tabla 4. Composición básica de la leche en función de la especie. | 115 |
| Tabla 5. Composición de los principales ácidos grasos en la leche de cabra y vaca... | 120 |
| Tabla 6. Composición de las principales proteínas en la leche de cabra y vaca..... | 127 |
| Tabla 7. Composición de aminoácidos esenciales de la proteína de la leche de cabra y vaca..... | 132 |
| Tabla 8. Composición vitamínica de la leche de cabra y vaca. | 134 |
| Tabla 9. Composición mineral de la leche de cabra y vaca..... | 137 |
| Tabla 10. Composición esencial de las leches fermentadas. | 148 |
| Tabla 11. Composición de las dietas experimentales. | 174 |
| Tabla 12. Composición química de la leche fermentada de cabra y vaca | 176 |
| Tabla 13. Composición de aminoácidos de la leche fermentada de cabra y vaca. | 177 |
| Tabla 14. Composición en ácidos grasos de la leche fermentada de cabra y vaca..... | 179 |
| Tabla 15. Composición mineral de la leche fermentada de cabra y vaca..... | 181 |
| Tabla 16. Composición vitamínica de leche fermentada de cabra y vaca..... | 183 |
| Tabla 17. Secuencia de los cebadores utilizados en la PCR cuantitativa a tiempo real. | 197 |



ÍNDICE DE ABREVIATURAS

| | |
|----------------------|--|
| ADE | Amplitud de distribución eritrocitaria |
| ADP | Adenosin difosfato |
| AFN | Anemia ferropénica nutricional |
| AGCM | Ácidos grasos de cadena media, |
| ALT | Alanina aminotransferasa |
| AST | Aspartato aminotransferasa |
| ATP | Adenosin trifosfato |
| cADN | ADN complementario |
| CAT | Catalasa |
| CAV-1 | Caveolina 1 |
| CDK1 | Quinasa dependiente de ciclina 1 |
| CHCM | Concentración de hemoglobina corpuscular media |
| CHERG | Grupo de Referencia de Epidemiología de Salud Infantil |
| CINC-1/GRO/KC | Quimioatrayentes de neutrófilos |
| CLA | Ácidos linoleicos conjugados |
| CVD | Enfermedad cardiovascular |
| Dcytb | Citocromo duodenal B |



| | |
|---------------|---|
| DMT1 | Transportador de metales divalentes 1 |
| DNPH | 2,4-dinitrofenilhidrazina |
| ECA | Enzima convertidora de angiotensina |
| EEM | Error estándar de la media |
| EPO | Eritropoyetina |
| ERNs | Especies reactivas de nitrógeno |
| EROs | Especies reactivas de oxígeno |
| FPN1 | Ferroportina 1 |
| GABA | Ácido gamma-aminobutírico |
| GPx | Glutación peroxidasa |
| GR | Glutación reductasa |
| GSH | Glutación reducido |
| GSSG | Glutación oxidado |
| HAMP | Gen que codifica la hepcidina |
| HCM | Hemoglobina corpuscular media |
| HCP1 | Proteína transportadora de hierro tipo hemo |
| HIF | Factor inducible por hipoxia |
| HIF-PH | HIF-1 α prolin-hidroxilasa |
| HJV | Hemojuvelina |



| | |
|---------------------|---|
| HO-1 | Hemo-oxigenasa 1 |
| HTST | Pasteurización relámpago |
| IDR | Ingesta diaria recomendada |
| IHS | Índice hepatosomático |
| IREs | Elementos de respuesta al hierro |
| IRP | Proteínas reguladoras del hierro |
| LIP | <i>Pool</i> de hierro lábil |
| LOOH | Hidroperóxidos lipídicos |
| MAO | Monoaminoxidasa |
| MCP-1 | Proteína quimioatrayente de macrófagos 1 |
| MCT | Triglicéridos de cadena media |
| NK | Células natural killer |
| NTBI | Hierro no unido a la transferrina circulante |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| OTM | <i>Olive tail moment</i> |
| PCFT/SLC46A1 | Transportador de folato acoplado a protones |
| PE | Período experimental |
| PepT1 | Cotransportador de péptidos dependiente de protones |
| PPE | Período pre-experimental |



| | |
|----------------|---|
| SICAM-1 | Molécula de adhesión intercelular soluble 1 |
| SOD | Superóxido dismutasa |
| SPF | Condiciones libres de gérmenes patógenos |
| STEAP3 | Antígeno epitelial transmembrana de la próstata |
| TAS | Estado antioxidante total |
| TCA | Tricloroacético |
| TfR1 | Receptor de la transferrina 1 |
| TFR2 | Receptor de la transferrina 2 |
| TIBC | Capacidad total de fijación al hierro |
| TIBC | Capacidad total de fijación de hierro |
| TIMP-1 | Metalopeptidasa 1 |
| UCP1 | Proteína de desacoplamiento 1 |
| UHT | Pasteurización a ultra temperatura |
| VCM | Volumen corpuscular medio |
| VEGF | Factor de crecimiento endotelial vascular |



INDICIOS DE CALIDAD

La presente Tesis Doctoral está conformada por tres artículos que han sido publicados en revistas científicas con índice de impacto:

Jorge Moreno-Fernández, Javier Diaz-Castro, Mario Pulido-Moran, Maria JM Alferez, Christine Boesch, Ana Sanchez-Alcover, Inmaculada López-Aliaga. Fermented goat milk consumption improves duodenal expression of iron homeostasis genes during anemia recovery. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 2016; 30;64(12):2560-2568

Indicios de calidad

Índice de impacto (Thomson Reuters, Journal of Citation Reports©, 2016): 3.154

| Categoría JCR® | Cuartil en su categoría |
|--------------------------------|-------------------------|
| AGRICULTURE, MULTIDISCIPLINARY | Q1 |
| FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY | Q1 |
| CHEMISTRY, APPLIED | Q1 |



Jorge Moreno-Fernandez, María J. M. Alférez, Inmaculada López-Aliaga, Javier Díaz-Castro. Role of fermented goat milk on liver gene and protein profiles related to iron metabolism during anemia recovery. **Nutrients**. 2020; 8;12(5):1336

Indicios de calidad

Índice de impacto (Thomson Reuters, Journal of Citation Reports©, 2018): 4.171

| Categoría JCR® | Cuartil en su categoría |
|-----------------------|-------------------------|
| NUTRITION & DIETETICS | Q1 |

Jorge Moreno-Fernández, Javier Diaz-Castro, Maria.J.M. Alferez, Christine Boesch, Teresa Nestares and Inmaculada Lopez-Aliaga. Fermented goat milk improves antioxidant status and protects from oxidative damage to biomolecules during anemia recovery. **Journal of the science of Food and Agriculture**. 2017; 97(5):1433-1442.

Indicios de calidad

Índice de impacto (Thomson Reuters, Journal of Citation Reports©, 2017): 2.379

| Categoría JCR® | Cuartil en su categoría |
|--------------------------------|-------------------------|
| AGRICULTURE, MULTIDISCIPLINARY | Q1 |

RESUMEN



1. RESUMEN

ANTECEDENTES

El hierro es un componente biológico esencial para los organismos vivos en los que participa en un conjunto de reacciones bioquímicas de gran importancia, rutas bioenergéticas, aporte de oxígeno a los tejidos y síntesis de ADN, entre otras. Casi todas las células del organismo requieren hierro como cofactor crucial en múltiples procesos bioquímicos del organismo tales como detección y transporte de oxígeno, transferencia de electrones y catálisis. Es por tanto un elemento indispensable para la vida.

Sus requerimientos varían en función de los cambios y necesidades fisiológicas que sufre el organismo durante su desarrollo, existiendo diferencias según el grupo poblacional. Como promedio un adulto almacena aproximadamente 1-3g de hierro, gracias al equilibrio entre la absorción y las pérdidas. Alrededor de 1mg de hierro se pierde al día por desprendimiento de células epiteliales y superficiales de mucosas, incluidas las del tracto gastrointestinal. Además la menstruación contribuye a la pérdida de hierro, incrementando ésta en 2mg al día en mujeres adultas pre-menopáusicas.

El hierro se absorbe por los enterocitos maduros en las vellosidades superiores del intestino delgado. Aunque se ha observado que algunas partes más distales del tracto gastrointestinal pueden absorber pequeñas cantidades de hierro, son las partes proximales del intestino delgado (duodeno y primera porción del yeyuno), las que están especialmente adaptadas para su absorción. El hierro debe atravesar tanto la membrana apical del borde de cepillo como la membrana basolateral de los enterocitos para pasar de la luz intestinal al torrente sanguíneo. Una vez absorbido, el hierro es transportado,

metabolizado o almacenado, siendo uno de los principales órganos de depósito el hígado.

La deficiencia de hierro implica el agotamiento de los niveles de hierro total del organismo, especialmente el de depósito presente en los hepatocitos y macrófagos. Teniendo en cuenta que la mayor cantidad de hierro se utiliza para la síntesis de la hemoglobina implicada en la producción de millones de eritrocitos al día, la anemia es el signo más evidente de deficiencia de hierro, y la anemia por deficiencia de hierro a menudo se considera sinónimo de deficiencia de hierro. De hecho, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la anemia por deficiencia de hierro constituye el segundo problema de salud pública a nivel mundial.

A pesar de ello, el hierro también tiene la capacidad de generar radicales oxidativos nocivos para la salud. Su regulación en nuestro organismo depende de los procesos de absorción, metabolismo y excreción, pero en algunas situaciones no fisiológicas o enfermedades, el hierro puede acumularse en exceso. Este exceso de hierro podrá provocar un daño oxidativo y disfunción orgánica en diferentes órganos o tejidos, pudiendo conducir a una lesión celular citotóxica (daño en el ADN, peroxidación lipídica, modificación de proteínas y daño mitocondrial).

Así pues, el estrés oxidativo se define como el desequilibrio que existe entre la formación y/o acumulación de radicales libres y la capacidad de los sistemas de defensa del organismo para eliminarlos o contrarrestar su acción. Se ha caracterizado como una alteración en el equilibrio prooxidante a antioxidante a favor de las especies oxidantes, lo que lleva a un daño potencial. Así pues, se ha asociado a una cantidad de especies reactivas de oxígeno (EROs) como resultado de un desequilibrio entre la generación y la



eliminación de las EROs. Por lo tanto, el estrés oxidativo conlleva una mayor producción de radicales libres, pero también afecta a los mecanismos de defensa antioxidante del organismo, que se ven diezmados. El daño inducido en el estrés oxidativo por los radicales libres contribuye a la fisiopatología y patogénesis de muchas afecciones de salud como las enfermedades cardiovasculares, cáncer, afecciones neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson, enfisema, entre otras).

Por lo tanto, el potencial daño oxidativo generado por la participación del hierro en las reacciones redox, podría deberse a transporte o almacenamiento de hierro inadecuados durante la anemia ferropénica nutricional, pudiendo dar lugar a su acumulación en el organismo.

La leche fermentada se ha reconocido como un alimento funcional, lo que sugiere que su uso tiene un efecto directo y medible en la promoción de la salud. Existen algunos estudios sobre los efectos beneficiosos de la leche fermentada en el sistema inmunitario, quelación de iones metálicos, inhibición enzimática e inhibición de la autooxidación de ascorbato. Sin embargo, es necesario un análisis exhaustivo de la influencia de la leche fermentada en la homeostasis del hierro, el estrés oxidativo a las principales biomoléculas y los mecanismos de defensa enzimática antioxidante.

Por otra parte, la leche de cabra contiene compuestos beneficiosos para la salud como son los péptidos bioactivos, ácido linoleico conjugado y oligosacáridos y se ha observado que mantiene unos niveles adecuados de triglicéridos y disminuye los niveles plasmáticos de colesterol. Contiene ácidos grasos esenciales como el linolénico, araquidónico y linoleico, así como ácidos grasos de cadena corta y media (cáprico, caprílico y caproico). También contiene proteínas de alto valor biológico y fácil



absorción. Respecto a su perfil mineral contiene selenio, cinc y cobre, minerales antioxidantes, a los que mejora su utilización nutritiva, pudiendo ejercer un efecto positivo en procesos oxidativos. Entre sus minerales destacan el calcio y el fósforo, que presentan una elevada digestibilidad, y una mejor absorción, y además mejora el uso del hierro minimizando las posibles interacciones con otros minerales (calcio, fósforo, y magnesio). Atendiendo a su contenido vitamínico, la leche de cabra es fuente de vitaminas A, E, D, riboflavina, niacina y tiamina. Así pues es un alimento muy saludable que influye positivamente en el metabolismo del hierro, además, la leche de cabra presenta una gran similitud con la leche materna, sus valores nutritivos son aproximados y se considera una alternativa muy válida como sustituta de la humana.

OBJETIVOS

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el objetivo general de esta Tesis Doctoral es conocer los efectos de una dieta basada en un fermentado lácteo de cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro, durante la recuperación de la anemia ferropénica nutricional, sobre la homeostasis del hierro a nivel duodenal y hepático como órganos clave del metabolismo de este mineral y evaluar el daño oxidativo a las principales biomoléculas del organismo y el estado de las defensas enzimáticas antioxidantes, durante la repleción crónica con hierro teniendo en cuenta el potencial pro-oxidante de este mineral.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para lograr la consecución del objetivo general de esta Tesis Doctoral, se ha llevado a cabo el siguiente diseño experimental:

• **Período pre-experimental (PPE):**

Las ratas (n=100), recién destetadas, se dividieron aleatoriamente en dos grupos experimentales (control y anémico), con el fin de inducir la ferropénica. Para ello durante 40 días, el grupo anémico recibió una dieta estándar AIN-93G con bajo contenido en hierro (5.91 ± 0.36 mg/Kg por análisis), siguiendo la técnica previamente desarrollada por nuestro grupo de investigación (Pallarés et al., 1993). Para la elaboración de esta dieta se omitió el hierro del suplemento mineral. El grupo control recibió la dieta AIN-93G con contenido normal de hierro (44.72 ± 0.98 mg/Kg por análisis) (Reeves et al., 1993).

• **Período experimental (PE):**

Al finalizar el PPE, los animales de experimentación, (controles y anémicos) se dividieron en 8 subgrupos (n=10) y fueron alimentados durante 30 días con dietas basadas en fermentados lácteos de cabra (raza Murciano-Granadina) o vaca (raza Holstein), con contenido normal de hierro (45 mg/kg dieta) o con sobrecarga (450 mg/kg dieta) (Raja et al., 1994) para proceder a la recuperación de la anemia ferropénica nutricional inducida.



Tras la finalización de ambos períodos experimentales, 10 ratas del grupo de control y 10 ratas del grupo anémico en el PPE, así como las 80 ratas en el PE, se desangraron por completo mediante canulación de la arteria aorta abdominal para determinar el estado antioxidante total del plasma (TAS), contenido de hierro, capacidad total de unión al hierro (TIBC), saturación de transferrina, ferritina, hepcidina y transaminasas séricas. Después del sacrificio de los animales experimentales, los órganos se extrajeron, procesaron y preservaron lo más rápido posible, para inducir las menores alteraciones posibles.

Al final del PPE se extrajo el hígado de los animales sacrificados. Al final del PE, se extrajeron el cerebro, el hígado y el duodeno para la determinación de proteínas y genes de las proteínas relacionadas con la homeostasis del hierro. El mismo día del sacrificio, se obtuvieron las fracciones citosólicas y membranas de eritrocitos, cerebro, hígado y mucosa duodenal para el análisis posterior de enzimas antioxidantes, hidroperóxidos, proteínas carbonilo, 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina y electroforesis en gel de células aisladas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras la inducción de anemia con privación de hierro durante 40 días, todos los parámetros hematológicos en el grupo anémico fueron menores con respecto al grupo control, excepto ADE, recuento de plaquetas y TIBC que fueron mayores. El recuento de glóbulos blancos permaneció sin cambios después de la inducción de anemia.

Una vez finalizó la administración de las dietas basadas en leches fermentadas de cabra o vaca, a nivel duodenal se observó que la leche fermentada de cabra



incrementó la expresión génica de Dcytb, DMT1, FPN1 y Ftl1 en los enterocitos y disminuyó la de TfR1 y Hamp tanto en animales controles como anémicos. Además la anemia disminuyó la expresión génica de Dcytb, DMT1 y Ftl1 en los animales alimentados con leche fermentada de vaca sobreexpresando TfR1 y Hamp. Finalmente se observó que la sobrecarga de hierro dio lugar a una menor expresión de Dcytb y TfR1 en animales alimentados con leche fermentada de vaca y, mientras que la expresión de DMT1 y FPN1 fue mayor.

También se evaluó el efecto de la administración de alimentos fermentados de leche de cabra y vaca a nivel hepático. En general el consumo de leche fermentada de cabra, tanto con contenido normal como con sobrecarga de hierro, aumentó la expresión génica de DMT1, FPN1 y FTL1 y la expresión proteica de DMT1 y FPN1. Sin embargo, la expresión génica de HAMP fue menor en todos los grupos de animales alimentados con leche fermentada de cabra, y la expresión de la hepcidina disminuyó en animales controles y anémicos alimentados con leche fermentada de cabra con contenido normal de hierro.

Asimismo se evaluó el daño oxidativo a las principales biomoléculas y los mecanismos de defensa enzimática antioxidante observándose un aumento significativo de enzimas antioxidantes endógenas (SOD, CAT, GPx y GR), junto con un aumento plasmático en el TAS y una disminución en plasma y orina de 8-OHdG en animales que consumieron una dieta basada en leche fermentada de cabra. Por el contrario, las roturas en la doble cadena de ADN, los hidroperóxidos (en plasma, eritrocitos e hígado), los 15-F2t-isoprostanos urinarios y los grupos carbonilo de proteínas (en plasma y mucosa duodenal), fueron más bajos en los animales alimentados con leche fermentada de



cabra, revelando una mejora en la actividad antioxidante sistémica y celular del plasma y los tejidos.

Por todo ello, los resultados obtenidos aportan un mejor conocimiento de los mecanismos de absorción de hierro a nivel duodenal y de la ventaja que la leche fermentada de cabra induce en ese proceso durante la recuperación de la anemia ferropénica nutricional. Además, se pone de manifiesto que la leche fermentada de cabra ejerce un efecto beneficioso en la regulación de genes que codifican la síntesis de proteínas involucradas en el metabolismo del hierro, desempeñando un papel clave en el aumento de la repleción de hierro durante la recuperación de la anemia, induciendo una adaptación fisiológica de los genes y proteínas del hígado, de manera coordinada con la fluctuación de los niveles de hierro celular, favoreciendo la homeostasis del hierro corporal. En relación con los procesos de daño oxidativo y defensa antioxidante, el consumo de leche fermentada de cabra demuestra un aumento en los niveles de TAS, como efecto protector, junto con menores niveles de biomarcadores de daño oxidativo, revelando que la leche fermentada de cabra puede proteger a los principales componentes biológicos celulares (lípidos, proteínas, ADN) del daño oxidativo provocado durante la recuperación de la anemia.



CONCLUSIONES

1. Las dietas basadas en leche fermentada de cabra aumentan la expresión génica y proteica de Dcytb, a nivel intestinal y DMT1 y FPN1 en duodeno e hígado, proteínas clave implicadas en la homeostasis del hierro, indicando no sólo una mejor recuperación hematológica, sino también una mayor movilización de hierro desde su almacenamiento hepático hasta los órganos diana, provocando un efecto hepatoprotector durante la sobrecarga de hierro.

2. La baja regulación de la hepcidina a nivel duodenal, tras el consumo de las dietas basadas en leche fermentada de cabra, aumentó el flujo de hierro desde las células duodenales a los tejidos, favoreciendo la hematopoyesis lo que lleva a una mejor absorción de hierro y recuperación de la anemia. Además la menor expresión de la hepcidina hepática aumenta el flujo de salida de hierro de los hepatocitos a la circulación general, dada la correlación inversa entre la expresión de hepcidina y FPN1.

3. Las dietas basadas en leche fermentada de cabra aumentan la expresión génica de FTL1 a nivel duodenal y hepático, asegurando un mayor secuestro intestinal de hierro y mejorando su almacenamiento hepático, hecho que se explica por el aumento de expresión de las proteínas DMT1 y FPN1. Además, la sobrecarga de hierro aumenta la expresión génica de FTL1, como un mecanismo compensatorio para evitar el daño oxidativo a las principales biomoléculas, debido al carácter pro-oxidante de este mineral.



4. La deficiencia de hierro conduce a una mayor producción de hidroperóxidos en eritrocitos, hígado y mucosa duodenal, como consecuencia de las alteraciones estructurales de la membrana celular. Sin embargo, este daño oxidativo es específico de los lípidos, ya que no se ha registrado un aumento de estrés oxidativo en las proteínas, prostaglandinas o ADN, debido a la deficiencia de hierro.

5. El consumo de dieta basada en leche fermentada de cabra induce un efecto protector en plasma, eritrocitos, hígado y cerebro, disminuyendo los niveles de hidroperóxidos, grupos carbonilo e isoprostanos y aumentando el estado antioxidante total, lo que se correlaciona directamente con la mayor expresión génica y actividad hepática de las enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx, GR, revelando un menor estrés oxidativo inducido durante la recuperación de la anemia ferropénica nutricional.

6. La dieta basada en leche fermentada de cabra tiene un papel positivo en la estabilidad genómica, reduciendo la fragmentación de la doble hélice de ADN y los niveles de 8-OHdG, debido a la alta biodisponibilidad de magnesio y zinc, que mejora la estabilidad genómica y promueve la reparación del material genético.

Conclusión General

La dieta basada en leche fermentada de cabra, en comparación con la de vaca, resulta ser más beneficiosa en la recuperación de los efectos nocivos causados por la deficiencia de hierro, ya que induce una adaptación fisiológica intestinal y hepática de



los genes y proteínas clave relacionados con la homeostasis del hierro. Además, el consumo de esta dieta induce un efecto protector en las principales biomoléculas, al disminuir los biomarcadores de daño oxidativo y aumentar el estado antioxidante total, que se correlacionan directamente con la expresión y actividad de las enzimas antioxidantes, durante la recuperación de la anemia.

SUMMARY



1. SUMMARY

INTRODUCTION

Iron is an essential biological component for living organisms which participates in a set of highly important biochemical reactions, bioenergetic pathways, oxygen supply to tissues and DNA synthesis, among others. Almost every cell in the body requires iron as a crucial cofactor in multiple body biochemical processes such as oxygen detection and transport, electron transfer, and catalysis, being therefore an essential element for life.

Iron requirements may vary depending on the physiological changes and needs that the organism undergoes during its development, with differences depending on the population group. On average, an adult human is able to store approximately 1-3 g of iron, thanks to the balance between absorption and losses. About 1 mg of iron is lost daily due to detachment of epithelial and superficial mucosal cells, including those of the gastrointestinal tract. In addition, menstruation contributes to iron losses, increasing it by 2 mg a day in premenopausal adult women.

Iron is absorbed by mature enterocytes in the upper villi of the small intestine. Although it has been observed that some distal parts of the gastrointestinal tract can uptake small amounts of iron, it is the proximal parts of the small intestine (duodenum and first part of the jejunum) those that are specially adapted for iron absorption. Iron pass through both the apical brush border membrane and the basolateral membrane of enterocytes to cross from the intestinal lumen into the bloodstream. Once absorbed, iron is transported, metabolized or stored, being the liver one of the main storage organs.



Iron deficiency involves depletion of the organism total iron levels, especially iron stored in hepatocytes and macrophages. Considering that the greatest amount of body iron is used for hemoglobin synthesis involved in the production of millions of red blood cells per day, anemia is the most obvious sign of iron deficiency, and iron deficiency anemia is often considered synonymous with iron deficiency. In fact, according to the World Health Organization (WHO), iron deficiency anemia constitutes the second public health problem worldwide.

Despite this, iron also has the ability to generate oxidative free radicals which are deleterious to health. Iron regulation in the body depends on the processes of uptake, metabolism and excretion, but in some non-physiological situations or diseases, the organism can accumulate iron in excess. This excess iron can cause oxidative damage and organic dysfunction in different organs or tissues, and can lead to cytotoxic cell damage (DNA damage, lipid peroxidation, protein modification, and mitochondrial damage).

Thus, oxidative stress is defined as the imbalance existing between the formation and/or accumulation of free radicals and the ability of the organism antioxidant systems to eliminate them or counteract their action. This disturbance has been characterized as an alteration in the prooxidant/antioxidant balance in favor of the oxidizing species, leading to potential damage. Thus, it has been associated with a number of reactive oxygen species (ROS) as a result of an imbalance between generation and elimination of ROS. Therefore, oxidative stress leads to a greater output of free radicals, but it also affects the antioxidant defense mechanisms, which are decimated. The damage induced in oxidative stress by free radicals contributes to the pathophysiology and pathogenesis



of many health conditions such as cardiovascular diseases, cancer, neurodegenerative conditions (Alzheimer disease, Parkinson disease, emphysema ..., etc).

Therefore, the potential oxidative damage generated by the participation of iron in redox reactions, could be due to inadequate transport or storage of iron during nutritional iron deficiency anemia, which could lead to its accumulation in the body.

Fermented milk has been recognized as functional food, suggesting that their use has a direct and measurable effect on promoting health. There are some studies on the beneficial effects of fermented milk on the immune system, metal ion chelation, enzyme inhibition and inhibition of ascorbate autoxidation. However, an exhaustive analysis of the influence of fermented milk on iron homeostasis and antioxidant defense mechanisms together with oxidative damage to the main biomolecules of the body is needed.

On the other hand, goat milk contains beneficial compounds for health such as bioactive peptides, conjugated linoleic acids and oligosaccharides and it has been observed that maintains adequate levels of triglycerides and reduces plasma cholesterol levels. Goat milk contains essential fatty acids such as linolenic, arachidonic and linoleic, as well as short and medium chain fatty acids (capric, caprylic and caproic). Caprine milk also contains proteins of high biological value and easy absorption. Regarding its mineral profile, it contains selenium, zinc and copper, antioxidant minerals, which improves its nutritional use, and can have a positive effect on oxidative processes. Among its minerals, calcium and phosphorus stand out, which have a high digestibility and better absorption, and it also improves the use of iron, minimizing possible interactions with other minerals (calcium, phosphorous, and magnesium).



Considering its vitamin content, goat milk is a source of vitamins A, E, D, riboflavin, niacin and thiamine. Thus, it is a very healthy food that positively influences iron metabolism. In addition, goat milk has a great similarity to breast milk, its nutritional values are approximate and it is considered a very valid alternative as a substitute for human milk.

AIMS

Taking into account all the mentioned above, the general objective of this Doctoral Thesis is to assess the effect of fermented goat milk-based diet (compared to that of a cow), with normal content or iron overload, on iron homeostasis in liver and duodenum as key organs of the metabolism of this mineral, during the recovery of nutritional iron deficiency anemia. In addition, it is also intended to evaluate the oxidative damage to the main biomolecules of the body along with the antioxidant enzymes involved in antioxidant defense mechanisms, during chronic iron repletion, taking into account the pro-oxidant potential of this mineral.

MATERIAL AND METHODS

To achieve the main objective of this Doctoral Thesis, the following experimental design was carried out:

- **Pre-experimental period (PEP):**

After weaning, rats ($n = 100$) were randomly divided into two experimental groups (control and anemic), in order to induce iron deficiency. For this purpose, during



40 days, the anemic group received a standard AIN-93G diet with low iron content (5.91 ± 0.36 mg/kg by analysis), following the technique developed previously by our research group (Pallarés et al., 1993). For the elaboration of this diet the iron of the mineral supplement was omitted. The control group received the AIN-93G diet with normal iron content (44.72 ± 0.98 mg /kg by analysis) (Reeves et al., 1993).

• **Experimental period (EP):**

At the end of the PEP, the experimental animals (controls and anemic) were divided into 8 subgroups (n = 10) and were fed for 30 days with diets based on fermented goat (Murciano-Grenadine breed) or cow milk (Holstein breed), with normal iron content (45 mg/kg diet) or with overload (450 mg / kg diet) (Raja et al., 1994) to proceed with the recovery of induced nutritional iron deficiency anemia.

After the completion of both experimental periods, 10 rats from the control group and 10 rats from the anemic group in the PEP, as well as 80 rats in the EP, were bled by cannulation of the abdominal aorta artery to determine plasma total antioxidant status (TAS), iron content, total iron binding capacity (TIBC), transferrin saturation, ferritin, hepcidin and serum transaminases. Subsequently, the organs were removed, processed and preserved as quickly as possible, to avoid possible alterations.

At the end of the PPE, the liver was removed from the sacrificed animals. At the end of PE, the brain, liver and duodenum were removed for protein and gene determination of proteins related to iron homeostasis. On the same day of sacrifice, cytosolic fractions and membranes of erythrocytes, brain, liver and duodenal mucosa were obtained for the subsequent analysis of antioxidant enzymes, hydroperoxides,



carbonyl proteins, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) and single cell gel electrophoresis of isolated lymphocytes.

RESULTS AND DISCUSSION

After induction of iron deficiency anemia during 40 days, all the hematological parameters in the anemic group were lower than control group, except RDW, platelets and TIBC. White blood cells count remained unchanged after induction of anemia.

After supplying the fermented milk-based diets, it was observed at duodenal level that fermented goat milk increased the gene expression of Dcytb, DMT1, FPN1 and Ftl1 in enterocytes and decreased TfR1 and Hamp both in control and anemic animals. Furthermore, anemia decreased Dcytb, DMT1 and Ftl1 gene expression in animals fed fermented cow's milk, while overexpressed TfR1 and Hamp. Finally, it was observed that iron overload decreased the expression of Dcytb and TfR1 in animals fed with fermented cow milk and increased the expression of DMT1 and FPN1.

The effect of fermented goat and cow milk diets in the liver was also assessed. In general, the consumption of fermented goat milk, both with normal iron content and with iron overload, increased the gene expression of DMT1, FPN1 and FTL1 and the protein expression of DMT1 and FPN1. However, Hamp gene expression was lower in all groups of animals fed fermented goat milk, as well as decreased hepcidin expression in control and anemic animals fed fermented goat milk-based diet with normal iron content.



In addition, oxidative damage to the main cell biomolecules and the antioxidant enzymatic defense mechanisms was also assessed, observing a significant increase endogenous antioxidant enzymes (SOD, CAT, GPx y GR), along with an increase in plasmatic TAS and a decrease in plasmatic and urine 8-OHdG in animals fed fermented goat milk-based diet. In contrast, DNA strand breaks, hydroperoxides (in plasma, erythrocytes and liver), urine 15-F2t-isoprostanes, and protein carbonyl groups (in plasma and duodenal mucosa), were lower in animals fed fermented goat milk, revealing an improvement in systemic and cellular antioxidant activity of plasma and tissues.

Taking into account all these considerations, the results obtained provide a better understanding of the mechanisms of iron absorption at the duodenal level, revealing that fermented goat milk improves all these processes during the recovery of nutritional iron deficiency anemia. Furthermore, fermented goat milk exerts a beneficial effect on the regulation of genes that encode proteins involved in iron metabolism, playing a key role in increasing iron replacement during recovery from anemia, inducing a physiological adaptation of genes and proteins of the liver, in a coordinated way with the fluctuation of cellular iron levels, favoring iron homeostasis. With regard to oxidative damage and antioxidant defense, the consumption of fermented goat milk increases TAS levels, exerting a protective effect, together with a decrease in the levels of oxidative damage biomarkers, revealing that fermented goat milk can protect the main cellular biological components (lipids, proteins, DNA) of the oxidative damage caused during the anemia recovery.



CONCLUSIONS

1 Fermented goat milk-based diets increase gene and protein expression of Dcytb (in duodenum), DMT1 and FPN1 (in duodenum and liver), key proteins involved in iron homeostasis, indicating not only a better hematological recovery, but also greater iron mobilization from liver storage to target organs, revealing a hepatoprotective effect during iron overload.

2. The downregulation of hepcidin at duodenal level, after fermented goat milk-based diets consumption, increases the iron efflux from the duodenal cells to the target tissues, favoring hematopoiesis, which leads to better iron absorption and anemia recovery. Furthermore, the decreased expression of hepatic hepcidin increases iron efflux from hepatocytes to the general circulation, due the inverse correlation of hepcidin and FPN1 expression.

3. Fermented goat milk-based diets increase FTL1 gene expression at the duodenal and hepatic level, ensuring greater intestinal iron sequestration and improving its hepatic storage, a fact that is explained by the increased protein expression of DMT1 and FPN1. Furthermore, iron overload increases FTL1 gene expression, as a compensatory mechanism to avoid oxidative damage to the main biomolecules, due to the pro-oxidative character of this mineral.



4. Iron deficiency leads to an increased production of hydroperoxides in erythrocytes, liver and duodenal mucosa, as a consequence of structural alterations of the cell membrane. However, this oxidative damage is lipid-specific, since no increase in oxidative stress has been recorded in proteins, prostaglandins or DNA, due to iron deficiency.

5. Fermented goat milk-based diet consumption induces a protective effect in plasma, erythrocytes, liver and brain, decreasing the levels of hydroperoxides, carbonyl groups and isoprostanes and increasing the total antioxidant status, which is directly correlated with the highest gene expression and liver activity of the antioxidant enzymes SOD, CAT, GPx, GR, revealing lower oxidative stress evoked during nutritional iron deficiency anemia recovery.

6. Fermented goat milk-based diet has a positive role in genomic stability, reducing DNA strand breaks and 8-OHdG levels, due to the high bioavailability of magnesium and zinc, which improves genomic stability and promotes the genetic material repairing.

Overall conclusion

Fermented goat milk-based diet, compared to cow milk based diet, is more beneficial in the recovery of the deleterious effects caused by iron deficiency, since it induces a physiological intestinal and hepatic adaptation of the key genes and proteins related with iron homeostasis. Furthermore, the consumption of this diet induces a



protective effect on the main biomolecules, by decreasing the oxidative damage biomarkers and increasing total antioxidant status, which are directly correlated with the expression and activity of antioxidant enzymes, during the anemia recovery.

ANTECEDENTES
BIBLIOGRÁFICOS



2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2.1 EL HIERRO EN LA NUTRICIÓN

Desde tiempos antiguos la humanidad ha reconocido el papel especial que tiene el hierro en la salud y en la enfermedad (Beard & Dawson, 1997). Fue utilizado con usos medicinales por egipcios, griegos y romanos (McDowell, 2003; Wood & Ronnenberg, 2005), aunque no fue hasta 1932 cuando su importancia fue puesta de manifiesto claramente cuando se demostró que el hierro inorgánico era necesario para la síntesis de la hemoglobina (Solomons, 1997).

El hierro es el segundo metal más abundante en la corteza terrestre. A pesar de su abundancia geológica, el hierro es un factor de crecimiento limitante en el medio ambiente (Quintero-Gutiérrez et al., 2008), debido a que en contacto con el oxígeno forma óxidos, los cuales son altamente insolubles, dificultando su absorción (Wood & Ronnenberg, 2005). Es por ello que existen mecanismos para obtener, transportar o almacenar hierro en el organismo.

Es un componente biológico esencial para los organismos vivos en los que participa en un conjunto de reacciones bioquímicas de gran importancia, rutas bioenergéticas, aporte de oxígeno a los tejidos y síntesis de ADN, entre otras. El hierro presenta tres estados de oxidación: hierro metálico (Fe^0), ferroso (Fe^{2+}) y férrico (Fe^{3+}) los cuales condicionan su participación en la transferencia de electrones y en reacciones de oxidación-reducción. Gracias a estos estados redox el hierro actúa como cofactor de enzimas. En nuestro organismo el hierro principalmente existe en forma de complejos unido a proteínas (hemoproteínas), compuestos hemo (hemoglobina o mioglobina), enzimas hemo, o compuestos no hemo (enzimas hierro-flavina, transferrina, ferritina)

(McDowell, 2003). Cuando se encuentra en estado libre, el hierro puede participar en la reacción de Fenton y generar radicales libres que pueden dañar a las proteínas, lípidos y ADN, en definitiva a los componentes biológicos esenciales (Aisen et al., 2001).

2.1.1 Funciones

Casi todas las células del organismo requieren hierro como cofactor crucial en múltiples procesos bioquímicos del organismo tales como detección y transporte de oxígeno, transferencia de electrones y catálisis, síntesis de ADN (Aisen et al., 2001). Es por tanto un elemento indispensable para la vida.

- Transporte y almacenamiento de oxígeno: como constituyente de los centros activos de la hemoglobina (grupo hemo) que contiene más del 65% de hierro de todo el organismo, y de la mioglobina. El hierro participa en el transporte y almacenamiento de oxígeno en los tejidos ya que es capaz de unirse al oxígeno de manera reversible, liberándolo en los tejidos (O'Brien, 2011). En el tejido muscular, que contiene del 10 al 15% del hierro del cuerpo humano, la mioglobina transporta y almacena el oxígeno desde los capilares sanguíneos hasta las mitocondrias, pudiendo ser utilizado durante el proceso de contracción muscular (Ordway & Garry, 2004).
- Mecanismo de detección de oxígeno: es conocido que el hierro no hemo desempeña un papel importante en la sensibilización al oxígeno a través del factor inducible por hipoxia (HIF). Es un factor de transcripción que regula la respuesta celular a la hipoxia y actúa como regulador de la homeostasis del

oxígeno (Semenza, 2003). El HIF es hidroxilado gracias a un proceso catalizado por HIF-1 α prolin-hidroxilasa (HIF-PH), enzima dependiente de hierro (Peyssonnaud et al., 2008). Proceso extremadamente importante para la adaptación celular a condiciones bajas de oxígeno, donde controla la expresión de genes y proteínas implicados en la eritropoyesis, la angiogénesis, la glucólisis, el tono vascular, la apoptosis, la regulación del pH y la homeostasis del epitelio (Bruick, 2003; Déry et al., 2005) (Figura 1).

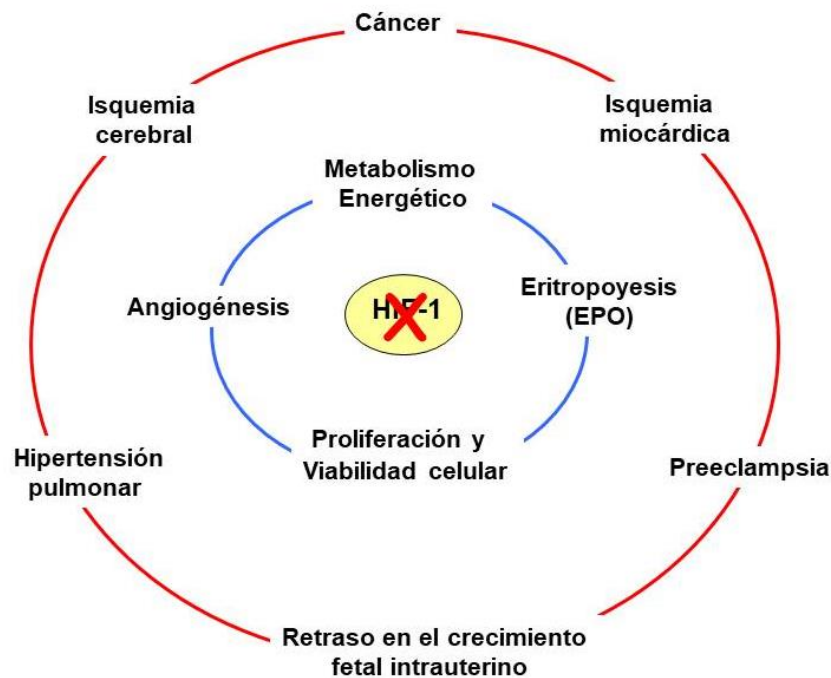


Figura 1. Papel del HIF en diversos procesos fisiológicos y patológicos. Elaboración propia.



- Eritropoyesis: el hierro junto con la eritropoyetina (EPO) son vitales para que se lleve a cabo la eritropoyesis. Son necesarios en diferentes etapas del proceso de diferenciación y maduración de las células madre pluripotenciales a eritrocitos. Durante este período, una pequeña cantidad de hierro es incorporada a la hemoglobina en el interior celular, aunque la mayor incorporación de hierro en la síntesis de la hemoglobina tiene lugar en el estadio en el que los eritroblastos se diferencian a reticulocitos. Una falta de hierro en esta etapa afectaría a la completa hemoglobinización de los eritrocitos (Besarab et al., 2009).
- Transporte de electrones y detoxificación del organismo: el hierro tiene capacidad de aceptar y donar electrones. Participa en los procesos redox de transferencia de electrones en la cadena respiratoria, donde interviene en la fosforilación del adenosin difosfato (ADP) para obtener adenosin trifosfato (ATP). Además el hierro forma parte de los citocromos (otra clase de hemoproteínas) donde juega una función importante en las reacciones redox y en el transporte de electrones (Chemmanur & Bonkovsky, 2004). Concretamente, el hierro en el hígado forma parte del citocromo P-450, que contiene un grupon hemo en su estructura y es el principal responsable de la excreción de xenobióticos (Beard, 2001). En la corteza suprarrenal, participa en la hidroxilación de esteroides, detoxificación mediante hidroxilación de distintos fármacos (barbitúricos, xenobióticos) y de carcinógenos ambientales (como los presentes en el humo del tabaco) (Nelson & Cox, 2008).



- **Inmunitaria:** el hierro es esencial en la respuesta inmune innata y adaptativa. Sus niveles ejercen un impacto no solo en la inmunidad del huésped sino también en la del patógeno. Así pues, niveles altos o bajos de hierro afectan a la función inmune. La proliferación de los linfocitos, la función de los neutrófilos, la producción de diversas citoquinas, la producción controlada de especies reactivas del oxígeno en los lisosomas para atacar a los agentes patógenos y la actividad de las células natural killer (NK) se ve alterada por niveles deficitarios de hierro (Oppenheimer, 2001). Por el contrario, niveles elevados de hierro (sobrecarga), presenta efectos negativos para la función inmune, aumentando la vulnerabilidad a infecciones (Drakesmith & Prentice, 2008; Drakesmith & Prentice, 2012). Así pues la homeostasis del hierro y la respuesta inmune están estrechamente relacionadas, aunque esta interacción es compleja.
- **Antioxidante y sistema nervioso:** las enzimas antioxidantes catalasa y peroxidasa contienen hierro en forma hemo. Estas enzimas son capaces de catalizar la conversión de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. En la función del sistema nervioso el hierro juega un papel muy importante. Se ha comprobado que el hierro participa en la mielinización y desarrollo del hipocampo, siendo tanto el rendimiento conductual como las funciones cerebrales sensibles al nivel de hierro, especialmente en etapas tempranas de la vida (Halterman et al., 2001; Moreno-Fernández et al., 2019a). Además parece que interviene en la síntesis, degradación y almacenamiento del ácido gamma-aminobutírico (GABA), dopamina, serotonina y neurotransmisores. Debe participar en funciones gabaminérgicas y dopaminérgicas ya que la distribución



de la dopamina y el GABA coincide aproximadamente con la del hierro (Toxqui et al., 2010). También ejerce otras funciones a nivel encefálico y en la homeostasis de neurotransmisores al estar vinculado con la actividad de la monoaminooxidasa (MAO).

- Síntesis del ADN: la enzima ribonucleótido reductasa cataliza la síntesis de desoxi-ribonucleótidos, es imprescindible y limitante para la síntesis de ADN y es dependiente de hierro. Esta enzima presenta varias subunidades que presentan un núcleo metálico donde se encuentra el hierro (Ye & Rouault, 2010).
- Función reproductiva: la función reproductiva también se ve alterada cuando los niveles de hierro son bajos en el organismo, observándose en esas situaciones recuentos reducidos, morfología anormal y motilidad reducida de los espermatozoides (Moreno-Fernandez et al., 2019b).

2.1.2 Requerimientos

Como se ha mencionado anteriormente el hierro es un elemento esencial para todas las etapas de la vida, aunque sus requerimientos varían en función de los cambios y necesidades fisiológicas que sufre el organismo durante su desarrollo, existiendo diferencias según el grupo poblacional.

El contenido de hierro en un recién nacido a término es de aproximadamente 250 a 300 mg (75 mg/kg de peso corporal). Tras el nacimiento el aumento de los niveles de oxígeno en el organismo, en comparación con la fase intrauterina, provoca una



disminución de la concentración de hemoglobina. Así pues tendrá lugar una redistribución del hierro presente en los eritrocitos hacia la reserva del organismo. Este hierro podrá cubrir las necesidades del recién nacido a término y lactante, durante los primeros 4 a 6 meses de vida, permitiendo que los requerimientos de hierro durante este período puedan ser provistos por la leche humana, aunque tenga un bajo contenido del mismo. La situación del hierro en el lactante prematuro y de bajo peso al nacer, será mucho menos favorable, ya que es en el último trimestre del embarazo donde se produce un marcado suministro de hierro al feto. Por lo tanto, durante sus 6 primeros meses de vida de sería necesario un suministro adicional de hierro en estos bebés (WHO/FAO, 2004; Abbaspour et al., 2014; Moreno-Fernandez et al., 2019c).

En el lactante a término, después de los 4 a 6 meses de edad, los requerimientos de hierro aumentan notablemente, ascendiendo aproximadamente a 0.7 a 0.9 mg/día, hasta el final del primer año de vida. Entre el primer y el sexto año de edad, el contenido de hierro corporal se duplica y los requerimientos de hierro son muy altos en relación con los requerimientos de energía (WHO/FAO, 2004; Abbaspour et al., 2014).

Durante la adolescencia los requerimientos de hierro son muy altos, particularmente durante el período de rápido crecimiento. Las niñas generalmente presentan el período de crecimiento acelerado antes de la menarquia, aunque el crecimiento no está terminado en ese momento, por lo tanto, sus requerimientos totales de hierro son considerables. En el caso de los niños, durante la pubertad presentan un marcado aumento de la concentración de hemoglobina, lo que aumenta aún más las necesidades de hierro (WHO/FAO, 2004; Abbaspour et al., 2014).



Como promedio un adulto almacena aproximadamente 1-3g de hierro, gracias al equilibrio entre la absorción y las pérdidas. Alrededor de 1mg de hierro se pierde al día por desprendimiento de células epiteliales y superficiales de mucosas, incluidas las del tracto gastrointestinal. Además la menstruación contribuye a la pérdida de hierro, incrementando ésta en 2mg al día en mujeres adultas pre-menopáusicas. Estas pérdidas con la sangre menstrual son constantes cada mes, pero pueden variar notablemente de una mujer a otra. Los activadores fibrinolíticos en la mucosa uterina son los principales responsables genéticos de estas variaciones. Durante todo el ciclo menstrual de 28 días, la pérdida media de hierro menstrual es de aproximadamente 0,56 mg/día. Así pues, teniendo en cuenta el resto de pérdidas de hierro basales, el requerimiento diario es de 1.36 mg, aunque en el 10% de las mujeres, supera los 2,27 mg y en el 5% supera los 2,84 mg. La elección del método anticonceptivo también influye mucho en las pérdidas menstruales. Es muy importante tener en cuenta la asimetría de las pérdidas menstruales, ya que constituye un gran problema nutricional (WHO/FAO, 2004; Abbaspour et al., 2014).

Durante el embarazo, los requerimientos fisiológicos de hierro son tres veces más altos que en la menstruación. Para cubrir los requisitos maternos y las demandas del feto en desarrollo, son necesarios aproximadamente 1200 mg de hierro de los depósitos corporales o de la dieta. Así pues se deberán ingerir unos 2mg más de hierro al día del que necesitaba mientras menstruaba para evitar un balance negativo de hierro (Tapiero et al., 2001; Anderson & Frazer, 2017).

En las mujeres posmenopáusicas y en las personas mayores físicamente activas, los requerimientos de hierro por unidad de peso corporal son los mismos que en los hombres (Moreiras et al., 2018). Cuando la actividad física disminuye como resultado



del envejecimiento, el volumen sanguíneo y la masa de hemoglobina disminuye, lo que lleva a un cambio en el uso de hierro de la hemoglobina y los músculos hacia las reservas de hierro. Esto implica una reducción de los requerimientos diarios de hierro. Por lo tanto, la deficiencia de hierro en los ancianos rara vez es de origen nutricional, aunque generalmente es causada por pérdidas patológicas de hierro (WHO/FAO, 2004; Abbaspour et al., 2014).

Así pues, para poder llegar a cubrir los requerimientos de hierro según las diferentes etapas y necesidades fisiológicas del organismo, se han establecido unas ingestas diarias recomendadas de hierro, que varían en función de la población y de la edad. En la Tabla 1 se resumen los valores de referencia sobre la ingesta diaria recomendada (IDR) de hierro para la población española (Moreiras et al., 2018) y los valores dietéticos de referencia para el hierro según la EFSA (EFSA, 2015).

Tabla 1. Ingesta diaria recomendada para el hierro.

| Edad | IDR población española (Moreiras et al., 2018) | Valores dietéticos de referencia (EFSA, 2015) |
|-----------------------|---|--|
| | Hierro mg/día | |
| 0-6 meses | 7 | 8 |
| 7-12 meses | 7 | 11 |
| 1-6 años | 8 | 7 |
| 7-9 años | 9 | 11 |
| 10-12 años | 12 | 11 |
| Hombres (años) | | |
| 13-19 | 15 | 11 |
| 20-49 | 10 | 11 |
| 50-59 | 10 | 11 |
| ≥60 | 10 | 11 |
| Mujeres (años) | | |
| 13-19 | 18 | 13 |
| 18-19 | 18 | 16 |
| 20-49 | 18 | 16 |
| 50-59 | 10 | 16 |
| ≥60 | 10 | 11 |
| Embarazo/lactancia | 18 | 16 |

Fuente: Moreiras et al., 2018 y EFSA, 2015.

2.1.3 Homeostasis del hierro

2.1.3.1 Absorción

La fracción de hierro que se absorbe de la cantidad ingerida es generalmente baja, pero puede variar de un 5% a un 35% dependiendo de las circunstancias y del tipo de hierro ingerido. Así pues la absorción será diferente si el hierro es inorgánico o hemo.

El hierro se absorbe por los enterocitos maduros en las vellosidades superiores del intestino delgado. Aunque se ha observado que algunas partes más distales del tracto



gastrointestinal pueden absorber pequeñas cantidades de hierro, son las partes proximales del intestino delgado (duodeno y primera porción del yeyuno), las que están especialmente adaptadas para su absorción. El hierro debe atravesar tanto la membrana apical del borde de cepillo como la membrana basolateral de los enterocitos para pasar de la luz intestinal al torrente sanguíneo. El hierro inorgánico (no hemo) atraviesa la membrana del borde de cepillo a través de una proteína de membrana, el transportador de metales divalentes 1 (DMT1). El hierro en estado ferroso (Fe^{2+}) es su sustrato, pero como la mayoría del hierro inorgánico de la dieta está en forma férrica (Fe^{3+}), deberá reducirse antes de que pueda ser absorbido. Para ello es necesario que el citocromo duodenal B (Dcytb), una reductasa presente en el borde de cepillo, permita que el Fe^{3+} se reduzca a Fe^{2+} y pueda ingresar al interior del enterocito a través del DMT1 (Anderson & Frazer, 2017; Ems et al., 2020).

El hierro tipo hemo presente en la dieta, también puede atravesar la membrana apical del enterocito, pero por un mecanismo diferente. Su absorción es más eficiente y no se ve influenciada por otros componentes de la dieta, aunque dicho proceso no se conoce en profundidad. Es por ello que se han propuesto varios mecanismos para explicar dicha captación de hierro hemo: endocitosis mediada por receptor, difusión pasiva y transporte activo, saturable y dependiente de la temperatura, indicativo de un transportador (Le Blanc et al., 2012). En la membrana apical del enterocito se identificó una proteína transportadora de hierro tipo hemo (HCP1), como posible responsable de su absorción. Sin embargo, se ha establecido que esa proteína es el transportador de folato acoplado a protones (PCFT/SLC46A1), un transportador de folato de alta afinidad (Gulec et al., 2014). A pesar de ello, la evidencia actual no excluye que pueda tener una doble funcionalidad, tanto para el folato como para el hierro tipo hemo. Una



vez en el interior del enterocito, el hemo se cataboliza por acción de la hemo-oxigenasa 1 (HO-1) junto con HO-2 y HO-3, permitiendo obtener hierro libre y producción de CO y biliverdina (Le Blanc et al., 2012).

Una vez en el interior del enterocito el hierro (Fe^{2+}) puede permanecer unido a la ferritina como fuente de almacenamiento de hierro. Si se requiere hierro en otra parte del cuerpo este se exporta rápidamente a través de la membrana basolateral de los enterocitos a través de la ferroportina 1 (FPN1). La eficiencia de esta exportación de hierro se ve incrementada por la acción de la hefastina (y también por su homólogo plasmático la ceruloplasmina). La hefastina es una oxidasa dependiente de cobre que oxida el hierro ferroso que había sido incorporado al interior celular a hierro férrico para que pueda unirse a la transferrina en los fluidos intersticiales (Anderson & Frazer, 2017) (Figura 2).

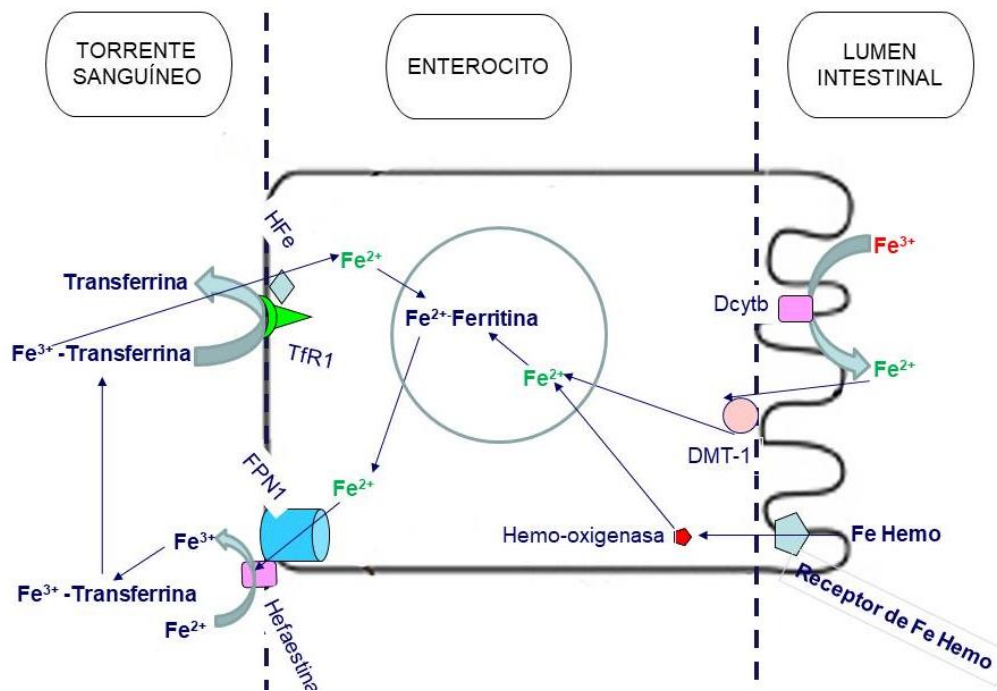


Figura 2. Mecanismos moleculares de absorción de hierro. Modificada de Martín-Masot et al., 2019.

2.4.2 Distribución

El hierro unido a transferrina se distribuye a través de la circulación por todo el humano. El contenido de hierro total presente en la transferrina es de ≈ 3 mg, correspondiendo a menos de 0.1% de todo el hierro corporal. Aunque no es una gran cantidad, se renueva diariamente unas 10 veces para mantener la eritropoyesis. El hierro presente en la transferrina proviene principalmente del reciclado del catabolismo de los eritrocitos y del absorbido a partir de la dieta. Tanto la distribución como el almacenamiento del hierro se encuentran principalmente regulados por la hepcidina, una hormona peptídica circulante, secretada por el hígado y que desempeña un papel crucial en la regulación de la homeostasis del hierro. Esta hormona actúa como un regulador



negativo de la entrada de hierro en el plasma. Se une a la FPN1, provocando la degradación de este complejo y por tanto disminuyendo la liberación de hierro a la circulación y por consiguiente provocando una disminución de la saturación de la transferrina (Abbaspour et al., 2014; Anderson & Frazer, 2017; Ems et al., 2020).

La transferrina se encuentra en su mayoría no saturada, permitiéndole soportar aumentos relativamente grandes en el flujo de hierro a la circulación, proveniente de la absorción intestinal o liberado de los depósitos del organismo. Así pues la unión del hierro con la transferrina evita la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) y su distribución segura por todo el organismo. En condiciones fisiológicas la principal vía de entrada de hierro a nivel celular es a través del receptor de la transferrina 1 (TfR1). Al unirse a la superficie celular, el complejo de transferrina y TfR1 cargado de hierro, se internaliza en las células a través de un proceso de endocitosis mediada por clatrina. Para abandonar el endosoma, el hierro férrico se reduce a la forma ferrosa gracias al antígeno epitelial transmembrana de la próstata (STEAP3). Posteriormente será transportarlo al citoplasma mediante el DMT1, aunque estudios recientes han puesto de manifiesto que las proteínas ZIP8 y ZIP14 también juegan un papel en el transporte de hierro desde las vesículas endocíticas. Los endosomas que contienen el complejo transferrina-TfR1 se reciclan de regreso a la membrana plasmática celular donde se separan. Si la capacidad de saturación de la transferrina está superada, puede aparecer hierro no unido a la transferrina circulante (NTBI). Este hierro puede generar EROs y por tanto es biológicamente tóxico. La entrada de NTBI en la célula se lleva a cabo de manera independiente al TfR1, por difusión pasiva o a través de un transportador, estando también involucradas en este proceso de captación de NTBI en la membrana plasmática, las proteínas ZIP8 y ZIP14 (Recalcati et al., 2017).



2.1.3.2 Metabolismo

El metabolismo intracelular del hierro está controlado principalmente por las proteínas reguladoras del hierro (IRP1 e IRP2). Son proteínas de unión al ARN que integran mecanismos de detección del *pool* de hierro lábil (LIP), que constituye el hierro citosólico en tránsito y que se une, principalmente en forma ferrosa, a varias sustancias de bajo peso molecular, como nucleótidos, aminoácidos y citrato, aunque la mayoría del hierro probablemente se asocia con el glutatión (GSH). Las IRP participan en la regulación de las proteínas involucradas en el transporte, tamponamiento intracelular y secuestro de hierro (Rouault, 2006; Recalcati et al., 2010). Cuando los niveles de LIP son bajos (situación de privación de hierro), las IRP se encuentran en su forma activa y son capaces de unirse a elementos de respuesta al hierro (IREs) en las regiones no traducidas del ARNm, modulando así la estabilidad del ARNm o la traducción de proteínas clave de hierro. Concretamente la absorción celular de hierro se ve aumentada cuando se estabiliza el ARNm para TfR1 y DMT1. Al mismo tiempo, la traducción de ARNm para FPN1 y ferritina se reprime, inhibiendo así la exportación de hierro desde la célula y favoreciendo el almacenamiento de hierro, respectivamente. Esta respuesta aumenta la disponibilidad de hierro en las células con bajos niveles de hierro. Por el contrario, las células cuyos niveles de hierro son altos, presentan una menor actividad de las IRP que favorece la degradación del ARNm de TfR1 y DMT1, permitiendo la traducción de ARNm para aumentar la síntesis de FPN1, ferritina y otras proteínas que regulan la homeostasis del hierro. Este mecanismo asegura que haya suficiente hierro disponible para las necesidades celulares, pero al mismo tiempo previene del daño celular dependiente de los niveles de hierro (Rupani & Connell, 2016).



Además de lo indicado anteriormente, el sistema IRE/IRP está involucrado en la regulación de la transcripción de otras proteínas relacionadas directa o indirectamente con la homeostasis del hierro. Las IRP no solo responden a los niveles de hierro en el LIP, sino que se ven influenciadas por agentes y condiciones que modifican el metabolismo del hierro en entornos fisiopatológicos distintos, (Recalcati et al., 2010; Pantopoulos et al., 2012), en particular bajo hipoxia, dada la interacción del metabolismo del hierro con la homeostasis de oxígeno (Recalcati et al., 2015; Simpson & McKie, 2015).

Las mitocondrias utilizan la mayor parte de hierro a nivel celular, ya que están involucradas en la biosíntesis del grupo hemo y de los clústeres Fe-S, que posteriormente serán necesarios para la síntesis de proteínas que requieren hierro, como son los citocromos o las enzimas dependientes de Fe-S (Muckenthaler et al., 2017). El metabolismo del hierro por parte de las mitocondrias es más complejo que en el resto de la célula, ya que son una fuente importante de EROs. El uso mitocondrial del hierro refleja el metabolismo celular del mismo, de hecho el hierro, el grupo hemo y los clústeres Fe-S se importan y exportan a través de las membranas mitocondriales, aunque no se conocen todos los transportadores involucrados en el proceso (Paul & Nesbitt, 2016). Incluso las mitocondrias pueden almacenar una parte del exceso del hierro en un tipo de ferritina mitocondrial, que también puede modificar la distribución celular de hierro al atraerlo del citosol hacia las mitocondrias (Arosio & Levi, 2010).

Por otra parte, el grupo hemo y los clústeres Fe-S también pueden insertarse en proteínas presentes en el citoplasma, (dioxigenasas y sintasas de óxido nítrico), en membranas (oxidadasas y ciclooxigenasas de NADPH) o en otros orgánulos. Además otras enzimas involucradas en funciones celulares esenciales requieren también hierro,

como las encargadas de la detección y adaptación al oxígeno (dioxigenasas dependientes del 2-oxoglutarato), síntesis de proteínas (desoxifusina hidroxilasa) o síntesis y reparación del ADN (ribonucleótido reductasa). También quinasas involucradas en el crecimiento celular requieren hierro (quinasa dependiente de ciclina 1, CDK1) (Xue et al., 2016).

2.1.3.3 Almacenamiento

La concentración de ferritina junto con la de hemosiderina refleja los depósitos de hierro del cuerpo. Almacenan el hierro en una forma insoluble y están presentes principalmente en el hígado, el bazo y la médula ósea, aunque todas las células nucleadas sintetizan ferritina para regular los niveles de hierro intracelular. La mayor parte del hierro que excede de las necesidades celulares inmediatas, se une a una proteína ubicua, la ferritina citosólica, capaz de almacenar hasta 4500 átomos de hierro en una estructura con forma de caparazón formada por 24 cadenas, que comprenden cadenas pesadas (H), con actividad de ferroxidasa, y cadenas ligeras (L) (Arosio et al., 2015). En situaciones de sobrecarga de hierro, éste puede depositarse en los tejidos en forma de partículas. En esos depósitos el hierro se encuentra la hemosiderina, cuya cubierta proteica está parcialmente degradada, permitiendo la unión del hierro. Así forma grupos insolubles y grandes en el interior celular, los cuales son visibles con microscopía óptica (Worwood, 2008).

Teniendo en cuenta la importancia del hierro en la generación de EROs, la inducción de la síntesis de ferritina se ve influenciada no solo por los niveles de hierro sino también por las condiciones de estrés oxidativo, que pueden estimular la expresión



de ferritina también a nivel transcripcional (Cairo et al., 1995; Tosha et al., 2012). La ferritina también está presente en la circulación y su concentración está estrechamente relacionada con las reservas corporales de hierro; por lo tanto, la ferritina sérica es un parámetro usado ampliamente para controlar la sobrecarga y la deficiencia de hierro. La ferritina secretada tiene utilidad clínica debido a su papel en diversas funciones tales como, el suministro de hierro, la angiogénesis, la inmunidad, entre otros (Wang et al., 2010). Lleva a cabo dos actividades principales. La primera es la entrada de hierro ferroso mediante una reacción redox catalítica con O_2 y la formación de $Fe^{3+}O$ (nucleación y crecimiento mineral). La segunda es la reducción/disolución del mineral con salida o quelación de hierro ferroso (Theil, 2013).

2.1.3.4 Excreción

Teniendo en cuenta que la absorción del hierro no es sencilla y que es un elemento esencial para nuestro organismo, una vez absorbido existe una maquinaria eficaz que permita reutilizar la mayor cantidad posible y evitar que se produzcan grandes pérdidas. Es por ello que los mecanismos por los cuales se produce la eliminación del hierro son escasos en nuestro organismo (Ganz, 2013).

A pesar de ello, existen pérdidas de hierro diarias a través de la exfoliación fisiológica de las células de las superficies epiteliales, incluyendo la piel, el tracto genitourinario y el tracto gastrointestinal, en el sudor y la orina (Hunt et al., 2009). Estas pérdidas diarias son muy limitadas y representan en los hombres aproximadamente 0.9mg y en las mujeres 1mg. La menstruación (promedio de 30 días) incrementa las pérdidas en las mujeres en edad fértil, en una media de 0.6-0.7mg (Abbaspour et al.,

2014). Una pérdida menstrual de hierro excesiva puede ser causa de ferropenia. Aunque no se han identificado mecanismos para la regulación de la excreción del hierro en los seres humanos, si se producen cambios compensatorios pasivos.

2.1.4 Déficit de hierro. Anemia ferropénica nutricional

La deficiencia de hierro implica el agotamiento de los niveles de hierro total del organismo, especialmente el de depósito presente en los hepatocitos y macrófagos. Teniendo en cuenta que la mayor cantidad de hierro se utiliza para la síntesis de la hemoglobina implicada en la producción de millones de eritrocitos al día, la anemia es el signo más evidente de deficiencia de hierro, y la anemia por deficiencia de hierro a menudo se considera sinónimo de deficiencia de hierro. Sin embargo, la deficiencia de hierro es una patología más amplia que generalmente precede a la aparición de la anemia y que indica deficiencia de hierro en órganos o tejidos distintos a los involucrados en la eritropoyesis, como pueden ser el músculo esquelético y el corazón, que son altamente dependientes de hierro para la producción de mioglobina y energía necesarias para mantener la contracción mecánica.

Esta deficiencia representa un desequilibrio entre los requerimientos del organismo y la cantidad de hierro absorbida. En los países desarrollados, la causa más común de este desequilibrio es la ingesta inadecuada de hierro en la dieta. En los países en vías de desarrollo, son otras las causas más frecuentes de la deficiencia de hierro, tales como las infecciones parasitarias o la pérdida de sangre. En condiciones normales, la absorción de hierro sería suficiente para reemplazar las pérdidas diarias anteriormente mencionadas y para mantener un nivel normal de hierro en suero y de reserva (Burke et



al., 2001). Aunque esta deficiencia representa un importante problema de desnutrición a nivel mundial, se hace más presente en los países en desarrollo, donde no está siendo controlada adecuadamente por las intervenciones de salud pública y nutrición (Stoltzfus, 2003). Además la deficiencia de hierro afecta a grandes poblaciones en el mundo industrializado. En Europa, la deficiencia de hierro se considera uno de los principales trastornos por deficiencia nutricional (Hercberg et al., 2007).

Más de dos mil millones de personas en todo el mundo están afectadas por esta deficiencia y la anemia por deficiencia de hierro sigue siendo la principal causa de anemia (Camaschella, 2015). La OMS estima que el 39% de los niños menores de 5 años, el 48% de los niños entre 5 y 14 años, el 42% de todas las mujeres y el 52% de las mujeres embarazadas en los países en desarrollo son anémicos, de los cuales la mitad tiene anemia por deficiencia de hierro. Según la OMS, la frecuencia de deficiencia de hierro en los países en desarrollo es aproximadamente 2 a 5 veces mayor que la de la anemia. Aunque la deficiencia de hierro también es común en mujeres y niños pequeños en países industrializados (Zimmermann & Hurrell, 2007). Además la anemia por deficiencia de hierro es una de las cinco causas principales de enfermedad discapacitante, siendo la primera causa en las mujeres. Para establecer una correcta definición de anemia se debe utilizar la concentración plasmática de hemoglobina, cuyos valores son específicos en función del género y están basados en una distribución estadística de los niveles de hemoglobina en la población sana. En base a los valores de referencia de hemoglobina establecidos por la OMS (13 g/dL en varones, 12 g/dL en mujeres, 11g/dL durante el embarazo), se ha observado que la anemia afecta a un tercio de la población (Camaschella, 2019).



A nivel mundial, la anemia por deficiencia de hierro o anemia ferropénica nutricional (AFN), tiene un importante impacto médico y social, lo que explica el deterioro del rendimiento cognitivo en niños pequeños, resultados adversos del embarazo tanto para las madres como para los recién nacidos, disminución de la capacidad física y laboral en los adultos y deterioro cognitivo en los ancianos (Camaschella, 2019). Después de la desnutrición proteico-calórica, la AFN es la segunda carencia nutricional a nivel mundial, caracterizada principalmente por la ausencia o reducción de los depósitos de hierro, como se ha mencionado anteriormente, así como un nivel bajo de hierro sérico y de hemoglobina, reducción del hematocrito y mayor nivel de plaquetas (Campos et al., 1998). Además el porcentaje de saturación de transferrina se verá disminuido junto con la concentración de ferritina sérica. Por el contrario, la capacidad total de fijación al hierro (TIBC), se verá drásticamente aumentada.

2.1.4.1 Causas

La anemia por deficiencia de hierro es el resultado del agotamiento de las reservas de hierro, que tiene lugar cuando la absorción no puede mantener las demandas metabólicas necesarias para mantener el crecimiento y reponer la pérdida de hierro, durante un período de tiempo prolongado (Abbaspour et al., 2014).

Las causas que pueden provocar la aparición de anemia por deficiencia de hierro pueden variar mucho, dependiendo de la población, nivel de desarrollo, género, requerimientos... La desnutrición, la hambruna y la pobreza pueden ser causas que expliquen la presencia de anemia ferropénica nutricional en personas que viven en



países en vías de desarrollo, especialmente en niños y mujeres embarazadas. Los alimentos presentes en la dieta también pueden incidir en la aparición de la anemia. Dietas ricas en cereales disminuyen la biodisponibilidad del hierro ya que los fitatos presentes secuestran el hierro formando un complejo poco absorbible. Otras causas comunes en los países en desarrollo incluyen las infecciones por anquilostomas y la esquistosomiasis, que causan pérdida crónica de sangre (Kassebaum et al., 2014).

En países desarrollados la malabsorción, la pérdida crónica de sangre como resultado de fuertes pérdidas menstruales y el auge de estilos de vida con dietas veganas estrictas o vegetarianas son causas importantes de anemia por deficiencia de hierro. La pérdida crónica de sangre del tracto gastrointestinal, incluida la sangre oculta, especialmente presente en pacientes varones y ancianos, puede revelar la presencia de lesiones benignas, angiodisplasia o cáncer. Los donantes de sangre también corren el riesgo de presentar deficiencia de hierro, y sus niveles de hierro deben ser controlados (Camaschella, 2015). Las pérdidas de hierro por la orina, en situaciones raras de hemólisis intravascular, pueden agravar la anemia, como ocurre en la hemoglobinuria paroxística nocturna. También pueden aparecer casos de anemia por déficit de hierro en atletas de resistencia, debido a la hemólisis, pérdida de sangre y, a menudo, inflamación leve. Además, los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos y los anticoagulantes pueden contribuir a la pérdida de sangre. Otros medicamentos que pueden alterar la absorción de hierro y que frecuentemente no son tenidos en cuenta, son los inhibidores de la bomba de protones (Heidelbaugh, 2013; Camaschella, 2015). En personas de edad avanzada, la prevalencia de anemia se correlaciona con la edad y múltiples afecciones relacionadas, incluida la deficiencia de hierro, trastornos inflamatorios, niveles disminuidos de eritropoyetina y cáncer. La obesidad puede estar asociada con una

deficiencia leve de hierro debido a la inflamación subclínica, niveles elevados de hepcidina y disminución de la absorción de hierro. Pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva presentan una alta prevalencia de deficiencia de hierro (30 a 50%), probablemente debido a la inflamación y a la alteración de la absorción de hierro (Jankowska et al., 2013; Cohen-Solal et al., 2014).

La combinación simultánea de múltiples causas de deficiencia de hierro, que conlleven a la aparición de anemia ferropénica nutricional, es habitual. A continuación se describen las causas más comunes:

- Malabsorción de hierro

En situación de anemia por deficiencia de hierro, el intestino es el encargado de absorber la cantidad suficiente de hierro que permita prevenir o tratar la anemia. Como se ha mencionado anteriormente, la absorción del hierro (especialmente el inorgánico), requiere de un conjunto de mecanismos complejos que permitan su entrada al organismo en el duodeno o yeyuno por los enterocitos. La absorción de hierro ha de ser evaluada en situaciones en las que pueda sospecharse una malabsorción del mismo, mediante una prueba de absorción de hierro por vía oral (Alleyne et al., 2008). Además si aparecen desórdenes en la síntesis de las proteínas implicadas en el metabolismo del hierro, (hepcidina, FPN1, DMT1...) pueden indicar algún problema de malabsorción. Así pues, niveles elevados de hepcidina disminuirían la entrada de hierro inorgánico de la dieta, ya que se acumularía en el enterocito, pero no pasaría a la sangre y sería eliminado a través de las heces después de la descamación de las células epiteliales (Anderson et al., 2009). Cualquier situación que altere la expresión de estas proteínas,



como los procesos infecciosos o la inflamación, modificarían la absorción de hierro no hemo a pesar de que la biodisponibilidad a partir de la dieta fuera alta.

La enfermedad celíaca constituye uno de los grupos con mayor riesgo de sufrir anemia ferropénica nutricional. La enfermedad celíaca conduce a una respuesta inmune anormal, que es seguida por una inflamación crónica de la mucosa del intestino delgado que provoca la desaparición progresiva de las vellosidades intestinales. Esto conduce a una disminución en la absorción de muchos nutrientes, incluido el hierro (Martín-Masot et al., 2019).

- Dieta

El hierro presente en los alimentos y su biodisponibilidad influyen de manera significativa en la aparición o no de anemia ferropénica nutricional. La biodisponibilidad del hierro inicialmente podría considerarse sinónimo de absorción y se determinó por solubilidad *in vitro*. Cuanto más soluble sea el hierro, mayor será su absorción potencial y por lo tanto su biodisponibilidad. La biodisponibilidad de hierro se define actualmente como la proporción de hierro ingerido que es absorbido por el intestino y utilizado a través de vías metabólicas normales o almacenado en el organismo. Se ve influenciado por múltiples factores dietéticos y se expresa como un porcentaje de la ingesta (Aggett, 2010). La absorción del hierro hemo no se ve prácticamente afectada por las interacciones entre componentes de la dieta, pero la forma hemo del hierro constituye únicamente de entre un 10-15% del hierro dietético total, por lo tanto no constituye la fuente principal de hierro. Como se ha mencionado anteriormente, el hierro inorgánico si lo es. Además actualmente hay estudios que indican que un aumento excesivo de la ingesta de hierro hemo para evitar la aparición

de ferropénica podría estar relacionado con un aumento del estado oxidativo del organismo, con la aparición de cáncer de colon... (Turner & Lloyd, 2017). Aunque pueda parecer obvio, la cantidad de hierro ingerido es un requisito para que este sea biodisponible, ya que aunque se ingieran potenciadores de su absorción, de nada sirven si este no está presente en la dieta. Además es importante tener en cuenta que las interacciones que puedan ocurrir en el tracto gastrointestinal tienen lugar varias horas después de la ingestión, por lo que tanto la cantidad de hierro ingerido, como la composición de la dieta y el tiempo entre comidas influyen.

Así pues la presencia en la dieta de factores que disminuyan o inhiban la absorción y biodisponibilidad del hierro puede ser causa de aparición de anemia ferropénica nutricional. De entre los más comunes:

- Calcio y otros metales divalentes: pueden interactuar con el hierro para su entrada en el enterocito a través del DMT1. Además el calcio puede afectar a la absorción tanto del hierro hemo como del inorgánico, de manera similar, por lo que se estima que la inhibición que ejerce el calcio puede que ocurra después de que el grupo hemo se libere del anillo de porfirina. Estudios han puesto de manifiesto que la ingesta de 165 mg de calcio como leche o derivados reduce la absorción de hierro en un 50-60% (Dasa & Abera, 2018). También se ha informado que el exceso de zinc reduce la absorción de hierro, y viceversa, una interacción que puede ser particularmente relevante en el embarazo y la infancia (Blanco-Rojo & Vaquero, 2019).
- Fitatos: presentes en los cereales integrales y legumbres, inhiben el proceso de absorción de hierro no hemo, dependiendo del número de fosfatos unidos

al anillo de inositol. Durante la digestión pueden cargarse negativamente, adquiriendo un potencial que favorezca la unión de iones metálicos cargados positivamente, como el hierro. El hexanofosfato de inositol y el pentafosfato de inositol son los inhibidores de hierro más potentes, y el efecto dependerá de la dosis (Hurrell & Egli, 2010).

- Polifenoles: son un grupo heterogéneo de compuestos vegetales ampliamente conocidos por su interacción con el hierro y otros metales. Durante la digestión estos compuestos fenólicos se liberan y pueden formar complejos con el hierro en la luz intestinal, disminuyendo su absorción. La fuerza de la quelación de hierro depende de la estructura de los polifenoles. Aunque presentan efectos beneficiosos en nuestro organismo debido a sus propiedades antioxidantes, pudiendo proteger contra enfermedades crónicas, cardiovasculares y varios tipos de cáncer. Como inhibidores de la absorción de hierro se encuentran el té negro y, en menor medida, el té verde, chocolate, café, vino, hierbas y especias... (Hurrell & Egli, 2010).

- Pérdida de sangre

La pérdida intensa de sangre como resultado de la menstruación, pérdidas crónicas en el tracto gastrointestinal o infecciones parasitarias, pueden reducir la concentración de hemoglobina en sangre e inducir la aparición de anemia ferropénica nutricional (de Benoist et al., 2008).

Las mujeres presentan una mayor pérdida de sangre menstrual durante su edad reproductiva, cuando la pérdida de hierro es mayor y los requerimientos están



aumentados debido a la etapa de crecimiento. Hay importantes variaciones individuales, pero en una misma mujer las variaciones son pequeñas en las diferentes etapas de la vida. De manera general puede considerarse que cada mililitro de sangre perdido equivaldría a una pérdida de 0.5mg de hierro. Si la pérdida menstrual de sangre es abundante (>80ml al mes), el riesgo de anemia por deficiencia de hierro aumenta drásticamente. Además, los métodos anticonceptivos influyen en las pérdidas de sangre menstruales, siendo mayores en mujeres que utilizan dispositivos intrauterinos y menores para aquellas que utilizan métodos anticonceptivos orales. Durante el parto se pierden con el sangrado unos 250mg de hierro, siendo mayor en los partos por cesárea, donde el sangrado prácticamente es el doble que en un parto normal (Zimmermann & Hurrell, 2007; Miller, 2013).

Dentro de las causas más frecuentes de pérdidas de sangre del tracto gastrointestinal se encuentran el carcinoma gástrico, el de colon, la úlcera gástrica benigna y la angiodisplasia. En los países en vías de desarrollo las infecciones de parásitos gastrointestinales como *Trichuris trichiura* y *Necator americanus* (anquilostoma), pueden llegar a representar un tercio de la anemia por deficiencia de hierro. Las infecciones por anquilostoma pueden llegar a afectar a más de 700 millones de personas en regiones tropicales y subtropicales. En áreas endémicas se estima que dicha infección representa el 35% de la anemia por deficiencia de hierro y el 73% de su forma grave (Zimmermann & Hurrell, 2007; Lopez et al., 2016). En las regiones tropicales, la malaria contribuye a la aparición de anemia por deficiencia de hierro debido a la hemólisis intravascular que causa, provocando pérdidas de hierro en la orina. La expresión de eritropoyetina (EPO) se ve afectada debido a la respuesta inmune

desencadenada por la malaria (Skorokhod et al., 2010) y los niveles de hepcidina aumentan disminuyendo los niveles de hierro (Portugal et al., 2011).

Muchos medicamentos se relacionan con la anemia por deficiencia de hierro, debido a que pueden aumentar la pérdida de sangre (medicamentos antiinflamatorios no esteroideos) o disminuir la absorción de hierro (inhibidores de la bomba de protones y antagonistas de los receptores H₂) (Camaschella, 2017).

La pérdida excesiva de sangre quirúrgica sin reemplazo también puede conducir a la anemia por deficiencia de hierro, así como hematuria, epistaxis o hemoptisis que ocurren con mucha menos frecuencia. La donación frecuente de sangre o las hemorragias nasales también pueden ser causas de pérdidas de sangre que pasan desapercibidas a menudo.

- Deficiencia de hierro materno-fetal

Como se ha mencionado anteriormente, los requerimientos de hierro se incrementan durante el embarazo, siendo necesarios unos 1200mg de hierro desde la concepción hasta el parto (Anderson & Frazer, 2017). Durante el embarazo los requerimientos aumentan tres veces debido a la expansión de la masa eritrocitaria materna y al crecimiento de la unidad fetal-placentaria. Las demandas fetales priman sobre las de la madre pudiendo causar la deficiencia de hierro. Tras el parto, las pérdidas de hierro se producen a través de la leche materna en forma de lactoferrina (0.25-0.80 mg/L de hierro al día), aunque estas pérdidas se compensan debido a que la mayoría de las madres en ese periodo son amenorreicas y por tanto los requerimientos de hierro disminuyen (Zimmermann & Hurrell, 2007; Lopez et al., 2016).



2.1.4.2 Consecuencias

Las consecuencias de la anemia ferropénica nutricional derivan de la propia deficiencia de hierro y de todas las implicaciones que esto conlleva, debido a la implicación del hierro como elemento esencial en múltiples funciones vitales, como se ha mencionado anteriormente. La anemia es un indicador de alteraciones relacionadas con la nutrición, pudiendo tener efectos graves sobre la salud materna e infantil debido al aumento del riesgo de mortalidad (de Benoist et al., 2008).

En el organismo, el hierro presente en las células es necesario para llevar a cabo funciones esenciales como el transporte de oxígeno a los tejidos desde los pulmones gracias a su unión a la hemoglobina. Una disminución de los niveles de hemoglobina podría afectar al rendimiento físico y a la capacidad de trabajo aeróbico, ya que se reduce la capacidad de transporte de oxígeno (Coad & Pedley, 2014). También puede verse afectado el transporte y el almacenamiento de oxígeno en el músculo cuando se alteran los niveles de mioglobina, pudiendo asociarse con una disminución del rendimiento. Aunque la deficiencia de hierro no esté asociada con una disminución de la capacidad de transporte de oxígeno de la sangre, sí provoca una disminución de los niveles de enzimas deshidrogenasas dependientes de hierro y que están involucradas en la oxidación del sustrato y en los citocromos que están involucrados en la cadena de transferencia de electrones. Así pues la deficiencia de hierro afectaría a la eficiencia energética, la resistencia, las respuestas metabólicas, la adaptación aeróbica y la fatiga muscular. Además la anemia ferropénica afecta también a la capacidad aeróbica; reduce el consumo máximo de oxígeno por lo que la capacidad de resistencia se ve



comprometida y afecta al rendimiento físico y la capacidad de trabajo (Coad & Pedley, 2014).

El déficit de hierro y la anemia ferropénica pueden afectar muy negativamente al embarazo. Niveles bajos de hemoglobina o hematocrito se han correlacionado con partos prematuros, bajo peso al nacer y con morbi-mortalidad perinatal. Según los datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la anemia está asociada con el 40% de las muertes maternas en todo el mundo (Breyman, 2015). La anemia por deficiencia de hierro puede ocasionar consecuencias muy graves en las mujeres embarazadas, tales como una elevada mortalidad con alta pérdida de sangre, mayor esfuerzo cardiovascular, disminución del rendimiento físico y mental, reducción de las reservas de sangre, mayor riesgo de transfusión de sangre, síndrome de leche insuficiente en la anemia posparto... Los estudios disponibles han puesto de manifiesto los resultados maternos y fetales en relación con la gravedad de la anemia, pero no en relación con la duración o el inicio de la anemia. Teniendo esta premisa en cuenta, varios autores han postulado una asociación entre la mortalidad materna y el grado de anemia. Sin embargo, no hay estudios prospectivos que lo investiguen y no queda claro qué nivel de hemoglobina es crítico con respecto a la mortalidad materna. Según el informe sobre la deficiencia de hierro del Grupo de Referencia de Epidemiología de Salud Infantil (CHERG), el riesgo de mortalidad materna disminuye significativamente por cada aumento de hemoglobina de 1 g / dL (Murray-Kolb et al., 2012). Hasta la fecha, no se han realizado estudios que investiguen la asociación entre la anemia por deficiencia de hierro antes del embarazo y el curso del embarazo, y tampoco hay estudios prospectivos en grandes poblaciones que demuestren el efecto de la intervención temprana y el



tratamiento de la anemia en la madre, el feto y el embarazo y resultados neonatales (Breyman, 2015).

Aunque hasta no hace muchos años existía la idea de que los niveles de hierro maternos no tenían impacto sobre los del recién nacido y lactante, salvo en ocasiones de anemia materna severa (Olivares & Walter, 2004), actualmente se ha puesto de manifiesto que en el feto, la anemia ferropénica materna puede provocar retraso del crecimiento intrauterino, prematuridad, muerte en el útero o infección. Existe asociación entre el momento y duración de la anemia ferropénica y los cambios patológicos feto-placentarios (Breyman, 2015). Así pues la deficiencia de hierro puede afectar muy negativamente al recién nacido pudiendo condicionar su crecimiento y el funcionamiento de múltiples órganos, músculo esquelético, corazón y tracto gastrointestinal. Particularmente niveles bajos de hierro pueden afectar al correcto desarrollo cerebral y cognitivo así como a la homeostasis cerebral, afectando etapas posteriores de la vida (Wenger & DellaValle, 2019; Moreno-Fernández et al., 2019a; Moreno-Fernandez et al., 2019c).

Hay que tener en cuenta que la anemia ferropénica se instaura de manera progresiva y en pacientes jóvenes suele ser bien tolerada, llegando a ser asintomática y pudiendo dificultarse su diagnóstico. Así pues es necesario prestar atención a ciertos síntomas que aunque raramente, aparecen en procesos prolongados. De entre ellos se encuentra la necesidad o deseo de comer o lamer sustancias sin valor nutricional como la tierra (pica), el deseo de comer hielo (pagofagia), caída de cabello, afectación de las uñas, glositis atrófica (trastornos tróficos epiteliales), presencia de escleróticas azules, infecciones de repetición... (Moya Arnao et al., 2016). Por lo tanto, para proceder a un correcto diagnóstico es necesario evaluar las modificaciones que la deficiencia de hierro

puede ocasionar en las proteínas relacionadas con el metabolismo del hierro o con los índices hematológicos. Según Moya Arnao et al., (Moya Arnao et al., 2016) en la anemia ferropénica los niveles de dichos parámetros se ven alterados (Tabla 2).

Tabla 2. Parámetros característicos de la anemia y del estado funcional del hierro.

| Parámetro | Valor diagnóstico | Anemia ferropénica |
|--|---|---|
| Ferritina | Reserva de hierro | Valores < 30 ng/ml |
| Capacidad total de fijación del hierro | Capacidad de transporte | Disminuida en la ferropenia |
| Índice de saturación de la transferrina | Sitios de la transferrina ocupados por el hierro | Disminuye con el déficit de hierro |
| Receptor soluble de la transferrina | Masa eritropoyética | Niveles incrementados |
| Índice receptor soluble de la transferrina-ferritina | Útil en situaciones de inflamación y, por tanto, falsa elevación de la ferritina. | Índice superior a 2 sugiere ferropenia |
| Volumen corpuscular medio (VCM) | Efecto sobre la eritropoyesis | Inferior a 80 fl |
| Hemoglobina corpuscular media (HCM) | | Disminuida en la ferropenia |
| Frotis de sangre periférica | Estudio morfológico de los elementos formes | Anisopoiquilocitosis, con microcitosis e hipocromía |

Fuente: Elaboración propia.

2.1.4.3 Tratamiento de la ferropenia

La etiología de la deficiencia de hierro o de la anemia ferropénica ha de abordarse e intentar eliminarla siempre que sea posible. El objetivo del tratamiento estará centrado en corregir la deficiencia de hierro para normalizar la concentración de hemoglobina y reponer las reservas de hierro, para así mejorar los síntomas, calidad de vida y el pronóstico. Para corregir la deficiencia de micronutrientes en la población

existen cuatro estrategias principales que se pueden utilizar solas o en combinación para corregir la ferropdeficiencia.

- Educación en buenas prácticas dietéticas combinada con modificación en la dieta que permita mejorar la ingesta y la biodisponibilidad del hierro.

Se pretende incluir modificaciones dietéticas que impliquen una mayor ingesta de alimentos ricos en hierro, especialmente carnes y pescados, un mayor consumo de frutas y verduras ricas en ácido ascórbico para mejorar la absorción de hierro no hemo y una ingesta reducida de té y café, y otras sustancias que pueden inhibir la absorción de hierro no hemo, como se ha mencionado anteriormente (WHO/FAO, 2004). Asimismo se pretende concienciar de la reducción de sustancias que puedan afectar a la disponibilidad del hierro. Mediante técnicas como la germinación y la fermentación se promueve la hidrólisis enzimática del ácido fítico en cereales y legumbres integrales debido a la mejora de la actividad de las enzimas fitasas endógenas o exógenas (Cook, 2005). EL uso de métodos no enzimáticos como el remojo, el procesamiento térmico y la molienda también permiten reducir el contenido de ácido fítico en los alimentos y ha demostrado que permite mejorar la biodisponibilidad del hierro (Schlemmer et al., 2009).

- Suplementación con hierro (generalmente en dosis más altas y no a través de los alimentos).

La suplementación con hierro se usa básicamente en dos escenarios clínicos, para prevenir la anemia por deficiencia de hierro en poblaciones en riesgo, o para tratar pacientes con la enfermedad comprobada. Cuando los cambios en la dieta por sí solos

no pueden restaurar las reservas de hierro y la hemoglobina a niveles normales, o cuando la anemia es grave, se debe comenzar el tratamiento con suplementación de hierro.

La dosis total del suplemento de hierro se puede calcular con fórmulas específicas, como la fórmula de Ganzoni (hemoglobina objetivo (g/dL) - hemoglobina real (g/dL) \times 2.4 \times peso corporal (kg) + 500 mg) o pautas específicas según especificaciones del fabricante, pero no existe una dosis estándar de hierro para el tratamiento (Joosten, 2018). Dicha suplementación podrá suministrarse de manera oral o parenteral.

Suplementación oral de hierro

La suplementación oral suele ser generalmente el tratamiento de elección para la deficiencia de hierro o anemia ferropénica sin complicaciones.

La suplementación oral con hierro puede llevarse a cabo a través de cuatro preparaciones comunes, sulfato ferroso, sulfato ferroso desecado, gluconato ferroso y fumarato ferroso. No existen evidencias de que un compuesto sea mejor que los demás. La dosis habitual recomendada es de 325 mg (correspondiente a 65 mg de hierro elemental), tres veces al día. Aunque se ha puesto de manifiesto que dosis más bajas (200 mg dos veces al día) pueden ser efectivas y presentan menos efectos secundarios (Goddard et al., 2011). Incluso se ha demostrado que la suplementación oral de hierro a dosis mayores o iguales a 60 mg, aumenta la hepcidina sérica durante 24 horas, reduciendo la absorción de hierro (Moretti et al., 2015). El sulfato ferroso y el gluconato ferroso (sales de hierro ferroso) suelen ser las más utilizadas debido a su elevada



biodisponibilidad y bajo coste (Larocque et al., 2005). La absorción de hierro se ve incrementada cuando la suplementación se lleva a cabo con el estómago vacío, pero puede dar lugar a la aparición de efectos no deseados como náuseas y dolor epigástrico que son más frecuentes a dosis altas. También es frecuente la aparición de diarrea, estreñimiento, coloración oscura de las heces, todo lo cual afecta negativamente a la adherencia del tratamiento (Elstrott et al., 2020). Otros efectos no deseados que puede causar la suplementación oral, es que el hierro no absorbido puede producir alteraciones en la composición del microbioma intestinal, con reducción de las bacterias beneficiosas presentes (*Lactobacillus* y *Bifidobacterium*), aumento de posibles patógenos (*Enterobacteriaceae*) y aumento de la inflamación y la diarrea (Jaeggi et al., 2015).

Para evitar o reducir dichos efectos se recomienda la toma de una menor dosis entre comidas o proporcionar el hierro con las comidas, a pesar de la presencia de alimentos que puedan reducir la absorción del hierro. La dosificación en días alternos también está siendo objeto de investigación, ya que podría tener menos efectos secundarios gastrointestinales e induciría niveles más bajos de hepcidina en comparación con la dosificación diaria convencional (Stoffel et al., 2017). Otros factores que pueden afectar la absorción de sales de hierro incluyen antiácidos, antagonistas de los receptores H_2 , inhibidores de la bomba de protones, antibióticos (quinolonas, tetraciclinas) y alimentos y bebidas que contienen calcio (Barragán-Ibañez et al., 2016; Widiada, 2020).

Aunque los beneficios de la suplementación con hierro generalmente se consideran mayores que los riesgos, hay que tener en cuenta que a pesar de que es necesario tratar la ferropdeficiencia, se debe tener precaución en circunstancias especiales. En zonas endémicas de malaria, dicha suplementación puede aumentar la



parasitemia o incluso la malaria clínica en niños (Sazawal et al., 2006). Se ha puesto de manifiesto que la FPN expresada en los eritrocitos es funcional, pero si los niveles de hepcidina son altos (debido a la suplementación de hierro), deja de serlo. Esta situación favorecería el contenido de hierro en los eritrocitos y por tanto el crecimiento del parásito (Zhang & Wu, 2018). Sería necesario que la suplementación de hierro fuera en asociación con un tratamiento antipalúdico (Neuberger et al., 2016). También se ha observado que la suplementación puede tener efectos negativos en otro tipo de infecciones como la infección respiratoria aguda o la diarrea (Pasricha et al., 2013; Pasricha & Drakesmith, 2016).

Aunque se sigan las recomendaciones y precauciones mencionadas anteriormente, la respuesta a la suplementación oral de hierro puede no ser suficiente debido a (Barragán-Ibañez et al., 2016):

- Malabsorción de hierro por la ingesta simultánea de inhibidores de la absorción de hierro o por trastornos digestivos como la celiaquía, el síndrome de intestino irritable o infección por *Helicobacter pylori*.
- Pérdida de hierro o aumento de los requerimientos de hierro por sangrado gastrointestinal, sangrado uterino disfuncional debido a enfermedad o trastorno de la coagulación familiar como la enfermedad de von Willebrand o insuficiencia renal en respuesta a agentes estimulantes de la eritropoyetina.
- Afectación simultánea de la médula ósea por infección, inflamación, cáncer, insuficiencia renal, deficiencia de vitamina B₁₂ o folato.
- Diagnóstico incorrecto de síndrome mielodisplásico, anemia familiar o trastornos endocrinos.



Suplementación parenteral de hierro

La suplementación parenteral de hierro está indicada en pacientes con intolerancia o que no respondan a la suplementación oral, que presenten malabsorción gastrointestinal, enfermedad inflamatoria intestinal, pérdida de sangre abundante, enfermedad renal crónica moderada a severa.

La suplementación parenteral de hierro puede llevarse a cabo a través de seis formas principales de hierro intravenoso, sacarosa de hierro, gluconato férrico, carboximaltosa férrica, isomaltosido de hierro 1000, ferumoxitol e hierro dextrano (formas de bajo peso molecular). Estos compuestos comprenden un núcleo que contiene una sal de hierro, como el oxihidróxido de hierro, rodeado por una cubierta de carbohidratos. El compuesto es procesado por el sistema reticuloendotelial. Posteriormente, el hierro se libera del complejo y se almacena en ferritina o se exporta a través de ferroportina, y se une a la transferrina (Lopez et al., 2016). Todas las formulaciones tienen equivalentes eficacia y perfiles de seguridad similares (Bircher & Auerbach, 2014).

A pesar de las indicaciones que presenta la suplementación parenteral de hierro (anteriormente expuestas), la posibilidad de que surjan reacciones de hipersensibilidad (incluida la anafilaxia) a algunos de las formulaciones intravenosas como el hierro dextrano, ha limitado la administración de hierro parenteral (Camaschella, 2015). Actualmente la indicación de hierro intravenoso ha aumentado debido a que las formulaciones presentan menos efectos secundarios y mayor seguridad. Aun así la administración parenteral de hierro deberá llevarse a cabo por personal capacitado



únicamente, en un lugar adecuado y con acceso a instalaciones de reanimación. Se realizará lentamente y bajo monitorización. Pacientes que presenten antecedentes de alergia al hierro o a medicamentos relacionados, deberán de ser evaluados pormenorizadamente antes del inicio del tratamiento y probablemente excluidos del mismo, así como las mujeres en el primer trimestre de embarazo, debido a la falta de datos de seguridad al respecto (Camaschella, 2017).

Se ha puesto de manifiesto que el hierro intravenoso es más eficaz que el oral en la corrección de la anemia ferropénica y que generalmente se tolera mejor, aunque su administración está limitada por su disponibilidad y coste (Muñoz et al., 2018). Además evita el daño oxidativo en la mucosa intestinal (Nielsen et al., 2015) y preserva el microbioma normal (Lee et al., 2017). Las nuevas formulaciones comerciales permiten la administración de altas dosis de hierro (hasta 1 g) en una sola inyección. Esto permite no solo corregir el déficit de hemoglobina, sino también replecionar rápidamente las reservas (Auerbach & Adamson, 2016) y es especialmente útil en pacientes con movilidad reducida, evitando visitas repetidas al hospital y para los cuales la suplementación oral puede llegar a ser especialmente molesta (Girelli et al., 2018), así como cuando se necesita una recuperación rápida (como en el segundo y tercer trimestre del embarazo o en la anemia posparto) (Holm, 2018). Dosis altas de hierro intravenoso pueden ser utilizadas en pacientes que van a someterse a un proceso quirúrgico en el que se prevé sangrado abundante, para prevenir la aparición de la anemia postoperatoria aguda y una alternativa a las transfusiones de sangre, que están asociadas con varias complicaciones postoperatorias, incluidas las infecciones (Camaschella, 2019).

Aunque de manera general la suplementación parenteral de hierro es segura, al igual que la suplementación oral de hierro, puede presentar efectos adversos no



deseados. Entre ellos destaca la aparición de náuseas, vómitos, prurito, dolor de cabeza y sofocos. También puede aparecer mialgia, artralgia y dolor de espalda y pecho que generalmente se resuelven en 48 horas. Con las nuevas formulaciones las reacciones de hipersensibilidad son raras, al igual que las reacciones graves o potencialmente mortales (Auerbach et al., 2013). Hay que tener en cuenta también que como se ha mencionado anteriormente, el hierro es un factor de crecimiento esencial para ciertos patógenos por lo que esta terapia está contraindicada en procesos infecciosos (Camaschella, 2019).

Transfusión de sangre

Cuando la suplementación oral o parenteral no permite alcanzar los objetivos propuestos o presenta efectos adversos graves, la anemia ferropénica puede ser tratada mediante la transfusión de sangre.

Este tratamiento ha evolucionado a lo largo de los años, siendo una práctica común la transfusión de sangre en algunos países, aunque actualmente la sangre del donante se procesa en glóbulos rojos, plaquetas y plasma previa detección de agentes infecciosos y eliminación de leucocitos. La sangre obtenida se trata con una solución conservante que contiene anticoagulante (generalmente CPDA1) (Paul & Nesbitt, 2016).

La transfusión de glóbulos rojos es un tratamiento altamente utilizado para corregir la anemia ferropénica (Pasricha et al., 2010). Aun así, la evidencia acumulada de los últimos 30 años ha puesto de manifiesto que a pesar de los efectos positivos que



presenta, no es un tratamiento inofensivo, pudiendo existir un desequilibrio entre mantener el suministro de oxígeno en el organismo y los riesgos inherentes de la transfusión de sangre (Goodnough et al., 2013). Desde la década de 1980 las transfusiones de sangre han provocado preocupación en los pacientes y en la comunidad médica, debido a la transmisión de infecciones como el virus de inmunodeficiencia humana y el virus de la hepatitis C a través de ellas (Perkins & Busch, 2010). Desde entonces, estos riesgos han disminuido sustancialmente, sin embargo, las amenazas emergentes de patógenos transmisibles siempre son una preocupación, un ejemplo reciente es el virus Zika, en el cual los posibles donantes de sangre que están gravemente enfermos y tienen viremia pueden ser asintomáticos y no haberse detectado previamente a la donación (Fauci & Morens, 2016). Además del riesgo de contagio de infecciones, las transfusiones pueden provocar la aparición de la lesión pulmonar aguda relacionada con la transfusión, reacciones de transfusión hemolítica ABO y no asociada a ABO, enfermedad de injerto contra huésped asociada a transfusión, sobrecarga circulatoria asociada a transfusión e inmunomodulación relacionada con transfusión, entre otras (Vamvakas & Blajchman, 2009; Goodnough et al., 2013).

La transfusión de plaquetas está indicada en pacientes con trombocitopenia, para prevenir o tratar la hemorragia o en situaciones de disfunción plaquetaria. También puede transfundirse plasma fresco congelado como tratamiento de la púrpura trombocitopenia trombótica y en situaciones especiales para reemplazar los factores de la coagulación (McClelland, 2007).

Debido a los riesgos anteriormente mencionados, la Junta Estadounidense de Medicina Interna, la Asociación Médica Estadounidense, la Sociedad Estadounidense de Hematología, y la Asociación Americana de Bancos de Sangre, han considerado la



terapia de transfusión como una de las intervenciones terapéuticas más utilizadas en exceso (y probablemente inapropiadas). Así pues, se han publicado recomendaciones para la transfusión de sangre en pacientes adultos (Goodnough et al., 2013) y pediátricos (Roseff et al., 2002), que permitan que su indicación sea correcta.

Debido a que la transfusión de sangre se asocia con algunos resultados adversos de entre los que se incluye la sobrecarga de líquidos (1% de los pacientes), además de los riesgos inmunológicos e infecciosos, por lo tanto se considera que la transfusión de sangre debe ser limitada, especialmente en pacientes con anemia ferropénica crónica, como tratamiento inmediato en pacientes en los que se compromete la función de un órgano, como en la angina de pecho o insuficiencia cardíaca, isquemia aguda de miocardio, o donde la anemia ferropénica se complique por una hemorragia grave y continua con hemodinámica inestable o si todas las otras terapias no logran corregir la aparición de anemia (Pasricha et al., 2010; Camaschella, 2015; Jimenez et al., 2015). La administración de la terapia de hierro adecuada puede minimizar el uso de transfusiones de sangre.

- Fortificación de los alimentos con hierro.

La fortificación es la adición de uno o más nutrientes esenciales a los alimentos con el fin de prevenir o corregir una deficiencia demostrada de uno o más nutrientes en la población o grupos de población específicos (WHO, 2015). La fortificación de alimentos permite alcanzar las necesidades nutricionales diarias sin depender de suplementos farmacéuticos, con un coste/beneficio rentable. Permite aumentar los niveles de hierro a través de los alimentos, a través del mecanismo de absorción regular



de la dieta, con un aumento gradual de los niveles de hierro de la población. Su efecto no es tan rápido como el de la suplementación, pero permite obtener beneficios sostenibles a largo plazo.

La fortificación del hierro implica el suministro de hierro a través de los alimentos. Es útil para dirigirse a un grupo específico al suministrar hierro a través de alimentos que siguen el mecanismo de absorción regular como el de la dieta, lo que resulta en un aumento gradual del estado de hierro de la población. Aunque el efecto de la fortificación de los alimentos no es tan rápido como el de la suplementación para atacar la deficiencia de nutrientes, la fortificación es un enfoque eficaz para obtener beneficios sostenibles considerando el largo plazo (Khan et al., 2019). La fortificación generalmente se realiza con dosis de hierro mucho más bajas que la suplementación. Además está más cerca del entorno fisiológico y podría ser la intervención más segura en áreas maláricas (WHO, 2007).

La identificación adecuada de los alimentos que actuarán como vehículo alimenticio, es un requisito imprescindible de la fortificación. Es necesario que ese alimento se consuma comúnmente en la población objetivo para lograr una alta biodisponibilidad de micronutrientes (Hurrell & Egli 2019). Además es importante tener en cuenta las interacciones químicas de los alimentos con los compuestos de hierro, así como los hábitos alimentarios, las regiones geográficas y el estado socioeconómico. EL alimento ideal no debería inducir ningún cambio significativo en el patrón dietético pero debe consumirse de forma habitual para que los niveles de hierro corporal puedan aumentar (Detzel & Wieser, 2015). El azúcar, la sal, la leche, y los productos a base de cereales. son los alimentos que se fortifican habitualmente (Martinez-Navarrete et al., 2002). Del mismo modo, la fortificación con hierro de galletas y pan son una práctica



común en el mundo occidental. De hecho, cada país adoptará su propio vehículo alimentario adecuado, teniendo en cuenta la cultura, los hábitos alimenticios y los patrones dietéticos, el estado de los ingresos de los grupos de población y las regiones geográficas (Lamounier et al., 2010).

La fortificación de los alimentos con hierro se considera el método más rentable para reducir la prevalencia de la deficiencia nutricional de hierro. El efecto beneficioso de esta medida ya se ha visto en los países desarrollados, sin embargo en los países en vías de desarrollo, la anemia ferropénica nutricional sigue siendo muy frecuente y la fortificación con hierro parece no haber tenido el efecto esperado. Este hecho podría deberse al uso de compuestos de hierro poco biodisponibles en la fortificación o a que no se ha documentado la magnitud real de la anemia ferropénica en esos lugares (Lynch, 2005). A pesar de los beneficios que presenta la fortificación de alimentos con hierro, este proceso influye negativamente en algunos aspectos, como el sabor y el color de los alimentos que actúan como vehículo. Además, la aceptabilidad de los alimentos, los sistemas óptimos de entrega y garantizar un impacto en la salud, son algunas de las limitaciones de este proceso. A pesar de ello, la fortificación sigue siendo rentable en términos de coste, ya que cualquier medicamento convencional utilizado en la suplementación de hierro presenta un elevado coste, aunque los alimentos fortificados no siempre están disponibles para las personas con mayores dificultades económicas (Horton, 2006).

Este proceso de fortificación con hierro es más difícil que la fortificación con otros nutrientes, como el yodo en la sal, la vitamina A en el aceite de cocina o el zinc en la harina (Larocque et al., 2005). Un motivo es que los compuestos de hierro más biodisponibles son solubles en agua, reaccionan con componentes de otros alimentos y



pueden causar cambios organolépticos en los alimentos fortificados (Hurrell, 2002), como se ha mencionado anteriormente. Es por ello que se seleccionan formas de hierro menos solubles, aunque su absorción se pueda ver reducida (Larocque et al., 2005). Los compuestos de hierro más recomendados para la fortificación de alimentos de alimentos incluyen fumarato ferroso, sulfato ferroso, polvo de hierro electrolítico y pirofosfato férrico. La harina de trigo es el alimento fortificado con hierro más común y generalmente está fortificado con polvos de hierro elementales que no son recomendados por la OMS (WHO, 2006).

- Biofortificación.

La biofortificación es un proceso biotecnológico que se centra en la agregación de macro y micronutrientes en las células vegetales. Puede llevarse a cabo mediante la modificación genética, un enfoque transgénico, a través de prácticas agronómicas o a través de microorganismos promotores del crecimiento de las plantas. La modificación genética, permite actuar sobre rasgos genéticos existentes que permitan el desarrollo o mejora de micronutrientes. Esta metodología es utilizada ampliamente, para la obtención de cultivos con un contenido nutricional aumentado (Khan et al., 2019). El enfoque transgénico en biofortificación permite producir micronutrientes en un planta gracias a la transferencia de genes específicos de una planta a otra que carece de ellos. En relación a la biofortificación agronómica se utilizan fertilizantes ricos en nutrientes para las raíces o el follaje, que permitan aumentar la concentración de micronutrientes en los tejidos vegetales. Los fertilizantes solubles se aplican directamente sobre las partes y raíces foliares cuando los elementos minerales no están disponibles en el suelo



(Balk et al., 2019). Como solo una pequeña cantidad de hierro del suelo está disponible para las plantas (a pesar de que existan cantidades adecuadas de hierro), debido a las reacciones de adsorción, precipitación y oxidación, para suministrar eficientemente hierro se utilizan quelantes del hierro. Finalmente, la biofortificación de cultivos a través de microorganismos que promueven el crecimiento de las plantas, se considera un enfoque complementario prometedor que incrementa las concentraciones de micronutrientes además de mejorar el rendimiento y la fertilidad del suelo. Esto se consigue gracias a la acción de los microorganismos que producen sideróforos que secuestran compuestos de hierro y las raíces de las plantas pueden absorberlos (Khan et al., 2019).

De entre los alimentos biofortificados destacan el mijo y el frijol, en los cuales se han incrementado los niveles de hierro con éxito. Por el contrario, hay otros alimentos como el arroz que debido a su insuficiente variación genética natural se ha procedido a introducir genes que permitan mejorar el metabolismo del hierro, pero parece ser que no es resistente al cocinado (Lucca et al., 2002).

2.1.5 Sobrecarga de hierro

El hierro es un elemento esencial para nuestro organismo, participando en múltiples rutas metabólicas, como se ha mencionado anteriormente. Su capacidad de oxidación/reducción entre la forma férrica a la ferrosa, le hace ser un elemento esencial de las proteínas transportadoras de oxígeno como la hemoglobina y la mioglobina, así como de muchas enzimas. A pesar de ello, el hierro también tiene la capacidad de generar radicales oxidativos nocivos para la salud (Gupta et al., 2018). Su regulación en



nuestro organismo depende de los procesos de absorción, metabolismo y excreción, pero en algunas situaciones no fisiológicas o enfermedades, el hierro puede acumularse en exceso.

De entre las principales causas de sobrecarga de hierro se encuentran la hemocromatosis hereditaria o trastornos de la maduración eritroide como la β -talasemia y también anemias sideroblásticas o síndromes mielodisplásicos. Como formas secundarias las transfusiones de sangre u otras sobrecargas de hierro (Camaschella & Nai, 2016; Pietrangelo, 2016). En estos trastornos el hierro excede la capacidad de transporte de la transferrina, pudiendo circular altas cantidades de hierro no unido a la transferrina, el cual es muy reactivo. Este exceso de hierro podrá provocar un daño oxidativo y disfunción orgánica en diferentes órganos o tejidos, principalmente en el hígado, corazón y páncreas (Fleming & Ponka, 2012). Podría conducir a una lesión celular citotóxica (daño en el ADN, peroxidación lipídica, modificación de proteínas y daño mitocondrial). La toxicidad del hierro depende de muchos factores además del nivel de hierro, la cantidad de las especies tóxicas relacionadas con el hierro, la duración de la exposición, la genética antioxidante del individuo y los factores ambientales entre otros (Coates, 2014). Las consecuencias clínicas de esta acumulación incluyen fibrosis hepática y cirrosis, mayor riesgo de carcinoma hepatocelular, cardiomiopatía, artritis y diabetes.

- Hemocromatosis hereditaria:

Es debida a mutaciones en genes que codifican la hepcidina propiamente (HAMP) o mutaciones en genes que son los principales inductores de la expresión de



hepcidina en respuesta al hierro como el HFE, el receptor de la transferrina 2 (TFR2) o el de la hemojuvelina (HFE2 o HJV). Debido a estas mutaciones, los niveles crecientes de hierro no son detectados correctamente y la expresión de la hepcidina es inadecuadamente baja. No se bloquea la absorción de hierro de la dieta, y al estar activa y funcional la FPN1 se libera hierro desde los depósitos, como el contenido en los macrófagos, provocando una acumulación de hierro en los tejidos (Muñoz et al., 2011). Se han identificado al menos 32 mutaciones del gen HFE, aunque la más común y que afecta aproximadamente el 10% de la población blanca tiene la mutación del gen C282Y HFE (Fleming & Ponka, 2012). En esta mutación se ha observado que provoca un aumento de la absorción de hierro a nivel intestinal, pero no modifica la captación de hierro placentario, ya que la sobrecarga de hierro no está presente en el nacimiento. Aun así, la colocalización de la proteína HFE y del receptor de la transferrina en la membrana de la placenta, podría indicar una posible implicación en situaciones de sobrecarga de hierro en el neonato (Zúñiga Cabrera & Orera Clemente, 2002).

La hemocromatosis generalmente se trata mediante una flebotomía altamente efectiva y relativamente económica con la eliminación de aproximadamente 0.5 g Fe/L de sangre. Posteriormente, el hierro se moviliza de las reservas para la eritropoyesis para reemplazar los glóbulos rojos eliminados (Anderson & Frazer, 2017).

- Trastornos de la maduración eritroide:

Esta clase de trastornos representan distintas formas de sobrecarga de hierro. La mayoría está caracterizada por una eritropoyesis ineficaz, en la que se puede producir apoptosis de precursores eritroides, fallo en la maduración eritroide y expansión secundaria de la eritropoyesis. Un ejemplo de estos trastornos es la β -talasemia, donde



las anomalías en la síntesis de globina β conducen a toxicidad y apoptosis de eritroblastos maduros, lo que resulta en anemia. Esta situación estimula la producción de eritropoyetina y la expansión de los precursores eritroides inmaduros, pero la eritropoyesis sigue siendo ineficaz y la anemia persiste. La población precursora eritroide expandida segrega un exceso de los reguladores eritroides que normalmente suprimen la expresión de la hepcidina para aumentar la disponibilidad de hierro para la producción de glóbulos rojos, lo que resulta en una absorción excesiva de hierro y una sobrecarga de hierro (Kautz et al., 2014).

En estos trastornos, la flebotomía no es apropiada y, por lo tanto, el hierro se elimina con el uso de medicamentos quelantes de hierro. Después de que los quelantes de hierro se unan al hierro, el complejo quelante de hierro se excreta en la orina o las heces (Anderson & Frazer, 2017).

- Formas secundarias de sobrecarga de hierro:

Pueden producirse como consecuencia de un aumento de las reservas de hierro en el organismo debido a transfusiones sanguíneas repetidas, trastornos hematológicos que aumentan la tasa de absorción de hierro o administración parenteral de hierro. Es cierto que el hierro en pacientes con sobrecargas secundarias de hierro suele almacenarse inicialmente en los macrófagos, siendo menos dañino, aunque ocasionalmente puede inducir patologías típicas de la sobrecarga de hierro (Institute of Medicine, 2001).

La sobrecarga de hierro debida a transfusiones era común en pacientes sometidos a diálisis antes de la incorporación de agentes estimulantes de la eritropoyesis



en el tratamiento. Aunque el grado de sobrecarga de hierro en pacientes con enfermedad renal crónica es más bajo que en pacientes con hemocromatosis y talasemia, donde se ha descrito bien la toxicidad de los órganos por el hierro, existe evidencia de que el hierro también puede estar asociado con enfermedades fuera del contexto de la sobrecarga masiva de hierro observada en estos trastornos genéticos (Dev & Babitt, 2017).

2.2 ESTRÉS OXIDATIVO

Se define como el desequilibrio que existe entre la formación y/o acumulación de radicales libres y la capacidad de los sistemas de protección del organismo para eliminarlos o contrarrestar su acción (Persson et al., 2014). Sies, (Sies, 1991) caracterizó por primera vez el estrés oxidativo como “una alteración en el equilibrio prooxidante a antioxidante a favor de las especies oxidantes, lo que lleva a un daño potencial”. Así pues, se ha asociado a una cantidad de especies reactivas de oxígeno (EROs) como resultado de un desequilibrio entre la generación y la eliminación de las EROs. Así pues, el estrés oxidativo conlleva una mayor aparición de radicales libres, pero también afecta a los mecanismos de defensa antioxidante del organismo, que se ven diezmados (Poljsak et al., 2013).

El daño inducido en el estrés oxidativo por los radicales libres contribuye a la fisiopatología y patogénesis de muchas afecciones de salud como las enfermedades cardiovasculares, cáncer, afecciones neurodegenerativas (alzheimer, parkinson etc.), enfisema... (Toda, 2011; López-Alarcón & Denicola, 2013; Maulik et al., 2013). El estrés oxidativo a corto plazo puede tener lugar en tejidos lesionados por traumatismos,



infecciones, lesiones por calor, hipertoxia, toxinas y ejercicio excesivo. En estos tejidos se producen enzimas como la lipogenasa o la xantina oxidasa, que aumentan la producción de radicales libres, activan a los fagocitos, liberan iones de hierro o cobre o interrumpen la fosforilación oxidativa generando más EROs (Rao et al., 2006). De hecho ya sea como fuente o como resultado, estrés oxidativo puede correlacionarse con más de 100 enfermedades (Halliwell et al., 1992).

2.2.1 Radicales libres. Especies reactivas de oxígeno

Los radicales libres son átomos o grupos de átomos que presentan un número de electrones desapareados (en su orbital más externo, al menos un electrón desapareado), son sustancias altamente reactivas con capacidad de producir reacciones en cadena, presentes en baja concentración y con una vida media corta. Los radicales libres pueden formarse a través de la ruptura de un enlace químico, mediante la división de un radical y también, mediante reacciones redox (Halliwell, 2007).

Los radicales libres participan como catalizadores en reacciones químicas entre moléculas, pudiendo establecerse reacciones entre dos radicales libres en las que los electrones desapareados forman un enlace covalente, dando estabilidad a las moléculas. Por el contrario, cuando una molécula no radicalaria reacciona con un radical libre, se produce una reacción en cadena que da lugar a la generación de nuevos radicales libres, pudiendo concluir gracias a la acción de un antioxidante o cuando se encuentre un compuesto estable (Morillas-Ruiz, 2010).

Las principales fuentes de radicales libres incluyen la respiración celular y los procesos metabólicos, aunque también pueden generarse por radiación. Al igual que el



hierro, el oxígeno es un elemento esencial para la vida. Cuando se utiliza para generar energía por las células, las mitocondrias producen radicales libres como consecuencia de la producción de adenosin trifosfato (ATP). Generalmente estos subproductos son EROs y también especies reactivas de nitrógeno (ERNs), resultantes del proceso redox celular (Halliwell & Gutteridge, 2007). Durante el proceso de respiración celular, el oxígeno se reduce por la transferencia sucesiva de electrones y algunos intermediarios con electrones impares pueden escapar de la cadena. Los procesos metabólicos también generan EROs; Es el caso de los peroxisomas que catabolizan las biomoléculas usando enzimas que eliminan el hidrógeno en una reacción oxidativa, creando así el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). De hecho, una gran cantidad de enzimas (óxido nítrico sintetasa, citocromos p450 y xantina oxidasa) y algunos orgánulos como las mitocondrias y los peroxisomas producen EROs como un subproducto metabólico.

Las EROs pueden ser moléculas neutras (H_2O_2), iones (superóxido, $O_2^{\bullet-}$) o radicales (radical hidroxilo, $OH \bullet$) siendo estas las principales EROs que se generan en nuestro organismo, entre otros (Tabla 3).

Tabla 3. Radicales libres derivados del oxígeno.

| Radical | Nombre | Sustrato | Vida media |
|-------------------------------|-----------------------|--------------------|-------------------------------------|
| HO • | Hidroxilo | Cualquier molécula | 10-9 s |
| RO• | R-oxilo | LH (linoleato) | 10-6 s |
| ROO• | R-peroxilo | LH | 7 s |
| ROOH | Hidroperóxido | LH | - |
| L• | Linoleil | LH | 10-6 s |
| O ₂ • – | Superóxido | Enzimas | Dismutación espontánea y enzimática |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de hidrógeno | LH | Estable; Reducción enzimática |
| NO• | Nitroxilo | LH | 5-6 s, 0,1 s (en corazón) |
| ¹ O ₂ | Singlete | H ₂ | 10-6 s |

Fuente: modificada de Cheeseman & Slater, 1993; Lindsay & Astley, 2002.

Como se ha mencionado anteriormente, las EROs son altamente reactivas y se pueden considerar como una cascada de transición de un tipo de radical libre a otro (Figura 3). Generalmente la reacción inicial que se lleva a cabo es la transferencia de un electrón al oxígeno para formar O₂•. Este no atraviesa fácilmente las membranas y su efecto es local y de corta duración. Posteriormente por acción de la enzima superóxido dismutasa o de manera espontánea, se dismuta a H₂O₂, que difunde en la membrana y cuya acción es de mayor duración (Guzik et al., 2000). Por acción de las enzimas

peroxidasas, se genera a partir de H_2O_2 ácido hipocloroso (HOCl) y oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), entre otras EROs. Finalmente, la reacción de Haber-Weiss utiliza un catalizador de hierro para generar radicales $\text{OH}\cdot$ a partir de $\text{O}_2\cdot^-$ y H_2O_2 .

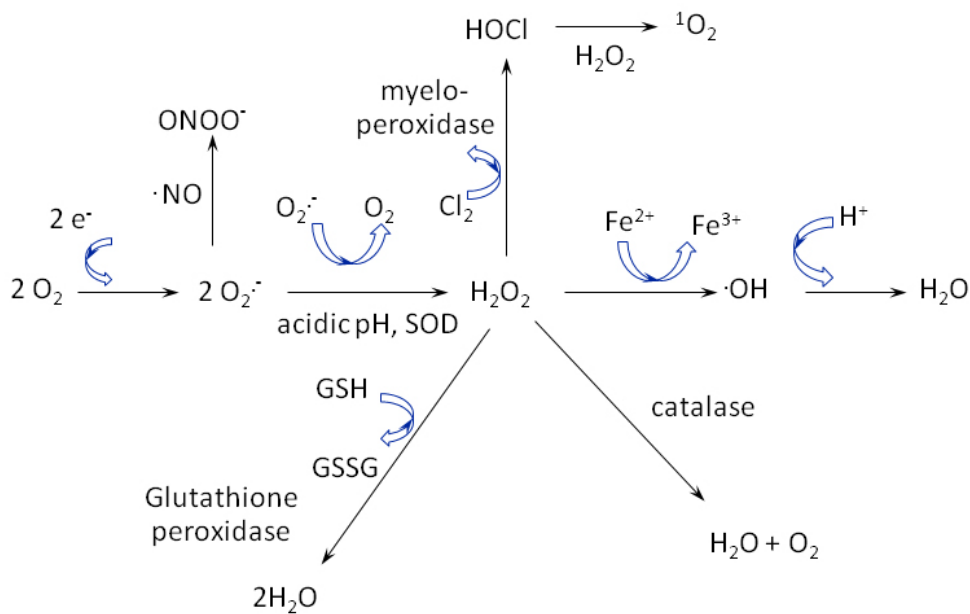


Figura 3. Cascada de transición entre las principales especies reactivas de oxígeno
Modificada de Brieger et al., 2012.

2.2.1.1 Anión superóxido

Se genera constantemente a través de procesos endógenos y fuentes exógenas, debido a la transferencia de un electrón en la reducción del O_2 o en procesos auto-oxidativos mediados por metales de transición. Aunque no es muy dañino, es capaz dar lugar a la formación de otras especies reactivas (es fuente de H_2O_2), a través de reacciones en cadena o diferentes vías (Turrens, 2003). En función de la solución en la que se encuentre, su capacidad oxidante variará. Así pues, en solución acuosa demostró



ser un agente oxidante débil hacia el ácido ascórbico y los tioles. También se comporta como un fuerte agente reductor, frente a algunos complejos de hierro como el citocromo C y el EDTA-férrico. Aun así el $O_2^{\bullet-}$ puede dismutarse rápidamente debido a la acción de la superóxido dismutasa (SOD) produciendo oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno (Kohen & Nyska, 2002).

2.2.1.2 Peróxido de hidrógeno

Puede generarse por cualquier sistema que produzca superóxido, como se ha mencionado anteriormente. Además, la presencia de oxidasas (D-aminoácido oxidasa, glucosa oxidasa, urato oxidasa), puede dar lugar a la transferencia de dos electrones al oxígeno molecular y por tanto a la síntesis de H_2O_2 de manera directa. Al no presentar electrones desapareados, el H_2O_2 no se considera un radical, pero si es capaz de generar radicales altamente reactivos como resultado de su interacción con iones metálicos (Gutteridge, 1994). Su producción en el interior de los peroxisomas por la acción de la enzima flavin deshidrogenasa está controlada por la presencia de catalasa, una enzima que degrada el H_2O_2 evitando su acumulación tóxica y produciendo oxígeno y agua. Si los peroxisomas presentan daños estructurales, los residuos tóxicos podrán salir al exterior y provocar daños (Berg et al., 2007). Aunque en pequeñas cantidades regula algunos procesos fisiológicos como la señalización en la proliferación celular, la muerte celular, el metabolismo de los carbohidratos, la función mitocondrial, la activación plaquetaria y el mantenimiento del equilibrio redox de tiol (Lobo et al., 2010). Sin embargo a altas concentraciones puede ser muy perjudicial para las células. La acción directa del H_2O_2 implica daños a la estructura de las proteínas hemo con liberación de



hierro, inactivación de enzimas y la oxidación de las principales biomoléculas (Kohen & Nyska, 2002). A pesar de sus nocivos efectos, otra enzima antioxidante, la catalasa, cataliza su descomposición en oxígeno gaseoso menos reactivo y agua.

2.2.1.3 Radical hidroxilo

Se considera una especie radical altamente agresiva. Es responsable del daño oxidativo de la mayoría de las biomoléculas, siendo capaz de atacar a las membranas de las células y proteínas. El $\text{OH}\cdot$ puede formarse por la descomposición del H_2O_2 en presencia de metales de transición como el Fe^{2+} o el Cu^{2+} (reacción de Fenton) (Dhalla et al., 2000; Wilcox & Pearlman, 2008), por radiólisis del agua, (Gutteridge, 1994) o por la participación del $\text{O}_2\cdot^-$ en la reacción de Haber-Weiss, pudiendo combinarse ambas reacciones (reacciones de Fenton-Haber-Weiss) (Valko et al., 2007). El $\text{OH}\cdot$ es considerado el radical oxidante más poderoso y es capaz de interactuar en el sitio de su generación, debido a su corta vida media, con la mayoría de las biomoléculas orgánicas e inorgánicas (proteínas ADN, azúcares, lípidos y metales). Tiene la capacidad de penetrar con facilidad las membranas de las células, ya que presenta un pequeño tamaño y similitud fisicoquímica con el agua.

A pesar de lo mencionado anteriormente, los radicales libres pueden tener funciones fisiológicas beneficiosas en nuestro organismo a concentraciones bajas o moderadas, participando en numerosas vías de señalización celular (Wu et al., 2015). Los EROs ejercen acciones críticas como la señalización fisiológica, donde pueden modificar aminoácidos sensibles a procesos redox en variedad de proteínas, incluidas fosfatasa, canales iónicos y factores de transcripción (Winterbourn & Hampton, 2008);



en la transcripción génica y en la regulación de la actividad de la guanilato ciclasa soluble en las células (Zheng & Storz, 2000). Ciertos procesos biosintéticos son dependientes de redox y las EROs están involucradas en reacciones como la yodación de las hormonas tiroideas y la reticulación de las proteínas fibrilares de la matriz. Aunque el efecto citotóxico de los radicales libres es perjudicial para las células y media la patogénesis de muchas enfermedades crónicas, es responsable de la muerte de los patógenos por acción de los macrófagos activados y otros fagocitos en el sistema inmune. Sin embargo, cuando hay una producción excesiva de radicales libres y/o una deficiencia de mecanismos antioxidantes, se producen efectos nocivos en los sistemas biológicos. Debido a su alta reactividad, las EROs reaccionan fácilmente con prácticamente todos los tipos de moléculas biológicas. Como oxidantes o inhibidores de las enzimas antioxidantes, darán lugar a la generación de estrés oxidativo el cual puede inducir un daño importante a las principales biomoléculas de nuestro organismo (proteínas, lípidos y ADN), conduciendo a la lesión y muerte celular (McCord, 2000; Valko et al., 2007).

2.2.2 Efecto del estrés oxidativo sobre las principales biomoléculas

2.2.2.1 Daño a nivel lipídico

Los lípidos son componentes celulares esenciales, que mantienen su estructura y controlan la función celular. Son un objetivo principal del estrés oxidativo debido al ataque que sufren por parte de las EROs y que se asocia con estados patológicos. La peroxidación lipídica es el daño oxidativo causado por los radicales libres sobre las membranas celulares, las lipoproteínas plasmáticas y otras moléculas que contienen



lípidos en condiciones de estrés oxidativo. En las membranas celulares, los lípidos que sufren el ataque oxidativo principalmente son los fosfolípidos, el colesterol y los glicolípidos. Una vez que se inicia la reacción de peroxidación, ésta va a continuar de forma progresiva y autocatalítica, originando cambios estructurales y funcionales de los sustratos que daña. De hecho, los productos de oxidación biológicamente significativos de los lípidos juegan un papel central en la señalización oxidativa (Halliwell & Gutteridge, 1985; Gaschler & Stockwell, 2017). Cuando la peroxidación lipídica se produce en condiciones controladas, la permeabilidad de la membrana se ve modificada, así como las proteínas de membrana y los lípidos, proporcionando el control de la proliferación celular, de la síntesis de eicosanoides biológicamente activos y el inicio de la muerte celular.

Los ácidos grasos poliinsaturados de fosfolípidos y glicolípidos son el principal sustrato del daño oxidativo ocasionado por los radicales libres. La cadena de oxidación de los compuestos orgánicos por acción de los radicales libres, ha recibido históricamente el nombre de autooxidación, ya que algunos peróxidos originados en la reacción pueden actuar como iniciadores del proceso de peroxidación lipídica en ciertas condiciones (Gaschler & Stockwell, 2017). Así pues el mecanismo de autooxidación se lleva a cabo en un proceso que consta de tres etapas, iniciación, propagación y terminación (Figura 4).



In: iniciador; L: lípido

Figura 4. Reacciones en el mecanismo de oxidación en cadena de radicales libres.

Modificada de (Yin et al., 2011).

En la iniciación de la peroxidación lipídica el elemento clave es la formación de un radical lipídico ($\text{L}\cdot$). En los sistemas biológicos, la oxidación lipídica de la membrana celular puede inducirse por agentes físicos o químicos exógenos, como la luz ultravioleta, contaminación, tabaquismo o radiaciones ionizantes. También pueden generar radicales libres los sistemas enzimáticos endógenos (xantina oxidasa, NADPH oxidasa, citocromo P450, etc.), así como la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Bochkov et al., 2010). El radical libre que inicie el proceso deberá ser un oxidante capaz de reaccionar con los ácidos grasos poliinsaturados (radical hidroxilo,



entre otros). Para estabilizar la molécula se forman dienos conjugados a los cuales se les adiciona oxígeno molecular produciendo un radical peroxilo ($\text{LOO}\cdot$). Este radical puede provocar aún más la eliminación del hidrógeno de las moléculas lipídicas adyacentes, favoreciendo la propagación y autooxidación en la peroxidación lipídica y dando lugar a la formación de hidroperóxidos lipídicos (LOOH). Estos hidroperóxidos pueden oxidarse generando un gran número de subproductos, siendo una importante fuente de $\text{OH}\cdot$. La propagación se repite pudiendo tener la capacidad de consumir todos los ácidos grasos presentes, hasta que los mecanismos de defensa contra la peroxidación lipídica incontrolada y otros daños oxidativos interrumpen el proceso en las reacciones de terminación (Gaschler & Stockwell, 2017). En esta etapa los mecanismos de defensa antioxidante permiten el control de la peroxidación lipídica, así los hidroperóxidos lipídicos se reducen a ácidos grasos hidroxilados gracias a la acción de la enzima glutatión peroxidasa (Gill & Tuteja, 2010). Si los hidroperóxidos provienen de ácidos grasos unidos a fosfolípidos, será necesario la acción de la fosfolipasa A2 (Yu et al., 1992). La actuación de antioxidantes en esta etapa que puedan interceptar y degradar los radicales libres o la reacción entre dos radicales libres por emparejamiento o transferencia de un grupo entre ambos, podría también inducir la finalización de estas reacciones en cadena (Lindsay & Astley, 2002).

La peroxidación lipídica dará lugar a la formación de productos de la peroxidación que podrán ser intermediarios primarios de alta reactividad o productos secundarios, tales como el radical alquilo, hidroperóxidos lipídicos, isoprostanos o malondialdehído entre otros. Su estudio aporta información del daño a los lípidos ya que son marcadores de oxidación lipídica. Los hidroperóxidos lipídicos se forman como el principal producto de la peroxidación lipídica de los ácidos grasos poliinsaturados y



colesterol. Se producen por oxidación, por acción del oxígeno singlete y la lipoxigenasa, así como por peroxidación lipídica mediada por radicales libres (Niki, 2009). Tienen poca estabilidad y pueden reaccionar con iones metálicos de transición como el hierro y el cobre para producir EROs. Estos hidroperóxidos lipídicos actúan como intermediarios en el proceso de peroxidación lipídica y alteran la estructura y la función de la membrana de las células originando efectos citotóxicos. Además, comparados con los radicales libres precursores, tienen una mayor polaridad y tiempo de vida media, pudiendo migrar desde su sitio de formación a zonas más sensibles del organismo (Niki, 2014).

Otros indicadores de peroxidación lipídica son los isoprostanos. Son sustancias similares a la prostaglandina F₂ que se producen por acción de los radicales libres que originan la peroxidación no enzimática del ácido araquidónico (Montuschi et al., 2004). Se diferencian de las prostaglandinas principalmente porque se forman sin acción de las ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2) (Milne et al., 2005). Se forman en las membranas lipídicas de los ácidos grasos poliinsaturados y luego son liberados por las fosfolipasas. También se ha puesto de manifiesto que pueden formarse a partir del ácido eicosapentaenoico y docosahexaenoico, no solo del araquidónico (Musiek et al., 2008; Song et al., 2009). Los isoprostanos son productos específicos de la peroxidación lipídica, estables, que están presentes en cantidades detectables en los fluidos biológicos y tejidos como el plasma, orina y líquido cefalorraquídeo y su presencia no se afecta por el mayor o menor contenido de lípidos de la dieta (Roberts & Morrow, 2000). El 2,3-dinor-5,6-dihidro-15-F_{2t}-isoprostano se excreta por la orina y es el principal metabolito de los isoprostanos, por lo que los niveles de isoprostanos generalmente se determinan



en la orina donde permanecen estable y además la toma de muestra es no invasiva (Roberts et al., 1996; Cracowski et al., 2002).

2.2.2.2 Daño a nivel proteico

Las proteínas son muy sensibles a la acción de los radicales libres, que pueden desencadenar procesos de fragmentación, agregación y una mayor susceptibilidad a la degradación proteolítica, dando lugar a una disminución de su funcionalidad, alteración conformacional proteica o a una excesiva acumulación de proteínas por fallos en el reconocimiento de los sistemas de degradación proteica (Dröge, 2002). En diversas enfermedades y afecciones como la oclusión coronaria y cerebral, lesiones de isquemia-reperusión, enfisema pulmonar, diabetes mellitus y afecciones neurológicas, se ha observado una modificación oxidativa de las proteínas (Stadtman, 2004; Miyoshi et al., 2006; Stadtman, 2006).

Las proteínas pueden sufrir modificaciones oxidativas de tres formas distintas, modificación oxidativa de aminoácidos específicos, división de péptidos mediada por radicales libres y formación de enlaces cruzados de proteínas debido a la reacción con productos de peroxidación lipídica. Las proteínas que contienen aminoácidos como la arginina, la metionina, la histidina o la cisteína, parecen ser más susceptibles a la oxidación (Lobo et al., 2010). Este daño oxidativo puede afectar a la actividad enzimática, a los receptores y al transporte de membrana. De hecho los productos proteicos que han sufrido un daño oxidativo pueden alterar la membrana y las funciones celulares.



La modificación oxidativa de las proteínas se produce de manera lineal (en tiempo y concentración) y es rápida, a diferencia de la peroxidación lipídica, por lo que es un parámetro de daño oxidativo a biomoléculas más sensible (Refsgaard et al., 2000; Stadtman & Levine, 2003). El daño oxidativo puede manifestarse en cambios en la estructura primaria, secundaria y terciaria de las proteínas. La modificación o déficit de aminoácidos, la agregación y/o fragmentación de proteínas, conlleva cambios en la estructura primaria. Las modificaciones de la estructura secundaria o terciaria conllevan cambios de carga y solubilidad (Stadtman et al., 2005).

El radical peroxilo se considera generalmente como uno de los principales responsables de la oxidación proteica. La cuantificación del daño a nivel proteico no es sencilla debido a que se generan productos estables capaces de propagar dicha alteración por el resto del organismo. Se han puesto de manifiesto varios tipos de modificaciones a las proteínas inducidas por EROs, tales como la pérdida de grupos sulfhidrilos, formación de carbonilos, enlaces cruzados de ditirosina o disulfuro, sulfóxido de metionina, entre otros.

La pérdida de grupos sulfhidrilos es una de las respuestas más inmediatas a un aumento de estrés oxidativo. La pérdida de estos grupos implica una serie de consecuencias funcionales en las proteínas como pueden ser la inactivación catalítica, el plegamiento de proteínas, la disminución de la capacidad antioxidante o la pérdida de funciones específicas. La adición a las cadenas laterales de residuos de aminoácidos, tales como lisina, arginina, prolina y treonina de aductos que contienen carbonilo, es probablemente la modificación estructural mejor caracterizada en las proteínas. Este proceso puede originarse por una amplia variedad de EROs, pero parece ser que el mecanismo más plausible es la oxidación catalizada por metales, que implica la

formación de especies ferril (Fe^{4+}) y radical hidroxilo en la reacción de Fenton (Chondrogianni et al., 2014). Es por ello que una de las técnicas más empleadas como biomarcador de daño oxidativo a las proteínas, es la determinación de las proteínas carbonilo, las cuales han sufrido modificaciones irreversibles.

2.2.2.3 Daño a nivel del material genético

El daño al ADN engloba un conjunto de modificaciones que pueden alterar sus propiedades de codificación y/o interferir en el metabolismo celular, afectando a nivel de la replicación o transcripción (Krebs et al., 2014). De entre las principales causas de daño al ADN destaca el daño oxidativo inducido por el estrés oxidativo. No todas las EROs dañan de la misma manera al ADN. A niveles fisiológicos, el $\text{O}_2^{\bullet-}$ y el H_2O_2 no reaccionan fácilmente con el material genético. Por el contrario el radical OH^{\bullet} si puede hacerlo y causar un importante daño oxidativo (Turrens, 2003; Waris & Ahsan, 2006), ataca a las cadenas de ADN adyacentes presentes no solo en las células sino también en las mitocondrias, dando lugar a la generación de múltiples productos de oxidación (Valko et al., 2007). En el caso del ARN, al estar constituido por solo una cadena, no presenta los mecanismos de protección mediante enlaces de hidrógeno, por lo que es más susceptible al daño oxidativo (Nunomura et al., 2007).

El daño oxidativo producido por las EROs en el ADN podrá atacar directamente al material genético mediante oxidación, desaminación, metilación y despurinización, provocando alteraciones en la base y/o azúcar, en los enlaces cruzados del ADN-proteína, ciclación del azúcar-base o en los enlaces cruzados intra e inter-filamentos, que a su vez pueden provocar roturas del filamento del ADN (Cadet et al., 2017), o



atacar a otras moléculas que estabilizan y conforman tanto al ADN como a las enzimas de los sistemas reparadores del mismo, impidiendo la escisión correcta de las secuencias de ADN afectadas (Halliwell, 2006). Son muchos los agentes exógenos que pueden ser responsables de este daño oxidativo como pueden ser la radiación ionizante, la luz ultravioleta, la exposición a pesticidas y metales, la contaminación del aire, el estilo de vida. Los factores endógenos como las mutaciones espontáneas o enzimáticas, y las EROs producidas en los procesos celulares como la respiración mitocondrial o los procesos inflamatorios, son también responsables del daño oxidativo al ADN (Finkel & Holbrook, 2000; De Bont & van Larebeke, 2004; Mena et al., 2009). La oxidación del ADN, junto con su hidrólisis y metilación, contribuye de manera significativa a la inestabilidad y a la descomposición del genoma.

Para evaluar el daño oxidativo y la afectación del mismo es necesario determinar ciertos marcadores de daño que indiquen a que nivel se produce y su gravedad. Uno de los principales marcadores es la 8-hidroxiguanina u 8-OH-dG, que es el producto oxidado más abundante debido a su estabilidad y a que se forma con relativa facilidad. Proporciona información estructural para identificar lesiones específicas relacionadas con las bases, con gran precisión y sensibilidad (Fleming et al., 2015). Las roturas de cadena sencilla o doble pueden evaluarse gracias al ensayo Comet (un ensayo de electroforesis en gel de agarosa), que permite obtener al microscopio imágenes que se asemejan a un cometa y que indican la mayor o menor fragmentación del ADN, en función del mayor o menor contenido de material genético presente en la cabeza (ADN intacto superenrollado), o en la cola (ADN fragmentado) (Singh et al., 1988).



2.2.3 Sistemas de defensa antioxidante

Como se ha mencionado anteriormente, en el organismo se producen EROs de manera constante y en ocasiones de manera excesiva y descontrolada. Pueden originar la aparición de estrés oxidativo, cuando los mecanismos de defensa antioxidante no son capaces de contrarrestar el exceso de radicales libres o sus efectos lo que lleva a la aparición de enfermedades. Aun así, estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto la capacidad de los antioxidantes para contrarrestar los efectos nocivos de las EROs y de disminuir la incidencia de cáncer y otras enfermedades (Godic et al., 2014).

Los antioxidantes pueden definirse como son sustancias que retrasan, previenen o eliminan el daño oxidativo de una biomolécula (Halliwell & Gutteridge, 2015). Son considerados sustancias que tienen la capacidad de eliminar las EROs directamente, mejorar los mecanismos de defensa antioxidante o inhibir la producción de EROs. Desde el punto de vista químico, son moléculas lo suficientemente estables como para donar un electrón a un radical libre y neutralizarlo, reduciendo así su capacidad de dañar, retrasando o evitando el daño celular, principalmente gracias a su capacidad de transformar a los radicales libres en especies menos reactivas, prevenir que los menos reactivos reaccionen para originar sustancias más reactivas o eliminarlos directamente (Khlebnikov et al., 2007). Así pues, estos sistemas de defensa actúan de manera eficiente y coordinada con el objetivo de evitar que la disrupción oxidativa causada por las EROs afecte a la homeostasis celular.

En los sistemas de defensa, los antioxidantes pueden actuar a diferentes niveles, prevención, eliminación de radicales, reparación y defensa (Ighodaro & Akinloye, 2018):



La primera línea de defensa la llevan a cabo los antioxidantes preventivos que evitan la formación de radicales libres o especies reactivas en las células. Son muy rápidos en neutralizar cualquier molécula con el potencial de convertirse en un radical libre o cualquier radical libre con la capacidad de inducir la producción de otros radicales. En esta fase, tres enzimas son claves, superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa. Así, dismutan el $O_2^{\bullet-}$ o reducen previamente el H_2O_2 y los hidroperóxidos a agua y alcoholes, sin generación de radicales libres. También se incluyen proteínas de unión a iones metálicos como la transferrina y ceruloplasmina que quelan o secuestran hierro y cobre, respectivamente, evitando que se formen radicales libres.

En la segunda línea de defensa, los antioxidantes actúan como eliminadores, ya que eliminan los radicales libres para evitar el inicio de la cadena y de las reacciones de propagación. Donan electrones a los radicales libres, neutralizándolos o eliminándolos, pudiendo convertirse en radicales libres que presentan efectos menos dañinos. Estos nuevos radicales son fácilmente neutralizables y otros antioxidantes actúan sobre ellos haciéndolos inofensivos. Antioxidantes como el ácido ascórbico, glutatión, ácido úrico, tocoferol y ubiquinol actúan en esta línea.

La tercera línea de defensa entra en juego después de que se haya producido el daño oxidativo. Implica la síntesis *de novo* de antioxidantes y enzimas que reparan el daño causado a las biomoléculas y reconstituyen la membrana celular. También reconocen, degradan y eliminan proteínas oxidativamente modificadas y evitan la acumulación de proteínas oxidadas. De entre ellas destacan los sistemas enzimáticos de reparación del ADN (polimerasas, glicosilasas y nucleasas), enzimas proteolíticas

(proteinasas, proteasas y peptidasas), que se encuentran tanto en el citosol como en el mitocondrias de células de mamíferos.

En la cuarta línea de defensa los antioxidantes inducen una última fase, la adaptación, donde se interpretan las señales que requieren la formación y el transporte de antioxidantes a los sitios específicos de acción.

2.2.3.1 Sistemas antioxidantes enzimáticos

2.2.3.1.1 Superóxido dismutasa

La enzima superóxido dismutasa (SOD), es una enzima antioxidante que pertenece a los mecanismos de defensa antioxidante endógenos. Es la primera enzima de detoxificación y el antioxidante celular más poderoso. Se considera que actúa en la primera línea de defensa contra los radicales libres y el estrés oxidativo. Cataliza la reacción de dismutación del $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 y oxígeno molecular (O_2), disminuyendo el daño potencial de este radical libre y siendo el único grupo de enzimas que lo elimina específicamente.



La SOD para llevar a cabo su actividad requiere de un cofactor metálico, ya que es una metaloenzima. En función del ion metálico requerido como cofactor (hierro, zinc, cobre y manganeso), existen distintas isoformas de la SOD (Fridovich, 1995; Gill & Tuteja, 2010; Karuppanapandian et al., 2011):



- Cu/Zn-SOD (SOD1): predominante en eucariotas y localizada principalmente en el citosol aunque también se encuentra en cloroplastos y peroxisomas. Es responsable de la eliminación del $O_2^{\bullet-}$ producido por el citocromo P₄₅₀.
- Mn-SOD (SOD2): presente en procariotas y mitocondrias de eucariotas. Es responsable de la eliminación del $O_2^{\bullet-}$ producido por las oxidasas mitocondriales y por la cadena de transporte de electrones.
- EC-SOD (SOD3): considerada la Cu/Zn-SOD eucariota extracelular. Es la principal defensa antioxidante enzimática contra enfermedades vasculares y cardiovasculares.
- Fe-SOD: presente generalmente en procariotas y cloroplastos de algunas plantas.

Es una enzima indispensable para mantener la integridad celular, ya que se encarga de proteger a las células de las EROs, otros radicales libres y de agentes nocivos que promueven el envejecimiento o la muerte celular. La deficiencia de esta enzima es común y sus niveles disminuyen con la edad, a medida que se incrementa la producción de radicales libres (Krishnamurthy & Wadhwani, 2012).

2.2.3.1.2 Catalasa

La catalasa (CAT) es una enzima antioxidante endógena que está presente en casi todos los organismos aeróbicos, expresándose en la mayoría de las células, órganos y tejidos y en concentraciones elevadas, en el hígado y los eritrocitos (Sung et al., 2013). Cataliza la reacción de degradación o reducción del H₂O₂ en agua y O₂, completando el proceso de degradación de radicales libres iniciado por la SOD (Marklund, 1984; Chelikani et al., 2004).



Es una enzima altamente eficiente, capaz de descomponer millones de moléculas de H₂O₂ por segundo, aunque su afinidad por el mismo es baja, requiriendo elevadas concentraciones de CAT para su degradación (Veal et al., 2007). Está presente principalmente en los peroxisomas, y no en las mitocondrias donde será otra enzima, la glutatión peroxidasa la que se encargue de la degradación del H₂O₂. La actividad de la CAT tiene lugar en dos pasos. Inicialmente una molécula de H₂O₂ oxida al hierro hemo a ferroxilo y se genera un radical catiónico de porfirina. Una segunda molécula de H₂O₂ actúa como agente reductor que reactiva a la CAT de su estado de reposo, produciendo agua y oxígeno (Chelikani et al., 2004). La CAT también reacciona eficientemente con donantes de hidrógeno como etanol, ácido fórmico, fenoles o metanol presentando una actividad peroxidasa (Ighodaro & Akinloye, 2018).

Su papel defensivo contra el estrés oxidativo en células y tejidos está ampliamente reconocido. La sobreexpresión de CAT aumenta la resistencia celular a la toxicidad producida por el H₂O₂ y a las posibles lesiones generadas por los procesos de oxidación. Se ha observado que ratones transgénicos que sobreexpresan CAT tiene una



mayor protección contra las lesiones miocárdicas. A pesar de que a baja concentración el H_2O_2 ejerce importantes funciones fisiológicas en el organismo, participando en la señalización de la proliferación celular, el metabolismo de los carbohidratos, la función mitocondrial, la muerte celular y la activación plaquetaria (Dröge, 2002); a altas concentraciones es muy perjudicial para las células (Ercal et al., 2001). Así pues la capacidad de la CAT para controlar la concentración de H_2O_2 celular tiene un papel fundamental en todos los procesos fisiológicos anteriormente mencionados.

El mal funcionamiento o deficiencia de la CAT está asociado con diversas enfermedades, como la anemia, hipertensión, enfermedad de Alzheimer, esquizofrenia, trastorno bipolar, vitíligo y diabetes mellitus, entre otras. Variaciones genéticas en el gen de la CAT y/o en la región promotora, juegan un importante papel en la patogénesis de diversas enfermedades (diabetes tipo I, diabetes tipo II, hipertensión, osteonecrosis, desnutrición, asma, cáncer de mama y carcinoma hepatocelular) (Nandi & Yan, 2019).

2.2.3.1.3 Glutación peroxidasa

La glutación peroxidasa (GPx) es una importante enzima intracelular que actúa sobre el H_2O_2 descomponiéndolo en agua, y sobre los peróxidos lipídicos, descomponiéndolos en sus correspondientes alcoholes. Ejerce su función principalmente a nivel mitocondrial, aunque en ocasiones también en el citosol (Góth et al., 2004). Esta enzima desempeña un importante papel protector frente al estrés oxidativo en el proceso de peroxidación lipídica.

La actividad de la GPx podrá requerir la presencia de selenio como cofactor dando lugar a una familia de isoformas de selenoproteínas, con una diferente

localización que condicionará su actividad, o ser independiente del selenio (glutación S-transferasa) (Matés et al., 1999). Las diferencias entre ambas radican principalmente en la cantidad de subunidades, el mecanismo catalítico y la unión del selenio en el centro activo. El metabolismo del glutación es uno de los mecanismos de defensa antioxidante más importantes presentes en las células. Hay al menos cuatro isoformas diferentes de GPx dependientes de selenio en animales (Brigelius-Flohé, 1999), aunque según Morón y Cortázar, (Morón & Castilla-Cortázar, 2012) existen al menos 8 GPx en humanos (GPx1-GPx8). De entre ellas, la GPx1 es la selenoperoxidasa más abundante y está presente prácticamente en todas las células. Cabe destacar que la GPx4 es la principal isoforma de GPx que descompone los hidroperóxidos de los fosfolípidos (Ighodaro & Akinloye, 2018).

La GPx es capaz de agregar dos electrones a los peróxidos para reducirlos y formar selenoles (Se-OH), evitando que actúen como sustratos potenciales para la reacción de Fenton. El mecanismo de acción de la GPx se lleva a cabo en asociación con el glutación (GSH), presentes en altas concentraciones a nivel celular, catalizando la conversión del H₂O₂ o peróxidos orgánicos en agua o alcohol a la vez que el GSH se oxida.



Junto con la CAT, la GPx actúa frente al H₂O₂ como sustrato, siendo la principal fuente de protección frente a bajos niveles de estrés oxidativo (Eboh, 2014). La GPx tiene importancia clínica puesta de manifiesto en diversos estudios. Así se ha observado que una menor actividad de GPx hace que las personas puedan estar predispuestas a una protección antioxidante deteriorada, que puede conducir a un daño oxidativo en los



ácidos grasos de membrana y proteínas funcionales (Chabory et al., 2009). Incluso una deficiencia de GPx1 podría inducir directamente un aumento del estrés oxidativo vascular pudiendo provocar disfunción endotelial (Forgione et al., 2002) y también se ha visto implicada en el desarrollo y prevención de diversas patologías incluyendo cáncer y enfermedades cardiovasculares (Rayman, 2005).

2.2.3.1.4 Glutation reductasa

El glutatión reducido (GSH) es esencial para la homeostasis redox del organismo. Puede sintetizarse en forma reducida, pero existen mecanismos que permiten reciclarlo. La glutatión reductasa (GR), es una enzima oxidoreductasa dependiente de NADPH, que cataliza la conversión de glutatión oxidado (GSSG) en (GSH). Así pues regula la relación entre GSH/GSSG y suministra GSH para distintas enzimas, entre las que destaca la GPx, como se ha mencionado anteriormente (Diaz-Vivancos et al., 2015). Contiene dos moléculas de dinucleótido de flavina y adenina (FAD) como grupo prostético, que es reducible por NADPH.



La GR se encuentra ubicuamente en todos los organismos desde procariotas hasta eucariotas, incluidas plantas y mamíferos (Gill et al., 2013). La GR tiende a acumularse en las regiones celulares de alto flujo de electrones, donde se generan las



EROs. En eucariotas se encuentra en el citoplasma y dentro de los orgánulos, incluidos el núcleo y las mitocondrias (Couto et al., 2013; Ge et al., 2014).

Así pues la GR juega un papel esencial en la prevención del estrés oxidativo, de manera indirecta manteniendo los niveles de GSH intracelular, cuyo papel es crítico como uno de los principales sistemas de defensa antioxidante y también contribuye en el mantenimiento del hierro en estado ferroso en la hemoglobina, así como en el mantenimiento de la estructura de los eritrocitos (Berg et al., 2007). La deficiencia de GR se caracteriza por la hemólisis debido a una mayor sensibilidad de las membranas de los eritrocitos al H_2O_2 desempeñando un papel clave en la patogénesis de muchas enfermedades (Ulus & Tandoğan, 2007).

2.2.3.2 Sistemas antioxidantes no enzimáticos

2.2.3.2.1 Ácido ascórbico

Es un antioxidante hidrosoluble ubicuo y de gran actividad. El enantiómero L de este ácido es la vitamina C, capaz de eliminar en medios biológicos EROs como el $OH\bullet$, alcoxilo y $O_2\bullet^-$ y también ERNs, por lo que previene del daño oxidativo a las principales biomoléculas (Du et al., 2012; Sung et al., 2013). También ejerce un efecto protector del daño peroxidativo sobre los fosfolípidos de membrana, y se ha demostrado que elimina eficazmente los radicales libres en el cerebro (May, 2012), ya que a pesar de no eliminar de manera directa los radicales libres lipofílicos, junto con el tocoferol ejerce un efecto sinérgico sobre la peroxidación lipídica (Du et al., 2012). Su acción antioxidante radica en la capacidad de donar átomos de hidrógeno a los radicales



lipídicos, bloquear al oxígeno singlete y eliminar el oxígeno molecular, además es capaz de eliminar radicales acuosos y regenerar el tocoferol a su forma reducida (Eboh, 2014).

Es necesario incorporar la vitamina C con la dieta, ya que el ser humano no puede sintetizarla (Lobo et al., 2010), a partir de las fuentes naturales principales como son las frutas ácidas, vegetales verdes y tomates. Es necesario tener en cuenta que es una molécula lábil, por lo que el cocinado puede influir negativamente en su conservación. Además debe considerarse que ingestas de dosis elevadas (2000mg/día o superiores), deberán tomarse con precaución, debido a su posible efecto prooxidante o carcinógeno (Naidu, 2003).

2.2.3.2.2 Vitamina E (tocoferol)

Es una vitamina liposoluble que existe en ocho formas diferentes (esteroisómeros), de entre las cuales el α -tocoferol es la principal forma bioactiva en humanos, presentando una mejor absorción y metabolización (Nguyen et al., 2006). Al ser soluble en grasa, actúa como agente protector de las membranas celulares frente al daño oxidativo, siendo su principal función antioxidante la protección contra la peroxidación lipídica. Su mecanismo antioxidante se inicia con la conversión del α -tocoferol en un radical α -tocoferoxilo, por la donación de un hidrógeno lábil a un lípido, o a un radical peroxilo lipídico; entonces el α -tocoferoxilo oxidado puede reducirse a su forma original por acción del ácido ascórbico, como se mencionó anteriormente (Kojo, 2004).

La vitamina E actúa sobre las lipoproteínas de baja densidad, aumentando su resistencia a la oxidación y a su incorporación por parte de los macrófagos



disminuyendo así el riesgo aterogénico, lo que podría contribuir terapéuticamente en la aterosclerosis espontánea. Además, la vitamina E parece tener un efecto preventivo contra diversos tipos de cáncer, como el de mama, próstata y colon, y ciertas enfermedades cardiovasculares, isquemia, artritis y ciertos trastornos neurológicos (Mayo Clinic Medical Information, 2005). A pesar de ello, también se ha puesto de manifiesto que dosis elevadas de α -tocoferol (400 UI/día o superiores, pueden aumentar el riesgo de mortalidad. Las principales fuentes dietéticas de esta vitamina son los aceites vegetales, nueces, frutas, cereales, carne y huevos (Willcox et al., 2004). Es importante tener en cuenta que el almacenamiento y la cocción pueden alterar o destruir el α -tocoferol presente en los alimentos (Mayo Clinic Medical Information, 2005).

2.2.3.2.3 Carotenoides

Los carotenoides son pigmentos presentes en las plantas que se dividen en dos clases, los carotenos y las xantofilas. Los carotenos son carotenoides de hidrocarburos y las xantofilas contienen oxígeno en forma de grupos hidroxilo, carboxilo, metoxilo, ceto o epoxi. El β -caroteno y el licopeno son carotenos típicos. Los carotenoides presentan un efecto antioxidante a baja presión de oxígeno, el β -caroteno puede reaccionar con los radicales $O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} y peroxilo. Además son capaces de regular factores de transcripción como el NF- κ B inhibido por el β -caroteno, previniendo de su activación por parte de oxidantes así como ocurre con el TNF- α y la interleucina 6. Los carotenoides también pueden afectar la apoptosis celular (Birben et al., 2012).

El β -caroteno también denominado provitamina A, ya que puede convertirse en retinol, (necesario para la visión), juega un importante papel en la diferenciación



celular, (Semba et al., 2001), en el sistema inmunitario, (favoreciendo la diferenciación y desarrollo de los leucocitos y de la respuesta inmune) (Imdad et al., 2011), en el desarrollo embrionario (participando en la formación del corazón, oídos, ojos y extremidades), y en la movilización de hierro (desde el almacenamiento para la formación de glóbulos rojos e incorporación en la hemoglobina) (Imdad et al., 2011).

Como antioxidante, el β -caroteno es capaz de inhibir $^1\text{O}_2$. Dentro de su actividad antioxidante destaca su capacidad para disminuir el daño oxidativo celular inducido por la xantina oxidasa, los polimorfonucleares activados o la hipoxantina. Actúa frente a la peroxidación lipídica originada por fuentes enzimáticas de EROs, como el citocromo P₄₅₀ o el sistema xantina-oxidasa, así como los originados por fuentes no enzimáticas como las sales de metales de transición (Hasnain & Mooradian, 2004). Así pues la actividad antioxidante fundamental del β -caroteno es su capacidad para actuar de manera directa contra la lipoperoxidación y modular los niveles endógenos de otros antioxidantes (Gul et al., 2015). Dosis de 20 mg/día durante un tiempo prolongado (5-8 años) han puesto de manifiesto que aumenta el riesgo de padecer cáncer de próstata, pulmón y una mayor mortalidad en fumadores (Seren et al., 2008), aunque estos efectos indeseables no parecen ocurrir en personas que ingieren una dieta con alimentos ricos en β -caroteno, el cual está presente en frutas, verduras como espinacas, zanahorias, tomate, aceites vegetales, mantequilla... (Linster & Van Schaftingen, 2007).

2.2.3.2.4 Coenzima Q10

La coenzima Q10 es un antioxidante biosintetizado en todos los tejidos del organismo en condiciones normales. Presenta varias funciones bioquímicas en el



organismo. De manera general, participa en la cadena respiratoria mitocondrial en el transporte de electrones así como también fuera de la mitocondria. Además como antioxidante frena la cadena de propagación del daño oxidativo interactuando con los radicales libres que dañan a los lípidos (Bentinger et al., 2010). Cuando se aporta de manera exógena, ejerce un efecto protector en las células contra el estrés oxidativo, acumulándose en la mitocondria y previniendo de la peroxidación lipídica (Bhagavan & Chopra, 2007).

Bajas concentraciones están relacionadas con envejecimiento y ciertas enfermedades cardiovasculares, hipertensión, enfermedades coronarias, cáncer y diabetes mellitus (Cooney et al., 2011). Una suficiente ingesta dietética junto con la síntesis *in vivo* proporcionan un suministro adecuado. A pesar de ello se estima que solo el 10% o incluso menos se absorbe de los alimentos (Blatt & Littarru, 2011). Las principales fuentes dietéticas son los alimentos cárnicos, de pollo, pescado o cerdo, las grasas y aceites (Lee et al., 2012), aunque también es importante tener en cuenta las técnicas de cocinado, ya que pueden reducir su contenido en los alimentos, siendo la fritura la que ocasiona más pérdidas (Ercan & El, 2011).

2.2.3.2.5 Melatonina

Es una hormona que se sintetiza principalmente en la glándula pineal y que participa en diversas funciones fisiológicas, incluidas la regulación del reloj biológico, la reproducción en mamíferos y la maduración genital, así como la regulación del metabolismo (Quera Salva et al., 2011). Dentro de sus importantes funciones, como antioxidante es capaz de prevenir la formación de radicales libres y eliminarlos,



mediantes la regulación de la actividad enzimática antioxidante y el estímulo de la actividad de los antioxidantes endógenos (Laudon & Frydman-Marom, 2014; Ozdinc et al., 2016). A diferencia de otros antioxidantes, no experimenta ciclos redox, es decir, no sufre diversas oxidaciones y reducciones, por lo que una vez oxidada, no se reduce ya que forma productos finales de reacción estables tras reaccionar con los radicales libres (Lobo et al., 2010).

La melatonina elimina muy eficazmente los radicales $\text{OH}\cdot$ y tiene capacidad de actuar sobre otras EROs y ERNs como el $^1\text{O}_2$, óxido nítrico y anión peroxinitrito. También evita la producción creciente de EROs derivadas de la actividad mitocondrial (Miller et al., 2010). Gracias a su estructura química y a su pequeño tamaño molecular, puede atravesar las membranas biológicas y reaccionar con los componentes celulares, ejerciendo su acción antioxidante en entornos celulares acuosos y alifáticos. La melatonina juega un importante papel beneficioso en múltiples enfermedades como el cáncer, accidente cerebrovascular, enfermedades neurodegenerativas, envejecimiento... (Devore et al., 2016).

2.2.3.2.6 Flavonoides

Son compuestos polifenólicos presentes en la mayoría de las plantas. Atendiendo a su estructura, se han identificado y clasificado más de 4000 flavonoides. Actúan como quelantes de iones metálicos y al donar un hidrógeno a los radicales libres forman un radical estable y no reactivo, por lo que interfieren en la peroxidación lipídica (Halliwell, 2007). Tienen una potente actividad antioxidante que les permite ejercer efectos beneficiosos en la salud humana (Miller, 1996). Previenen o retrasan la



aparición de enfermedades degenerativas y crónicas, artritis, cáncer, enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, inflamación, envejecimiento...

2.2.3.2.7 Otros antioxidantes

La ferritina y la transferrina son responsables del almacenamiento y del transporte de hierro. Cualquier fallo en su metabolismo podría provocar que el hierro circulase libre pudiendo ejercer un efecto prooxidante. La ceruloplasmina puede oxidar el hierro, impidiendo su acción prooxidante además de ser la proteína responsable de incorporar el cobre al interior celular (Cea Bonilla et al., 2002).

La taurina es un β -aminoácido que tiende a acumularse en el interior de las células eucariotas, siendo principalmente abundante en los neutrófilos. Presenta una capacidad de captación de radicales libres, pudiendo transformarlos en sustancias menos dañinas. Además, participa en reacciones de conjugación de xenobióticos (Schaffer et al., 2014).

2.3 LECHE DE CABRA

La leche constituye el primer alimento para los mamíferos, proporcionándoles la energía y nutrientes necesarios para garantizar en el periodo postnatal, un correcto crecimiento y desarrollo. Por lo general el consumo de leche se detiene al finalizar el periodo de destete, salvo en los humanos, que la ingieren durante su vida adulta, siendo



un componente esencial de la dieta de unos 6 millones de personas. Además de la leche, se producen y consumen otros productos lácteos (yogurt, queso, nata, mantequilla y kéfir entre otros) en todo el mundo desde hace milenios, ya que se consideran alimentos nutritivos y balanceados que tienen un papel importante dentro de una dieta saludable. Así pues el impacto que ejerce la leche y sus derivados en la salud humana es muy relevante (Pereira, 2014).

La leche se considera un alimento con una excelente densidad nutricional, ya que aporta un elevado contenido de nutrientes en relación a su aporte calórico. Una ración de 200 ml presenta un aporte energético de 130 kcal, grasa de 7.6 g y proteico de 6.2g (FAOSTAT, 2012). Los hidratos de carbono, grasas y proteínas que aporta son de alto valor biológico, además se considera una fuente de minerales y vitaminas, todos ellos con importantes efectos en el organismo (Fernández Fernández et al., 2015). Teniendo en cuenta su valor nutricional se recomienda una ingesta de dos a cuatro raciones diarias de leche y sus derivados, dependiendo del estado fisiológico y de la edad (Baró et al., 2010).

La composición y características de la leche varían en función de la especie (Tabla 4). En Europa Occidental la leche que se consume principalmente es la de vaca, seguida de la de cabra y oveja (Baró et al., 2010). La leche de cabra a pesar de haber sido un componente esencial de la “Dieta Mediterránea”, durante años ha sido considerada como la leche que consumían las personas con menos recursos, donde era esencial para producir alimentos de calidad y que aun representa una importante fuente proteica para esa población (Bidot Fernández, 2006). Fue a partir de 1960, cuando tanto la leche de cabra como sus derivados lácteos comenzaron a generar un creciente interés en la población, debido a su importante valor nutricional. Desde entonces ha llegado a



considerarse un nutracéutico y la industria alimentaria la considera como un recurso emergente. Tanto es así que la población de cabras a nivel mundial se ha incrementado desde el año 2000 al 2013 un 133.8%, aunque este incremento podría ser mucho mayor si se tiene en cuenta que el registro y recuento en países en vías de desarrollo es muy deficiente. En 2016 la producción de leche de cabra en el mundo ascendía a 15.262.116 toneladas, siendo Francia el principal productor de leche de cabra en Europa, seguida de España y Grecia (FAOSTAT, 2012). Teniendo en cuenta que la producción ha aumentado en las últimas décadas más del doble, las estimaciones y tendencias del mercado estiman que para el año 2030 podría aumentar otro 53% (Pulina et al., 2018).

La composición de la leche de cabra se ve influenciada por la raza, condiciones ambientales, edad, periodo de lactancia, alimentación, salud de las ubres, tiempo y periodo de ordeño, al igual que sucede con la composición de la leche de otros mamíferos (Amigo & Fontecha, 2011). El interés creciente por parte del consumidor de la leche de cabra y sus derivados lácteos se relaciona con los beneficios nutricionales que ofrece. A pesar de que su composición es similar a la leche de vaca en relación al contenido graso, proteico y mineral (Tabla 4), existen diferencias importantes que afectan tanto al valor nutricional como a la digestibilidad (Clark & Mora García, 2017). Los ácidos grasos de la leche de cabra tienen una longitud de cadena menor que los de la leche de vaca, y los glóbulos de grasa son más pequeños, mejorando su potencial digestivo (Hodgkinson et al., 2018). Además la leche de cabra contiene compuestos beneficiosos para la salud como son los péptidos bioactivos; ácidos linoleicos conjugados; y oligosacáridos (Songisepp et al., 2005; Abeijón Mukdsi et al., 2013; Assis et al., 2016). Por todo ello, en los países desarrollados, la leche de cabra es

consumida por personas que presentan intolerancia a la leche de vaca o trastornos digestivos, principalmente (Pulina et al., 2018).

Tabla 4. Composición básica de la leche en función de la especie.

| Componentes | Leche humana | Leche de cabra | Leche de vaca |
|----------------------------|--------------|----------------|---------------|
| Energía (kcal) | 70 | 69 | 61 |
| Sólido totales (g/100g) | 12.4 | 13.2 | 12.6 |
| Grasa (g/100g) | 3.8 | 4.5 | 3.7 |
| Proteínas totales (g/100g) | 1.0 | 3.6 | 3.4 |
| Lactosa (g/100g) | 7.0 | 4.3 | 4.7 |
| Minerales (g/100g) | 0.2 | 0.8 | 0.7 |

Fuente: Modificada de Turkmen, 2017.

Teniendo en cuenta todas las propiedades beneficiosas de este alimento natural (Figura 5), el grupo de investigación AGR-206 del PAIDI lleva caracterizando y estudiando la leche de cabra desde hace años y ha puesto de manifiesto sus efectos beneficiosos en la salud. Desde el punto de vista lipídico, se ha observado que la leche de cabra mantiene unos niveles adecuados de triglicéridos y disminuye los niveles plasmáticos de colesterol (Alfárez et al., 2001; López-Aliaga et al., 2005). Contiene ácidos grasos esenciales como el linolénico, araquidónico y linoleico, así como ácidos



grasos de cadena corta y media (cáprico, caprílico y caproico). También contiene proteínas de alto valor biológico y fácil absorción (Lopez-Aliaga et al., 2003; Ramos et al., 2005). Respecto a su perfil mineral contiene selenio, cinc y cobre, minerales antioxidantes, a los que mejora su utilización nutritiva (Barrionuevo et al., 2002; Barrionuevo et al., 2003), pudiendo ejercer un efecto positivo en procesos oxidativos. De entre sus minerales destacan el calcio y el fósforo, que presentan una elevada digestibilidad, y una mejor absorción, y además mejora el uso del hierro minimizando las posibles interacciones con otros minerales (calcio, fósforo, y magnesio) (López Aliaga et al., 2000). Atendiendo a su contenido vitamínico, la leche de cabra es fuente de vitaminas A, E, D, riboflavina, niacina y tiamina. Así pues es un alimento muy saludable que influye positivamente en el metabolismo del hierro, (Nestares et al., 2008) y en el recambio óseo (Díaz-Castro et al., 2009). Tiene un elevado contenido probiótico, incluyendo bacterias productoras de ácido láctico (García et al., 2014). Además, la leche de cabra presenta una gran similitud con la leche materna, sus valores nutritivos son aproximados y se considera una alternativa muy válida como sustituta de la humana. Por todo ello, médicos y nutricionistas indican el consumo de leche de cabra en personas que presentan intolerancia a la lactosa o alergia a la leche de vaca, así como en personas que causan afecciones intestinales.

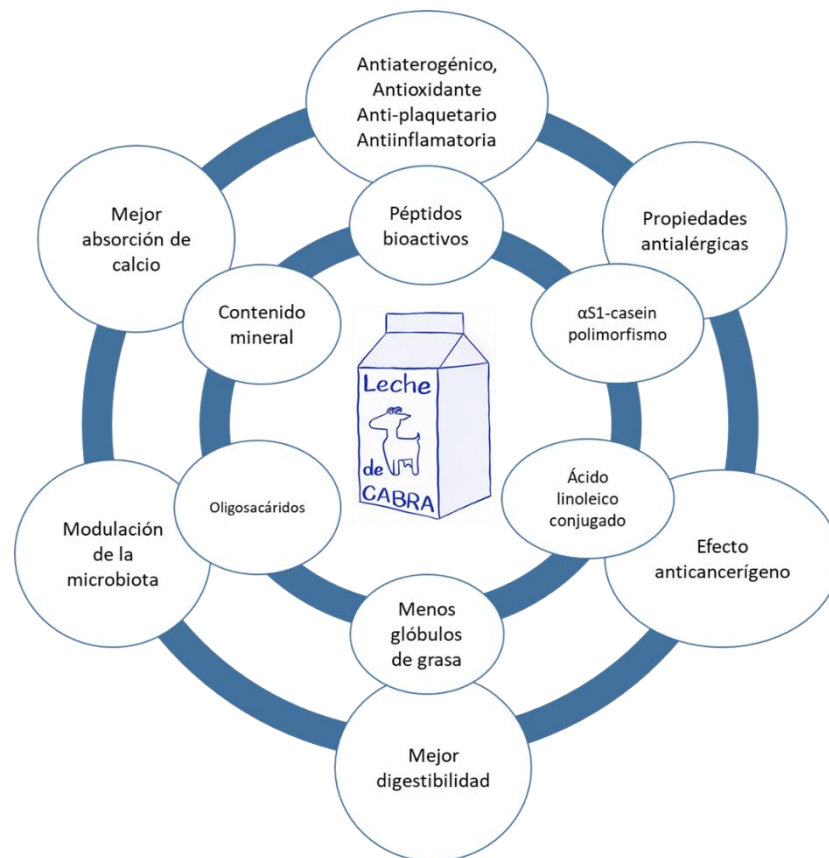


Figura 5. Resumen de los principales componentes y efectos beneficiosos de la leche de cabra. Modificada de (Verruck et al., 2019).

La leche de cabra también se utiliza para producir una amplia variedad de derivados lácteos, como bebidas, leche a temperatura ultra alta, productos fermentados (yogurt, queso, suero de leche...), mantequilla, helados, dulces... (Kalyankar et al., 2016; Aryana & Olson, 2017; Fazilah et al., 2018). Además, la leche de cabra también es una excelente matriz para desarrollar una gran variedad de productos innovadores que promueven la salud y alimentos funcionales (Silanikove et al., 2010). Su baja alergenicidad y alta digestibilidad la han llegado a convertir en un alimento esencial para ancianos y bebés.

2.3.1 Composición nutricional

Como se ha mencionado anteriormente la composición de la leche de cabra puede variar según factores fisiológicos, genéticos, de manipulación y ambientales (Mayer & Fiechter, 2012), a los que habría que incluir la amplia variabilidad existente dentro de la misma raza, debida al extenso y complejo polimorfismo genético de caseínas presentes en la leche de cabra (Amigo & Fontecha, 2011).

Así pues, la leche de cabra se considera una mezcla cualitativamente constante de grasas, hidratos de carbono, proteínas, minerales, vitaminas... Entre estos compuestos se encuentran péptidos y lípidos bioactivos y otros componentes bioactivos como hormonas, citocinas, oligosacáridos y nucleótidos (Figura 5), que pueden tener un papel importante en el desarrollo y mantenimiento de los procesos metabólicos, inmunológicos y fisiológicos y, por lo tanto, contribuir al desarrollo de productos lácteos funcionales (Songisepp et al., 2005; Salva et al., 2011; Abeijón Mukdsi et al., 2013; Assis et al., 2016).

2.3.1.1 Grasa

Los lípidos son uno de los componentes más importantes de la leche de cabra, así como de otras leches de mamíferos, ya que afectan al valor nutricional, características organolépticas y físicas y al coste (Amigo & Fontecha, 2011). Suponen el mayor aporte calórico, aunque este variará si la leche es entera, semidesnatada o desnatada (Jenkins & McGuire, 2006). Los triglicéridos son los componentes



principales de la fracción grasa, alrededor del 98% de la grasa total, junto con pequeñas cantidades de colesterol, fosfolípidos, ácidos grasos libres y mono y diacilgliceroles (Taylor & MacGibbon, 2011).

En la leche de cabra, la grasa está presente en forma de glóbulos que no se agregan de manera natural al enfriarse, debido a que carecen de aglutinina, (responsable de la agregación de glóbulos de grasa en la leche de vaca) (Amigo & Fontecha, 2011). Además estos glóbulos de grasa tienen un menor tamaño promedio, (aproximadamente 3.5 μm), en comparación con los de vaca (4.5 μm). Este menor tamaño favorece su dispersión y permite crear una mezcla más homogénea, favoreciendo la actuación de las lipasas sobre una mayor superficie de grasa y por lo tanto mejorando su digestibilidad. Desde el punto de vista de la salud humana, la homogeneización natural de la leche de cabra es mejor para la digestión que los lácteos de vaca homogeneizados mecánicamente (Park, 2017).

La grasa láctea es rica en ácidos grasos de cadena corta y media, que son fácilmente absorbibles, y constituyen una fuente energética inmediata con baja tendencia a acumularse en el tejido adiposo (Mataix & Rivas, 2015). La mejor digestibilidad de la leche de cabra en comparación con la de vaca, también se relaciona con las diferencias en la composición de ácidos grasos (Tabla 5). La cantidad de ácidos grasos esenciales de cadena corta, media y larga, es mayor por lo general en la leche de cabra en comparación con la de vaca. Es rica en ácidos grasos de cadena media, (AGCM), un 35% frente al 17% de la leche de vaca. Son una fuente grasa que se absorbe rápidamente y sin sufrir re-esterificación alcanzan de manera directa la circulación portal. Se transportan al hígado donde sufren β -oxidación preferentemente. Penetrarán en las mitocondrias de las células hepáticas sin necesidad de carnitina, por lo

que su β - oxidación es más rápida que la de los ácidos grasos de cadena larga (Alfárez et al., 2001). Estos AGCM, tienen elevada importancia en el metabolismo energético de los hidratos de carbono y lípidos, como se pone de manifiesto al estimular la lipogénesis o gluconeogénesis y al inhibir la glicolisis. También son capaces de modular el metabolismo energético mitocondrial; disminuyen la eficacia de la síntesis de ATP oxidativo y en la cadena respiratoria, proporcionan equivalentes reductores (Schönfeld & Wojtczak, 2016).

Tabla 5. Composición de los principales ácidos grasos en la leche de cabra y vaca.

| Ácidos grasos (%) | Leche de cabra | Leche de vaca |
|-------------------------------------|----------------|---------------|
| Butírico (C _{4:0}) | 2.18 | 3.70 |
| Caproico (C _{6:0}) | 2.39 | 2.40 |
| Caprílico (C _{8:0}) | 2.73 | 1.50 |
| Cáprico (C _{10:0}) | 9.97 | 3.20 |
| Láurico (C _{12:0}) | 4.99 | 3.60 |
| Mirístico (C _{14:0}) | 9.81 | 11.10 |
| Miristoleico (C _{14:1}) | 0.18 | 0.90 |
| Pentadecanoico (C _{15:0}) | 0.71 | 1.20 |
| Palmítico (C _{16:0}) | 28.00 | 28.30 |
| Palmitoleico (C _{16:1}) | 1.59 | 1.60 |
| Esteárico (C _{18:0}) | 8.88 | 11.80 |
| Oleico (C _{18:1}) | 19.3 | 18.80 |

| | | |
|---|------|------|
| Linoleico (C_{18:2}) | 3.19 | 1.40 |
| Linolénico (C_{18:3}) | 0.42 | 0.90 |
| Linoleico conjugado (C_{18:2}) | 0.70 | 1.10 |

Fuente: modificada de Verruck et al., 2019.

De entre los AGCM, los ácidos grasos cáprico, caprílico y caproico representan aproximadamente del 15-18% de todos los ácidos grasos presentes en la leche de cabra, mientras que en la vaca, esos mismos ácidos grasos representan solo el 5-9% (Clark & Mora García, 2017). Dicha composición se asocia con el característico sabor y olor de la leche de cabra (Amigo & Fontecha, 2011). Principalmente los ácidos grasos caprílico y caproico presentan propiedades diferentes la de los ácidos grasos de cadena larga cuando son metabolizados en el ser humano.

Estos ácidos grasos de cadena media son la fuente de los triglicéridos de cadena media (MCT). La leche de cabra es rica en MCT, alrededor de un 30.83% en comparación con el 25.16% de la leche de vaca. Este alto contenido de MCT vuelve a ser un indicador metabólico que permite obtener energía más rápidamente, ya que son un sustrato altamente disponible en comparación con los triglicéridos de cadena larga. Así pues, la leche de cabra constituye un importante aporte energético, especialmente en niños en etapa de crecimiento (Turkmen, 2017). Estudios en animales de experimentación que consumieron dietas basadas en leche de cabra o de vaca, han puesto de manifiesto que en ambos casos el aumento de peso fue similar, aunque la cantidad de leche de cabra consumida fue menor, estos resultados podrían explicarse



por la mejor disponibilidad energética que presenta la leche de cabra (Alfárez et al., 2001), como se ha mencionado anteriormente.

Otros componentes de elevada importancia biológica presentes en la grasa de los rumiantes, son los ácidos grasos esenciales y los ácidos linoleicos conjugados (CLA). La leche de cabra contiene más ácidos grasos esenciales (ácidos linoléico y araquidónico) y CLA, en comparación con otras leches (Amigo & Fontecha, 2011). El contenido total de CLA en la leche de cabra es de 35,75 mg/100 g mientras que en la leche de vaca solo es de 15,62 mg/100 g (Ceballos et al., 2009). Se ha puesto de manifiesto como algunos isómeros de CLA previenen de la aparición de ciertas enfermedades y presentan efectos beneficiosos para la salud (Bauman et al., 2011). Así pues ejercen este efecto beneficioso en la inhibición de la aterosclerosis, cáncer, actividad antioxidante, antiinflamatoria, antihipertensivas, antidiabéticas, mejora de la respuesta inmune y antiadipogénicas (Elwood et al., 2010).

En relación al resto de componentes de la fracción lipídica de la leche de cabra se pueden encontrar otros compuestos bioactivos como el ácido cis y trans palmitoleico, el ácido fitánico, el ácido alfa-linolénico y el ácido butírico, los cuales se considera que ejercen efectos positivos en la salud humana (McBain et al., 1997; Belury, 2002). Asimismo, el contenido de colesterol en la leche de cabra es menor (11 mg/100g de leche) que en la leche de vaca (14 mg/100g de leche) (Turkmen, 2017), a pesar de que la fracción lipídica total sea mayor. Este menor nivel de colesterol puede tener importancia para la salud humana y en especial en la enfermedad coronaria. Además, se ha observado en ratas, que la secreción biliar de colesterol podría aumentar tras el consumo de leche de cabra y disminuir los niveles plasmáticos del mismo en comparación con ratas alimentadas con leche de vaca (López-Aliaga et al., 2005).



Respecto al contenido de ácidos grasos libres en la leche de cabra es de 3.11 $\mu\text{eq/ml}$ y en la leche de vaca es algo menor, (3.0 $\mu\text{eq/ml}$). El contenido de estos ácidos grasos se ve influenciado por la raza y la etapa de la lactancia, siendo máximo durante la mitad de la lactancia (Agnihotri & Prasad, 1993). Se ha correlacionado la intensidad del olor “caprino” de la leche de cabra, con estos ácidos grasos, principalmente con los ácidos octanoico ($\text{C}_{8:0}$) y decanoico ($\text{C}_{10:0}$). Sin embargo, existen otros factores que pueden estar involucrados en ese olor, ya que muestras que presentaban el mismo contenido de ácidos grasos libres, mostraron olores diferentes (Juarez & Ramos, 1986). La cantidad de ácidos grasos libres varía dependiendo del tipo de producto lácteo, del tipo de cuajo utilizado, de los iniciadores lácticos, del tiempo de maduración, de los métodos de fabricación y demás factores (Nouira et al., 2011). En cualquier caso, la leche de cabra no debería generar rechazo al consumidor debido a su olor, ya que estos ácidos grasos en el interior del glóbulo graso, están encapsulados, por lo que si se manipula correctamente, no presenta grandes diferencias respecto al de la leche de vaca, en cuanto a su olor se refiere. Si la membrana del glóbulo graso se rompe, estos ácidos grasos pueden liberarse, pero si estuvieran formando parte de triglicéridos, sería necesaria la actuación de una lipasa para poder liberarlos. Si el proceso de pasteurización fue correcto, estas enzimas habrían sido destruidas y por tanto no podrían liberarse estos ácidos grasos.

2.3.1.2 Hidratos de carbono

El principal carbohidrato de las leches de todos los mamíferos excepto de las focas, es la lactosa (Park et al., 2007), un disacárido formado por una molécula de



glucosa y otra de galactosa, sintetizado en la glándula mamaria. Presenta un leve sabor dulce, es sensible al calor y es sustrato para la fermentación bacteriana, de elevada importancia en la elaboración de derivados lácteos fermentados, como los yogures o los quesos. Su contenido en la leche de cabra es algo menor que en la de vaca, 4.3 g/100g y 4.7g/100g respectivamente (Turkmen, 2017).

La lactosa es un nutriente que ejerce importantes funciones fisiológicas en el organismo. Promueve el peristaltismo intestinal, la secreción de las glándulas digestivas y participa en la regulación de los ácidos gástricos. Además, favorece la absorción intestinal de calcio, fósforo y magnesio (Lad et al., 2017), parece ser que a través de un aumento de la permeabilidad intestinal, así como la utilización de la vitamina D. También es de gran importancia durante la producción y secreción de leche en el sistema de conductos de la ubre.

Como se ha mencionado anteriormente, la concentración de lactosa en la leche de cabra es menor que en la de vaca, pudiendo llegar a ser hasta un 41% más baja que en la leche humana. Este hecho juega un importante papel en aquellas personas que carecen de lactasa en sus células intestinales, o que esta enzima presenta una menor actividad (Mataix & Rivas, 2015), lo que provocaría un cúmulo de lactosa sin hidrolizar, que aumentaría la osmolaridad, ocasionando trastornos digestivos no deseados. Es por ello que la leche de cabra presenta menos problemas relacionados con la intolerancia en estos individuos (Richardson, 2004).

Otros tipos de carbohidratos presentes en la leche de cabra son los glucopéptidos, glucoproteínas y azúcares de nucleótidos en pequeñas cantidades (Amigo & Fontecha, 2011). Además, la leche contiene también otros productos

derivados de la lactosa como lactitol, galactooligosacáridos, lactulosa, ácido lactobiónico, entre otros (Park, 2009). Estos componentes ejercen un papel importante como prebióticos, favoreciendo el crecimiento de bacterias probióticas (Turkmen, 2017) y mejorando la absorción de calcio y magnesio a nivel intestinal (Schaafsma, 2008).

Aunque en menor proporción, los oligosacáridos presentes en la leche de cabra juegan un papel esencial en la salud. Su contenido en la leche de cabra es de 250-300 mg/L, cuatro a cinco veces mayor que en la leche de vaca (Kiskini & Difilippo, 2013). Los oligosacáridos de la leche de cabra son estructuralmente más similares a los de la leche humana, en comparación con la leche de otras especies de rumiantes (Giorgio et al., 2018). Los oligosacáridos presentan propiedades antigénicas y son valiosos para promover el crecimiento de la microbiota intestinal en recién nacidos (Park et al., 2007). Además ejercen un efecto protector de las células de la mucosa intestinal frente al ataque de patógenos, ya que promueven el crecimiento de *Lactobacillus bifidus* en el tracto intestinal, con un mayor efecto en los recién nacidos (Raynal-Ljutovac et al., 2008). Presentan también un efecto beneficioso a nivel cerebral y del sistema nervioso (Park, 2009). Estudios en animales de experimentación han demostrado que los oligosacáridos de la leche de cabra disminuyen la inflamación intestinal y contribuyen a la recuperación de la mucosa colónica dañada (Lara-Villoslada et al., 2006). Este efecto antiinflamatorio también se ha observado en la enfermedad inflamatoria intestinal (Daddaoua et al., 2006).

2.3.1.3 Proteínas

Al igual que el resto de macronutrientes, las proteínas son componentes de gran interés nutritivo, con relevancia en la salud humana y a nivel tecnológico (Sanz et al., 2003). Las fracciones proteicas de la leche se pueden dividir en dos fases, la fase soluble compuesta por las proteínas del suero, y las caseínas que se encuentran suspendidas como micelas. Estas fracciones son similares tanto en la leche de cabra como en la de vaca y la humana. Al igual que en la leche de vaca, las caseínas se clasifican como κ -, β -, α_1 -, α_2 - y γ -caseínas y las proteínas del suero como β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina, albúmina sérica e inmunoglobulinas (Tabla 6).

La composición de caseína difiere entre las leches de diferentes especies y se ve influenciada por un alto polimorfismo genético en el locus de caseína (afectando principalmente a la α_1 -caseína) (Park, 2011). La leche de cabra y vaca contienen proporciones similares de κ -caseína y α_2 -caseína (Clark & Sherbon, 2000). Pero la fracción de β -caseína es el componente principal tanto en la leche de cabra como en la leche humana, ya que representa $\sim 54.8\%$ y $\sim 60\% - 70\%$, respectivamente, del total de caseínas de la leche; mientras que en la leche de vaca, la α_1 -caseína es la proteína que se encuentra en mayor proporción ($\sim 38\%$ de caseína total). La leche de cabra tiene una composición más baja de α_1 -caseína (5,6% de la caseína total) que la de la leche de vaca (Park, 2006; Selvaggi et al., 2014).

Tabla 6. Composición de las principales proteínas en la leche de cabra y vaca. Los valores relativos a las caseínas individuales y a las proteínas del suero, se expresan como porcentaje de la caseína total y del suero total, respectivamente.

| Componente | Leche de cabra | Leche de vaca |
|---|------------------|------------------|
| Caseínas totales (g/100 mL) | 2.33–4.63 | 2.40–2.80 |
| α1-Caseína | 0*–28.0 | 42.86–53.57 |
| α2-Caseína | 10.0–25.0 | 10.71–14.28 |
| β-Caseína | 0*–64.0 | 32.14–39.28 |
| κ-Caseína | 15.0–29.0 | 10.71–14.28 |
| Proteínas del suero totales (g/100 mL) | 0.37–0.70 | 0.50–0.70 |
| α-Lactoalbúmina | 17.8–33.3 | 14.28–21.42 |
| β-Lactoglobulina | 39.2–72.1 | 28.57–57.14 |
| Albúmina sérica | 5.1–21.5 | 1.43–5.71 |
| Immunoglobulina | 4.6–21.4 | 8.57–14.28 |

*Ausencia de β -caseína o α 1-caseína en la leche de animales portadores de los respectivos alelos nulos.

Fuente: modificada de Verruck et al., 2019.

Del total de las proteínas de la leche de cabra, la fracción correspondiente a la caseína, representa un 74% y la fracción de las proteínas del suero casi un 17% (Al-Saadi et al., 2014). La proporción de micelas de caseína de pequeño tamaño, es mayor en la leche de cabra que en la de vaca, lo que explica su mayor susceptibilidad al calor,



a la desnaturalización y la mejor digestibilidad de la leche de cabra y de sus productos lácteos (Haenlein, 2004), además de que tiene un mayor contenido de calcio y fósforo (Park et al., 2007). Las micelas de caseína de la leche de cabra presentan un tamaño de 180nm mientras que las de la leche de vaca es de 260nm. Además, la fracción de las caseínas de la leche de cabra presenta una menor tensión y tiempo de cuajado al compararse con la α s1-caseína de la leche de vaca. Debido a ello, a nivel gástrico se formará una cuajada más suave y fina que requerirá un menor tiempo de tránsito, lo que favorecerá también la mejor digestibilidad de la leche de cabra, de especial importancia en personas que sufren patologías como el estreñimiento (Richardson, 2004). A nivel colónico llegarán menos residuos sin digerir que puedan ser sustrato para posibles fermentaciones bacterianas (Rodden, 2004).

Estas diferencias en la composición de la caseína en la leche de cabra, ejercen efectos significativos en la salud humana, así como en algunos parámetros tecnológicos, de los productos lácteos elaborados con leche de cabra. La similitud entre la leche de cabra y la humana, en relación a la fracción correspondiente a la caseína, puede explicar que la proteína de la leche de cabra se digiera mejor que la de vaca (Boyazoglu & Morand-Fehr, 2001; Park, 2011; Yangilar, 2013), debido a la mayor proporción de β -caseína que de α s1-caseína. La β -caseína es más sensible a la acción de la pepsina que la α s1-caseína (El-Agamy, 2007), favoreciendo así su hidrólisis, como se ha puesto de manifiesto tras investigar la acción de la pepsina y la tripsina sobre la caseína de diferentes mamíferos (ser humano, cabra, vaca). Se observó que la hidrólisis de las caseínas humanas fue del 100%, la de las caseínas de la leche de cabra del 96% y las la de las caseínas de la leche de vaca de un 70-90% (Jasińska, 1995).



Con respecto a la porción de proteína soluble, también existen diferencias entre la leche caprina y bovina, concretamente en los aminoácidos cargados de α -lactoalbúmina, y se ha detectado que dos variantes genéticas presentan lisina o alanina como residuos N-terminales (Amigo & Fontecha, 2011). Además, la β -lactoglobulina de la leche de cabra presenta una menor carga neta que la de vaca. En relación a la mejor digestibilidad proteica de la leche de cabra, investigaciones *in vitro* evaluaron la digestión por enzimas proteolíticas humanas, de leche de cabra y vaca, demostrando que solo un 23% de la β -lactoglobulina de leche de cabra permaneció sin digerir, mientras que en la leche de vaca fue un 83% (Almaas et al., 2006). Tanto la β -lactoglobulina, la α -lactoalbumina y la albúmina sérica participan positivamente en el metabolismo del hierro, favoreciendo su absorción, además de que la mayor parte de sus componentes dietéticos, pueden reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} (Almaas et al., 2006). Además, de las proteínas mencionadas, la leche de cabra contiene lactoferrina e inmunoglobulinas, proteínas de gran interés biológico.

Durante la digestión de los alimentos, su procesado o fermentación por las bacterias del ácido láctico, se pueden producir péptidos bioactivos a partir de las proteínas inactivas anteriormente mencionadas (Korhonen & Pihlanto, 2007). Estos fragmentos proteicos a medida que se liberan exhiben actividades biológicas específicas como inmunomoduladores, de unión a minerales, antioxidantes, antihipertensivos, opioides, antimicrobianos. En la Figura 6 se indican las actividades biológicas de los péptidos bioactivos presentes en la leche.

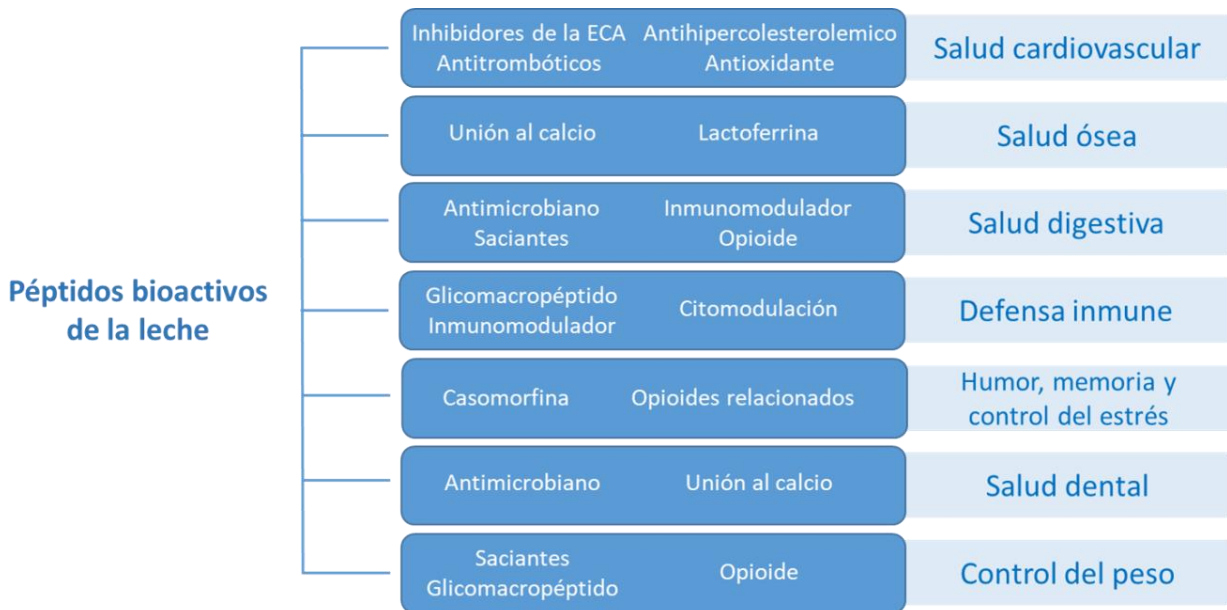


Figura 6. Actividades biológicas específicas de péptidos bioactivos de la leche. Modificada de Verruck et al., 2019.

Muchos de estos péptidos bioactivos que derivan de las proteínas lácteas, pueden presentar más de una funcionalidad a la vez, como ocurre con los péptidos de la secuencia 60-70 de β -caseína, que tienen actividades inhibitorias de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), inmunoestimuladoras y opioides (Korhonen & Pihlanto, 2007). Además el estudio del proteoma de la leche de cabra ha puesto de manifiesto que están presentes ciertas proteínas que no se habían encontrado en la leche de vaca. Estas proteínas pueden ser precursoras de péptidos bioactivos tales como el angiotensinógeno (induce un posible efecto hipotensor), el factor H (contribuye a la protección inmunológica), componentes del sistema del complemento C2 y C6 (factores



de defensa) o el distroglicano (involucrado en el desarrollo normal de la glándula mamaria) (Cunsolo et al., 2015).

Otro aspecto importante a tener en cuenta es el número de personas que presentan alergia a las proteínas de la leche de vaca. Una reacción adversa a la ingestión de este tipo de leche, mediada o no por IgE o mixta (Fiocchi et al., 2010; Koletzko et al., 2012). Se ha observado que las principales proteínas responsables de la alergia a la leche de vaca, son la α S1-caseína y la β -lactoglobulina (Asresie & Adugna, 2014). En el caso de la leche de cabra, sus proteínas presentan una menor capacidad alergénica. El polimorfismo genético presente en las proteínas entre las diferentes especies, es lo que justifica el potencial uso de la leche de cabra como sustituto de la leche de vaca cuando hay enfermedad alérgica (Ballabio et al., 2011). Del 30 al 40% de los pacientes que presentan alergia a las proteínas de la leche de vaca, son capaces de tolerar las proteínas de la leche de cabra (Ribeiro & Ribeiro, 2010). Además, en animales de experimentación se han observado mayores niveles de histamina e inmunoglobulina G1 tras ser tratados con leche de vaca, en comparación con los animales tratados con leche de cabra (Lara-Villoslada et al., 2004). Este efecto terapéutico frente a la alergia a las proteínas de la leche de vaca es muy importante, ya que se considera la alergia alimentaria más común, llegando a afectar al 2% de los lactantes durante los primeros 2 años de su vida (Nongonierma et al., 2016). Además se estima que el total de los requerimientos proteicos diarios de un niño hasta los 8 años de edad, pueden ser cubiertos por la leche de cabra, así como cubrir el 54% de los requeridos por la mujer durante el embarazo o lactancia (Bidot Fernández, 2017).

Es importante tener en cuenta que la elevada calidad biológica de las proteínas presentes en la leche, dependerá de los aminoácidos esenciales que las constituyan. Así

pues existen diferencias entre la composición de aminoácidos de la proteína de la leche de cabra y la de vaca (Tabla 7). De manera general, la leche de cabra presenta un mayor contenido de aminoácidos esenciales por gramo de proteína, especialmente en los aminoácidos azufrados y en la lisina. Al analizar la composición de aminoácidos de las proteínas de la leche de cabra y vaca, se han observado grandes diferencias entre las distintas fracciones de caseínas, más que entre las especies (cabra vs vaca) para una misma caseína. Así las α -caseínas contienen mayores niveles de aspartato, lisina y tirosina que la β -caseína y ésta contiene más leucina, prolina y valina que la primera (Park, 2017).

Tabla 7. Composición de aminoácidos esenciales de la proteína de la leche de cabra y vaca.

| Aminoácidos esenciales (g/g de proteína) | Leche de cabra | Leche de vaca |
|---|----------------|---------------|
| Metionina + cistina | 17.7 | 8.4 |
| Triptófano | 5 | 4.6 |
| Treonina | 23 | 15 |
| Leucina | 39 | 35 |
| Valina | 28 | 23 |
| Lisina | 34 | 26 |
| Fenilalanina + tirosina | 42 | 17 |
| Isoleucina | 23 | 21 |

Fuente: modificada de Zibil et al., 2016.



La leche de cabra presenta una relación entre aminoácidos esenciales y totales de 0,46 y una relación entre esenciales y no esenciales de 0,87. Sus caseínas también se caracterizan por contener menos arginina y aminoácidos sulfurados, especialmente la metionina y más glicina. Estas diferencias respecto a la leche de vaca, también contribuyen a explicar su mejor digestibilidad, menores reacciones alérgicas y la formación de la cuajada de la leche de cabra (Yadav et al., 2016).

2.3.1.4 Vitaminas

Las vitaminas que contiene la leche son compuestos metabólicamente orgánicos, bioquímicos y fisiológicos (Park, 2009). Su contenido en la leche de cabra varía en función de ciertas condiciones, como ocurre con otros nutrientes que se han mencionado anteriormente. Así pues su contenido se verá influenciado o el periodo de lactancia, factores ambientales o condicionantes dietéticos (Park et al., 2007).

De manera general, atendiendo a la composición vitamínica, la leche de cabra es similar a la de vaca y a la humana (Tabla 8), aunque existen diferencias en el contenido específico de ciertas vitaminas. Así pues, el contenido de vitamina A quizás pueda ser la diferencia más importante entre las vitaminas presentes en la leche de cabra y vaca. En la leche de cabra todo el β -caroteno se convierte en vitamina A, responsable del color más blanco de la leche de cabra en comparación con la leche de vaca y de su mayor contenido en esta vitamina (Kalyankar et al., 2016). Este hecho es de especial importancia, sobre todo para la población infantil, ya que la deficiencia de vitamina A es muy común en esa etapa y llega a ser responsable de 500000 casos de ceguera y de uno a dos millones de muertes al año (Turkmen, 2017).

Tabla 8. Composición vitamínica de la leche de cabra y vaca.

| Vitamina (mg/100ml) | Leche de cabra | Leche de vaca |
|----------------------------------|-----------------------|----------------------|
| Vitamina A (UI/100 ml) | 191 | 159 |
| Vitamina B1 (Tiamina) | 0.04 | 0.04 |
| Vitamina B2 (Riboflavina) | 0.18 | 0.17 |
| Niacina | 0.19 | 0.09 |
| Ácido Pantoténico | 0.34 | 0.34 |
| Vitamina B6 | 0.01 | 0.06 |
| Biotina | 0.004 | 0.003 |
| Vitamina B9 (Fólico) | 0.0008 | 0.0059 |
| Vitamina B12 | 0.00007 | 0.00042 |
| Vitamina C | 1.5 | 2.1 |
| Vitamina D (UI/100 ml) | 2.4 | 2.2 |
| Vitamina E | - | 0.10 |

Fuente: Modificada de Hayam et al., 2014.

Atendiendo a los requerimientos vitamínicos de un bebé, la leche de cabra puede cubrir las cantidades adecuadas de vitamina A y niacina, y en exceso las de tiamina, riboflavina y pantotenato (Park, 2017). Por el contrario, la leche de cabra presenta niveles más bajos de vitamina B12 y ácido fólico en comparación con la de vaca (Park et al., 1986). Este hecho hizo que en el pasado se le atribuyera a la leche de cabra la

responsabilidad de la llamada “anemia por leche de cabra”, hecho que actualmente se sabe que no es cierto. Si se compara el contenido de ácido fólico presente en la leche de cabra y en la humana, se observa que contiene cantidades muy similares; es con las vitaminas del complejo B donde se observa que su contenido es algo menor en la leche de cabra respecto a la humana (Maree, 1978). La leche de vaca tiene un contenido mucho mayor de ácido fólico (hasta cinco veces más) y de vitamina B12 (Bidot Fernández, 2017). Quizás el bajo contenido de ácido fólico presente en la leche de cabra, en comparación con otras especies, puede estar asociado al hecho de que ciertas proteínas se encuentren unidas al folato, lo que dificultaría su determinación y detección analítica (Zibil et al., 2016).

En relación al contenido de vitamina C, D y piridoxina, tanto la leche de cabra como la de vaca contienen bajos niveles de estas vitaminas, por lo que es necesario complementar con otras fuentes alimentarias para alcanzar los requerimientos (Park, 2017). Desde el punto de vista tecnológico, se ha observado que para preservar ciertas vitaminas presentes en la leche de cabra y extender su vida útil, la pasteurización a alta temperatura y corto tiempo era un buen método (Lavigne et al., 1989). El uso de técnicas como la pasteurización relámpago (HTST) o la pasteurización a ultra temperatura (UHT) reducen más las pérdidas de tiamina, riboflavina y vitamina C en comparación con las técnicas de pasteurización a baja temperatura y mayor periodo de tiempo o el tratamiento en autoclave (Park, 2017).

2.3.1.5 Minerales

El contenido mineral presente en la leche de cada especie sigue un patrón individual, que puede ser indicador de la importancia nutricional de cada leche. Como



se ha mencionado anteriormente con otros componentes de la leche, la variabilidad mineral de la leche de cabra puede deberse a varios factores, como el estado de las ubres, la raza, la genética, los procedimientos analíticos o la etapa de la lactancia (Amigo & Fontecha, 2011).

La leche de cabra contiene niveles superiores de minerales en comparación con la leche de vaca (Tabla 9). Presenta niveles mayores de calcio, fósforo y magnesio (Ceballos et al., 2009) y menores de azufre (Park et al., 2007) que la leche de vaca. De entre las diferencias más significativas en cuanto al contenido mineral entre la leche de cabra y la de vaca, está el contenido en calcio. La leche de cabra tiene 134 mg/100g, mientras que la leche de vaca tiene 119 mg/100 g, siendo su contenido mucho mayor que el de la leche humana que tiene solo 32 mg/100 g. Otra diferencia significativa en la leche de cabra es la del contenido en fósforo, que es de 111 mg/100g, mientras que las leches de vaca y humana tienen 93 mg y 14 mg/100 g, respectivamente.

Tabla 9. Composición mineral de la leche de cabra y vaca.

| Mineral (mg/100g) | Leche de cabra | Leche de vaca |
|------------------------------|-----------------------|----------------------|
| Calcio | 134 | 119 |
| Cloro | 150 | 100 |
| Cobre | 0.05 | 0.06 |
| Yodo | 0.022 | 0.021 |
| Hierro | 0.05 | 0.05 |
| Magnesio | 14 | 13 |
| Manganeso | 0.032 | 0.02 |
| Fósforo | 111 | 93 |
| Potasio | 204 | 151 |
| Selenio | 1.33 | 0.96 |
| Azufre | 28 | 32 |
| Sodio | 50 | 49 |
| Zinc | 0.30 | 0.38 |

Fuente: modificada de Turkmen, 2017.

Es una fuente mineral muy valiosa, especialmente cuando el consumo de otros alimentos como la carne, está disminuido, como puede ocurrir en los países en vías de desarrollo (Park, 2006). En relación al contenido de calcio y fosforo la leche humana contiene solo de un cuarto a un sexto de los niveles de estos minerales presentes en la leche de cabra (Park, 2017). De hecho la leche se considera como la principal fuente de



aporte de calcio de la dieta, y la leche de cabra aporta un 13% más calcio que la leche de vaca. Respecto al fósforo, su mayor contenido en la leche de cabra es importante, debido a que como estrategia nutricional complementa la dieta de personas que se alimentan principalmente de vegetales, frutas, raíces... y además contribuye a la capacidad de tamponamiento que presenta la leche de cabra (Rodden, 2004). La leche de cabra contiene más selenio que la de vaca, un mineral antioxidante, que juega un papel fundamental en la enzima glutatión peroxidasa, como se ha mencionado anteriormente. Se ha puesto de manifiesto que la actividad de dicha enzima en la leche de cabra es del 65% en contraste con el 29% de actividad en la leche de vaca (Debski et al., 1987). En relación a los niveles de yodo, tanto la leche de cabra como la de vaca presentan niveles mayores que los de la leche humana, hecho que puede tener un papel importante debido a la relación del yodo con la función tiroidea y la tasa metabólica corporal (Park, 2017).

Esta mejor composición mineral de la leche de cabra no solo está relacionada con el contenido mineral presente en la leche, sino también con la utilización que el cuerpo humano pueda hacer, tanto en los procesos digestivos como metabólicos (Ceballos et al., 2009). La leche de cabra presenta una mejor biodisponibilidad de calcio, cobre, hierro, fósforo y magnesio que la de vaca (Alfárez et al., 2006). Igualmente se han evaluado los coeficientes de digestibilidad, la biodisponibilidad y el balance de calcio, fósforo, magnesio, hierro, cobre y zinc en animales de experimentación alimentados con dietas basadas en leche de cabra o vaca, concluyendo que debido a las características nutricionales, metabólicas y a su composición, la leche de cabra podría ser un alimento de elección en pacientes con síndrome de malabsorción (López-Aliaga et al., 2010).



2.3.2 Leche fermentada

La leche fermentada se define según la Norma del Codex Alimentarius para leches fermentadas (FAO/WHO, 2010), como un producto lácteo obtenido por fermentación (de composición láctea modificada o no), por la acción de microorganismos adecuados y como resultado de la reducción del pH, con o sin coagulación. En la fermentación láctica, el sustrato a fermentar es la lactosa, que una vez hidrolizada dará lugar a glucosa y galactosa. Posteriormente se formará el ácido láctico y otros compuestos que modifican las características organolépticas del producto fermentado. La disminución del pH, previene de la proliferación microbiana, favorece la precipitación de las caseínas en forma de un fino coágulo, favoreciendo la acción proteolítica de las enzimas digestivas y por tanto su digestibilidad. Además, el calcio y fósforo coloidales de la leche se solubilizan (Mataix & Rivas, 2015).

La fermentación de la leche ocurre desde la antigüedad, de manera natural y ajena a la acción del hombre. Las fermentaciones tradicionales tenían lugar como resultado de la actividad de la microbiota natural presente en los alimentos. Posteriormente la leche fermentaba espontáneamente, pero la reutilización de los recipientes y utensilios utilizados en el proceso de fermentación, contribuyó a estandarizar el proceso. Antiguamente, la fermentación de la leche se realizaba para preservar o aumentar la vida útil de la leche percedera. Así pues, se comenzaron a aislar y estudiar los microorganismos específicos para la fabricación de productos fermentados y hoy en día incluso cada país puede tener un proceso de fermentación característico (Shiby & Mishra, 2013).



La fermentación de la leche mejora la digestibilidad y el sabor de la leche. Ciertas características organolépticas propias de algunos productos lácteos fermentados, se deben a sus perfiles de fermentación, pudiendo hacerlos más apetitosos. Estas características podrán mantenerse en el tiempo si la conservación y el almacenamiento del producto son correctos. Se deben a la producción de ácidos orgánicos u otros compuestos químicos durante la fermentación, que previenen del deterioro de la microbiota, o a la menor actividad del agua. Además ciertos microorganismos que producen mejoras organolépticas deseables, pueden añadirse como cultivos iniciadores de la fermentación (Tamime, 2006; Panesar, 2011).

Las leches fermentadas se producen mediante la adición de cultivos bacterianos a la leche cruda o tratada con calor. Como iniciador del proceso de fermentación, se utilizaba una porción del producto fermentado del día anterior y se inoculaba en la leche fresca. Hoy en día, los iniciadores microbianos del proceso están muy bien definidos, siendo los lactobacilos, estreptococos y lactococos los principales grupos bacterianos utilizados en el proceso de fabricación de fermentados lácteos, debido a sus excelentes características nutricionales y organolépticas, siendo las bacterias ácido-lácticas, el grupo dominante más importante que produce fermentación (Panesar, 2011).

La fermentación láctea aporta a sus productos propiedades funcionales beneficiosas para el alimento y para la salud. Mejora el sabor, la textura, la conservación, disminuye el contenido calórico, favorece la emulsión y formación de espumas y aporta beneficios nutricionales. Estos productos lácteos fermentados se pueden clasificar en moderadamente agrios (leche fermentadas con aroma agradable), agrios y muy agrios (yogur o cuajada), además de los producidos por reacciones lacto-alcohólicas (kéfir y kumis) (Puniya et al., 2016). Los productos lácteos fermentados se

preparan a partir de leche o crema pasteurizada, a veces enriquecida con leche desnatada en polvo y a la que se le pueden agregar otros ingredientes, como aromatizantes, espesantes y otras preparaciones de frutas, y acidificada por bacterias ácido-lácticas, que dan como resultado un producto con consistencia y textura típicas. Todas las leches acidificadas tienen una característica común: la presencia de ácido láctico resultante de la fermentación de lactosa por diversas combinaciones de bacterias mesofílicas y termofílicas que promueven la coagulación de la proteína de la leche (de Oliveira, 2014).

Los derivados lácteos fermentados pueden clasificarse como:

- Leche fermentada: resultante de la fermentación de leche pasteurizada o esterilizada por fermentos lácticos.
- Yogur: cumple con los requisitos de la leche fermentada pero este proceso se lleva a cabo con iniciadores específicos de la fermentación, concretamente *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* pudiendo estar acompañados de otras bacterias del ácido láctico, que contribuyen y modifican las características finales del producto.
- Yogur fermentado alternativo: igual que un yogur pero la fermentación se lleva a cabo con uno o más de los siguientes cultivos: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium sp.*, *S. thermophilus* y cualquier especie de *Lactobacillus*. Por lo que la leche cuya fermentación se ha llevado a cabo por otros microorganismos además de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*, no debe denominarse yogur.



- Leche fermentada concentrada: leche fermentada cuyo contenido proteico se ha aumentado antes o después de la fermentación un 5.6% como mínimo.
- Leche fermentada aromatizada: contiene un 50% como máximo de ingredientes no lácteos (como edulcorantes, frutas y verduras nutritivas y no nutritivas).
- Bebida a base de leche fermentada: productos lácteos combinados obtenidos al mezclar leche fermentada con agua potable con o sin la adición de otros ingredientes, como suero, otros ingredientes no lácteos y saborizantes. Al menos un 40% deberá de ser leche fermentada.
- Kéfir: leche acidificada formada a partir de leche pasteurizada en el que la fermentación es el resultado de la acción de bacterias y levaduras, lo que resulta en ácido láctico, etanol y CO₂.
- Kumis: originalmente hecho con leche de yegua, fermentación ácido-alcohólica.

Entre todos los derivados lácteos fermentados, el yogur es el que ha adquirido más popularidad. Caracterizado como un gel suave y viscoso con una consistencia y sabor delicados. El yogur debe tener una consistencia lo suficientemente firme y su



textura debe ser delgada y suave, sin grumos, gránulos y ni grietas. Debe presentar un sabor ácido típico (de Oliveira, 2014).

La leche fermentada y sus derivados están ampliamente distribuidos a nivel mundial (Li et al., 2012). Presentan unas propiedades muy beneficiosas para la salud, además de proporcionar una sólida base para el desarrollo de alimentos funcionales que aporten ingredientes innovadores que promuevan la salud (Steijns, 2008). Entre sus propiedades destacan su capacidad desintoxicante, siendo capaz de eliminar del cuerpo humano una amplia gama de metales pesados. Además contienen probióticos y nutrientes esenciales como proteínas de alto valor biológico, vitaminas, aminoácidos esenciales y ácidos grasos. La acción probiótica produce una amplia gama de sustancias beneficiosas para el organismo, con actividad antimicrobiana (ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico, ácido propiónico, etanol, diacetil, acetaldehído, reuteriicina, reuterina, ácidos grasos y bacteriocinas) que inhiben los patógenos (Jain et al., 2009), que junto con otros componentes presentes en las leches fermentadas (anticuerpos, oligosacáridos y glicoproteínas), tienen capacidad estimulante del sistema inmunológico, principalmente en niños y ancianos (Parvez et al., 2006), jugando un papel clave en la reducción de infecciones y en el desarrollo del epitelio intestinal.

El mayor contenido de lactasa en estos productos ayuda a digerir la lactosa y es una estrategia terapéutica para el consumo de lácteos en personas que presentan intolerancia a la lactosa, disminuyendo los síntomas típicos (diarrea, hinchazón, dolor abdominal y flatulencia) (Levri et al., 2005). Asimismo, también son utilizados en enfermedades diarreicas como la diarrea viral y bacteriana aguda y en la diarrea asociada al consumo de antibióticos. La leche fermentada además puede ejercer un efecto anticancerígeno debido al aumento de la acidez intestinal que altera la actividad



microbiana indeseable que puede convertir los agentes pro-carcinogénicos en carcinogénicos (Shiby & Mishra, 2013).

Otras ventajas de la leche fermentada son sus características organolépticas y texturas que difieren de las presentes en la leche de partida. Más allá de estas características, se entiende cada vez más que las leches fermentadas también promueven la salud humana en formas no directamente atribuibles a los componentes alimentarios de partida, sino a través de su interacción con la microbiota del hospedador. Es decir, los resultados de la fermentación y población microbiana, en particular, pueden proporcionar propiedades beneficiosas más allá de la nutrición básica (Marco et al., 2017).

La interacción entre la microbiota y el hospedador han atraído el interés tanto científico como industrial para desentrañar mecanismos moleculares de acción en este campo (Klaenhammer et al., 2012). Su desarrollo podría apoyar aplicaciones terapéuticas o profilácticas dirigidas y/o personalizadas de cepas bacterianas (Remus et al., 2011). Una ventaja única de la terapia con probióticos es que estos organismos vivos son su propia vía de administración y tienen un potencial antipatógeno y antiinflamatorio. Los mecanismos de acción incluyen: mejora de la función de barrera natural de la mucosa intestinal normal, modulación del sistema inmune, antagonismo de patógenos y producción de actividades enzimáticas y/o metabolitos beneficiosos para el hospedador. El impacto de las cepas de probióticos en la microbiota humana parece depender de cambios en la red de interacciones microbiana, mientras que los cambios cuantitativos parecen ser moderados y poco documentados. Las bacterias probióticas, generalmente ingeridas a un nivel de 10^8 - 10^9 células, llegan al colon en una cantidad basada en la tasa de supervivencia en el estómago y el intestino delgado. El impacto de



los probióticos ingeridos se atribuye esencialmente a la persistencia fecal de las cepas ingeridas. Colonizan el intestino temporalmente y desaparecen una vez que se detiene el consumo (Ceapa et al., 2013).

La mayor parte de la evidencia científica disponible sobre el impacto de los microorganismos probióticos en la composición de la microbiota y sus funciones, se ha centrado en géneros bacterianos específicos como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Savard et al., 2011) mientras que se ha observado que este tipo de nutrición puede tener una influencia muy pequeña en otros géneros. Una intervención probiótica exitosa puede estar asociada con una modulación dirigida de la microbiota para reprimir patobiontes específicos o estimular grupos microbianos endógenos beneficiosos, además de la interacción molecular directa con células inmunes en el intestino delgado. Por lo tanto, no siempre se espera que los probióticos afecten la estructura de la microbiota residente de una manera importante, sino más bien que modulen directamente el sistema inmune y receptores epiteliales diversos a lo largo del tracto digestivo.

Estudios amplios de cohortes han revelado una importante asociación entre el consumo de alimentos lácteos fermentados y el control de peso corporal a través de la mejora de la microbiota del hospedador (Mozaffarian et al., 2011). Asimismo, otros estudios prospectivos a largo plazo muestran reducciones en el riesgo de enfermedad cardiovascular (CVD), diabetes tipo II y mortalidad general por consumo frecuente de yogur (Soedamah-Muthu et al., 2013; Tapsell, 2015). Estos beneficios pueden extenderse a respuestas fisiológicas inducidas, por el hallazgo de que el consumo de leche fermentada mejora metabolismo de la glucosa y reduce el dolor muscular inducido por el ejercicio de alta intensidad (Iwasa et al., 2013). Del mismo modo, la evidencia



científica incluye beneficios como antidiabéticos y contra la obesidad (An et al., 2013). En enfermedades inflamatorias intestinales y otras patologías relacionadas con el sistema inmunitario, como la artritis y la esclerosis, también se han reportado beneficios para la salud de los alimentos fermentados relacionados con una mejora general de la microbiota intestinal (Lorea Baroja et al., 2007).

Por otra parte, aunque el eje microbiota-intestino-cerebro es un campo de investigación incipiente, hay una indicación de que el consumo de alimentos fermentados puede alterar el estado de ánimo y la actividad cerebral (Omagari et al., 2014; Hilimire et al., 2015). En este sentido, Moreno-Fernandez et al., (Moreno-Fernández et al., 2019a) reportaron que durante la recuperación de la anemia ferropénica, la leche de cabra fermentada inhibe las actividades de la Monoaminoxidasa y aumenta la serotonina, sinaptofisina y niveles de hormona estimulante de los melanocitos. El consumo de leche de cabra fermentada también está implicado en la supresión de respuestas inflamatorias sugiriendo un efecto neuroprotector, que podría mejorar las funciones moleculares del cerebro.

Muchas de las especies bacterianas presentes en los alimentos fermentados son idénticas o comparten rasgos fisiológicos con especies relevantes que promueven la salud del tracto gastrointestinal. La importancia de este hecho se ha demostrado en un estudio en el que se observó que leches fermentadas producidas usando iniciadores de la fermentación (*Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* CNRZ327 y *Pseudomonas freudenreichii* ITG) seleccionados en función de su potencial antiinflamatorio *in vitro* (Plé et al., 2016), protegían contra la colitis ulcerosa y el daño a las células epiteliales del intestino. En este sentido, el hecho de que las leches fermentadas mejoren la salud y microbiota del tracto gastrointestinal es consistente con la visión emergente en la

comunidad científica de que los beneficios para la salud de los cultivos probióticos se pueden asignar a una especie en concreto, en lugar de cepas específicas de una especie (Hill et al., 2014).

Está comprobado que los microorganismos asociados a la fermentación de los productos lácteos modifican la composición de la microbiota intestinal o su función (Kato-Kataoka et al., 2016). Existen diversas vías en las que dichos cambios podrían ocurrir e incluyen interacciones tróficas (por ejemplo, producción de ácidos grasos de cadena corta o butirato), inhibición directa o estimulación de la microbiota residente y otros efectos indirectos en el hospedador (Derrien & van Hylckama Vlieg, 2015). De acuerdo con la aplicación actual de los probióticos, los microorganismos asociados a la fermentación se ven afectados por la dieta del hospedador y otras enfermedades intestinales (Tachon et al., 2014) y por tanto es probable que tengan efectos temporales limitados en la microbiota colónica residente (Zhang et al., 2016).

2.3.2.1 Composición de la leche fermentada

La composición de los productos lácteos fermentados deberá seguir las recomendaciones recogidas en el Codex Alimentarius (Tabla 10) y dependerá de la reproducción, alimentación, lactancia y condiciones ambientales, entre otras.

Tabla 10. Composición esencial de las leches fermentadas.

| Componente | Leche fermentada | Yogur, yogur fermentado alternativo, y leche acidófila | Kéfir | Kumis |
|--|----------------------|--|----------------------|----------------------|
| Proteína láctea ^a (%/mm) | Min. 2.7% | Min. 2.7% | Min. 2.7% | - |
| Grasa láctea (%/mm) | <10% | ≤15% | ≤10% | ≤10% |
| Acidez titulable, expresada como % de ácido láctico (%/mm) | Min. 0.3% | Min. 0.6% | Min. 0.6% | Min. 0.7% |
| Etanol (% vol.) | - | - | - | Min. 0.5% |
| Suma de microorganismos que constituyen el cultivo iniciador (ufc/g, en total) | Min. 10 ⁷ | Min. 10 ⁷ | Min. 10 ⁷ | Min. 10 ⁷ |
| Microorganismos identificados ^b (ufc/g, en total) | Min. 10 ⁶ | Min. 10 ⁶ | - | - |
| Levadura (ufc/g) | - | - | Min. 10 ⁴ | Min. 10 ⁴ |

^a El contenido de proteína es 6.38 multiplicado por el nitrógeno total Kjeldahl determinado.

^b Se aplica cuando se hace una declaración de contenido en el etiquetado, que se refiere a la presencia de un microorganismo específico que se ha agregado como suplemento al cultivo iniciador específico.

Fuente: Modificada de Oliveira, 2014.

En cuanto a su composición, la leche fermentada puede variar en función de la especie. Así aunque la leche fermentada de cabra y la de vaca son similares, presentan diferencias de composición que pueden ser importantes de cara a su efecto en la salud. Como se ha mencionado anteriormente, la leche de cabra tiene unas características nutricionales, bioquímicas y organolépticas muy positivas. Es por ello que se considera un alimento saludable que influye positivamente en la salud a nivel del metabolismo mineral (Nestares et al., 2008), óseo (Díaz-Castro et al., 2011) o antioxidante (Díaz-

Castro et al., 2012). La composición de la leche de cabra permite la producción de derivados lácteos fermentados (como yogures, quesos y demás) de gran valor (Scatamburlo et al., 2015).

Se han puesto de manifiesto las diferencias en cuanto a composición se refiere, entre las leches fermentadas deshidratadas de cabra y vaca (como mecanismo para aumentar la vida útil de la leche fermentada y su conservación), (Moreno-Fernández et al., 2016). Aunque la composición básica de ambas leches fermentadas es similar, existen diferencias específicas. La leche fermentada de cabra presenta un mayor contenido de proteínas y aminoácidos, así como un mayor contenido mineral. Minerales como el selenio, magnesio y zinc, con un papel antioxidante clave, y el calcio, de elevada importancia en la mineralización ósea y la señalización celular, se encontraron en mayor cantidad en la leche fermentada de cabra con respecto a la de vaca. A nivel vitamínico, la leche fermentada de cabra presenta mayores niveles de vitamina A, B6, B12 y D3 y menores de vitamina E, ácido fólico y vitamina C, en comparación con la leche fermentada de vaca, además presenta un perfil de ácidos grasos saludable (Moreno-Fernández et al., 2016). Dadas las mejores características nutricionales de la leche fermentada de cabra, en comparación con la leche fermentada de vaca, diversos estudios han puesto de manifiesto que su consumo habitual en la dieta puede ejercer un papel potencialmente beneficioso en la salud humana.

2.3.2.1.1 Aminoácidos

La composición de aminoácidos de las leches fermentadas deshidratadas de cabra y vaca se resume en la Tabla 13. Excepto para la alanina (Ala), todos los demás

aminoácidos fueron más altos en la leche fermentada de cabra que en leche fermentada de vaca (Moreno-Fernández et al., 2016).

2.3.2.1.2 Ácidos grasos

La Tabla 14 muestra el perfil de ácidos grasos de la grasa de leche fermentada deshidratada de cabra y vaca (g/100 g de ácidos grasos totales). El contenido de C11:0, C13:0, C16:0, C18:0, C20:5, C22:5, y la cantidad total de ácidos grasos saturados y monoinsaturados, es similar en ambas leches fermentadas, por el contrario, todos los demás ácidos grasos son significativamente diferentes. El contenido de C4:0, C14:0, C14:1, C15:0, C16:0, C16:1, C17:0, C18:3 y C20:4 es menor en la leche fermentada de cabra en comparación con la leche fermentada de vaca. En contraste, todos los otros ácidos grasos estudiados fueron más altos en la leche fermentada de cabra (Moreno-Fernández et al., 2016).

2.3.2.1.3 Mineral

La composición mineral de las leches fermentadas de cabra y vaca se muestra en la Tabla 15. En el contenido de potasio, yodo y fósforo no se observaron diferencias significativas entre ambas leches fermentadas. Respecto al resto de los minerales, la leche fermentada de cabra presentó un mayor contenido en comparación con la leche fermentada de vaca (Moreno-Fernández et al., 2016).

2.3.2.1.4 Vitaminas

Las vitaminas que contienen la leche fermentada de cabra y vaca se muestran en la Tabla 16. La leche fermentada de cabra fermentada tiene menores cantidades de vitamina C, ácido fólico y vitamina E y valores más altos de vitamina B₆, vitamina A, vitamina B₁₂ y vitamina D₃ (Moreno-Fernández et al., 2016).

2.3.2.2 Valor nutritivo de las leches fermentadas

Una vez analizada la fermentación de la leche, los distintos tipos de leches fermentadas, su composición y las principales diferencias entre la leche fermentada de cabra y vaca, es interesante resaltar cuales son los principales efectos beneficiosos de la fermentación sobre el valor nutritivo de la leche (AASA, s.f.).

- Composición:

Las leches fermentadas presentan un menor contenido de lactosa que la leche sin fermentar. La fermentación reduce el contenido de lactosa una vez que se han agotado los azúcares, evitando así que disminuya en exceso el pH y que el producto fermentado sea demasiado ácido. El proceso de fermentación se detiene por refrigeración, una vez que se alcanza un contenido de ácido láctico del 0.9%. La lactosa hidrolizada alcanza un 20%, fermentándose tanto la glucosa como la galactosa. En el yogur se produce la fermentación de casi el doble de lactosa, ya que las bacterias del yogur no actúan sobre la galactosa y no se descompone.

Las características del cultivo microbiano presente en la leche fermentada condicionarán las diferencias existentes en relación al contenido vitamínico. Las

bacterias lácticas necesitan para su desarrollo vitaminas del grupo B, siendo capaces además de producir otras vitaminas. En el caso del yogur se ha observado como presenta una menor concentración del contenido vitamínico respecto a la leche sin fermentar. Aun así el contenido de vitamina B₉ (ácido fólico) puede encontrarse aumentado, aunque no existen evidencias de que su aprovechamiento sea óptimo en humanos. Las condiciones que afectan al proceso de fermentación también pueden modificar el contenido vitamínico, como pueden ser, el almacenamiento y el pretratamiento de la leche a fermentar. El contenido de vitaminas B₁₂, B₁ y B₉ se ve disminuido en la leche fermentada si la leche ha sufrido un tratamiento térmico previo.

En otras etapas del proceso de fermentación también pueden inducirse cambios en la composición del producto fermentado, como puede ser durante la ultrafiltración o adición de otros ingredientes como leche en polvo, estabilizantes, aromatizantes, trozos de frutas o caseinatos.

- Aspectos nutritivos:

La fermentación reduce el valor energético de las leches fermentadas mínimamente, debido a la conversión de la lactosa en ácido láctico. Por lo que este proceso no induce cambios significativos en cuanto al aporte energético se refiere.

En relación a la digestibilidad de las proteínas y grasas, se ve mejorada debido a la acción de las bacterias lácticas, que llevan a cabo una predigestión de estos nutrientes. Este hecho supone una ventaja funcional para pacientes que presentan problemas digestivos o intestinales. En el estómago la proteína de las leches fermentadas coagula dando lugar a partículas más pequeñas y que presentan una mayor superficie para ser digeridas, por lo que se mejora su digestibilidad.



Como se ha mencionado anteriormente, las leches fermentadas presentan un menor contenido de lactosa, hecho que puede ser beneficioso para aquellas personas que presentan intolerancia a la lactosa, favoreciendo la digestión de estos productos. Además del menor contenido de lactosa, la leche fermentada presenta otros factores que contribuyen a una mejor digestión de la lactosa. Así pues, las bacterias presentes en la leche fermentada tienen lactasa con una importante actividad enzimática y además se ha comprobado como el yogur es capaz de estimular la lactasa de la mucosa intestinal. Sumado a esta mejor actividad enzimática, el consumo de leche fermentada retrasa el paso del contenido estomacal al intestino, aumentando el tiempo de contacto de las enzimas hidrolizantes con la lactosa, favoreciendo su digestión.

Respecto a la absorción de minerales, la leche fermentada presenta un bajo pH, que favorece la solubilidad de ciertos minerales en comparación con la leche sin fermentar y por tanto su absorción. En el caso del magnesio y del cinc, su absorción puede verse reducida, ya que depende del contenido de lactosa y es menor en la leche fermentada. Se ha comprobado como animales de experimentación alimentados con leche fermentada presentaron una mayor absorción de minerales como el fósforo, cuya absorción no está tan influenciada por el contenido de lactosa.

Aquellas personas que presentan algún problema que afecta a la producción de jugos gástricos, como suele ocurrirles a los ancianos y bebés, encuentran en la leche fermentada un alimento que disminuye el riesgo de supervivencia de patógenos, debido a que no aumenta el pH del contenido estomacal. De hecho la leche fermentada podría ejercer un efecto antimicrobiano debido a que las bacterias lácticas presentes en estos alimentos, pueden formar compuestos bioactivos que han demostrado tener actividad antimicrobiana *in vitro*. Su papel en patologías como la gastroenteritis no se encuentra

bien establecido. Su consumo podría favorecer la activación del sistema inmune contribuyendo a aumentar la resistencia frente a microorganismos patógenos.

- Efecto sobre la salud:

El consumo de leche fermentada puede contribuir al descenso del colesterol sanguíneo, como se ha puesto de manifiesto en estudios en animales de experimentación, pudiendo reducir el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares. Un consumo elevado de yogur o leches fermentadas en torno a 4-5 litros/días, puede estar relacionado con la disminución del colesterol LDL, por lo que se podría establecer un posible efecto del yogur con la colesterolemia. Es cierto que no todos los estudios corroboran este efecto de manera concluyente, aunque se ha comprobado que ciertas cepas presentes en los lácteos fermentados son capaces de asimilar el colesterol existente en los medios de cultivo y otras no (Jay, 2002), indicando que el efecto podría variar dependiendo del cultivo starter de la fermentación. Además parece ser necesario que para que se produzcan estos efectos sobre el colesterol, es necesario que los microorganismos lleguen vivos al intestino, ejerciendo un efecto probiótico. Se ha establecido que tras el paso digestivo, deberían llegar vivos al menos del orden de $5 \times 10^6 - 10^8$ u.f.c/g de producto según, para que se produzca el efecto buscado, por debajo de esa cantidad no suelen ejercer su acción (Corthier, 2004).

A nivel bucal, el consumo de leche fermentada induce una menor aparición de caries dental, debido a que a pesar de que presenta un pH bajo, no daña el esmalte. Las bacterias lácticas de la microbiota bucal no sintetizan dextranos a partir de la lactosa (hecho que si ocurre a partir de la sacarosa), por lo que no forman placa dental.

Como se ha mencionado anteriormente, las leches fermentadas presentan un menor contenido de lactosa, siendo un alimento bien tolerado por aquellas personas que padecen intolerancia a la lactosa. Dicho beneficio fue corroborado por la Agencia Francesa de Seguridad Alimentaria (AFSSA), afirmando que la leche fermentada mejora la digestibilidad de la lactosa debido a los fermentos vivos presentes en ella. Así pues, la ingesta de yogur podría mejorar no solo la digestión de este azúcar, sino también disminuir los síntomas asociados a esta intolerancia (Saloff-Coste, 1997). Además del menor contenido de lactosa presente en la leche fermentada, la producción de β -galactosidasa por los microorganismos presentes, favorece estos efectos positivos.

El ácido láctico que se produce durante la fermentación presenta un interés fisiológico ya que existen dos esteroisómeros con diferente metabolización en el organismo. El dextrorrotatorio L(+) se metaboliza fácilmente, pero el levorrotatorio D(-) sufre una metabolización muy lenta, eliminándose en parte por la orina. Se ha observado que *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus* en el yogur tradicional produce ácido láctico levorrotatorio (de un 40-60%). Una cantidad excesiva de este ácido láctico podría originar acidosis y lesiones tisulares.

El sistema inmune también se ve modificado por el consumo de leches fermentadas. Concretamente algunos estudios han puesto de manifiesto como ciertas bifidobacterias pueden llegar a estimular la respuesta inmune tanto natural como adquirida, favoreciendo una mejora de las defensas del organismo y disminuyendo la aparición de alergias infantiles. También se han observado modificaciones en los niveles de anticuerpos, interferones, citocinas y macrófagos, pudiendo ejercer un efecto antiinflamatorio (Corthier, 2004; López-Aliaga et al., 2018).



En relación con el riesgo de cáncer, se ha observado que ciertas células tumorales inhiben su crecimiento y desarrollo por la acción de ciertos metabolitos como el ácido láctico, enzimas y antibióticos, producidos por los microorganismos presentes en la leche fermentada. Así pues, se ha observado una disminución de la actividad de la enzima glucuronidasa, asociada al cáncer de colon, tras la ingesta de ciertas bifidobacterias, así como de *Lactobacillus casei*. El consumo de yogur se ha correlacionado con un menor riesgo de padecer adenomas colorectales (Marcos, 2002). A pesar de estos efectos beneficiosos, son necesarios estudios más concluyentes para poder profundizar en este campo.

2.3.2.3 Beneficios del consumo de leche fermentada de cabra

2.3.2.3.1 Señalización inflamatoria

La leche fermentada de cabra disminuye los niveles plasmáticos de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 β , IL-2, IL-12p70, IP-10 y TNF- α) e induce un aumento de las citoquinas antiinflamatorias (IL-4, IL-13 e IL-10), debido a las mejores características nutricionales de este tipo de leche, mencionadas anteriormente. Las fracciones lipídicas de la leche fermentada de cabra muestran una clara actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria inducida por el factor activador de plaquetas, su mayor contenido en ácido linoleico, en comparación con la leche de vaca, tiene efectos moduladores sobre las respuestas pro- y antiinflamatorias y su mayor contenido en vitamina A, induce una recuperación de las proteínas intracelulares relacionadas con la homeostasis férrica y la inducción de las células T y B a nivel intestinal, mejorando la defensa inmunitaria. Además la leche fermentada de cabra previene del secuestro

intracelular de hierro por las células duodenales, mejorando la homeostasis de hierro durante la recuperación de la anemia y disminuyendo la señalización pro-inflamatoria (López-Aliaga et al., 2018).

2.3.2.3.1 Tejido muscular y efecto ergogénico

Se ha observado un aumento de la expresión de la proteína de desacoplamiento 1 (UCP1) cuando se consume leche fermentada de cabra, lo que conduciría a un aumento de la termogénesis, mejorando el metabolismo muscular e induciendo un efecto ergogénico positivo de la leche fermentada de cabra. Este descubrimiento también sugiere que las células del músculo esquelético están bien dotadas de otros factores de transcripción termogénica, con un buen contenido mitocondrial, e indica una mejora en la degradación de los ácidos grasos, representando una ventaja positiva de crecimiento para las células del músculo esquelético. Se ha demostrado que el cotransportador de péptidos dependiente de protones (PepT1) está regulado por hormonas tales como la insulina, la tiroxina y principalmente la leptina, que influyen en el balance energético, consumo de alimentos y apetito. Entre los reguladores fisiológicos del PepT1, la leptina, es la hormona reguladora clave y un aumento de los niveles de leptina se asocian con una mejora e incremento de la función del PepT1, aumentando la absorción de péptidos. En este sentido, la leche fermentada de cabra aumenta la leptinemia, explicando la mayor expresión del PepT1 en las células del músculo esquelético, lo que lleva a un efecto ergogénico que favorece la síntesis y regeneración de las fibras musculares y a un mayor porcentaje de masa magra. La leche fermentada de cabra también aumenta en gran medida los niveles de irisina en plasma y músculo, desencadenando la conversión

del tejido adiposo blanco a tejido adiposo beige o marrón, conduciendo a un mayor gasto energético y mejorando el perfil metabólico, promoviendo la pérdida de peso, mejor tolerancia a la glucosa, sensibilización a la insulina y rendimiento muscular (Moreno-Fernandez et al., 2017).

2.3.2.3.1 Sistema cardiovascular

El consumo habitual de leche fermentada de cabra mejora el estado hematológico durante la recuperación de la anemia con contenido normal o sobrecarga de hierro y promueve respuestas metabólicas beneficiosas que pueden atenuar los factores de riesgo cardiovasculares al disminuir los valores plasmáticos de TNF- α , IL-6 y el inhibidor de la metalopeptidasa 1 (TIMP-1), biomarcadores implicados en todas las etapas del proceso aterosclerótico, desde la disfunción endotelial hasta la ruptura de la placa y la trombosis, protegiendo la integridad de las tónicas vasculares. Además conduce a un aumento de los niveles plasmáticos de caveolina 1 (CAV-1), mejorando el flujo y la presión sanguínea, y de adiponectina, con propiedades antiinflamatorias, reduciendo la fragilidad vascular durante la recuperación de la anemia. Por otro lado, reduce los niveles plasmáticos de quimioatrayentes de neutrófilos (CINC-1/GRO/KC), limitando la activación y adhesión de los macrófagos, y de factor de crecimiento del tejido conectivo, un factor clave en la fibrogénesis involucrado en la apoptosis. Por tanto, la leche fermentada de cabra ejerce un efecto beneficioso sobre la homeostasis vascular. Las propiedades antiinflamatorias de las fracciones lipídicas de la leche fermentada de cabra (esfingomiélna, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina) presentan actividad inhibidora de la agregación plaquetaria, gracias a la reducción de la



concentración plasmática de t-PAI, disminuyendo el riesgo de trombogénesis durante la recuperación de la anemia, tanto con contenido normal como con sobrecarga de hierro. La disminución de los niveles plasmáticos del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), molécula de adhesión intercelular soluble 1 (SICAM-1), E-selectina y proteína quimioatrayente de macrófagos 1 (MCP-1) inducida con leche fermentada de cabra reduce la angiogénesis, limitando la formación de nuevos vasos, lo cual reduce la fragilidad de las tunicas vasculares y evita la infiltración de las células inflamatorias, reduciendo la formación de lesiones ateroscleróticas. Esta mejora se debe a que la leche fermentada de cabra proporciona un menor sustrato lipídico para la peroxidación y en consecuencia disminuye la generación de radicales libres y la migración y adhesión de monocitos (Muñoz Alférez et al., 2019).

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Objetivo general

Conocer los efectos de una dieta basada en un fermentado lácteo de cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro, durante la recuperación de la anemia ferropénica nutricional, sobre la homeostasis del hierro a nivel duodenal y hepático como órganos clave del metabolismo de este mineral y evaluar el daño oxidativo a las principales biomoléculas del organismo y el estado de las defensas enzimáticas antioxidantes, durante la repleción crónica con hierro teniendo en cuenta el potencial pro-oxidante de este mineral.

Objetivos específicos

Para desarrollar este objetivo general se han planteado los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar la influencia del consumo de leche fermentada de cabra o vaca, con contenido normal o sobrecarga de hierro, sobre patrones de expresión génica y proteica implicados en la absorción de hierro a nivel duodenal (Dcytb, DMT1, FPN1, HAMP, FTL1, TfR1), durante la recuperación de la anemia ferropénica nutricional.
2. Evaluar los mecanismos de depósito de hierro, el índice hepatosomático y la expresión génica y proteica de transportadores en el hígado (DMT1, FPN1, HAMP, FTL1), como órgano clave en la homeostasis y almacenamiento de hierro en el organismo, durante la recuperación de la ferropenia, tras el consumo de leche fermentada de cabra o vaca con contenido normal o sobrecarga de hierro.



3. Determinar el daño oxidativo a las principales biomoléculas (lípidos, proteínas y ADN) inducido por la anemia ferropénica nutricional y tras la recuperación con fermentados lácteos de cabra o vaca con contenido normal o sobrecarga de hierro.
4. Estudiar el efecto de la dieta de leche fermentada de cabra o vaca sobre los mecanismos de defensa enzimática antioxidante, a nivel de cambios en los niveles de expresión génica y actividad, durante la recuperación de la anemia ferropénica nutricional.



La investigación científica y el diseño y desarrollo experimental llevados a cabo, con objeto de cubrir cada uno de los objetivos específicos que se han planteado, ha permitido la publicación de tres artículos científicos, cuyo contenido se ajusta a los objetivos específicos anteriormente descritos y que, de forma conjunta, proporcionan una visión global y completa de la homeostasis del hierro y estrés oxidativo durante la recuperación de anemia ferropénica nutricional.

Los artículos científicos publicados y su relación con los objetivos son los siguientes:

Objetivo 1: Fermented goat's milk consumption improves duodenal expression of iron homeostasis genes during anemia recovery. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2016; 30;64(12):2560-2568

Objetivo 2: Role of fermented goat milk on liver gene and protein profiles related to iron metabolism during anemia recovery. *Nutrients*. 2020; 8;12(5):1336.

Objetivos 3 y 4: Fermented goat milk improves antioxidant status and protects from oxidative damage to biomolecules during anemia recovery. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2017; 97(5):1433-1442.

MATERIAL Y MÉTODOS



4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Para el desarrollo de este estudio se emplearon 100 ratas Wistar albina macho (*Rattus norvegicus albinus*) con una edad de 21 días y peso inicial de $\approx 42 \pm 5$ g, procedentes del Servicio de Animales de Laboratorio de la Universidad de Granada. Los protocolos de manejo, cuidado y sacrificio de los animales fueron aprobados por el Comité de Bienestar Animal de la Universidad de Granada (ref. 11022011) y se llevaron a cabo siguiendo la directiva 2010/63/EU del Parlamento Europeo y del Consejo y la Declaración de Helsinki, relativas a la protección y bienestar de los animales utilizados con fines de investigación.

Los ensayos biológicos de experimentación se llevaron a cabo en condiciones libres de gérmenes patógenos (SPF). Desde el inicio del estudio los animales fueron alojados en células individuales con ventilación y termorregulación, asegurando una temperatura constante de $21 \pm 2^\circ\text{C}$ y una humedad de 55-60%, con ciclos de 12 h de luz/oscuridad, en la Unidad de Experimentación Animal del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Granada. Se garantizó una alta seguridad biológica con un exhaustivo control de los parámetros sanitarios y medioambientales. Para su alimentación, durante el período pre-experimental los animales recibieron dieta *ad libitum* y durante el período experimental una dieta controlada (*pair feed*), asegurando que los animales ingirieran el 80% de la ingesta media de cada periodo al día, para evitar diferencias debidas a la cantidad de dieta ingerida. El agua que se les suministró era bidestilada y estaba disponible *ad libitum*.

4.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental de este estudio comprende dos periodos experimentales (Figura 7):

- Período pre-experimental (PPE):

Las ratas (n=100), se dividieron aleatoriamente en dos grupos experimentales tras el destete (control y anémico), con el fin de inducir la ferropénica. Para ello durante 40 días, el grupo anémico recibió una dieta estándar AIN-93G con bajo contenido en hierro (5.91 ± 0.36 mg/Kg por análisis), siguiendo la técnica previamente desarrollada por nuestro grupo de investigación (Pallarés et al., 1993). Para la elaboración de esta dieta se omitió el hierro del suplemento mineral. El grupo control recibió la dieta AIN-93G con contenido normal de hierro (44.72 ± 0.98 mg/Kg por análisis) (Reeves et al., 1993).

- Período experimental (PE):

Al finalizar el PPE, los animales de experimentación, (controles y anémicos) se dividieron en 8 subgrupos (n=10) y fueron alimentados durante 30 días con dietas basadas en fermentados lácteos de cabra (raza Murciano-Granadina) o vaca (raza Holstein), con contenido normal de hierro (45 mg/kg dieta) o con sobrecarga (450 mg/kg dieta) (Raja et al., 1994) para proceder a la recuperación de la anemia ferropénica nutricional inducida.

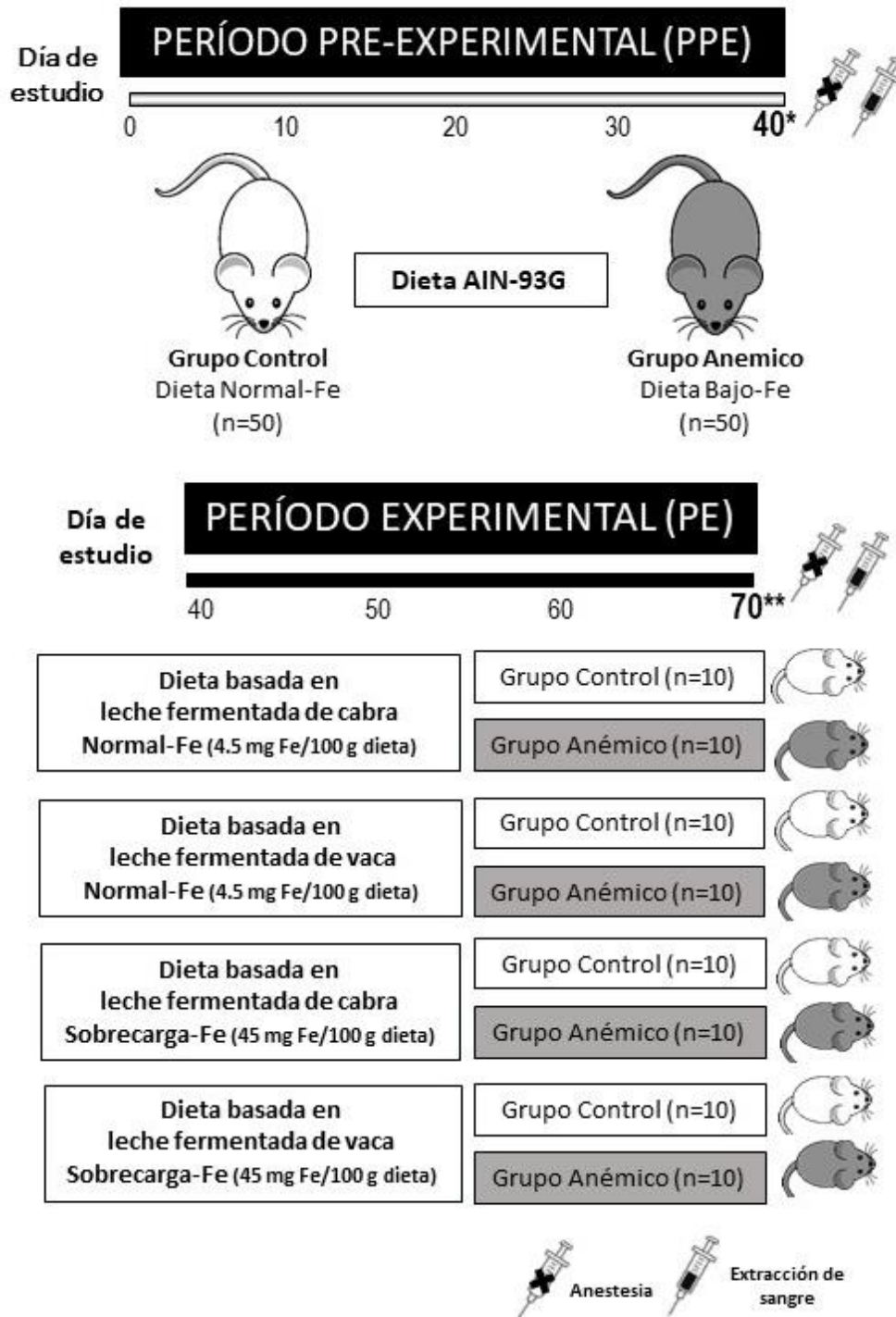


Figura 7. Diseño experimental del estudio.



4.3 TOMA DE MUESTRAS

4.3.1 Orina

Un día antes del sacrificio al finalizar el PE, los animales de experimentación se dispusieron en cámaras metabólicas de policarbonato, que permiten la recogida automática de la orina.

Las muestras de orina recogidas se congelaron a -80°C para la posterior determinación de 15-F_{2t}-Isoprostanos y de 8-Hidroxi-2'-desoxiguanosina.

4.3.2 Sangre total, plasma y suero

Al final de ambos periodos de experimentación, 10 ratas del grupo control y 10 ratas del grupo anémico en el PPE así como las 80 ratas del PE, fueron desangradas completamente por canulación de la arteria aorta abdominal, previa anestesia con pentobarbital sódico (Sigma Diagnostic, St Louis, MO), a una dosis de 5 mg/kg de peso por vía intraperitoneal.

La sangre obtenida se alicuotó en dos fracciones. Una fracción se trató con EDTA como anticoagulante para realizar el control hematológico de la anemia y para la obtención del plasma tras centrifugar durante 15 min a 1500g y 4°C . La fracción de sangre sin anticoagulante se dejó coagular en reposo durante 30 min y posteriormente se centrifugó bajo las mismas condiciones anteriormente descritas. Las muestras de suero y plasma se almacenaron a -80°C hasta su posterior análisis.

El estado antioxidante total (TAS) se determinó en el plasma y el contenido de hierro, capacidad total de fijación de hierro (TIBC), saturación de transferrina, ferritina, hepcidina y transaminasas se determinaron en el suero.

4.3.3 Obtención de órganos

Tras el sacrificio de los animales de experimentación se procedió, de la forma más rápida posible, a la extracción, procesado y conservación de los órganos, para inducir las menores alteraciones posibles. Al finalizar el PPE se extrajo el hígado. Al final del PE se extrajeron el cerebro, hígado y duodeno.

Los órganos se lavaron con solución salina a 4°C para eliminar cualquier resto de sangre. El duodeno se lavó repetidamente con agua fría tratada con DEPC (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) hasta la eliminación completa de los fluidos duodenales y la bilis. Posteriormente se obtuvo la capa de epitelio de células cilíndricas que recubre la pared del intestino (mucosa duodenal) mediante raspado intestinal con portaobjetos de vidrio estériles, evitando contaminaciones cruzadas con las células musculares del tubo intestinal.

Una fracción de hígado y mucosa duodenal se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C para el posterior análisis de la expresión proteica. Otra fracción (0.5-1g) de ambos órganos se conservó en solución RNA-*Later* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) durante 24h y después se procedió a su congelación en nitrógeno líquido y almacenamiento a -80 °C, para la posterior extracción de ARN y análisis de la expresión génica.

4.3.4 Fracciones citosólicas y membranas

El mismo día del sacrificio se obtuvieron las fracciones citosólicas de eritrocitos, cerebro, hígado y mucosa duodenal mediante centrifugaciones diferenciales sucesivas con hemólisis hipotónica, según el método de (Hanahan & Ekholm, 1974) preservando estas fracciones a -80°C para análisis posteriores de enzimas antioxidantes, hidroperóxidos y proteínas carbonilo. El contenido de proteínas en las fracciones citosólicas se midió siguiendo el método descrito por (Lowry et al., 1951).

4.4 ELABORACIÓN Y DESHIDRATACIÓN DE LAS LECHE FERMENTADAS

4.4.1 Obtención de la leche fermentada de cabra o vaca

La leche que se utilizó para el proceso de fermentación se obtuvo de dos granjas distintas, una de cabras Murciano-Granadina y la otra de vacas Holstein Friesian. Ambas granjas se encontraban en una situación geográfica similar, en la zona del sureste de España, a 694 m sobre el nivel del mar, con un clima mediterráneo continental. Las muestras de leche, sin conservantes añadidos, se almacenaron inmediatamente a -80°C hasta la fermentación. La leche seleccionada presentó un contenido mínimo de sólidos no grasos de origen lácteo en torno al 8% (FAO/OMS).

La fermentación se llevó a cabo mediante la inoculación de la leche con microorganismos que transforman la lactosa en ácido láctico. El producto lácteo fermentado se elaboró en condiciones controladas que conllevan la producción de



dióxido de carbono, ácido acético, diacetilo, acetaldehído y otros compuestos que condicionan las propiedades funcionales de los productos lácteos fermentados.

4.4.2 Tratamiento previo a la fermentación

Aunque las leches se almacenaron sin añadirles ningún aditivo se procedió al análisis de la presencia de antimicrobianos inhibidores del crecimiento, que podrían afectar al inóculo a emplear para la fermentación. Posteriormente se homogeneizó la muestra para evitar que exista una separación de la fase grasa.

A continuación la leche cruda de cabra y vaca se pasteurizó a 77 °C durante 15 minutos y se enfrió a temperatura ambiente (25 °C). Posteriormente las muestras de leche se transfirieron a matraces Schott estériles en el interior de una cámara de flujo laminar, y se almacenaron a 4°C durante 24 h antes de su uso.

4.4.3 Inoculación del cultivo iniciador de la fermentación (*starter*)

Ambos tipos de leches se inocularon con cultivos starter tradicionales utilizados en la producción del yogur, que provocan un descenso del pH de la leche al producir ácido láctico. Así pues se les añadió a las leches *Lactobacillus bulgaricus sub. delbruickii* y *Streptococcus thermophilus* con una concentración inicial de 1×10^{11} UFC/ml en una proporción del 1-3% y se incubaron a 37°C durante 24h aproximadamente. Al finalizar la fermentación, las leches fermentadas se enfriaron a 15°C en un baño de hielo, y el coágulo se rompió con un disco perforado de acero inoxidable con movimientos hacia arriba y hacia abajo durante aproximadamente 1



minuto. El pH de las muestras de leche fermentada se evaluó mediante un medidor de pH digital (Crison, Barcelona, España) y el proceso de fermentación finalizó cuando las leches alcanzaron un pH = 4.6.

4.4.4 Deshidratación del producto lácteo fermentado

Una vez finalizado el proceso de fermentación de la leche, el producto resultante se deshidrató como medida de conservación de la leche fermentada y para reducir los posibles cambios nutricionales y organolépticos negativos.

Para ello las muestras de leche fermentada de cabra y vaca se sometieron a un proceso de deshidratación industrial suave en túnel de aire forzado (Conterm Selecta, Barcelona, España), a una temperatura de $50 \pm 3^{\circ}\text{C}$ durante 24h, hasta que la humedad del producto final oscilara entre un 2.5-4.5%. El túnel contaba con calentadores internos en una cámara independiente, que permite obtener una distribución uniforme de la temperatura y una rápida estabilización. En este dispositivo, una turbina interna del motor origina un flujo de aire que mejora el proceso de deshidratación, evitando cambios nutricionales negativos.

4.5 DIETAS EXPERIMENTALES

La composición de las dietas experimentales ensayadas en el periodo pre-experimental (PPE) y en el periodo experimental (PE) se muestra en la Tabla 11.

Tabla 11. Composición de las dietas experimentales.

| Componente | PPE | | PE | |
|---------------------------------------|---|--|---|---------------|
| | AIN-93G ¹ | | Dietas basadas en leches fermentadas | |
| g/100g dieta | | | Leche de cabra | Leche de vaca |
| | Grupo control (4.5mg Fe/100 g dieta) Grupo anémico (0.5 mg Fe/100 g dieta) | | Normal-Fe (4.5 mg/100 g dieta) Sobrecarga-Fe (45 mg/100 g dieta) | |
| Carbohidratos | | | | |
| Almidón de trigo | 50.00 | | 20.50 | 20.10 |
| Sacarosa | 10.00 | | - | - |
| Lactosa | - | | 29.00 | 29.50 |
| Lípidos | | | | |
| Aceite de oliva virgen | 10.00 | | - | - |
| Grasa de la leche | - | | 10.00 | 10.00 |
| Proteína | | | | |
| Caseína | 20 | | - | - |
| Proteína láctea | - | | 20.50 | 20.40 |
| Fibra | | | | |
| Celulosa micronizada | 5.00 | | 5.00 | 5.00 |
| Corrector vitamínico | 1.00 | | 1.00 | 1.00 |
| Corrector mineral ² | 3.50 | | 3.50 | 3.50 |
| Bitartrato de colina | 0.25 | | 0.25 | 0.25 |
| L-Cisteína | 0.30 | | 0.30 | 0.30 |
| Tert butilhidroquinona | 0.01 | | 0.01 | 0.01 |

Fuente: elaboración propia.

¹ En el PPE la dieta AIN-93G y los correctores vitamínicos y minerales se prepararon siguiendo las recomendaciones del Instituto Americano de Nutrición (Reeves et al., 1993), aunque con ligeras modificaciones en relación a la fuente y nivel de grasa. Se sustituyó la soja por aceite de oliva virgen al ser ampliamente consumido en nuestro país y por tener efectos beneficiosos contrastados en la salud. Respecto a la fuente de hierro empleada, fue citrato férrico.



² En el PE las dietas basadas en fermentados lácteos se prepararon siguiendo las recomendaciones del Instituto Americano de Nutrición (Reeves et al., 1993). Se elaboró para cada dieta un corrector mineral específico, teniendo en cuenta el contenido mineral que aportaba cada leche fermentada para alcanzar las recomendaciones.

4.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.6.1 Contenido proteico, materia grasa, lactosa, materia seca y cenizas

El contenido de nitrógeno se midió mediante el método Kjeldahl. El contenido proteico se calculó como la diferencia entre el nitrógeno total y el nitrógeno no proteico. Los valores de nitrógeno de la proteína, caseína y proteína del suero, se convirtieron en valores proteicos multiplicando por un factor de conversión de 6.25 para la dieta AIN-93G y 6.38 para la proteína aportada por las leches y las dietas basadas en leche fermentada de cabra o vaca.

La materia grasa de las dietas experimentales se determinó por extracción con éter de petróleo tras hidrólisis hidroclicórica (Sanderson, 1986).

El contenido de lactosa de la leche se calculó como la diferencia entre la cantidad de sólidos totales y la suma de proteínas, grasas y cenizas totales. La materia seca y las cenizas se determinaron de acuerdo con los métodos descritos por AOAC (AOAC, 2005). El contenido de cenizas se determinó por incineración en un horno de mufla eléctrico a 550 °C (**Tabla 12**)

Tabla 12. Composición química de la leche fermentada de cabra y vaca

| Componente (%) | Leche fermentada de cabra | Leche fermentada de vaca |
|----------------|---------------------------|--------------------------|
| Proteína | 29.8 | 26.2 |
| Grasa | 31.8 | 31.6 |
| Lactosa | 29.1 | 29.5 |
| Cenizas | 9.3 | 12.7 |

Fuente: modificada de Moreno-Fernández et al., 2016.

4.6.2 Determinación y composición de aminoácidos

Se procedió a suspender en agua las leches fermentadas hasta alcanzar una concentración de 7g de contenido deshidratado/100 ml. A continuación se determinó el contenido proteico de las muestras y para que fuera similar, se tomaron 1.28 ml de las muestras de leche fermentada de cabra y 1.21 ml de las de leche fermentada de vaca y se dividieron en alícuotas por duplicado en dos series de tubos de hidrólisis, una para el análisis de los aminoácidos estables en medio ácido y otra para los aminoácidos azufrados. Para el análisis en medio ácido se mezcló la alícuota con 1 ml de HCl 6M que contenía 0.1% de fenol añadido antes de eliminar el gas y posteriormente se sellaron los tubos. Tras la hidrólisis se agitaron los tubos y se añadió como patrón interno norleucina. Después del secado, los aminoácidos se disolvieron mediante la adición de citrato sódico 67 mM, a un pH 2.2, con fenol al 0.1% (p/v) (tampón de carga), para su posterior análisis por cromatografía líquida de alta resolución de intercambio iónico (Waters Corporation, Milford, MA, EE. UU.). El contenido de la

alícuota que se destinó para el análisis de los aminoácidos azufrados se trató con ácido per fórmico, previo a la hidrólisis, para oxidar cuantitativamente la cisteína y la metionina a los componentes más estables, ácido cisteico y metionina sulfona. Tras proceder al enfriamiento de las muestras, se añadió 1 ml de ácido per fórmico frío (proporción 9: 1 de ácido fórmico al 88% y peróxido de hidrógeno al 30%). A continuación, los tubos se incubaron en un refrigerador durante 16h. Tras la incubación se añadieron 0,15 ml de bromuro de hidrógeno y se sometieron a hidrólisis ácida, como ha sido descrito anteriormente (**Tabla 13**)

Tabla 13. Composición de aminoácidos de la leche fermentada de cabra y vaca.

| Aminoácidos (g/Kg) | Leche fermentada de cabra | Leche fermentada de vaca |
|--------------------|---------------------------|--------------------------|
| Treonina | 18.51 | 15.11 |
| Isoleucina | 22.50 | 19.01 |
| Leucina | 41.11 | 28.12 |
| Lisina | 28.62 | 24.83 |
| Metionina | 13.61 | 8.12 |
| Cisteína | 0.80 | 0.52 |
| Fenilalanina | 19.81 | 12.10 |
| Tirosina | 8.83 | 4.91 |
| Valina | 27.61 | 19.23 |
| Arginina | 13.91 | 7.52 |

| | | |
|------------------------|-------|-------|
| Histidina | 14.20 | 7.74 |
| Alanina | 14.81 | 15.21 |
| Ácido apártico | 34.02 | 27.11 |
| Ácido glutámico | 94.62 | 54.15 |
| Glicina | 8.63 | 5.32 |
| Prolina | 41.21 | 29.11 |
| Serina | 23.30 | 17.70 |

Fuente: modificada de Moreno-Fernández et al., 2016.

4.6.3 Determinación y composición de ácidos grasos

Los ésteres metílicos de ácidos grasos se prepararon inicialmente, por metanolisis básica catalizada por glicéridos (KOH en metanol), siguiendo el procedimiento ISO-IDF (ISO-IDF, 2002). El análisis se llevó a cabo por cromatografía de gases con un detector de ionización de llama (GC-FID) en un cromatógrafo de gases y líquidos con autoinyector (Agilent 6890 N) en una columna capilar de sílice fundida (Varian, Middelburg, Netherlands) con un programa de gradiente de temperatura, partiendo de una temperatura inicial de 160°C. Trascorridos 80 minutos la temperatura se elevó gradualmente a 210°C permaneciendo constante durante 35 min. Como gas portador se utilizó helio y la temperatura del inyector y detector fue de 250 °C (**Tabla 14**).

Tabla 14. Composición en ácidos grasos de la leche fermentada de cabra y vaca.

| Ácidos grasos (g/100 g) | Leche fermentada de cabra | Leche fermentada de vaca |
|-------------------------|---------------------------|--------------------------|
| C4:0 | 2.63 | 3.61 |
| C6:0 | 3.21 | 2.29 |
| C8:0 | 3.59 | 1.38 |
| C10:0 | 11.11 | 3.30 |
| C11:0 | 0.11 | 0.10 |
| C12:0 | 4.59 | 3.61 |
| C13:0 | 0.12 | 0.11 |
| C14:0 | 8.02 | 12.31 |
| C14:1 | 0.41 | 1.07 |
| C15:0 | 0.89 | 2.39 |
| C16:0 | 26.77 | 34.81 |
| C16:1 | 1.11 | 2.09 |
| C17:0 | 0.39 | 1.22 |
| C18:0 | 8.64 | 8.22 |
| C18:1 <i>n-9</i> | 24.23 | 19.41 |
| C18:2 <i>n-6</i> | 3.42 | 2.29 |
| C18:0 | 0.21 | 0.20 |
| C18:3 | 0.42 | 0.71 |

| | | |
|------------------------|-------|-------|
| C20:4 | 0.12 | 0.22 |
| C20:5 | 0.08 | 0.10 |
| C22:5 | 0.11 | 0.09 |
| AGCC | 72.90 | 73.60 |
| AGMI | 20.00 | 20.80 |
| AGPI | 3.50 | 2.90 |
| AGPI <i>n-3</i> | 0.70 | 0.40 |
| AGPI <i>n-6</i> | 2.90 | 2.30 |

Fuente: modificada de Moreno-Fernández et al., 2016.

4.6.4 Determinación y composición mineral

Para llevar a cabo la determinación mineral, las muestras de leches fermentadas se mineralizaron previamente en un baño de arena (JR Selecta, Barcelona, España), por vía húmeda. Las muestras se disolvieron en ácido nítrico seguido de una mezcla de HNO₃: HClO₄ (69%:70%, v/v; en relación 1:4, v/v; Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) hasta proceder a la eliminación total de la materia orgánica. Posteriormente se diluyeron en agua bidestilada Milli-Q ultrapura. Con el fin de inducir el menor riesgo de contaminación posible, se utilizaron placas de polipropileno y puntas de pipeta de plástico.

El análisis multielemental de los minerales Ca, P, Mg, Zn, K, Fe, Cu, Se, I, se llevó a cabo por espectrofotometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) (Perkin-Elmer Optima 8300, Perkin-Elmer, Shelton, CT).

Todos los minerales no se midieron en el mismo análisis, para evitar inferencias y dado que no todos reaccionan igual en soluciones ácidas o en ciertas condiciones de plasma de acoplamiento inductivo, por lo que solo se analizaron juntos aquellos elementos compatibles. Para la calibración del aparato se utilizaron soluciones de calibración de Astatol multielemental (Analytika, Khodlova, Praga) (Tabla 15).

Tabla 15. Composición mineral de la leche fermentada de cabra y vaca.

| Minerales (mg/kg) | Leche fermentada de cabra | Leche fermentada de vaca |
|-------------------|---------------------------|--------------------------|
| Calcio | 9490 | 7965 |
| Fósforo | 7340 | 7530 |
| Magnesio | 921.1 | 809.0 |
| Zinc | 29.31 | 24.33 |
| Potasio | 11.49 | 11.82 |
| Hierro | 5.45 | 4.58 |
| Cobre | 0.79 | 0.28 |
| Selenio | 0.32 | 0.21 |
| Yodo | 0.03 | 0.05 |

Fuente: modificada de Moreno-Fernández et al., 2016.



4.6.5 Determinación y composición vitamínica

La vitamina A, la vitamina E, la vitamina B6, la vitamina B12 y la vitamina C se determinaron mediante el sistema de HPLC (Hewlett-Packard, Waldbronn, Alemania), que consiste en un dispositivo de desgasificación de la serie HP 1050, un HP 1100 (para análisis hidrosoluble), o un automuestreador Waters 717 (para análisis liposoluble) (Waters, Milford, MA), ambos con un inyector de bucle fijo y un detector de UV serie HP 1050 de longitud de onda variable. La adquisición de datos se realizó mediante un sistema Chemstation HP 3365-II (Hewlett-Packard). La separación se realizó usando una columna de fase inversa Tracer Spherisorb ODS2 C18 (TR-011019) de 250 x 4.6 mm, diámetro de partícula de 5 mm (Teknokroma, Barcelona, España). Ambos análisis se llevaron a cabo isocráticamente a un caudal de 1 ml/min.

Para la determinación de las vitaminas hidrosolubles, se disolvieron 10 g de leches fermentadas deshidratadas en 10 ml de agua bidestillada Milli-Q. La fase móvil utilizada en HPLC contenía ácido octanosulfónico 5 mM (reactivo de emparejamiento iónico), trietilamina al 0.5%, ácido acético glacial al 2.4% y 15% de metanol en agua bidestillada Milli-Q. Respecto a las vitaminas A y E, se disolvieron 15 g de leches fermentadas deshidratadas en 100 ml de agua bidestillada Milli-Q y se saponificaron con etanol absoluto, solución de hidróxido de potasio y ácido ascórbico como antioxidante a temperatura ambiente. Las muestras se extrajeron con n-hexano y se añadió hidroxitolueno butilado (BHT) como antioxidante, se evaporó y se redisolvió en metanol. Los extractos se inyectaron en el sistema de HPLC. Se usó agua-acetonitrilemetanol (4:1:95, v/v/v) como fase móvil. El ácido fólico se determinó en un sistema de HPLC (Hewlett-Packard, Waldbronn, Alemania) acoplado a un detector de masa en tándem Quattro Ultima (Waters-Micromass, Manchester, Reino Unido). Las

condiciones de trabajo requerían poca luz y atmósfera de nitrógeno para evitar la degradación de las vitaminas.

El sistema de HPLC estaba equipado con una columna XBridge C18 de 150 mm x 3 mm (Waters, Milford, PA) mantenida a 40°C. Se usó una fase móvil de gradiente binario a un caudal de 0,4 mL/min con disolvente A (ácido acético al 0.1% en agua) y disolvente B (ácido acético al 0.1% en metanol). El gradiente se inició de forma indirecta durante 0.5 minutos a 10% de disolvente B, seguido de un aumento lineal a 100% de disolvente B en 4.5 minutos. Después de una retención isocrática al 100% de disolvente B durante 5.9 minutos, el gradiente volvió al 10% de disolvente B en 0,1 min para el equilibrio de la columna durante 3 minutos. El espectrómetro de masas se hizo funcionar en modo negativo por electrospray y la adquisición de datos se realizó en modo de monitorización de reacción múltiple. El argón se usó como gas de colisión a 3.2×10^{-3} mbar y el multiplicador de fotones V-750 (**Tabla 16**).

Tabla 16. Composición vitamínica de leche fermentada de cabra y vaca.

| Vitaminas ($\mu\text{g}/100\text{g}$) | Leche fermentada de cabra | Leche fermentada de vaca |
|--|---------------------------|--------------------------|
| Vitamina A | 498.33 | 207.25 |
| Vitamina D ₃ | 0.07 | 0.02 |
| Vitamina E | 0.03 | 0.09 |
| Vitamina B ₆ | 33.25 | 42.71 |
| Vitamina B ₁₂ | 0.45 | 0.08 |
| Ácido fólico | 0.73 | 2.21 |



| | | |
|------------|--------|--------|
| Vitamina C | 759.65 | 931.12 |
|------------|--------|--------|

Fuente: modificada de Moreno-Fernández et al., 2016.

4.7 PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS

Se determinaron los siguientes parámetros hematológicos: concentración de hemoglobina, recuento de hematíes, hematocrito, volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM), concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), amplitud de distribución eritrocitaria (ADE), recuento plaquetario, recuento de leucocitos y linfocitos. Todos ellos se determinaron en un analizador hematológico automático Mythic 22CT (C2 Diagnostics, Grabels, France).

4.8 HIERRO SÉRICO, CAPACIDAD TOTAL DE FIJACIÓN AL HIERRO Y SATURACIÓN DE TRANSFERRINA

La concentración de hierro sérico y la capacidad de fijación al hierro (TIBC) se determinaron utilizando los reactivos Sigma Diagnostics Iron y TIBC (Sigma Diagnostics). En un lector de microplacas (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, EE. UU.) se determinó la absorbancia de las muestras a 550 nm. El cálculo del porcentaje de saturación de la transferrina se realizó con la ecuación:

$$\text{Saturación de transferrina (\%)} = \frac{\text{concentración sérica de hierro } (\mu\text{g/L})}{\text{TIBC } (\mu\text{g/L})} \times 100$$



4.9 FERRITINA Y HEPCIDINA SÉRICA

La concentración de ferritina y hepcidina se determinó en muestras de suero por el método ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), Rat Ferritin ELISA (Biovendor GmbH, Heidelberg, Germany) y DRG ELISA (DRG Instruments GmbH, Marburg, Germany) en muestras de suero, La absorbancia de la reacción se leyó a 450 nm en un lector de (Bio-tek, Vermont, EE. UU) y la intensidad de color desarrollada fue inversamente proporcional a la concentración presente en la muestra.

4.10 ÍNDICE HEPATOSOMÁTICO, CONTENIDO DE HIERRO EN HÍGADO Y TRANSAMINASAS

El índice hepatosomático (IHS) se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Índice hepatosomático} = (\text{peso del hígado} / \text{peso corporal}) \times 100$$

El análisis de la concentración de hierro en hígado se realizó utilizando un espectrómetro de emisión óptico de plasma (ICP-OES) PerkinElmer Optima 8300 acoplado inductivamente (Waltham, MA, EE. UU.) con un detector de dispositivo de acoplamiento de carga segmentado (SCD). Se usó una solución de calibración multielemental de Atasol (Analytika, Khodlova, Praga) para calibrar el aparato. Previamente se mineralizaron por vía húmeda las muestras de hígado, como se ha descrito previamente.

Las transaminasas alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) se midieron mediante métodos colorimétricos y enzimáticos estándar utilizando un analizador químico BS-200 (Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co. Ltd.,



Shenzhen, China).

4.11 OBTENCIÓN DE CITOSOL Y MEMBRANAS DE CEREBRO, HÍGADO, MUCOSA DUODENAL, Y ERITROCITO. DETERMINACIÓN DE CONTENIDO PROTEICO

La obtención de las fracciones citosólicas se llevó a cabo mediante distintas centrifugaciones diferenciales, siguiendo el método descrito por (De Sandro et al., 1991). Los órganos fueron fraccionados con cuchilla automática (Polytron-Vertrieb GmbH, Langwiesenweg, Deutschland) y posteriormente se procedió a la homogeneización de las muestras en un potter con pistón de teflón (Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Germany) y con la adición de 4 ml de tampón de sacarosa (para las muestras de cerebro y mucosa duodenal) y 4 ml de tampón de sacarosa-albúmina para las muestras de hígado. Tras la homogeneización, el contenido resultante se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos en una centrífuga J2-21 (Beckman, Brea, CA, USA) a 4°C. Se filtraron los sobrenadantes obtenidos con gasa y se centrifugaron durante 20 min a 8000 rpm y 4°C. Los pellets que se obtuvieron se guardaron en frío y oscuridad para posterior obtención de membranas. Tras esta centrifugación, los sobrenadantes se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 minutos y 4°C, obteniéndose así los citosoles de cerebro, hígado, y mucosa duodenal. Los pellets reservados en frío se resuspendieron en tampón de sacarosa y la mezcla resultante se centrifugó a 4°C durante 10 min a 12000 rpm. Se desecharon los sobrenadantes obtenidos y los pellets se resuspendieron en tampón de sacarosa hasta su completa homogeneización, obteniéndose así las membranas correspondientes. Tanto las



fracciones citosólicas como las membranas se conservaron a -80°C hasta su posterior análisis.

Para la obtención de las fracciones citosólicas de los eritrocitos, se siguió el método descrito por (Hanahan & Ekholm, 1974), mediante centrifugación diferencial con hemólisis hipotónica. Los leucocitos se eliminaron tras lavado con tampón isotónico de Tris a pH 7.6 y centrifugación posterior a 100 g durante 15 minutos y 4°C . Con una pipeta Pasteur se recogió el sobrenadante y la capa superficial de células. Este proceso de lavado se repitió dos veces más en cada muestra y los eritrocitos lavados que se obtuvieron se resuspendieron en un tampón Tris isotónico hasta alcanzar un hematocrito aproximado del 50%. Posteriormente se adicionó a la suspensión un tampón Tris hipotónico de pH 7.6 en proporción 1/5 y se procedió a realizar tres veces el lavado con este tampón, hasta que se observó un ligero color rosáceo en las membranas (pellet) y prácticamente incoloro el sobrenadante obtenido de la hemólisis, que corresponde a la fracción citosólica. Finalmente se congelaron las muestras a -80°C hasta su posterior análisis.

La concentración de proteína en las diferentes fracciones citosólicas se determinó siguiendo el método descrito por (Lowry et al., 1951) con lectura de la absorbancia en un microplacas (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, EE. UU.) a una longitud de onda de 640 nm.

4.12 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ANTIOXIDANTE Y ESTADO ANTIOXIDANTE TOTAL

La actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), catalasa



(CAT), glutathion peroxidasa (GPx) y glutathion reductasa (GR) se determinó en las fracciones citosólicas de cerebro, hígado, mucosa duodenal y eritrocitos. Además, también se determinó la actividad de la SOD en plasma. Los resultados se expresaron como unidad de actividad por 1 mg de proteína (U/mg).

Para la determinación de la SOD se siguió la técnica descrita por (Crapo et al., 1978) con ligeras modificaciones. Dicha técnica se basa en la inhibición del citocromo C por la SOD determinada espectrofotométricamente a 550 nm (Thermo Spectronic, Rochester, NY, USA). Inicialmente se construyó una curva patrón con distintos grados de actividad de la SOD para posteriormente determinar la actividad de la SOD, mediante la adición del volumen adecuado de la solución de citocromo C, el buffer de trabajo con azida y la xantina. A continuación se añadió el volumen adecuado de xantina oxidasa y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se procedió a la lectura espectrofotométrica a 550nm.

La actividad de la CAT se determinó según el método descrito por Aebi (Aebi, 1984), basado en la descomposición del H_2O_2 por acción de la CAT. Para ello, se añadió el volumen adecuado de tampón de trabajo y la muestra y a continuación la solución de H_2O_2 . Tras proceder a la incubación se midió la absorbancia a 240nm (Thermo Spectronic, Rochester, NY, USA).

Para determinar la actividad de la GPx, se siguió la técnica descrita por Flohé y Gunzler (Flohé & Günzler, 1984), basada en la formación instantánea de glutatión oxidado durante la reacción catalizada por GPx. Para ello se preparó una solución reactiva compuesta por glutathion reducido y NADPH a la que posteriormente se le añadió glutathion reductasa. En los pocillos de una microplaca de media área, se añadieron el buffer de trabajo y la cantidad adecuada de muestra. Tras homogeneizar la



mezcla por agitación, se procedió a añadir la solución reactiva y finalmente el Tert-Butil H₂O₂. Finalmente se midió la absorbancia espectrofotométricamente a 340nm (Thermo Spectronic, Rochester, NY, USA).

La actividad de la GR, se determinó utilizando el método de (Worthington & Rosemeyer, 1974), basado en la reacción de oxidación del NADPH a NADP catalizada por una concentración limitante de GR. Para ello a la muestra se le añadió la solución de trabajo compuesta por tampón fosfato GSSG. Se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y se inició la reacción al añadir el NADPH. La actividad de la GR se midió espectrofotométricamente durante 5 minutos a 340nm (Thermo Spectronic, Rochester, NY, USA). El descenso de la absorbancia es directamente proporcional a la actividad de la glutatión reductasa en la muestra ya que la enzima está presente en concentraciones limitantes.

La capacidad antioxidante total en muestras de plasma se determinó según el método descrito por (Re et al., 1999). Inicialmente se preparó la solución madre de ABTS*, previa mezcla de persulfato potásico y ABTS (2,2'-azino-di-[sulfonato de 3-etilbenzotiazolina]), en agitación durante 18 horas y en oscuridad. También se preparó una solución del antioxidante TROLOX (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico). El radical ABTS* se expuso a diferentes concentraciones de TROLOX y se trazó una curva patrón para establecer los equivalentes TROLOX que correspondían con la capacidad antioxidante total de la muestra. En la microplaca se dispuso el plasma y la solución radical ABTS. Una vez homogeneizada la muestra previa agitación, se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y se procedió a la lectura de la absorbancia a 734 nm. Los resultados se expresaron como mmol/L de equivalentes de TROLOX.



4.13 DETERMINACIÓN DEL DAÑO OXIDATIVO A LAS PRINCIPALES BIOMOLÉCULAS

4.13.1 Evaluación del daño oxidativo a los lípidos

4.13.1.1 15-F2t-Isoprostanos

La determinación del daño oxidativo a los isoprostanos se evaluó midiendo la concentración de isoprostanos en orina por enzimoimmunoensayo a través de un kit ELISA comercial (Oxford Biomedical Research, Oxford, UK). Inicialmente se diluyeron las muestras de orina con un tampón de dilución, para eliminar las interferencias debidas a la unión no específica. El 15-F2t-Isoprostano de las muestras o patrones compete con el que está conjugado con la peroxidasa para unirse al anticuerpo de conejo específico presente en la microplaca. La concentración del 15-F2t-Isoprostano conjugado permanece constante a lo largo de todo el ensayo, por lo que solo varía la concentración del 15-F2t-Isoprostano de la muestra. Así pues la cantidad de isoprostano conjugado capaz de unirse al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración de 15-F2t-Isoprostano presente en las muestras de orina.

Para llevar a cabo el ensayo, en una microplaca se dispensaron 100 μ l de orina diluida. A continuación se añadieron 100 μ l del reactivo 15-F2t-Isoprostano conjugado y se incubó durante 2h a temperatura ambiente. Tras eliminar el contenido y lavar la microplaca con buffer de lavado, se añadieron 200 μ l de sustrato y una vez transcurridos 20-40 min se detuvo la reacción mediante la adición de 50 μ l de ácido sulfúrico 3M.



Finalmente se leyó la absorbancia de la placa a 450nm.

4.13.1.2 Hidroperóxidos

La concentración de peróxidos plasmáticos y en membranas de cerebro, hígado, mucosa duodenal y eritrocitos se determinó mediante kit comercial Pierce Quantitative Peroxide Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Este ensayo se basa en la oxidación del Fe^{2+} a Fe^{3+} mediada por los hidroperóxidos en un pH ácido. Inicialmente los peróxidos reaccionan con sorbitol, provocando su conversión a radical peroxilo. Este radical es el encargado de iniciar la reacción de oxidación del Fe^{2+} a Fe^{3+} . Los complejos de Fe^{3+} se tiñen con xilenol en la solución de ácido sulfúrico, generando un producto de color púrpura. La absorbancia se mide a 560 nm transcurridos 20 minutos de incubación.

En una microplaca se dispensaron 20 μl de muestra o patrones y 200 μl de solución de trabajo. Una vez mezclado convenientemente, se incubó durante 15-20 min a temperatura ambiente y se procedió a la lectura de la absorbancia a 560 nm.

4.13.2 Evaluación del daño oxidativo a las proteínas

4.13.2.1 Carbonilos proteicos

La oxidación de las proteínas plasmáticas, cerebrales, hepáticas y de la mucosa duodenal se midió de acuerdo con el método basado en la detección espectrofotométrica de la reacción del 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) con carbonilos proteicos para formar hidrazona proteica (Reznick & Packer, 1994).



Para ello se las muestras se colocaron en dos tubos eppendorf. En el primer tubo se añadió 1 ml de DNPH 10 mM (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland) en HCl 2.5 M (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Al otro tubo se le añadió 1 ml de HCl 2.5 M. Tras 1 hora de incubación a temperatura ambiente y con agitación vigorosa de la mezcla cada 10 min, se añadieron 500 μ L de tricloroacético (TCA) al 20% (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) y se procedió a incubar durante 10 min a 4°C. A continuación se centrifugaron los tubos durante 3 minutos a 3000g, lavando el pellet obtenido 3 veces con 1 mL de etanol-etilacetato (1:1) para eliminar el reactivo libre. Posteriormente se redissuelve la proteína en guanidina 6 M a 37°C y la mezcla se centrifuga a 3000 g durante 3 minutos, eliminando así el material insoluble. Los pellets tratados con HCl 2.5 M se disuelven en cloruro de guanidina 6 M (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland) y a continuación se determinan espectrofotométricamente la absorbancia a 280 nm (Thermo Spectronic, Rochester, NY, USA). La concentración de carbonilos proteicos en las muestras tratadas con DNPH, se calculó por medida espectrofotométrica a 366 nm (Thermo Spectronic, Rochester, NY, USA), expresando los resultados en nmol/mg proteína.

4.13.3 Evaluación del daño oxidativo al material genético

4.13.3.1 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina

El daño oxidativo a los ácidos nucleicos genera productos de oxidación como la 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) que fue determinada en muestras de orina y plasma mediante enzoinmunoensayo, a través de un kit ELISA comercial Highly Sensitive 8-OHdG Check (Japan Institute for the Control of Aging, Shizuoka, Japan).



Una vez reconstituido el anticuerpo primario se dispensaron 50 μ l de la muestra o los patrones en una microplaca. Se distribuyó la muestra uniformemente mediante agitación y se incubó la microplaca a 4°C durante 18 h. A continuación se descartó el contenido de los pocillos y se lavaron con buffer de lavado y agitación dos veces. Posteriormente se añadieron 100 μ l del anticuerpo secundario reconstituido y tras homogeneizar mediante agitación, se incubó la microplaca a temperatura ambiente durante 1 hora. Una vez finalizada la incubación se procedió de nuevo al lavado de los pocillos y a la posterior dispensación de 100 μ l de sustrato. Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y se detuvo la reacción al añadir 100 μ l de la solución ácida. Posteriormente se procedió a la lectura espectrofotométrica de la absorbancia a 450 nm (Thermo Spectronic, Rochester, NY, USA), expresando los resultados en ng/ml.

4.13.3.2 Electroforesis en gel de células aisladas (ensayo comet alcalino)

El daño oxidativo generado en la doble hélice del ADN de linfocitos aislados se determinó mediante el ensayo comet alcalino, basado en la técnica descrita por Ostling y Johanson (Ostling & Johanson, 1984). Combina la electroforesis de células individualizadas con la microscopía de fluorescencia. Así pues, cuando el ADN presenta hebras dañadas, cargadas negativamente, migrarán hacia el ánodo durante. Si el ADN no ha sufrido daños, no se produce migración hacia dicho polo. La combinación con la microscopía de fluorescencia permite observar si la fracción ha migrado o no, indicando el daño producido en la doble hélice del ADN.

El ensayo comet alcalino consta de varias fases. Inicialmente se procede al aislamiento de los linfocitos. Para ello se procedió a obtener la fase leucocitaria de las



muestras de sangre tratadas con anticoagulante por centrifugación a 3500 rpm, durante 15 minutos y a 4°C. Después se diluyeron los leucocitos con PBS (1:1). Se añadió Histopaque 1077 (Sigma Aldrich, EE.UU) suavemente en la base del tubo y se centrifugaron a 200 g durante 3 min a 4°C. A continuación se procedió al lavado de las células recogiendo la interfase (linfocitos) y se depositaron en otro tubo con PBS, volviendo a centrifugar en las mismas condiciones, obteniendo un pellet con los linfocitos aislados. Una vez aislados los linfocitos se procedió a su inclusión en agarosa de bajo punto de fusión. Esta mezcla se dispensó sobre un gel de agarosa de elevado punto de fusión, previamente adherido a un portaobjetos, dejándolo enfriar a 4°C durante 5 minutos. A continuación se procedió a la lisis de las membranas celulares, incluyendo los portaobjetos en una solución de lisis con Triton X-100 (Sigma Aldrich, EE.UU), durante al menos una hora. Posteriormente se sometió a las células a un tratamiento alcalino en cubeta de electroforesis durante 40 minutos a 4°C para favorecer la desnaturalización de las cadenas de ADN. Transcurrida esta fase, se inició la electroforesis a un voltaje constante de 25 V y 300 mA durante 30 minutos y 4°C. Una vez finalizó la electroforesis, se introdujeron los portaobjetos en una solución de neutralización (Tris base 0.4 M a pH 7.5) y se procedió a realizar tres lavados consecutivos de 5 min a 4°C y oscuridad. Finalmente se procedió a la tinción de las muestras con 4,6 -diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro (DAPI) (Sigma Aldrich, EE.UU). Los nucleoides teñidos se observaron en un microscopio-UV Leica DMSL (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) con un software de análisis de imagen (Komet 5.5; Kinetic Imaging Ltd., Liverpool, United Kingdom). En cada gel se contabilizaron 100 comets y se determinó el porcentaje de ADN en la cola del comet y el parámetro *olive tail moment* (OTM).



4.14 EXTRACCIÓN DE RNA Y REACCIÓN DE RETROTRANSCRIPCIÓN

Se procedió al aislamiento del ARN de las muestras de hígado y mucosa duodenal usando trizol TRIsure lysis reagent (Bioline, Luckenwalde, Germany). Se tomaron unos 50-100 mg de tejido y se homogeneizaron con un volumen de trizol inferior a 1 ml en un homogeneizador de vidrio. Tras 5 min de incubación a temperatura ambiente se centrifugaron las muestras para eliminar los restos celulares y el sobrenadante se transfirió a tubo eppendorf. Se añadieron 160 μ l de cloroformo y se agitaron vigorosamente los tubos durante 15 segundos, incubándolos a temperatura ambiente durante 2-3 minutos. A continuación se centrifugaron las muestras a 10000 g durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente se transfirió la fase acuosa superior a un tubo eppendorf y se procedió a iniciar la precipitación del ARN mediante la adición de 400 μ l de isopropanol e incubación de 10 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a 10000 g durante 10 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. El pellet se lavó con 800 μ l de etanol al 75% y se centrifugó durante 5 minutos a 7500 g y 4°C. Finalmente se descartó el sobrenadante, se dejaron secar las muestras y se resuspendieron en agua fría tratada con DEPC (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.). La cantidad y la pureza del ARN aislado se determinaron por espectrofotometría (NanoDrop 1000, Thermo Fisher Scientific) a 260/280 nm. El RNA aislado se conservó a -80 °C hasta su posterior uso.

El ADN complementario (cADN) se sintetizó utilizando la enzima transcriptasa inversa con 1 μ g de ARN por muestra, (iScript cDNA Synthesis kit. Bio-Rad laboratories). El cDNA sintetizado se conservó a -20 °C hasta el posterior análisis de la



expresión génica.

4.15 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL

La expresión de los genes relacionados con el metabolismo del hierro y estrés oxidativo se determinaron mediante PCR cuantitativa a tiempo real en un volumen total de reacción de 20 μ L, utilizando como sistema de detección el CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Como fluoróforo se utilizó SYBR Green (Sso Advanced Universal SYBR Green Supermix. Bio-Rad). Las secuencias de los cebadores se diseñaron mediante el uso de herramientas estándar (Spidey, Primer3, NCBI Blast) y fueron suministrados por Eurofins MWG Biotech (Ebersberg, Germany). Dichas secuencias se detallan en la Tabla 17. Las muestras se analizaron por duplicado y la expresión de los genes diana se normalizó con el gen de referencia elegido, que fue la β -actina, el cual se expresó de manera consistente en todos los grupos. Para determinar la eficacia de la amplificación se utilizaron diluciones seriadas de las muestras control. El análisis de la curva de fusión y la electroforesis en gel, se usaron para confirmar el tamaño del producto final de la PCR.

Tabla 17. Secuencia de los cebadores utilizados en la PCR cuantitativa a tiempo real.

| Gen | Dirección | Secuencia del cebador | Temperatura de Annealing | Tamaño (bp) |
|-----------------|-----------|------------------------|--------------------------|-------------|
| β-Actina | 5'→3' | GGGGTGTGTTGAAGGTCTCAAA | 57°C | 165 |
| | 3'→5' | TGTCACCAACTGGGACGATA | | |
| DMT1 | 5'→3' | GGCATGTGGCACTGTATGTG | 59°C | 163 |
| | 3'→5' | CCGCTGGTATCTTCGCTCAG | | |
| FPN1 | 5'→3' | GAACAAGAACCCACCTGTGC | 57°C | 191 |
| | 3'→5' | AGGATGGAACCACTCAGTCC | | |
| HAMP | 5'→3' | CCTATCTCCGGCAACAGACG | 59°C | 121 |
| | 3'→5' | GGGAAGTTGGTGTCTCGCTT | | |
| FTL1 | 5'→3' | GCCCTGGAGAAGAACCTGAA | 59°C | 247 |
| | 3'→5' | AGTCGTGCTTCAGAGTGAGG | | |
| SOD1 | 5'→3' | ACACAAGGCTGTACCACTGC | 59°C | 115 |
| | 3'→5' | CCTTTCCAGCAGCCACATTG | | |
| CAT | 5'→3' | GTGCATGCATGACAACCAGG | 59°C | 163 |
| | 3'→5' | GAATGTCCGCACCTGAGTGA | | |
| GPx1 | 5'→3' | CCGTGCAATCAGTTCGGACA | 59°C | 132 |
| | 3'→5' | CTCACCATTACCTCGCACT | | |
| GR | 5'→3' | GTATCACGCTGTGACCACGA | 59°C | 84 |
| | 3'→5' | TGGATGCCAACCACCTTCTC | | |

Fuente: elaboración propia.



4.16 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA MEDIANTE WESTERN BLOT

Con el fin de evaluar la expresión de proteínas implicadas en el metabolismo del hierro en muestras de hígado y mucosa duodenal, se procedió inicialmente a la extracción de las proteínas presentes en esos tejidos. Para ello unos 50-100 mg de tejido se homogeneizaron en un Potter-Elvehjem de vidrio en tampón de extracción T-PER específico de tejidos (Thermo Scientific Inc., Hanover Park, IL, USA) en una relación 1:20. A este tampón de lisis se le añadió también un inhibidor de proteasas comercial en proporción 1:200 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). El homogenado resultante se centrifugó a 10000 g durante 5 minutos a 4°C para eliminar los restos celulares. El sobrenadante que contenía la totalidad de las proteínas extraídas, se conservó a -80°C hasta su análisis. El contenido proteico se cuantificó con el kit Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific Inc., Hanover Park, IL).

12 µg del extracto proteico anteriormente obtenido, se mezclaron con un tampón de carga comercial 4x Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad California, EE.UU.) y β-Mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) y se calentaron a 95 °C durante 5 min. Posteriormente se procedió a la separación de las proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida de 4-20% (Criterion TGX, Bio-Rad California, EE.UU). Las condiciones de voltaje de la electroforesis fue de 250-300 V en cubeta de electroforesis vertical (Criterion; Bio-Rad California, EE.UU) durante 25 minutos. A continuación, las proteínas separadas se transfirieron a membranas PVDF (Bio-Rad California, EE.UU.) por transferencia húmeda con buffer de transferencia compuesto por agua, metanol y Tris-Glicina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), a 120 V durante 60 minutos. Una vez finalizada la transferencia, las membranas se bloquearon con leche en polvo desnatada



al 5% en TBS-T (Tris 50 mM, NaCl 0.15 M y Tween 20 1%) durante 1h. Tras finalizar el bloqueo, las membranas se lavaron tres veces con TBS y se incubaron con los respectivos anticuerpos primarios durante 18 h a 4 °C en continua agitación. Los anticuerpos empleados fueron: anticuerpos policlonales de conejo DMT1 dilución 1:400 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), FPN1 dilución 1:800, Hepsidin dilución 1:500 y anticuerpo monoclonal de ratón β -actin, dilución 1:1000 (Abcam, UK; dilución 1:1000). Todos los anticuerpos primarios fueron diluidos en TBS-T con leche desnatada en polvo al 5%. Finalizada la incubación con el anticuerpo primario y tras someter a las membranas a tres lavados de 5 minutos con TBS-T, se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario apropiado, Immun-Star goat anti-rabbit (GAR)-HRP, dilución 1:40000 y ImmunStar goat anti-mouse (GAM)-HRP, dilución 1:80000 (Bio-Rad Laboratories), previamente preparados en leche desnatada al 5% en TBS-T, durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se lavaron las membranas dos veces con TBS-T y una con TBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las bandas fueron detectadas por quimioluminiscencia, con el reactivo Luminata Forte Western HRP substrate (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). La cuantificación de la señal de cada banda se realizó con un dispositivo ImageQuant LAS 4000 (Fujifilm Life Science Corp., EE. UU.). Todos los resultados fueron analizados con el software Image J.

4.17 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados presentados han sido expresados como media aritmética \pm error estándar de la media (EEM). El análisis *t*-Student se utilizó para comprobar la significación estadística entre los grupos control y anémico durante el PPE, así como entre los grupos con contenido normal y sobrecarga de hierro durante el PE. El efecto de



la anemia, el tipo de dieta y el contenido de hierro de la dieta se analizaron mediante ANOVA de dos vías. Las medias individuales se analizaron mediante comparación por pares con la prueba de comparación múltiple de Tukey, cuando los efectos e interacciones principales fueron significativos. La significación estadística se estableció en $P < 0.05$ para todas las comparaciones. El análisis estadístico descrito se realizó con el programa informático SPSS 26.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)

Para establecer el número de animales por grupo, se realizó un análisis de potencia para estimar el número de animales necesario para obtener una potencia del 80% a un nivel de confianza del 95%. Se requerían 8 animales por grupo para obtener diferencias significativas en los parámetros hematológicos y 7 animales por grupo para obtener diferencias significativas en los patrones de expresión génica/proteica. Se utilizaron 10 animales por grupo para asegurar un cálculo de poder estadístico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La sección de resultados y discusión se presenta en los artículos científicos originalmente publicados.



5.1 ARTÍCULO CIENTÍFICO I

Artículo científico I

JOURNAL OF
**AGRICULTURAL AND
FOOD CHEMISTRY**

Article

pubs.acs.org/JAFC

Fermented Goat's Milk Consumption Improves Duodenal Expression of Iron Homeostasis Genes during Anemia Recovery

Jorge Moreno-Fernandez,^{†,‡} Javier Diaz-Castro,^{†,‡} Mario Pulido-Moran,^{‡,#} Maria J. M. Alferez,^{†,‡} Christine Boesch,[§] Ana Sanchez-Alcover,^{†,‡} and Inmaculada López-Aliaga^{*,†,‡}

[†]Department of Physiology, University of Granada, Granada, Spain

[‡]Institute of Nutrition and Food Technology "José Mataix Verdú", University of Granada, Granada, Spain

[#]Department of Biochemistry and Molecular Biology II, University of Granada, Granada, Spain

[§]School of Food Science and Nutrition, University of Leeds, Leeds, United Kingdom

ABSTRACT: Despite the crucial roles of duodenal cytochrome *b* (Dcytb), divalent metal transporter 1 (DMT1), ferritin light chain (Ftl1), ferroportin 1 (FPN1), transferrin receptor 1 (TfR1), and hepcidin antimicrobial peptide (Hamp) in Fe metabolism, no studies have investigated the modulations of these genes during Fe repletion with fermented milks. Analysis included Fe status markers and gene and protein expression in enterocytes of control and anemic animals fed fermented milks. Fermented goat's milk up-regulated enterocyte Dcytb, DMT1, FPN1, and Ftl1 and down-regulated TfR1 and Hamp gene expression in control and anemic animals. Anemia decreased Dcytb, DMT1, and Ftl1 in animals fed fermented cow's milk and up-regulated TfR1 and Hamp expression. Fe overload down-regulated Dcytb and TfR1 in animals fed fermented cow's milk and up-regulated DMT1 and FPN1 gene expression. Fermented goat's milk increased expression of duodenal Dcytb, DMT1, and FPN1 and decreased Hamp and TfR1, improving Fe metabolism during anemia recovery.

KEYWORDS: *fermented cow's and goat's milk, anemia, iron metabolism, gene expression, Fe repletion*

Publicado en Journal of Agricultural and Food Chemistry 2016; 30;64(12):2560-2568.

doi: 10.1021/acs.jafc.6b00108



**Fermented goat milk consumption improves duodenal expression of iron
homeostasis genes during anemia recovery**

Jorge Moreno-Fernandez^{*,†}, Javier Diaz-Castro^{*,†}, Mario Pulido-Moran^{†,‡}, Maria JM
Alferez^{*,†}, Christine Boesch[§], Ana Sanchez-Alcover^{*,†} and Inmaculada López-
Aliaga^{*,†,⊥}

^{*}Department of Physiology, University of Granada, Granada, Spain.

[†]Institute of Nutrition and Food Technology “José Mataix Verdú”, University of Granada, Granada, Spain.

[‡]Department of Biochemistry and Molecular Biology II, University of Granada, Spain.

[§]School of Food Science and Nutrition, University of Leeds, Leeds, UK.

[⊥]Corresponding author:

M^a Inmaculada López-Aliaga, Department of Physiology, Faculty of Pharmacy,
Campus Universitario de Cartuja, University of Granada, 18071, Granada, Spain. Tel:
34-958-243880, Fax: 34-958-248959, *E-mail address*: milopez@ugr.es



ABSTRACT

In spite of the crucial role of Duodenal cytochrome b (Dcytb), Divalent metal transporter 1 (DMT1), Ferritin light chain (Ftl1), Ferroportin 1 (FPN1), Transferrin receptor 1 (TfR1) and Hepcidin antimicrobial peptide (Hamp) in Fe metabolism, no studies have investigated the modulations of these genes during Fe repletion with fermented milks. Analysis included Fe status markers, gene and protein expression in enterocytes of control and anemic animals fed fermented milks. Fermented goat milk up-regulated enterocyte Dcytb, DMT1, FPN1 and Ftl1, and down-regulated TfR1 and Hamp gene expression in control and anemic animals. Anemia decreased Dcytb, DMT1 and Ftl1, in animals fed fermented cow milk and up-regulated TfR1 and Hamp expression. Fe-overload down-regulated Dcytb and TfR1 in animals fed fermented cow milk, up-regulating DMT1 and FPN1 gene expression. Fermented goat milk increased expression of duodenal Dcytb, DMT1 and FPN1 and decreased Hamp and TfR1, improving Fe metabolism during anemia recovery.

KEY WORDS:

Fermented cow and goat milk; Anemia; Iron metabolism; Gene expression; Fe repletion.



INTRODUCTION

Fe is an essential mineral for life and it is an important cofactor for several enzymatic reactions involved in organism physiology,¹ although if in excess, reacts with oxygen species and generates free radicals, inducing cellular damage to macromolecules and organelles.² For these reasons, Fe homeostasis is tightly regulated to avoid both deficiency and toxicity due to Fe excess.

Iron deficiency anemia (IDA) has been described extensively and represents a source of morbidity and mortality worldwide. Recent epidemiological studies suggest that one-third of the world's population is affected. As a highly prevalent hematological disorder, IDA represents a major public health problem.³ This pathology is developed usually due to low Fe intake, however, some genetic conditions may also result in anemia by causing defective Fe homeostasis.⁴ Several studies have reported noteworthy approach to the molecular mechanisms of Fe metabolism and the way that these processes are being disturbed in this prevalent micronutrient deficiency condition. The above mentioned studies have generated novel physiological approaches, dietary and pharmacological treatments.

Routine clinical tests used to assess Fe transport and storage include serum Fe (representing the Fe available between physiological compartments), total Fe binding capacity (TIBC) (which reflects the organism capacity to bind Fe with transferrin), serum ferritin (the predominant Fe storage protein, reflects the cumulative Fe stores in hematopoietic organs and tissues), and transferrin saturation, which is affected by the rate of Fe absorption in the small bowel as well as the amount of Fe in the stores.⁵



Recently, major scientific efforts have been made to elucidate and understand the molecular mechanism of Fe homeostasis through gastrointestinal absorption, transport, tissue uptake, storage or remobilization from stores, leading to the identification of key proteins on intestinal level, including duodenal cytochrome b (Dcytb), divalent metal transporter 1 (DMT1), ferritin light chain 1 (Ftl1), ferroportin 1 (FPN1), transferrin receptor 1 (TfR1) and hepcidin antimicrobial peptide (Hamp). The orchestrated regulation of these key genes at transcriptional and translational levels regulates Fe uptake and transportation during IDA and during normal Fe metabolism conditions.⁶

On the other hand, we have previously reported^{7, 8} that goat milk improves Fe status, because enhances and improves Fe digestive and metabolic utilization, increasing Fe deposits in target organs, favoring the recovery of hematological parameters and minimizing interactions between dietary divalent cations such as Ca and Mg, however the genetic mechanisms controlling these physiological processes during dietary Fe repletion are still not completely elucidated. In spite of the crucial role of Dcytb, DMT1, Ftl1, FPN1, TfR1 and Hamp gene expression in Fe metabolism, to date, no studies have directly tested the modulation of gene expression during Fe repletion with fermented milks. Taking into account all these considerations, the aim of this work was to contribute to a better understanding of the pathophysiology and recovery from IDA, by studying how fermented milk consumption affects Fe absorption and metabolism during Fe repletion. Analysis included Fe status markers in blood and gene expression of Dcytb, DMT1, Ftl1, FPN1, TfR1 and Hamp in duodenal tissue.

MATERIAL AND METHODS



Fermentation and dehydration of the milks

Fermented cow and goat milks were prepared according to the method described by Moreno-Fernandez et al.⁹ Both milk types were inoculated with traditional yoghurt starters *Lactobacillus bulgaricus* sub. *delbruickii* and *Streptococcus thermophiles* and incubated at 37°C for approximately 24 h. Subsequently, both fermented milk samples were evaluated for pH (Crison, Barcelona, Spain) and the fermentation ended when the milks reached pH=4.6. Later, fermented milk samples were subjected to a smooth industrial dehydration process, until the final moisture ranged between 2.5%- 4.5%.

Animals

Animal housing, care, handling procedures and experimental protocols were approved by the Ethics Committee of the University of Granada (Ref. 11022011) in accordance with the European Community guidelines (Declaration of Helsinki; Directive 2010/63/EU). 80 recently weaned male Wistar albino breed rats, purchased from the University of Granada Laboratory Animal Service (Granada, Spain) were used for the study. To ensure conditions of high biological safety, all the animal assays were carried out in the animal breeding unit of the Centre of Biomedical Research of the University of Granada, with sanitary and environmental controlled parameters in an free of pathogens area. All animals were fed with the same amount of diet (pair feeding with 80% of the average intake) to avoid differences due to the intake and deionized water was available ad libitum.



During the study, to ensure welfare and controlled conditions, the animals were housed in individual, ventilated, thermoregulated cages with controlled temperature ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), humidity ($60 \pm 5\%$) and a circadian rhythm of 12 hours (9:00 to 21:00 h).

Design of experiment and diets

At the beginning, the animals were divided into two groups: the control group receiving a normal-Fe diet (44.6 mg/Kg by analysis)¹⁰, and the anemic group receiving a low-Fe diet (6.2 mg/Kg by analysis), induced experimentally during 40 d by a method developed previously by our research group¹¹. On day 40 of the study, two blood samples per rat were collected from the caudal vein (with EDTA to measure the hematological parameters) and the rest of the blood was centrifuged ($1500 \times g$, 4°C , 15 min) without anticoagulant to separate the serum and subsequent analysis of serum Fe, total Fe binding capacity (TIBC), ferritin and serum hepcidin.

After inducing experimentally the Fe-deficiency anemia (day 40 of the study), the rats were placed on an experimental period in which both groups (control and anemic) were fed for 30 days with either fermented cow milk or fermented goat milk-based diet, with normal-Fe content (45 mg/kg) or Fe-overloaded (450 mg/kg) to induce chronic Fe-overload¹². Diets were prepared with fermented cow or fermented goat milk powder to provide 20% of protein and 10% of fat (Table 1). During the experimental period, diet intake was also controlled (pair feeding of all the animals with 80% of the average intake) and deionized water was also available ad libitum. The Fe content (mg/kg) in the diets by analysis was: normal-Fe diet: 42.7 (fermented cow milk-based diet), 43.5 (fermented goat milk-based diet) and Fe-overload diets: 472.2 (fermented cow milk-based diet) and 472.8 (fermented goat milk-based diet).



At the end of the experimental period (day 70), the animals were anesthetized intraperitoneally with sodium pentobarbital (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) and totally bled out by cannulation of the aorta and the hematological parameters were analysed in total blood with anticoagulant (Figure 1). The rest of the blood was centrifuged (1500 x g, 4°C, 15 min) without anticoagulant to separate the serum and for analysis of serum Fe, TIBC, ferritin and hepcidin. The duodenum was removed and washed repeatedly with ice-cold diethyl pyrocarbonate-treated (DEPC) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) deionized water until complete elimination of duodenal fluids and bile.

Table 1. Composition of the experimental diets

| Component | g/Kg diet |
|--|-----------|
| Pre-experimental period, Standard (non-milk) diet ^a | |
| Casein | 200 |
| Lactose | 0 |
| Fat (virgin olive oil) | 100 |
| Wheat starch | 500 |
| Constant ingredients ^b | 200 |
| Experimental period | |
| Fermented cow milk-based diet ^c | |
| Protein | 205 |
| Lactose | 295 |
| Fat | 100 |
| Wheat starch | 200 |
| Constant ingredients ^b | 200 |
| Fermented goat milk-based diet ^c | |
| Protein | 206 |
| Lactose | 291 |
| Fat | 100 |
| Wheat starch | 203 |
| Constant ingredients ^b | 200 |

^a The diets were prepared according to the recommendations of the AIN-93G for control rats (45 mg Fe/Kg diet) (Reeves et al., 1993), or with low Fe content (5 mg Fe/Kg diet) (Pallarés et al., 1993), for anaemic groups.

^b The constant ingredients consisted of (g/Kg diet): fibre (micronized cellulose) 50, sucrose 100, choline chloride 2.5, L-cystine 2.5, mineral premix 35, vitamin premix 10.

^c Specific vitamin and mineral premixes supplements for fermented goat and cow milk-based diets were formulated taking into account the mineral and vitamin contents of the fermented milk powder supplied in order to meet the recommendations of the AIN-93G for normal-Fe diets (45 mg Fe/Kg diet) (Reeves et al., 1993) or Fe-overload (450 mg Fe/Kg diet) (Raja et al., 1994).

Subsequently, duodenal mucosa was scrapped using sterile glass slides and approximately 0.5 g of duodenal mucosa was incubated with RNA-later stabilization solution (Thermo Fisher Scientific, MA USA) overnight at 4°C. Subsequently, RNA-



later solution was removed, the mucosa samples frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for RNA extraction.

Hematological tests

All the hematological parameters studied were measured using an automated haematology analyzer Mythic 22CT (C2 Diagnostics, Grabels, France).

Serum iron, total iron binding capacity (TIBC) and transferrin saturation

Transferrin saturation, serum Fe and TIBC were determined using Sigma Diagnostics Iron and TIBC reagents (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO). The absorbance of samples was read at 550 nm on a microplate reader (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA).

Serum ferritin

Serum ferritin concentration was determined using the rat Ferritin ELISA Kit (Biovendor GmbH, Heidelberg, Germany). The absorbance of the reaction was read at 450 nm using a microplate reader (Bio-tek, Vermont, USA).

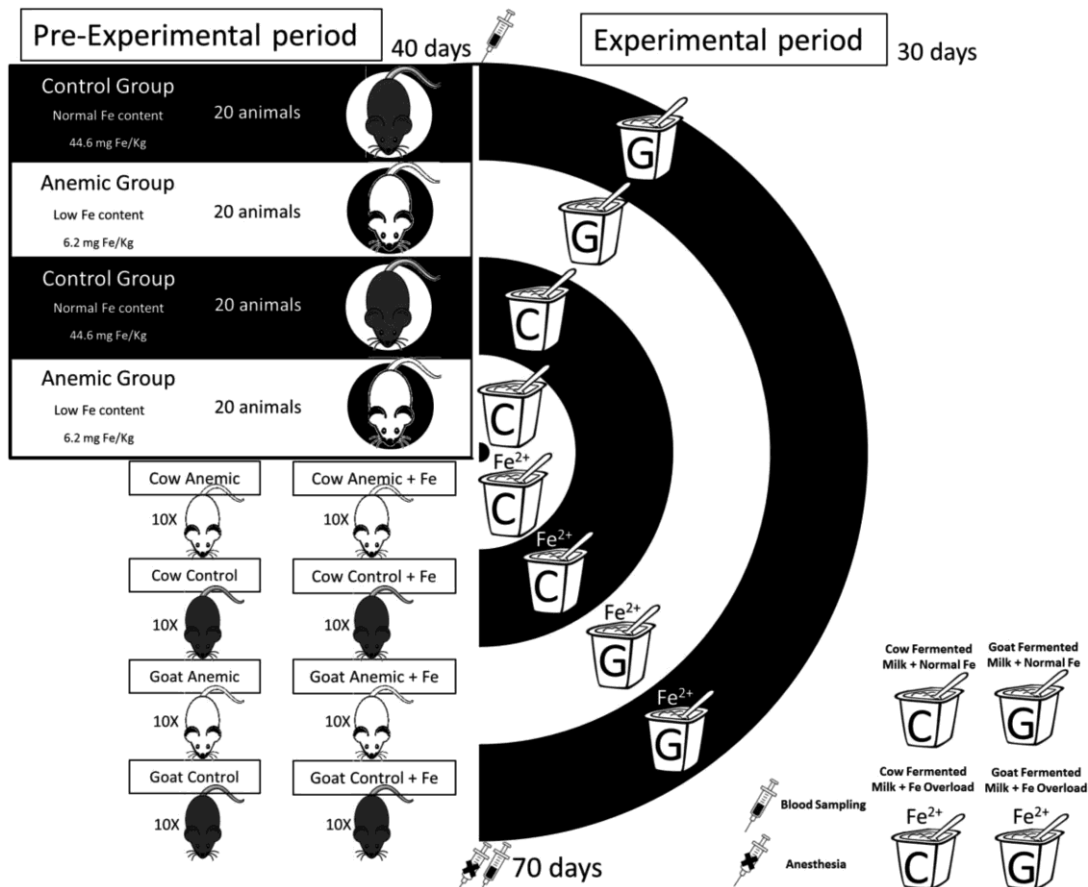
Serum hepcidin

Hepcidin-25 was determined using a DRG ELISA Kit (DRG Instruments GmbH, Germany). The absorbance was read at 450nm with a plate reader (Bio-Rad).

RNA isolation and real time qPCR

Total RNA was isolated from duodenal mucosa samples using TRIsure lysis reagent (Bioline, Luckenwalde, Germany) according to manufacturer's instructions. RNA quantity and purity were determined by spectrophotometer (NanoDrop 1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) at 260/280nm. Complementary DNA (cDNA) was synthesized using iScript cDNA Synthesis kit (Bio-Rad) in a 20µl reaction, with 1µg of total RNA following the protocol supplied by the manufacturer.

Figure 1. Experimental design of the study.





Quantitative real-time PCR was carried out as two step procedure in a total reaction volume of 20µl using the CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) and SYBR Green detection using Sso Advanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Primer sequences for quantitative real-time PCR were designed by use of standard tools (Spidey, Primer3, NCBI Blast). Primer pairs were obtained from Eurofins MWG Biotech (Ebersberg, Germany). The selected rat genes, detailed in Table 2, were as follows: duodenal cytochrome b (Dcytb), divalent metal transporter 1 (DMT1), ferritin (Ftl1), Ferroportin 1 (FPN1), transferrin receptor 1 (TfR1) and hepcidin antimicrobial peptide (Hamp). Measurements were done in duplicate and the expression of the target genes was normalized to the housekeeping gene β -actin which was consistently expressed across the groups. Serial dilutions of control samples were used to determine the efficacy of amplification. Melt curve analysis and gel electrophoresis were used to confirm PCR product size.

Table 2. PCR primer sequences and annealing temperatures

| Gene | Forward Sequence | Reverse Sequence | Annealing temperature (°C) |
|----------------|------------------------|----------------------|----------------------------|
| β -Actin | GGGGTGTGTTGAAGGTCTCAA | TGTCACCAACTGGGACGATA | 57 |
| Dcytb | AGATTGCCATGGACCTGGAA | GAGCCCATGGAAGCAGAAAG | 57 |
| DMT1 | GGCATGTGGCACTGTATGTG | CCGCTGGTATCTTCGCTCAG | 59 |
| Ftl1 | GCCCTGGAGAAGAACCTGAA | AGTCGTGCTTCAGAGTGAGG | 59 |
| FPN1 | GAACAAGAACCCACCTGTGC | AGGATGGAACCACTCAGTCC | 57 |
| TfR1 | CAAATGGTTTCGTACAGCAGGC | CTCCACGAGCAGAATACAGC | 59 |
| Hamp | CCTATCTCCGGCAACAGACG | GGGAAGTTGGTGTCTCGCTT | 59 |



Western blotting and immunocytochemistry

Finely chopped mucosa samples were obtained using Potter–Elvehjem homogenizer apparatus on ice, and whole cell proteins were extracted using T-PER tissue extraction reagent (Thermo Scientific Inc., Hanover Park, IL, USA). Protease inhibitor (1:200 dilution; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was incorporated. Protease inhibitor mixture (1:200 dilution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) was added to avoid protein degradation. Total protein concentration was determined in the extracts using a Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Twelve μg of total protein were separated on 4–20% Criterion TGX (Tris-Glycine extended) gels (Mini-PROTEAN TGX Precast Gels, 15 μL ; 15 wells; Bio-Rad). An electrophoretic separation was performed at 250 V in a vertical electrophoresis tank (Mini-PROTEAN System; Bio-Rad) for 20 min. Fermentas PageRuler Plus Prestained Protein Ladder was employed as molecular weight marker (Thermo Scientific). Thereafter, proteins were transferred from gel onto a PVDF membrane (Bio-Rad) by wet transfer for 60 min at 120V with transfer buffer comprising 250 mM Trizma HCl, 200 mM glycine, and 6% methanol, pH 8.3 (Sigma-Aldrich). After transfer, the membranes were blocked with 5% dry milk in Tris-buffered saline (TBS) plus Tween-20 (TTBS) (Bio-Rad) solution for 1 h at room temperature. The blots were then washed 3 times in TBS, and incubated with rabbit anti DMT1 polyclonal [(Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA (dilution 1:400)], rabbit anti SLC40A1 polyclonal antibody (FPN1) [Abcam, UK (dilution 1:800)] and mouse anti β -actin monoclonal [Abcam, UK (dilution 1:1000)] as primary antibodies, in 5% dry milk in TTBS overnight at 4 °C with shaking. β -actin was used as loading control.



Blots were then washed 3 times for 5 min each in TTBS and incubated with the appropriate secondary conjugated antibody [ImmunStar Goat Anti-Mouse (GAM)-HRP; 1:80,000 and Immun-Star Goat Anti-Rabbit (GAR)-HRP; Bio-Rad Laboratories; 1:40,000] in TTBS for 1 h at room temperature. The bands were visualised with Luminata forte western HRP Substrate (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Signal quantification and recording densitometry of each band were performed with chemiluminescence in ImageQuant LAS 4000 (Fujifilm Life Science Corporation, USA). All results were analysed with Image J software.

Statistical analysis

Data are reported as means \pm standard error of the mean (SEM) of 40 animals per group during the pre-experimental period (anemia induction) and 10 animals per group during the experimental period (anemia recovery). Statistical analyses were performed using the SPSS computer program (version 22.0, 2013, SPSS Inc., Chicago, IL). Data were analysed by 2-way ANOVA to determine the effects of anemia, type of diet and dietary Fe content. Differences were considered significant at $P < 0.05$. Differences between groups (normal-Fe vs. low-Fe and normal-Fe vs. Fe-overload) were tested for statistical significance with Student's *t* test. Individual means were tested by pairwise comparison with Tukey's multiple comparison test when main effects and interactions were significant. A power analysis was performed to estimate the number of rats needed to obtain 80% power at a confidence level of 95%, and although eight animals would be required to obtain significant differences in hematological parameters and seven animals per group would be required to obtain significant differences in gene expression patterns, to ensure a power calculation, 10 rats per groups were used.



RESULTS

Hematological parameters

After anemia induction with Fe deprivation during 40 d, all the hematological parameters in the IDA group were different from the controls ($P < 0.001$), except white blood cells that remained unchanged after anemia induction (Table 3).

Table 3. Hematological parameters of control and anemic rats

| Parameter | Normal-Fe Control group ($n = 40$) | Low-Fe Anemic group ($n = 40$) |
|----------------------------|--|--|
| Total blood | | |
| Hb concentration (g/L) | 133.88 \pm 2.98 | 60.22 \pm 2.87 * |
| RBCs ($10^{12}/L$) | 7.14 \pm 0.20 | 3.08 \pm 0.24 * |
| Hematocrit (%) | 40.01 \pm 1.13 | 12.76 \pm 1.33 * |
| MCV (fL) | 55.76 \pm 0.53 | 36.91 \pm 0.37 * |
| MCH (pg) | 19.47 \pm 0.15 | 14.10 \pm 0.63 * |
| MCHC (g/dl) | 35.54 \pm 0.36 | 30.21 \pm 0.82* |
| RDW (%) | 16.23 \pm 0.35 | 19.16 \pm 0.39 * |
| Platelets ($10^9/L$) | 733 \pm 72.15 | 2123 \pm 119 * |
| WBCs ($10^9/L$) | 8.91 \pm 0.39 | 8.53 \pm 0.88 |
| Lymphocytes ($10^6/ml$) | 7.98 \pm 0.58 | 5.76 \pm 0.84* |
| Serum | | |
| Fe ($\mu g/L$) | 1336 \pm 99.12 | 601 \pm 55.98 * |
| TIBC ($\mu g/L$) | 2675 \pm 189 | 17935 \pm 598 * |
| Transferrin saturation (%) | 49.02 \pm 5.87 | 3.93 \pm 0.41 * |
| Ferritin ($\mu g/L$) | 79.74 \pm 2.12 | 49.65 \pm 1.64 * |
| Hepcidin, ng/mL | 16.87 \pm 0.46 | 13.48 \pm 0.62* |

Data are shown as the mean values \pm SEM.

Hb, hemoglobin; RBCs, red blood cells; MCV, mean corpuscular volume; MCH, mean corpuscular Hb; MCHC, mean corpuscular Hb concentration; RDW, red cell distribution width; WBCs, white blood cells; TIBC, total Fe-binding capacity.

*Significantly different from the control group ($P < 0.001$, Student's t test).



After 30 d feeding the fermented milk-based diets, the hematological parameters were recovered with both milk-based diets, either with normal-Fe or Fe-overload. Serum hepcidin was higher in control and anemic animals fed fermented goat milk either with normal-Fe or Fe-overload in comparison with fermented cow milk ($P < 0.001$). As expected, serum Fe was higher in the Fe-overload groups ($P < 0.01$). Fe-overload also increased hemoglobin ($P < 0.001$), serum ferritin ($P < 0.01$), transferrin saturation ($P < 0.01$) and TIBC ($P < 0.01$) (Table 4).



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Table 4. Haematological parameters from control and anemic rats fed for 30 days with fermented cow or goat milk, Fe content or Fe-overload (experimental period).

| Parameters | Fe content | Fermented cow milk | | Fermented goat milk | |
|--------------------------------|------------|--------------------|-----------------|---------------------|-----------------|
| | | Control group | Anemic group | Control group | Anemic group |
| Hb concentration (g/l) | Normal | 129.55 ± 2.89 | 129.33 ± 2.61 | 131.95 ± 2.76 | 129.15 ± 2.48 |
| | Overload | 142.63 ± 2.63C | 141.10 ± 2.92AC | 141.30 ± 2.98C | 147.35 ± 3.01BC |
| RBCs (10 ¹² /l) | Normal | 7.06 ± 0.18 | 7.08 ± 0.22 | 7.39 ± 0.21 | 7.21 ± 0.20 |
| | Overload | 6.94 ± 0.17a | 7.19 ± 0.24 | 8.01 ± 0.30 bC | 7.11 ± 0.21 |
| Haematocrit % | Normal | 40.02 ± 1.19a | 39.01 ± 0.97A | 41.93 ± 1.23b | 42.95 ± 0.98B |
| | Overload | 39.37 ± 1.33a | 44.89 ± 2.76C | 44.86 ± 1.26 bC | 45.42 ± 1.35C |
| MCV (fL) | Normal | 57.68 ± 0.54 | 55.34 ± 0.59 | 57.25 ± 0.56 | 55.04 ± 0.53 |
| | Overload | 56.79 ± 0.58 | 53.18 ± 0.55A | 56.44 ± 0.53 | 56.15 ± 0.53B |
| Platelets (10 ⁹ /l) | Normal | 933.00 ± 70.32 | 963.00 ± 66.45 | 926.00 ± 79.65 | 935.33 ± 66.89 |
| | Overload | 939.67 ± 71.37 | 965.50 ± 72.22 | 933.59 ± 81.32 | 945.86 ± 70.26 |
| Serum Fe (µg/l) | Normal | 1346 ± 86.18 | 1355 ± 86.35 | 1352 ± 88.96 | 1326 ± 94.35 |
| | Overload | 1591 ± 100C | 1587 ± 102C | 1556 ± 99C | 1576 ± 97C |
| TIBC (µg/l) | Normal | 2787 ± 158 | 2798 ± 137 | 2785 ± 144 | 2789 ± 166 |
| | Overload | 3145 ± 177C | 3254 ± 175C | 3251 ± 169C | 3195 ± 166C |
| Transferrin saturation (%) | Normal | 45.98 ± 0.91 | 45.32 ± 0.89 | 46.65 ± 0.76 | 46.37 ± 0.94 |
| | Overload | 47.76 ± 1.32C | 47.88 ± 1.02C | 49.59 ± 0.98C | 48.96 ± 1.05C |
| Serum ferritin (µg/l) | Normal | 83.25 ± 1.75 | 82.97 ± 1.68 | 84.33 ± 1.77 | 82.34 ± 1.82 |
| | Overload | 87.73 ± 1.87C | 86.87 ± 1.91C | 87.91 ± 1.88C | 86.65 ± 1.96C |
| Serum hepcidin (ng/mL) | Normal | 14.25 ± 0.59a | 14.42 ± 0.49A | 16.85 ± 0.55b | 16.66 ± 0.59B |
| | Overload | 15.75 ± 0.62aC | 14.98 ± 0.58A | 17.01 ± 0.61b | 16.73 ± 0.63B |

¹NS, not significant.



Moreno Fernández J, 2020
International Ph.D .Thesis

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- ^{a,b} Mean values among groups of controls rats fed with different diet and different lower case letters in the same row indicated significant difference by 2-way ANOVA.
- ^{A,B} Mean values among groups of anaemic rats fed with different diet and different upper case letters in the same row indicated significant difference by 2-way ANOVA.
- ^C Mean values were significantly different from the corresponding group of rats fed with normal Fe content at $P < 0.05$ by Student's t test.

Effect of fermented milks on Fe metabolism and uptake related genes and proteins

The relative expression pattern of genes relevant to Fe metabolism is shown in Figure 2A-F. Fermented goat milk up-regulated enterocyte Dcytb gene expression in both groups of animals either with normal-Fe or Fe-overload ($P < 0.001$), previously induced anemia decreased Dcytb expression in the animals fed fermented cow milk with normal-Fe content ($P < 0.01$) and Fe-overload down-regulated Dcytb expression in both groups (control and anemic rats) fed fermented cow milk with normal-Fe content ($P < 0.001$) and in the anemic group fed fermented goat milk ($P < 0.001$) (Figure 2A).

Expression of DMT1 increased in control and anemic animals fed fermented goat either with normal-Fe or Fe-overload ($P < 0.001$). Enterocyte DMT1 expression was down-regulated in the anemic group fed fermented cow milk with Fe-overload ($P < 0.05$), however, the induction was much higher in the animals fed fermented goat milk with normal-Fe content ($P < 0.001$). Fe-overload increased DMT1 gene expression in the control group fed fermented goat milk ($P < 0.001$), but decreased its expression in the anemic animals fed the same diet ($P < 0.001$) (Figure 2B).

Similarly, DMT1 relative protein expression was higher in the animals fed fermented goat milk either with normal-Fe ($P < 0.001$) or Fe-overload ($P < 0.01$). Anemia increased DMT1 protein expression in animals fed fermented cow milk with normal Fe content ($P < 0.05$) and decreased this protein expression in animals fed fermented goat milk with normal-Fe content ($P < 0.001$). Fe-overload decreased DMT1 protein expression in all animals fed fermented goat milk in comparison with normal-Fe



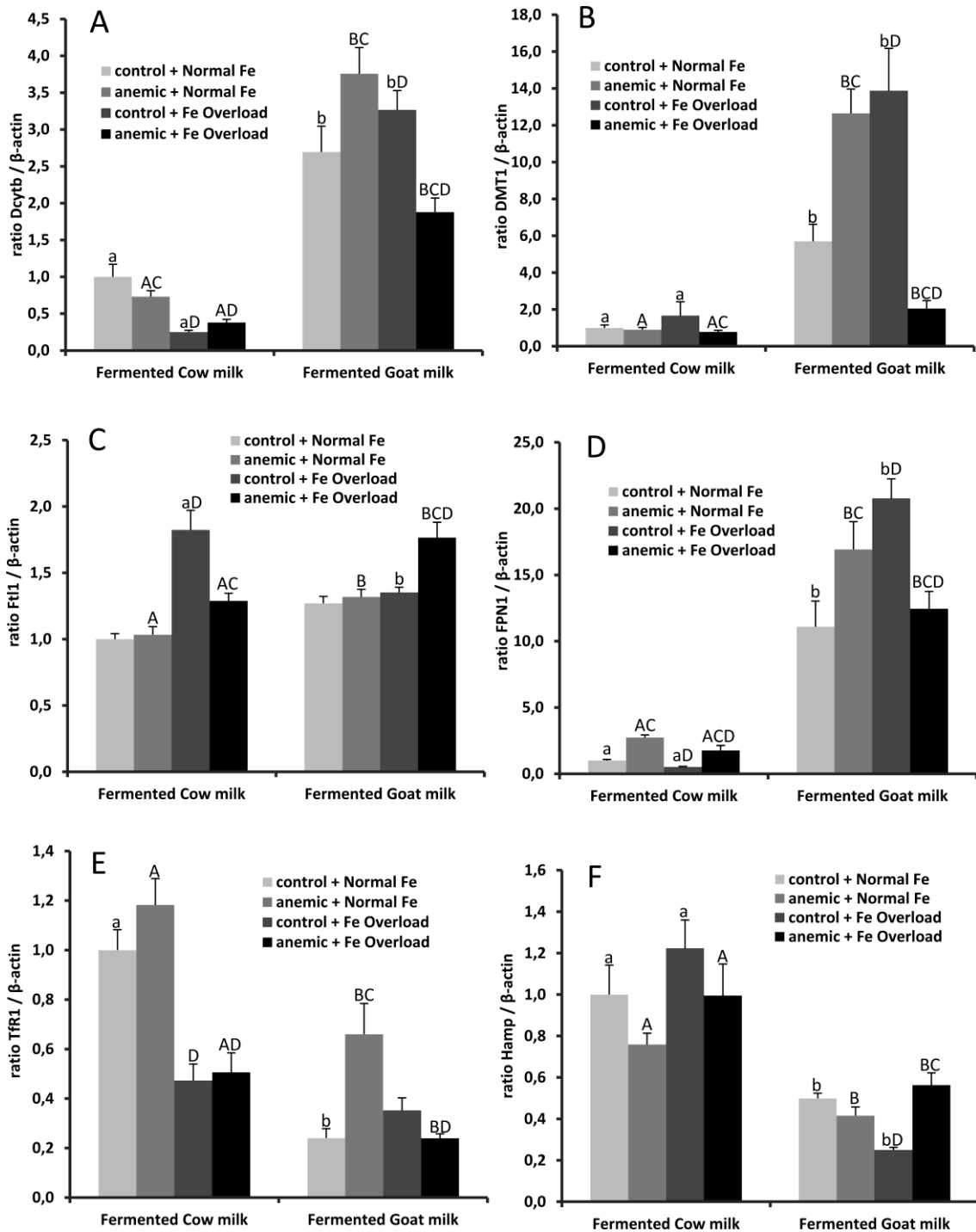
content groups ($P < 0.001$ for control animals and $P < 0.05$ for anemic animals) (Figures 3A and 3C).

Fermented goat milk induced an up-regulation of Ftl1 expression in control and anemic animals, especially in the anemic groups either with normal-Fe or Fe-overload ($P < 0.05$). Anemia up-regulated enterocyte Ftl1 expression in the animals fed both fermented milks with Fe-overload ($P < 0.01$). Fe-overload up-regulated Ftl1 expression in the anemic groups fed fermented cow milk ($P < 0.05$) and fermented goat milk ($P < 0.01$) (Figure 2C).

Fermented goat milk consumption induced a marked up-regulation of FPN1 mRNA in control and anemic rats fed with normal-Fe or Fe-overload ($P < 0.001$). Anemia increased FPN1 expression in all the groups of rats fed fermented milks ($P < 0.001$), except in those fed fermented goat milk diet with Fe-overload, which recorded a down-regulation of this gene ($P < 0.001$). Fe-overload in animals fed fermented cow milk down-regulated FPN1 gene expression in control rats ($P < 0.05$) and up-regulated this gene expression in anemic animals ($P < 0.05$), however in the animals fed fermented goat milk, Fe-overload up-regulated FPN1 in control animals ($P < 0.001$) and down-regulated this gene in anemic rats ($P < 0.01$) (Figure 2D).



Figure 2. Effect of fermented cow's and goat's milk in control and anemic rats under normal and Fe-overload conditions on mRNA levels of duodenal Dcytb (A), DMT1 (B), Ftl1 (C), FPN1 (D), Tfr1 (E), and Hamp (F).



Data are means with SEM of 10 animals per group. Mean values among groups of controls rats with different lower case letters (a, b) were significantly different ($P < 0.05$, Tukey's test). Mean values among groups of anemic rats with different upper case letters (A, B) were significantly different ($P < 0.05$, Tukey's test). Mean values from the corresponding group of control rats designated "C" were significantly different ($P < 0.05$, Student's *t* test). Mean values from the corresponding group of rats fed normal Fe content designated "D" were significantly different ($P < 0.05$, Student's *t* test).

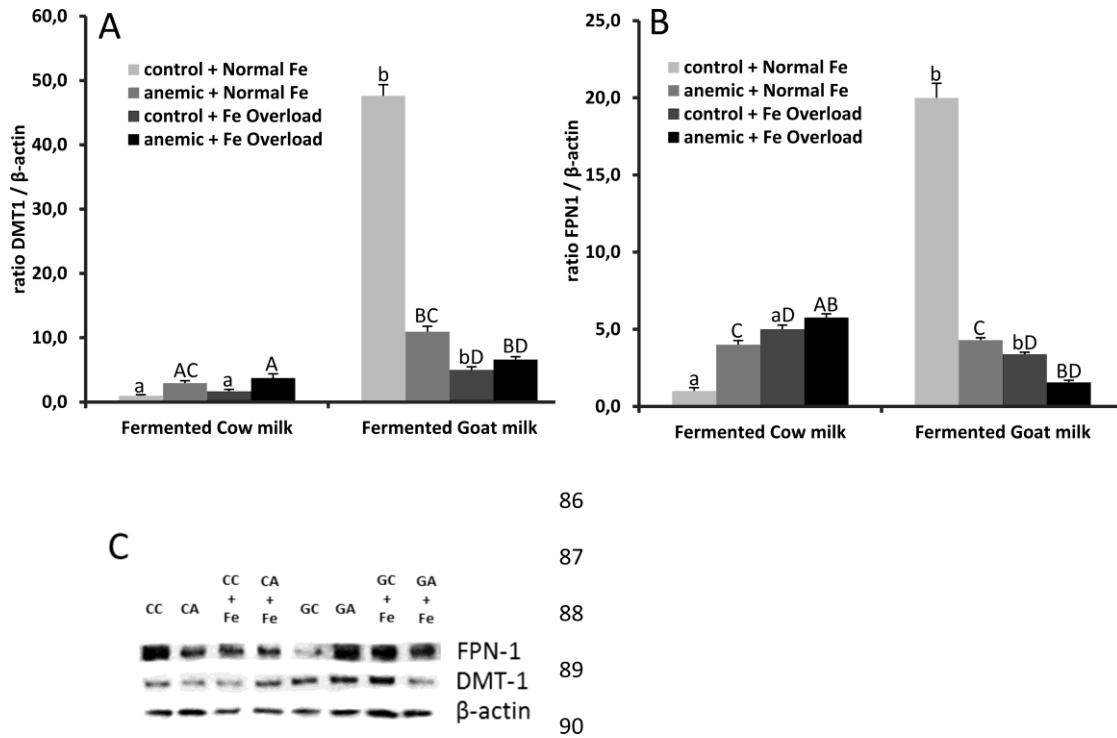


With regard to FPN1 protein expression, a higher expression of this protein was recorded in control animals fed fermented goat milk with normal-Fe content in comparison with fermented cow milk ($P < 0.001$). Anemia increased FPN1 protein expression in the animals fed fermented cow milk with normal-Fe content ($P < 0.001$) and reduced this protein expression in the animals fed fermented goat milk with normal-Fe content ($P < 0.001$). Fe-overload increased FPN1 protein expression in control rats fed fermented cow milk ($P < 0.001$) and reduced this protein expression in control ($P < 0.001$) and anemic ($P < 0.05$) rats fed fermented goat milk (Figures 3B and 3C).

TfR1 was down-regulated in control and anemic rats fed fermented goat milk with normal-Fe content ($P < 0.001$) and in the anemic rats fed the same diet with Fe-overload ($P < 0.001$). Anemia induced a clear up-regulation of TfR1 gene expression in the anemic animals fed fermented goat milk with normal-Fe ($P < 0.001$). Fe-overload diminished TfR1 expression in all the experimental groups ($P < 0.001$), except in the control rats fed fermented goat milk (Figure 2E).

Hamp enterocyte expression was down-regulated in all the experimental groups (control and anemic) fed fermented goat milk (either with normal-Fe or Fe-overload) ($P < 0.001$). Anemia increased Hamp gene expression in the animals fed fermented goat milk with Fe-overload ($P < 0.01$). Fe-overload only showed an effect in the control group fed fermented goat milk, where a decrease in the expression of Hamp was recorded ($P < 0.001$) (Figure 2F).

Figure 3. Effect of fermented cow's and goat's milk in control and anemic rats under normal and Fe-overload conditions on expression of DMT1 (A) and FPN1 (B) protein.



Data are means with SEM of 10 animals per group. Mean values among groups of controls rats with different letters (a,b) were significantly different ($P < 0.05$, Tukey's test). Mean values among groups of anemic rats with different upper case letters (A, B) were significantly different ($P < 0.05$, Tukey's test). Mean values from the corresponding group of control rats designated "C" were significantly different ($P < 0.05$, Student's *t* test). Mean values from the corresponding group of rats fed normal Fe content designated "D" were significantly different ($P < 0.05$, Student's *t* test). (C) Representative immunoblots of DMT1, FPN1, and β -actin are shown.

DISCUSSION

Dietary fermented goat milk was found to be more beneficial in overcoming the effects of Fe deficiency, when compared with fermented cow milk. Among the studied genes, up-regulations in relative expression of enterocyte Dcytb, DMT1 and FPN1 mRNA were most significant, thereby confirming our research hypothesis (fermented



goat milk improves Fe homeostasis) and previous results indicating better anemia recovery with goat milk consumption,^{7, 8} but in this case at the gene expression level.

It has been previously reported that a low vitamin A content in the diet, led to a reduced DMT1 protein expression by post-transcriptional regulation due either to a decreased translation or increased degradation, affecting negatively Fe metabolism.¹³ In addition, intracellular Fe sequestration is related to inflammatory signaling. In a study conducted by Katz et al.,¹⁴ vitamin A attenuated inflammatory signaling, and induced a recovery of the intracellular Fe-related proteins abnormalities, as well as alleviated intracellular Fe sequestration in duodenal cells. These results were serum hepcidin independent, thus they reflect the local intestinal compartmental events (at enterocyte level) and suggest that by applying anti-inflammatory compounds, less Fe is locked in inflamed intestinal epithelial cells, leading to its increased bioavailability by up-regulating the genes involved in Fe homeostasis. Taking into account that goat milk contains more vitamin A than cow milk,^{7, 15} this vitamin might be contributing to the increased expression of Fe-status related genes.

In addition, goat milk fat is richer in medium chain triglycerides (MCT), which are able to pass through the mitochondrial membrane independently of carnitine, do not need re-esterification and are oxidized in the mitochondria, therefore providing fast energy discharge available for several metabolic pathways, conferring metabolic and energetic advantages to the enterocytes.⁷ Through goat milk consumption, the higher amount of MCT would provide more energy, inducing a trophic effect¹⁶ in the enterocyte and contribute to the up-regulation of the genes studied and hence improving duodenal Fe absorption.



Regulation of Fe uptake in the organism occurs in the enterocyte, which determines how much Fe is acquired in the intestinal lumen. Subsequent to reduction of dietary ferric iron (Fe^{3+}) by Dcytb, ferrous Fe (Fe^{2+}) is transported across the brush-border membrane of enterocytes via DMT1.¹⁷ In our case an up-regulation of Dcytb was recorded in all the groups fed fermented goat milk, revealing a higher capacity of dietary Fe reduction and thus conferring more substrate to DMT1, improving therefore the bioavailability by the enterocyte. Anemia induced an over-expression of Dcytb mRNA in the groups fed fermented goat milk with normal-Fe content, however this trend was inverse in the case of rats fed fermented cow milk with normal-Fe content, revealing that Fe bioavailability by DMT1 would be lower in the case of cow milk. An up-regulation of Dcytb and DMT1, has been previously reported in situation of Fe-deficiency, as a compensatory mechanism to promote Fe absorption,¹⁸ findings in agreement with those obtained in the current study.

Furthermore, present results clearly show an up-regulation of DMT1 expression in animals consuming fermented goat milk in comparison with fermented cow milk. IDA did not show any effect on enterocyte DMT1 expression in the animals fed fermented cow milk, whereas increased DMT1 mRNA was observed in animals consuming fermented goat milk with normal-Fe content, however a significant reduction was observed in the anemic animals fed goat milk with Fe-overload, in a protective mechanism to avoid excessive Fe storage and subsequent Fe mediated damage in the tissues. DMT1 is a multipass, transmembrane protein that mediates the uptake of divalent cations, especially ferrous iron (Fe^{2+}). Physiological data reveal the essential role of DMT1 as an essential intestinal Fe importer, fact that can be confirmed because severe IDA that results from deletion¹⁹ or mutation²⁰ of the gene in rodents. The up-



regulation of DMT1 in the animals consuming goat milk confirms the better Fe absorption, fact that influences positively the recovery of the hematological parameters and confirms previous findings, on improved Fe digestive and metabolic utilization after goat milk consumption (non fermented),^{7,8} at the level of gene expression.

Fe²⁺ leaves enterocytes via FPN1-mediated transport, being the only protein capable to export ferrous Fe in mammals.²¹ FPN1 is highly expressed various types of cells that play critical roles in Fe homeostasis, such as enterocytes, macrophages and hepatocytes, consistent with its roles in Fe absorption and recycling. The key role of FPN1 can be exemplified by knockout of the gene in mice, which leads to a severe IDA.²² FPN1 gene mutations have been reported, and, although they are not common, they represent an important group of Fe-loading disorders.²³ Subjects affected feature several phenotypes depending upon how the mutations alter FPN1 export function. It is noteworthy that these reports clearly feature the critical, non-redundant role of FPN1 in Fe absorption. Similarly to Dcytb and DMT1, an up-regulation in relative expression of FPN1 mRNA was observed in animals consuming fermented goat milk either with normal-Fe or Fe-overload. As previously reported, anemia induces an up-regulation of FPN1 as a compensatory response to systemic Fe depletion, to adjust the rates of Fe export,²⁴ results in agreement with those obtained in the current study.

Fe homeostasis in the enterocytes is regulated towards the FPN1-Hamp axis, which involves specific physiological adaptations that have evolved to maximize Fe uptake from the diet when the Fe requirements increase. These adaptations include direct effects on duodenal cells gene transcription, posttranscriptional control of mRNA stability, and morphological remodeling of the duodenal epithelium, probably all in response to alterations in intracellular Fe levels in enterocytes.²⁵ Hepcidin plays a



central role in Fe absorption by the duodenal epithelial cells (enterocytes). Hamp expression was found to be decreased in rats consuming fermented goat milk in comparison with rats consuming cow milk. This down-regulation of enterocyte Hamp would increase Fe efflux from the duodenal cells, because enterocyte Hamp mRNA expression correlates inversely with the activity of FPN1 and Fe absorption.²⁶ Once more these data indicate the better Fe status recovery and absorption with fermented goat milk.

In contrast, serum hepcidin followed a different pattern during Fe repletion with fermented milks, increasing in the animals fed fermented goat milk, finding in agreement with previous results.²⁷ As previously mentioned, hepcidin intervenes in regulating Fe storage in the enterocytes and liver (attenuating both the intestinal Fe absorption and the liberation of the Fe of the macrophages and hepatocytes), being a key factor in the erythroid regulation, recording a diminished expression of this peptide in response to the anemic hypoxia.²⁸ Therefore, the increase in serum hepcidin recorded during Fe repletion with fermented goat milk, can be explained by the induction of erythropoiesis,²⁹ due to increase of duodenal Fe absorption. The higher levels of this peptide hormone compared with fermented cow milk diet would decrease Fe export from hepatocytes, increasing its storage in liver and revealing that Fe stores were replete.²⁷

It is known that duodenal Fe absorption correlates with Fe status of the body. In the present study, most of the genes showed significantly higher mRNA abundance during Fe depletion with fermented goat milk compared with cow milk. This finding suggests that up-regulation of genes coding for proteins involved in Fe absorption, such as Dcytb, DMT1 and FPN1, play a key role in enhanced absorption of Fe during IDA



recovery. In addition, enhanced expression of TfR1 has been reported in IDA^{30, 31} therefore the down-regulation of this gene in the animals consuming fermented goat milk reveals, once again, the adapted genetic regulation of Fe metabolism during Fe repletion.

Ftl1 is an intracellular protein that stores and releases Fe in a strictly controlled way. Ferritin gene is up-regulated in situation of Fe overload, to ensure higher Fe sequestration, which prevents Fe-mediated oxidative damage to the main biomolecules. In the current study, the expression of enterocyte ferritin mRNA is higher in the anemic group fed goat milk with normal-Fe content. In addition, Fe-overload increased ferritin gene expression in control group fed fermented cow milk and anemic group fed fermented goat milk, probably as a compensatory mechanism to avoid the oxidative damage induced by Fe-overload.

In conclusion, consumption of fermented goat milk was found to be more beneficial compared to fermented cow milk in overcoming the effects of IDA. Effects due to fermented goat milk can be explained on molecular level as changes in key proteins of intestinal Fe metabolism showing increased expression of duodenal Dcytb, DMT1 and FPN1. In addition, Hamp and TfR1 showed significantly lower or equal mRNA abundance during Fe repletion with fermented goat milk, compared with fermented cow milk, revealing that changes in relative expression of enterocyte Fe-related genes are sensitive molecular biomarkers for IDA recovery with fermented goat milk consumption. The results also suggest that fermented goat milk promotes Fe-related genes expressions mechanisms, increasing Fe bioavailability and Fe repletion after induced anemia, a fact that can have significant implications in populations suffering nutritional deficiencies to alleviate IDA.



AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Tel: 34-958-243880, Fax: 34-958-248959, E-mail address: milopez@ugr.es

Notes

The authors declare no conflict of interest. The funding sponsor had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, and in the decision to publish the results.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Andalusian Government, Excellence Research Project No. P11-AGR-7648. Jorge Moreno-Fernandez was supported by a grant from the University of Granada and International Excellence Campus (CEI-Biotic) during his stay at the University of Leeds, and is grateful to the Excellence Ph.D. Program “Nutrition and Food Sciences” from the University of Granada. The authors are grateful to Dr. Juan Capel Salinas from University of Almería for his guidance in the results expression.



REFERENCES

- (1) Hentze, M. W.; Muckenthaler, M. U.; Andrews, N. C. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* 2004, 117, 285–297.
- (2) Britton, R. S.; Leicester, K. L.; Bacon, B. R. Iron toxicity and chelation therapy. *Int. J. Hematol.* 2002, 76, 219–228.
- (3) Kassebaum, N. J.; Jasrasaria, R.; Naghavi, M.; Wulf, S. K.; Johns, N.; Lozano, R.; Regan, M.; Weatherall, D.; Chou, D. P.; Eisele, T. P.; Flaxman, S. R.; Pullan, R. L.; Brooker, S. J.; Murray, C. J. A systematic analysis of global anemia burden from 1990 to 2010. *Blood* 2014, 123, 615–624.
- (4) Finberg, K. E.; Heeney, M. M.; Campagna, D. R.; Aydinok, Y.; Pearson, H. A.; Hartman, K. R.; Mayo, M. M.; Samuel, S. M.; Strouse, J. J.; Markianos, K.; Andrews, N. C.; Fleming, M. D. Mutations in *TMPRSS6* cause iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA). *Nat. Genet.* 2008, 40, 569–571.
- (5) Njajou, O. T.; Alizadeh, B. Z.; Aulchenko, Y.; Zillikens, M. C.; Pols, H. A.; Oostra, B. A.; Swinkels, D. W.; van Duijn, C. M. Heritability of serum iron, ferritin and transferrin saturation in a genetically isolated population, the Erasmus Rucphen Family (ERF) Study. *Hum. Hered.* 2006, 61, 222–228.
- (6) Knutson, M. D. Iron-sensing proteins that regulate hepcidin and enteric iron absorption. *Annu. Rev. Nutr.* 2010, 30, 149–171.
- (7) Alférez, M. J. M.; López-Aliaga, I.; Nestares, T.; Díaz-Castro, J.; Barrionuevo, M.; PB, R.; MS, C. Dietary goat milk improves iron bioavailability in rats with induced



- nutritional ferropenic anaemia in comparison with cow milk. *Int. Dairy J.* 2006, 16, 813–821.
- (8) Nestares, T.; Barrionuevo, M.; Diaz-Castro, J.; Lopez-Aliaga, I.; Alferez, M. J.; Campos, M. S. Calcium-enriched goats' milk aids recovery of iron status better than calcium-enriched cows' milk, in rats with nutritional ferropenic anaemia. *J. Dairy Res.* 2008, 75, 153–159.
- (9) Moreno-Fernandez, J.; Diaz-Castro, J.; Alferez, M. J.; Hijano, S.; Nestares, T.; Lopez-Aliaga, I. Production and chemical composition of two dehydrated fermented dairy products based on cow or goat milk. *J. Dairy Res.* 2016, 83, 81–88.
- (10) Reeves, P. G.; Nielsen, F. H.; Fahey, G. C., Jr. 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.
- (11) Pallares, I.; Lisbona, F.; Aliaga, I. L.; Barrionuevo, M.; Alferez, M. J.; Campos, M. S. Effect of iron deficiency on the digestive utilization of iron, phosphorus, calcium and magnesium in rats. *Br. J. Nutr.* 1993, 70, 609–620.
- (12) Raja, K. B.; Simpson, R. J.; Peters, T. J. Intestinal iron absorption studies in mouse models of iron-overload. *Br. J. Haematol.* 1994, 86, 156–162.
- (13) Kelleher, S. L.; Lonnerdal, B. Low vitamin A intake affects milk iron level and iron transporters in rat mammary gland and liver. *J. Nutr.* 2005, 135, 27–32.
- (14) Katz, O.; Reifen, R.; Lerner, A. beta-Carotene can reverse dysregulation of iron protein in an in vitro model of inflammation. *Immunol. Res.* 2015, 61, 70–78.



- (15) Guneser, O.; Karagul Yuceer, Y. Effect of ultraviolet light on water- and fat-soluble vitamins in cow and goat milk. *J. Dairy Sci.* 2012, 95, 6230–6241.
- (16) Schwartz, S.; Farriol, M.; Garcia-Arumi, E.; Andreu, A. L.; Lopez Hellin, J.; Arbos, M. A. Effect of medium chain triglycerides (MCT) on jejunal mucosa mass and protein synthesis. *Gut* 1994, 35, S39–S41.
- (17) Mackenzie, B.; Garrick, M. D. Iron imports. II. Iron uptake at the apical membrane in the intestine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2005, 289, G981–G986.
- (18) Tako, E.; Hoekenga, O. A.; Kochian, L. V.; Glahn, R. P. High bioavailability iron maize (*Zea mays* L.) developed through molecular breeding provides more absorbable iron in vitro (Caco-2 model) and in vivo (*Gallus gallus*). *Nutr. J.* 2013, 12, 3.
- (19) Gunshin, H.; Fujiwara, Y.; Custodio, A. O.; Drenzo, C.; Robine, S.; Andrews, N. C. Slc11a2 is required for intestinal iron absorption and erythropoiesis but dispensable in placenta and liver. *J. Clin. Invest.* 2005, 115, 1258–1266.
- (20) Fleming, M. D.; Romano, M. A.; Su, M. A.; Garrick, L. M.; Garrick, M. D.; Andrews, N. C. Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998, 95, 1148–1153.
- (21) McKie, A. T.; Marciani, P.; Rolfs, A.; Brennan, K.; Wehr, K.; Barrow, D.; Miret, S.; Bomford, A.; Peters, T. J.; Farzaneh, F.; Hediger, M. A.; Hentze, M. W.; Simpson, R. J. A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol. Cell* 2000, 5, 299–309.
- (22) Donovan, A.; Lima, C. A.; Pinkus, J. L.; Pinkus, G. S.; Zon, L. I.; Robine, S.;



- Andrews, N. C. The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metab.* 2005, 1, 191–200.
- (23) Del-Castillo-Rueda, A.; Moreno-Carralero, M. I.; Cuadrado-Grande, N.; Alvarez-Sala-Walther, L. A.; Enriquez-de-Salamanca, R.; Mendez, M.; Moran-Jimenez, M. J. Mutations in the HFE, TFR2, and SLC40A1 genes in patients with hemochromatosis. *Gene* 2012, 508, 15–20.
- (24) Matak, P.; Zumerle, S.; Mastrogiannaki, M.; El Balkhi, S.; Delga, S.; Mathieu, J. R.; Canonne-Hergaux, F.; Poupon, J.; Sharp, P. A.; Vaulont, S.; Peyssonnaud, C. Copper deficiency leads to anemia, duodenal hypoxia, upregulation of HIF-2 α and altered expression of iron absorption genes in mice. *PLoS One* 2013, 8, e59538.
- (25) Gulec, S.; Anderson, G. J.; Collins, J. F. Mechanistic and regulatory aspects of intestinal iron absorption. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2014, 307, G397–G409.
- (26) Frazer, D. M.; Wilkins, S. J.; Becker, E. M.; Vulpe, C. D.; McKie, A. T.; Trinder, D.; Anderson, G. J. Hcpidin expression inversely correlates with the expression of duodenal iron transporters and iron absorption in rats. *Gastroenterology* 2002, 123, 835–844.
- (27) Diaz-Castro, J.; Pulido, M.; Alferrez, M. J.; Ochoa, J. J.; Rivas, E.; Hijano, S.; Lopez-Aliaga, I. Goat milk consumption modulates liver divalent metal transporter 1 (DMT1) expression and serum hepcidin during Fe repletion in Fe-deficiency anemia. *J. Dairy Sci.* 2014, 97, 147–154.
- (28) Zhang, A. S.; Enns, C. A. Iron homeostasis: recently identified proteins provide insight into novel control mechanisms. *J. Biol. Chem.* 2009, 284, 711–715.



- (29) Nemeth, E.; Ganz, T. The role of hepcidin in iron metabolism. *Acta Haematol.* 2009, 122, 78–86.
- (30) Saini, R. K.; Manoj, P.; Shetty, N. P.; Srinivasan, K.; Giridhar, P. Dietary iron supplements and *Moringa oleifera* leaves influence the liver hepcidin messenger RNA expression and biochemical indices of iron status in rats. *Nutr. Res.* 2014, 34, 630–638.
- (31) Tong, X.; Kawabata, H.; Koeffler, H. P. Iron deficiency can upregulate expression of transferrin receptor at both the mRNA and protein level. *Br. J. Haematol.* 2002, 116, 458–464.




5.2 ARTÍCULO CIENTÍFICO II

Artículo científico II



Article

Role of Fermented Goat Milk on Liver Gene and Protein Profiles Related to Iron Metabolism during Anemia Recovery

Jorge Moreno-Fernandez ^{1,2,3} , María J. M. Alférez ^{1,2} , Inmaculada López-Aliaga ^{1,2,*} and Javier Díaz-Castro ^{1,2} 

¹ Department of Physiology, University of Granada, 18071 Granada, Spain; jorgemf@ugr.es (J.M.-F.); malferez@ugr.es (M.J.M.A.); javierdc@ugr.es (J.D.-C.)

² Institute of Nutrition and Food Technology “José Mataix Verdú”, University of Granada, 18071 Granada, Spain

³ Nutrition and Food Sciences Ph.D. Program, University of Granada, 18071 Granada, Spain

* Correspondence: milopez@ugr.es; Tel.: +34-958-243880; Fax: +34-958-248959

Received: 6 April 2020; Accepted: 30 April 2020; Published: 8 May 2020



Abstract: Despite the crucial role of the liver as the central regulator of iron homeostasis, no studies have directly tested the modulation of liver gene and protein expression patterns during iron deficiency instauration and recovery with fermented milks. Fermented goat milk consumption improves the key proteins of intestinal iron metabolism during iron deficiency recovery, enhancing the digestive and metabolic utilization of iron. The aim of this study was to assess the influence of fermented goat or cow milk consumption on liver iron homeostasis during iron-deficiency anemia recovery with normal or iron-overload diets. Analysis included iron status biomarkers, gene and protein expression in hepatocytes. In general, fermented goat milk consumption either with normal or high iron content up-regulated liver DMT1, FPN1 and FTL1 gene expression and DMT1 and FPN1 protein expression. However, HAMP mRNA expression was lower in all groups of animals fed fermented goat milk. Additionally, hepcidin protein expression decreased in control and anemic animals fed fermented goat milk with normal iron content. In conclusion, fermented goat milk potentiates the up-regulation of key genes coding for proteins involved in iron metabolism, such as DMT1, and FPN1, FTL1 and down-regulation of HAMP, playing a key role in enhanced iron repletion during anemia recovery, inducing a physiological adaptation of the liver key genes and proteins coordinated with the fluctuation of the cellular iron levels, favoring whole-body iron homeostasis.

Keywords: fermented cow and goat milk; anemia; iron homeostasis; iron repletion; gene and protein expression

Publicado en *Nutrients*. 2020; 8;12(5):1336. doi: 10.3390/nu12051336



Article

Role of Fermented Goat Milk on Liver Gene and Protein Profiles Related to Iron Metabolism during Anemia Recovery

Jorge Moreno-Fernandez ^{1,2,3}, María J. M. Alférez ^{1,2}, Inmaculada López-Aliaga ^{1,2,*} and Javier Díaz-Castro ^{1,2}

¹ Department of Physiology, University of Granada, Granada, 18071, Spain; jorgemf@ugr.es (J.M.-F.); malfearez@ugr.es (M.J.M.A.); javierdc@ugr.es (J.D.-C.)

² Institute of Nutrition and Food Technology “José Mataix Verdú”, University of Granada, Granada, Spain.

³ Nutrition and Food Sciences Ph.D. Program. University of Granada, Granada, Spain

* Correspondence: milopez@ugr.es; Tel: 34-958-243880, Fax: 34-958-248959

Abstract: Despite the crucial role of the liver as the central regulator of iron homeostasis, no studies have directly tested the modulation of liver gene and protein expression patterns during iron deficiency instauration and recovery with fermented milks. Fermented goat milk consumption improves the key proteins of intestinal iron metabolism during iron deficiency recovery, enhancing the digestive and metabolic utilization of iron. The aim of this study was to assess the influence of fermented goat or cow milk consumption on liver iron homeostasis during iron-deficiency anemia recovery with normal or iron-overload diets. Analysis included iron status biomarkers, gene and protein expression in hepatocytes. In general, fermented goat milk consumption either with normal or high iron content up-regulated liver DMT1, FPN1 and FTL1 gene expression and DMT1 and FPN1 protein expression. However, HAMP mRNA expression was lower in all groups of animals fed fermented goat milk. Additionally, hepcidin protein expression decreased in control and anemic animals fed fermented goat milk with normal iron content. In conclusion, fermented goat milk potentiates the up-regulation of key genes coding for proteins involved in iron metabolism, such as DMT1, and FPN1, FTL1 and down-regulation of HAMP, playing a key role in enhanced iron repletion during anemia recovery, inducing a physiological adaptation of the liver key genes and proteins coordinated with the fluctuation of the cellular iron levels, favoring whole-body iron homeostasis.

Keywords: fermented cow and goat milk; anemia; iron homeostasis; iron repletion; gene and protein expression

1. Introduction

Iron deficiency anemia (IDA) is a highly prevalent pathology and a medical condition in the clinical practice, affecting more than two billion people worldwide. This public health problem has a negative impact on the lives of infants and fertile women worldwide [1]. Daily, in the duodenum and proximal jejunum, 2 mg of iron is absorbed. The non-heme iron in the diet is in Fe³⁺ form and it must be reduced to ferrous form before it can be absorbed by the action of duodenal cytochrome B. Fe²⁺ is then transported across the apical membrane of enterocytes by the divalent metal transporter 1 (DMT1). This protein transports some divalent cations including ferrous iron. Iron crosses the basolateral membrane of intestinal enterocytes by the action of ferroportin, an iron exporter, entering into systemic circulation. After that, iron can be stored in the liver joined to ferritin, which is an iron storage protein. The mechanisms regulating systemic iron homeostasis are largely centered on the liver and involve two molecules, hepcidin and ferroportin, that work together to regulate the flow of iron from cells into the systemic circulation [2].

Due to the key role of iron in many physiological cell functions, including replication, ATP, DNA synthesis and the heme group in hemoglobin [3], and as a constituent of essential cofactors such as iron–sulfur (Fe-S) clusters [4], the organism has evolved to conserve body iron stores; however, it does not have an efficient mechanism for removing excess iron, iron-overload being highly deleterious to many physiological mechanisms. In addition, defects in molecules related to regulating iron homeostasis are usually a cause of genetically inherited iron overload, called hereditary hemochromatosis (HH) [2]. Therefore, it is essential to tightly regulate iron homeostasis, a function performed mainly by the liver [5].

The liver is one of the most functionally and metabolically active organs in the body. In addition to roles in detoxification, digestion, protein synthesis, gluconeogenesis, and fat metabolism, the liver also plays a significant role in iron homeostasis. It is responsible for approximately 8% of plasma iron turnover and it is the major site for iron storage, acting also as the key regulator of iron homeostasis [6]. The liver synthesizes hepcidin, a peptide which binds to and induces the internalization of ferroportin [7], reducing the amount of iron released into the bloodstream, therefore being the major contributor to systemic regulation of iron status [8]. The noteworthy influence of the liver on body iron regulation can be attributed to the expression of many liver-specific or liver-enriched proteins, which play an important role in the physiological regulation of iron metabolism [6].

On the other hand, it has been previously reported that fermented goat milk consumption improves the key proteins of intestinal iron metabolism during IDA recovery, enhancing the digestive and metabolic utilization of iron [9]. However, in spite of the crucial role of the liver as a central regulator of iron metabolism, to date, no studies have directly tested the modulation of hepatic gene and protein expression profiles during anemia recovery, including divalent metal transporter 1 (DMT1), ferritin light chain 1 (FTL1), ferroportin 1 (FPN1), and hepcidin antimicrobial peptide (HAMP). Taking into account all these considerations, the aim of this study was to contribute to a better understanding of iron metabolism during IDA recovery, by studying how fermented goat vs. cow milk (the most commonly consumed milk worldwide) consumption affects liver iron homeostasis during nutritional iron repletion in animal models with severe, induced iron-deficiency anemia and overload.



2. Material and Methods

2.1. *Animals and Experimental Design*

One hundred male Wistar rats aged 3 weeks and weighing about 34.56 ± 6.35 g, purchased from the University of Granada Laboratory Animal Service (Granada, Spain), were included in this study. The animals were maintained under standard animal housing conditions with a 12-hour light/dark cycle (lights on at 9:00 A.M), temperature (23 ± 2 °C) and humidity ($60 \pm 5\%$). All animal experiments were carried out in accordance with Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes.

In the pre-experimental period (PEP), 100 rats were randomly divided into two groups; a control group received the AIN-93G diet ($n = 50$) [10] and an anemic or experimental group received a low Fe diet ($n = 50$) for 40 days [11]; deionized water and diet were available ad libitum. In the experimental period (EP), control and anemic groups were fed for 30 days with either fermented cow milk or fermented goat milk diet, with normal Fe (4.5 mg/100g) or high Fe content (45.0 mg/100g) (Fe citrate) [12]. Deionized water was available ad libitum, and dietary intake pattern induced by pair feeding (80% of the average intake) (Figure. 1). At the end of the PEP and EP, hematological parameters and serum iron, total iron binding capacity (TIBC), transferrin saturation, ferritin, serum hepcidin and transaminases were determined. Furthermore, the liver was removed (at the end of the PEP, in 10 animals per group and in all the animals in the EP), for measurement of hepatosomatic index (HSI), and a fraction of the liver was snap-frozen in liquid nitrogen and keep in a -80 °C freezer for subsequent mineral analysis (liver iron content). Subsequently 1 g of liver was stored overnight at 4 °C with RNA-later (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma, USA), the solution was removed and stored at -80 °C until isolation of total RNA.

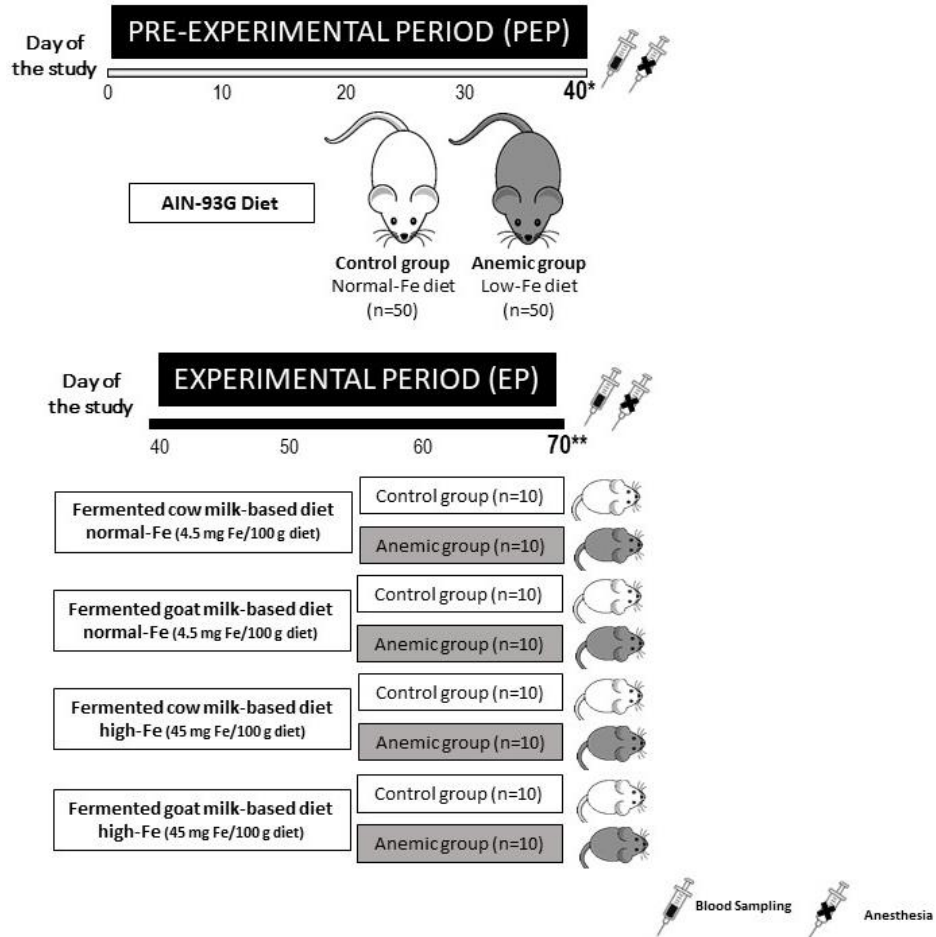


Figure 1. Experimental design of the study. * 10 animals per group and ** all the animals were anesthetized, peripheral blood samples from caudal vein were analyzed for hematological and biochemical parameters and the liver was removed.

2.2. Diets Preparation

Diets were prepared with fermented cow or fermented goat milk. *Lactobacillus bulgaricus* subsp. *delbrueckii* and *Streptococcus thermophilus* were inoculated to an initial concentration of 1×10^{11} CFU/mL (10mL/L inoculum) in goat or cow milk, and then the samples were incubated at 37 °C for approximately 24 hours. Subsequently, fermented milk samples were dehydrated by a smooth industrial process to obtain products with a moisture content ranging between 2.5% and 4.5%. Sufficient amounts of fermented dehydrated cow or goat milk were utilized in the experimental diets to provide 20% of protein and 10% of fat. The constituents and nutrient compositions of the experimental diets are presented in Table 1.

Table 1. Composition of experimental diets.

| Constituents g/100 g diet | Pre-Experimental Period | Experimental Period | |
|-----------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|-----------|
| | AIN-93G ¹ | Fermented milk diets ² | |
| | | cow milk | goat milk |
| Protein | 20.00 | 20.50 | 20.60 |
| Lactose | - | 29.50 | 29.10 |
| Fat | 10.00 | 10.00 | 10.00 |
| Wheat starch | 50.00 | 20.00 | 20.30 |
| Constant ingredients ³ | 20.00 | 20.00 | 20.00 |

¹ Normal iron content for control rats (4.5 mg Fe/100 g diet) [10], or low iron content (0.5 mg Fe/100 g diet) [11] for the anemic group. ² Specific vitamin and mineral premix supplements for fermented goat and cow milk diets were to meet the recommendations of the AIN-93G for diets with normal iron (4.5 mg Fe/100 g diet) [12] or diets with high iron content (45 mg Fe/100 g diet) (Raja et al., 1994). ³ Fibre (micronized cellulose) 5%, sucrose 10%, choline chloride 0.25%, L-cystine 0.25%, mineral premix 3.5%, vitamin premix 1%.

2.3. Hematological Tests

Hematological parameters were measured at the end of PEP and EP using a fully automated hematology analyzer (Mythic 22CT, C2 Diagnostics, Grabels, France).

2.4. Transferrin Saturation, Serum Iron, Total Iron Binding Capacity (TIBC), Serum Ferritin and Serum Hepcidin

Transferrin saturation, serum iron and TIBC were determined using Sigma Diagnostics Iron and TIBC reagents (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO). Serum ferritin was measured by the Elisa method using a standard kit (rat ferritin ELISA Kit) supplied by Biovendor GmbH, Heidelberg (Germany). Hepcidin-25 was determined using a DRG ELISA Kit (DRG Instruments GmbH, Germany).

2.5. Hepatosomatic Index, Hepatic Iron Concentration and Transaminases Analysis

The HSI was determined by the use of the following equation:

$$\text{HSI} = (\text{weight of the liver} / \text{weight of the body}) \times 100$$

Prior to iron analysis, liver fractions were mineralized by wet digestion in a sand bath (Selecta, Barcelona, Spain) using nitric acid followed by a mixture of HNO₃:HClO₄, 1:4 v/v (69%:70%, v/v; Merck, Darmstadt, Germany) until the total elimination of organic matter. Finally, the samples were diluted with Milli Q (Millipore S.A., Bedford, MA, US) ultrapure water. Iron analysis was undertaken using a PerkinElmer Optima 8300 inductively coupled plasma-optical emission spectrometer (ICP-OES) (Waltham, MA, USA) with a segmented-array charge-coupled device (SCD) detector. Multi-elemental Atasol calibration solution (Analytika, Khodlova, Prague) was used to calibrate the apparatus. For the calibration curve, diluted

standards were prepared from concentrated standard solutions. After each series of 5 samples, an internal standard solution of 10 mg/L was used. The acceptable result was assessed as 10%. Three replicates of each sample were analyzed.

Alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were measured by standard colorimetric and enzymatic methods using a BS-200 Chemistry Analyzer (Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co. Ltd., Shenzhen, China).

2.6. RNA Extraction and Quantitative Real Time PCR

From liver samples, total RNA was extracted with TRIsure lysis reagent (Bioline, Luckenwalde, Germany) following the manufacturer's instructions. The RNA quantity and purity were measured using a spectrophotometer (NanoDrop 1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) at 260/280nm. Reverse transcription was performed on 1 µg of total RNA in a 20 µL reaction to synthesize complementary DNA (cDNA), using an iScript cDNA Synthesis kit (Bio-Rad). Quantitative real-time PCR was performed in a total reaction volume of 20 µL using the CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) and SYBR Green detection using Sso Advanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Primer sequences of divalent metal transporter 1 (DMT1), ferroportin 1 (FPN1), ferritin (FTL1) and hepcidin antimicrobial peptide (HAMP) for quantitative real-time PCR are shown in Table 2 and were obtained from Eurofins MWG Biotech (Ebersberg, Germany). The expression of the target genes was normalized to the housekeeping gene β -actin. All the measurements were done in duplicate and, to confirm PCR product size, melt curve analysis and gel electrophoresis were conducted.

Table 2. Primers, annealing temperatures, and product sizes for PCR amplification.

| Gene | Direction | Primer Sequence (5'→3') | Annealing Temperature | Size (bp) |
|----------------|-----------|-------------------------|-----------------------|-----------|
| β -Actin | Forward | GGGGTGTGAAGGTCTCAAA | 57 °C | 165 |
| | Reverse | TGTCACCAACTGGGACGATA | | |
| DMT1 | Forward | GGCATGTGGCACTGTATGTG | 59 °C | 163 |
| | Reverse | CCGCTGGTATCTTCGCTCAG | | |
| FPN1 | Forward | GAACAAGAACCCACCTGTGC | 57 °C | 191 |
| | Reverse | AGGATGGAACCACTCAGTCC | | |
| HAMP | Forward | CCTATCTCCGGCAACAGACG | 59 °C | 121 |
| | Reverse | GGGAAGTTGGTGTCTCGCTT | | |
| FTL1 | Forward | GCCCTGGAGAAGAACCTGAA | 59 °C | 247 |
| | Reverse | AGTCGTGCTTCAGAGTGAGG | | |

2.7. Western Blotting and Immunocytochemistry

Liver samples were mechanically homogenized in tissue protein extraction reagent (T-PER) (Thermo Scientific Inc., Hanover Park, IL, USA) supplemented with a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) under ice-cold conditions. On 4%–20% Criterion TGX (Tris-Glycine extended) gels (Mini-PROTEAN TGX Precast Gels; Bio-Rad), 12 µg of total protein was separated in a vertical electrophoresis tank (Mini-PROTEAN System; Bio-Rad) at 250 V for 20 minutes. Separated proteins were transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (Bio-Rad) by wet transfer for 60 minutes at 120V. Thereafter, the membranes were blocked with 5% dry milk in Tris-buffered saline (TBS) plus Tween-20 (TTBS) (Bio-Rad) solution for 1 hour at room temperature. After three washes in TBS, membranes were incubated with rabbit anti-DMT1 polyclonal, dilution 1:400 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), rabbit anti-SLC40A1 polyclonal antibody (FPN1), dilution 1:800, hepcidin polyclonal antibody, dilution 1:500, and mouse anti-β-actin monoclonal, dilution 1:1000 (Abcam, UK) as primary antibodies, in 5% dry milk in TTBS overnight at 4 °C with shaking. β-actin was used as the loading control. Then, the membranes were washed 3 times in TTBS and incubated for 1 hour at room temperature with the appropriate secondary conjugated antibody Immun-Star Goat Anti-Rabbit (GAR)-HRP; Bio-Rad Laboratories; 1:40,000 and ImmunStar Goat Anti-Mouse (GAM)-HRP; 1:80,000 in TTBS. Immunoblots were detected with a chemiluminescence Luminata forte western HRP Substrate (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and visualized with chemiluminescence using ImageQuant LAS 4000 (Fujifilm Life Science Corporation, USA). All results were analyzed with Image J software.

2.8. Statistical Analysis

Data are presented as mean ± standard error of the mean (SEM) and statistical analyses were performed using SPSS 26.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Differences between groups (control versus anemic during the PEP and normal Fe versus high Fe during the EP) were tested for statistical significance with Student's *t*-test. Following a significant F-test ($p < 0.05$), individual means were tested by pairwise comparison with Tukey's multiple comparison test when main effects and interactions were significant. Two-way analysis of variance (ANOVA) was used to determine the effect of the type of diet supplied to the animals, anemia, and iron content in the diet. Statistical significance was set at $p < 0.05$ for all comparisons.

3. Results

3.1. Effect of Iron Deficiency on Hepatosomatic Index, Liver Iron Content and Serum Levels of Aspartate Aminotransferase and Alanine Aminotransferase

Iron deprivation impaired all the hematological parameters studied (Moreno-Fernandez et al., 2016), and these parameters are detailed in Supplementary Table S1. Additionally, body weight and liver iron content were lower in the anemic group ($p < 0.001$); however, liver weight remained unchanged, and, as a consequence, HSI was higher in anemic group ($p < 0.05$). Transaminases were significantly higher in the anemic group ($p < 0.001$) (Table 3).

Table 3. Hepatosomatic index, liver iron content and serum levels of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase from control and anemic rats in the pre-experimental period (PEP).

| | Control Group (<i>n</i> = 20) | Anemic Group (<i>n</i> = 20) |
|--------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| Body weight (g) | 239.7 ± 3.9 | 201.15 ± 2.9 ** |
| Liver weight (g) | 6.324 ± 0.31 | 6.129 ± 0.31 |
| HSI (%) | 2.55 ± 0.07 | 2.89 ± 0.09 * |
| Liver iron content (µg/g dry weight) | 615.25 ± 31.10 | 432.31 ± 24.07 ** |
| AST (UI/L) | 103.58 ± 8.93 | 228.04 ± 18.45 ** |
| ALT (UI/L) | 24.57 ± 1.16 | 52.28 ± 2.73 ** |

Values are means ± SEM (*n* = 10). HSI, hepatosomatic index; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase. * Significantly different from the control group (*, *p* < 0.05) Student's *t*-test). ** Significantly different from the control group (**, *p* < 0.001) Student's *t*-test).

3.2. Effect of Fermented Milk-Based Diets on Hepatosomatic Index, Liver Iron Content and Serum Levels of Aspartate Aminotransferase and Alanine Aminotransferase during Anemia Recovery

After supplying both fermented milk-based diets during a month, all the hematological parameters were recovered, either with normal Fe or high Fe content. The results were described (Moreno-Fernandez et al., 2016) and are shown in Supplementary Table S2. Fermented goat milk reduced body weight in control and anemic animals, either with normal Fe or high Fe content (*p* < 0.001) compared to animals fed fermented-cow-milk-based diets. Body weight was significantly lower in anemic animals fed both fermented milks with normal Fe content (*p* < 0.01). Body weight was lower with high Fe content diet than with a normal Fe content diet in animals fed with fermented-cow-milk-based diets in both groups (control and anemic) (*p* < 0.05). HSI was higher in both groups of animals (control and anemic) fed fermented-goat-milk-based diets, either with normal Fe or high Fe, compared to animals fed fermented-cow-milk-based diets (*p* < 0.001). Liver iron content was increased in animals fed with fermented goat milk compared to animals fed with fermented cow milk with normal Fe content diets (*p* < 0.01). In contrast, liver iron content was lower in animals fed fermented goat milk compared to fermented cows' milk with high Fe content (*p* < 0.01). Liver iron content was lower in anemic animals compared to the control group, irrespective of the iron content in both types of fermented milks (*p* < 0.01). As expected, dietary high Fe content increased the liver content of this mineral in control and anemic animals fed fermented cow milk (*p* < 0.001), this increase being lower in the animals fed fermented goat milk (*p* < 0.05). AST and ALT were lower in rats fed with fermented-goat-milk-based diets compared to rats fed with fermented-cow-milk-based diets in all experimental conditions (*p* < 0.01). High Fe content did not affect the transaminases when supplying both milk-based diets (Table 4).



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Table 4. Hepatosomatic index, liver iron content and serum levels of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase in anemic rats fed for 30 days with fermented cow- or goat-milk-based diets with normal Fe or high Fe content in the

| | Fe Content | Fermented Cow Milk | | Fermented Goat Milk | |
|---|------------|------------------------------|--------------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| | | Control Group | Anemic Group | Control Group | Anemic Group |
| Body weight (g) | Normal | 365.23 ± 8.61 ^a | 347.21 ± 8.39 ^{A,*} | 278.98 ± 3.70 ^b | 255.41 ± 2.85 ^{B,*} |
| | High | 339.42 ± 5.18 ^{ac} | 329.22 ± 5.81 ^{AC} | 287.27 ± 4.92 ^b | 267.57 ± 4.03 ^B |
| Liver weight (g) | Normal | 6.528 ± 0.24 ^a | 6.269 ± 0.10 ^A | 8.391 ± 0.23 ^b | 8.521 ± 0.21 ^B |
| | High | 6.764 ± 0.2 ^a | 6.555 ± 0.12 ^A | 7.692 ± 0.22 ^{bc} | 7.934 ± 0.22 ^{BC} |
| HSI (%) | Normal | 1.84 ± 0.04 ^a | 1.77 ± 0.02 ^A | 2.95 ± 0.03 ^b | 3.27 ± 0.05 ^B |
| | High | 1.79 ± 0.03 ^a | 1.82 ± 0.03 ^A | 2.65 ± 0.04 ^b | 3.12 ± 0.04 ^B |
| Liver iron content (µg/g dry weight) | Normal | 559.56 ± 28.72 ^a | 401.56 ± 24.50 ^{A,*} | 666.45 ± 33.21 ^b | 489.32 ± 29.64 ^{B,*} |
| | High | 832.25 ± 32.56 ^{ac} | 782.32 ± 33.55 ^{AC,*} | 735.67 ± 29.33 ^{bc} | 657.15 ± 29.22 ^{BC,*} |
| AST (UI/L) | Normal | 107.62 ± 4.29 ^a | 80.86 ± 4.25 ^{A,*} | 67.99 ± 2.75 ^b | 61.11 ± 2.12 ^B |
| | High | 82.92 ± 4.15 ^{ac} | 78.19 ± 3.82 ^A | 60.43 ± 1.10 ^b | 68.47 ± 2.03 ^B |
| ALT (UI/L) | Normal | 28.91 ± 1.34 ^a | 27.77 ± 3.91 ^A | 23.14 ± 1.9 ^b | 16.49 ± 0.76 ^{B,*} |
| | High | 24.04 ± 1.73 ^a | 19.00 ± 1.21 ^A | 19.47 ± 0.53 ^b | 14.48 ± 0.35 ^{B,*} |

Values are means ± SEM ($n = 10$). ¹ NS, not significant. HSI, hepatosomatic index; AST, aspartate aminotransferase. Significantly different from the control group ($p < 0.05$) *Student's t*-test). ^{a,b} Mean values among groups of control and anemic rats fed with different diets; different lower-case letters in the same row indicate a significant difference by two-way ANOVA (Tukey's test); different upper-case letters in the same row indicate a significant difference between control and anemic rats.



Moreno Fernández J, 2020
International Ph.D .Thesis

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

° Mean values of controls rats were significantly different from the corresponding group of rats fed with normal F test. ° Mean values of anemic rats were significantly different from the corresponding group of rats fed with Student's *t*-test.

3.3. Effect of Fermented Milk-Based Diets on Liver Iron Homeostasis during Anemia Recovery

Fermented goat milk up-regulated liver DMT1 gene expression in control and anemic rats fed with high Fe content ($p < 0.01$) and in control groups fed with a normal Fe diet, and previously induced anemia reduced DMT1 expression in the animals fed fermented goat milk with normal Fe content ($p < 0.05$) (Figure 2A). Similarly, DMT1-relative protein expression was higher in control and anemic animals fed fermented goat milk with normal Fe ($p < 0.001$). Induced anemia increased liver DMT1 protein expression in animals fed both fermented milk with normal Fe content ($p < 0.001$). High Fe content increased DMT1 protein expression in all groups of animals fed fermented goat or cow milk ($p < 0.001$), except in control animals fed fermented goat milk, which showed a decrease ($p < 0.05$) (Figure 2B).

Expression of FPN1 mRNA increased in control and anemic animals fed fermented goat milk either with normal Fe ($p < 0.001$) or high Fe content ($p < 0.01$) (Figure 2C). Protein expression of FPN1 increased in control and anemic animals fed fermented goat milk with normal Fe content ($p < 0.001$). Anemia decreased FPN1 protein expression in animals fed fermented goat milk with normal Fe ($p < 0.01$) and increased in animals fed both fermented milks with high Fe content ($p < 0.001$). High Fe content increased liver FPN1 protein expression in all groups of animals fed fermented goat or cow milk ($p < 0.001$), except control animals fed fermented goat milk, which showed a decrease ($p < 0.001$) (Figure 2D).

HAMP mRNA expression was lower in control and anemic animals fed fermented goat milk with normal Fe ($p < 0.05$) and also in control and anemic animals fed fermented goat milk with high Fe content ($p < 0.001$). Anemia increased HAMP mRNA expression in animals fed fermented cow milk with high Fe content ($p < 0.01$). High Fe content increased HAMP gene expression in anemic animals fed both fermented milks ($p < 0.001$) and in control groups fed a fermented cow milk diet ($p < 0.01$) (Figure 2E). Hepcidin protein expression decreased in control and anemic animals fed fermented goat milk with normal Fe content ($p < 0.001$). Anemia decreased hepcidin protein expression in animals fed fermented cow milk with normal Fe content ($p < 0.001$) and increased in animals fed fermented goat milk with normal Fe content ($p < 0.05$); however, with high Fe content, anemia increased hepcidin protein expression in the animals fed both fermented milks ($p < 0.001$). High Fe content increased hepcidin protein expression in all groups of animals fed fermented cow or goat milk ($p < 0.01$) but decreased in control animals fed fermented cow milk ($p < 0.001$) (Figure 2F).

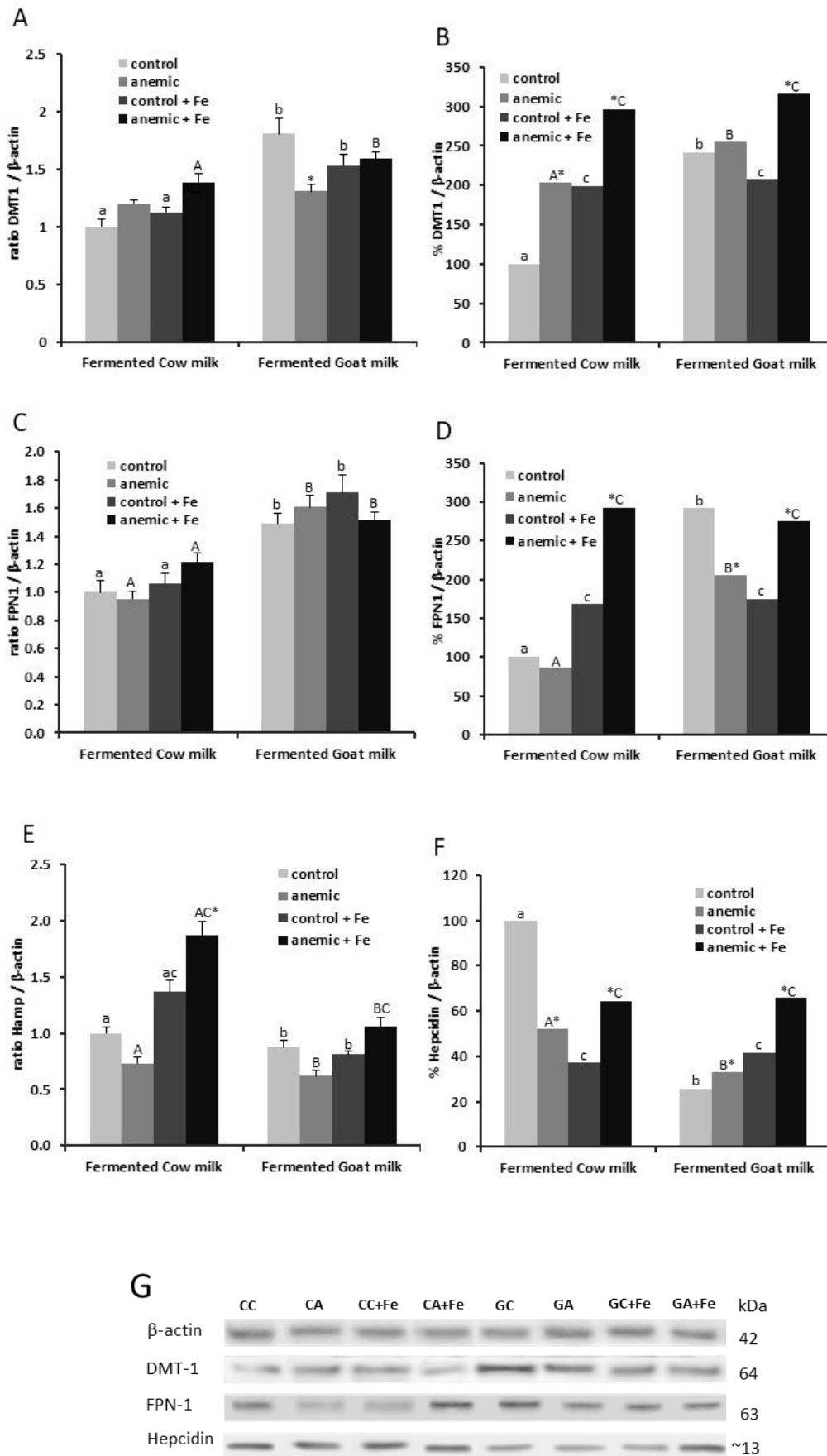


Figure 2. mRNA levels (A, C, E) and protein expression levels (B, D, F) of DMT-1, FPN1 and hepcidin in livers of control and anemic rats, fed normal Fe or high Fe content fermented cow or goat milk-based diets. Values are represented as mean \pm SEM ($n = 10$). For protein expression, values are expressed as % vs β -actin. a,b: mean values among groups of control rats fed with different diets; different lower-case letters in the same row indicate a significant difference by two-way ANOVA (Tukey's test). A,B: Mean values among groups of anemic rats fed with different diet; different upper-case letters in the same row indicate a significant difference by two-way ANOVA (Tukey's test). * Significantly different ($p < 0.05$) from the control group by Student's t -test. c: Mean values of control rats were significantly different from the corresponding groups of rats fed with normal Fe content at $p < 0.05$ by Student's t -test. C: Mean values of anemic rats were significantly different from the corresponding group of rats fed with normal Fe content at $p < 0.05$ by Student's t -test. (G) Representative immunoblots. Abbreviations: cow control (CC), cow anemic (CA), cow control high Fe content (CC+Fe), cow anemic high Fe content (CA+Fe), goat control (GC), goat anemic (GA), goat control high Fe content (GC+Fe), goat anemic high Fe content (GA+Fe)

In general, fermented goat milk induced an up-regulation of mRNA FTL1 expression in control and anemic animals fed either with normal Fe or high Fe content ($p < 0.01$). Anemia up-regulated liver mRNA FTL1 expression in animals fed fermented cow milk with high Fe content ($p < 0.01$). High Fe content up-regulated FTL1 mRNA expression in the anemic groups fed both fermented milks ($p < 0.001$) and in the control group fed fermented cow milk ($p < 0.01$) (Figure 3).

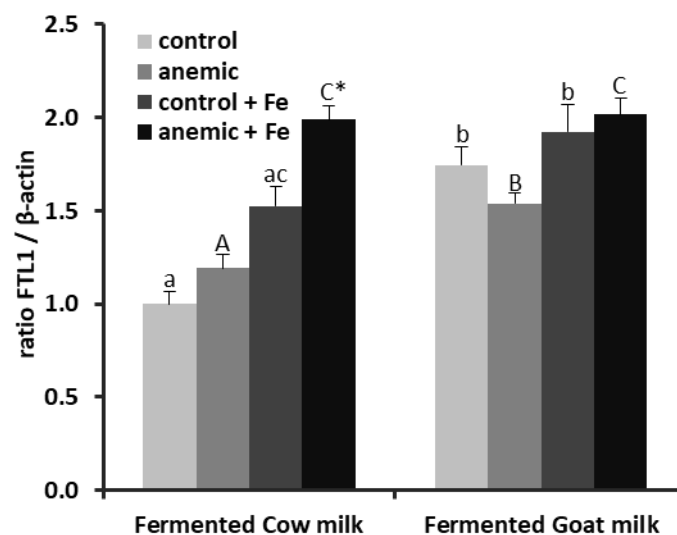


Figure 3. mRNA levels of FTL1 in the liver of control and anemic rats, fed normal Fe or high Fe content fermented cow- or goat-milk-based diets. Values are represented as mean \pm SEM ($n = 10$). a,b: mean values among groups of controls rats fed with different diets; different lower case letters in the same row indicate a significant difference by two-way ANOVA (Tukey's test). A, B: mean values among groups of anemic rats fed with different diets; different upper case

letters in the same row indicate a significant difference by two-way ANOVA (Tukey's test). *Significantly different ($p < 0.05$) from the control group by Student's *t*-test. c: mean values of controls rats were significantly different from the corresponding group of rats fed with normal Fe content at $p < 0.05$ by Student's *t*-test. C: mean values of anemic rats were significantly different from the corresponding group of rats fed with normal Fe content at $p < 0.05$ by Student's *t*-test.

4. Discussion

Anemia reduced body weight in the PEP, due to the impairment of hematological parameters and the depletion of the hepatic iron levels. These negatively affect the weight gain of animals during the growing period, since the hypoxia induced by the lack of iron limits ATP production and decreases levels of thyroid hormones and ghrelin, inducing cachexia and leading to reductions of lean mass [13]. In a previous study, we reported that serum total bilirubin was increased in hepatocellular damage. In that study, bilirubin was increased and AST and ALT activities were also found elevated in IDA. The increase of transaminase release into the bloodstream could be due to the impairment of the hepatic function induced by the iron deficiency [13,14].

During the EP, body weight was statistically lower in the animals fed fermented goat milk. This finding can be explained because, as previously reported [15], fermented goat milk consumption influences adipose tissue depot homeostasis during iron deficiency recovery, reducing adiposity, increasing leptin elevation and reducing ghrelin, and, therefore, diminishing appetite and increasing basal metabolic rate. Additionally, fermented goat milk consumption reduces adiponectin levels and shows an inverse correlation with non-esterified fatty acids, indicating increased lipolysis rates in adipose tissue [15].

Liver iron homeostasis is tightly regulated to maximize the iron supply when anemia is established and to promote storage when iron status is adequate. Intracellular iron content is regulated by the relative rate of cellular import, via DMT1, versus export, via FPN1 [16].

Fermented goat milk improves iron metabolism, because, as previously reported [15], it increases expression of duodenal key proteins in intestinal iron metabolism, improving iron absorption after induced anemia. However, in spite of the role of the liver as the central regulator of iron homeostasis, a better characterization of the hepatic events in the pathophysiology of iron deficiency instauration and recovery leads to new nutritional strategies to improve liver molecular functions related to iron homeostasis.

After supplying the fermented-milk-based diets, iron repletion was more efficient with fermented goat milk, a fact that is corroborated by the recovery of hematological parameters and the liver iron content recorded in the current study. This fact can be explained due to the beneficial increase in the liver DMT1 iron-transport gene and protein expression, enhancing iron metabolism and storage compared with fermented cow milk. DMT1 is localized both to the plasma membrane and in the cytosol of hepatocytes [17]. In addition to its role in endosomal iron export, the presence of DMT1 on the microvillous membrane of hepatocytes reveals that the liver is capable of absorbing non-heme, non-transferrin-bound iron. Contrary to the duodenal DMT1, hepatic DMT1 expression parallels iron status [17], playing a key role by regulating iron homeostasis in the liver. Therefore, the increased liver DMT1 protein levels faithfully reflect the increased liver iron storage after dietary iron repletion [18] and, this way, the increase in DMT1 protein expression in anemic animals fed fermented goat milk reveals that

iron repletion is more efficient, a finding that is supported and corroborated by the higher iron storage in the rats fed fermented goat milk compared with fermented cow milk. As previously reported, goat milk fat is richer in medium-chain triglycerides, which are oxidized in the mitochondria, providing fast energy discharge used in several metabolic pathways [19] and thus contributing to increasing the synthesis of carrier proteins such as DMT1 [20]. On the other hand, goat milk has more than twice the vitamin A content of cow milk [19], and this vitamin increases liver DMT1 protein expression by posttranscriptional regulation via increased protein translation or decreased degradation [18].

Hepcidin is a key indicator of iron status and metabolism. This hormone regulates iron levels and location in response to nutritional status. High hepcidin levels block intestinal iron absorption and macrophage recycling, causing anemia. Low hepcidin levels favor bone marrow iron supply for hemoglobin synthesis and erythropoiesis. Multiple factors regulate the expression of hepcidin in the liver. As expected, low serum hepcidin levels were recorded in the PEP due to the increased expression of key duodenal proteins involved in iron absorption [20], favoring red blood cell production during insufficient dietary iron supply. On the other hand, inflammation is a strong inducer of hepcidin production and release from the liver [21–23], resulting in reduced iron release from stores and macrophages, thereby reducing iron in the circulation and disrupting iron homeostasis [24]. In the current study, a down-regulation of liver hepcidin has been recorded in animals consuming fermented goat milk, a fact that increases the iron efflux from the hepatocytes to the serum, due to the inverse correlation between hepcidin expression and the FPN1 activity [9,25].

In addition, we have previously reported that fermented goat milk consumption decreased pro-inflammatory cytokines and increased anti-inflammatory cytokines [25], due to the anti-inflammatory activities of its biologically active lipid fractions, such as sphingomyelin, phosphatidylcholine, and phosphatidylethanolamine lipid derivatives [26,27]. Moreover, fermented goat milk has a higher content in conjugated linoleic acid than fermented cow milk, featuring a putative role modulating anti-inflammatory responses [25]. All these anti-inflammatory properties of fermented goat milk would contribute to the decrease in liver hepcidin expression. This decrease in hepcidin, together with the increase in DMT1 and FPN1 gene and protein liver expression recorded when fermented goat milk is supplied, would lead to the mobilization of iron from hepatic storage to sustain erythropoiesis and improve iron status, even under Fe-overload conditions. These data indicate a not only a better hematological recovery but also improved iron mobilization for liver storage to target organs.

Although, in physiological conditions, hepatocytes have a high capacity for iron storage, the liver is also the main organ affected by the oxidative stress caused by Fe-overload toxicity due to its high propensity to induce reactive oxygen species (ROS) [28]. As mentioned above, the increase in DMT1 and FPN1 gene and protein liver expression recorded with fermented goat milk lead to lower amounts of iron stored in the hepatocytes during the dietary Fe overload in comparison with fermented cow milk, reducing the evoked oxidative stress. In this sense, fermented goat milk has positive effects on enzymatic antioxidant hepatic defense, even in a situation of Fe overload, which limits the processes of lipid peroxidation in comparison with cow milk, due to the improvement of zinc bioavailability (with antioxidant capacity) and the better lipid quality in comparison to fermented cow milk, reducing the generation of ROS [29]. Additionally, these findings are supported by the previous results [30], reporting a clear diminishment of transaminase release into the bloodstream, corroborating the hepatoprotective effect of goat milk during Fe overload and reducing hepatocellular damage, a fact that could avoid, at least partially, the progression of Fe-overload-related diseases [31].



FTL1 is the intracellular iron storage protein that stores and releases iron in a controlled way, and its expression greatly increases when cellular iron concentrations rise, providing the cell with an enormous ability to sequester iron. When intracellular iron content is low, iron-responsive element-binding protein 2 (IRP2) represses FTL1, mRNA translation, while intracellular iron accumulation promotes IRP2 degradation and allows FTL1 mRNA translation [32]. As previously mentioned, the increased DMT1 and FPN1 expression levels when fermented goat milk is supplied improve iron storage, also explaining the higher levels of mRNA FTL1. In addition, Fe overload increased FTL1 gene expression, probably as a compensatory mechanism to avoid the liver oxidative damage induced by Fe overload, because intracellular iron redox activity is controlled by ferritin [33].

5. Conclusion

Fermented goat milk consumption potentiates the up-regulation of key genes and proteins involved in iron metabolism, such as DMT1 and FPN1, and downregulates liver hepcidin, enhancing and improving iron repletion during anemia recovery. In addition, taking into account the better iron storage in the liver during anemia recovery, the reduction in the iron accumulation during Fe overload, and the improvement of the hematological parameters, fermented goat milk consumption induces a hepatic physiological adaptation of the key genes and proteins that regulate the fluctuation of the cellular iron levels, favoring whole-body iron homeostasis.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1, **Table S1:** Hematological parameters of control and anemic rats in the pre-experimental period (PEP); **Table S2.** Hematological parameters from control and anemic rats fed for 30 days with fermented cow or goat milk-based diets with normal-Fe content or Fe-overload in the experimental period (EP).

Author Contributions: **Author Contributions:** Research Design, I.L.-A. and J.D.-C.; Methodology, J.M.-F., J.D.-C., I.L.-A., and M.J.M.A.; Formal Analysis, Investigation and Software, J.M.-F. and J.D.-C; Writing—Original Draft Preparation J.M.-F., I.L.-A., J.D.-C. and M.J.M.A.; Supervision and Project Administration, I.L.-A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript. All persons designated as authors qualify for authorship, and all those who qualify for authorship are listed.

Funding: This study is funded by the Excellence Project (P11-AGR-7648) from the Regional Government of Andalusia.

Acknowledgments: J.M.-F. was supported by two fellowships from the Ministry of Education, Culture and Sport (Spain), FPU and Traslados Temporales FPU (University of King's College of London). J.M.-F. is grateful to the Excellence Ph.D. Program "Nutrición y Ciencias de los Alimentos" from the University of Granada. The authors are grateful to Susan Stevenson for her efficient support in the revision with the English language.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Reference



1. McLean, E.; Cogswell, M.; Egli, I.; Wojdyla, D.; de Benoist, B. Worldwide prevalence of anaemia, WHO Vitamin and Mineral Nutrition Information System, 1993–2005. *Public Health Nutr.* **2009**, *12*, 444–454.
2. Wallace, D.F. The Regulation of Iron Absorption and Homeostasis. *Clin. Biochem. Rev.* **2016**, *37*, 51–62.
3. Hentze, M.W.; Muckenthaler, M.U.; Galy, B.; Camaschella, C. Two to tango: Regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell* **2010**, *142*, 24–38.
4. Maio, N.; Jain, A.; Rouault, T.A. Mammalian iron-sulfur cluster biogenesis: Recent insights into the roles of frataxin, acyl carrier protein and ATPase-mediated transfer to recipient proteins. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2020**, *55*, 34–44.
5. Weiss, G.; Goodnough, L.T. Anemia of chronic disease. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 1011–1023.
6. Rishi, G.; Subramaniam, V.N. The liver in regulation of iron homeostasis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2017**, *313*, G157–G165.
7. Ross, S.L.; Tran, L.; Winters, A.; Lee, K.J.; Plewa, C.; Foltz, I.; King, C.; Miranda, L.P.; Allen, J.; Beckman, H.; et al. Molecular mechanism of hepcidin-mediated ferroportin internalization requires ferroportin lysines, not tyrosines or JAK-STAT. *Cell Metab.* **2012**, *15*, 905–917.
8. Vyoral, D.; Jiri, P. Therapeutic potential of hepcidin—The master regulator of iron metabolism. *Pharmacol. Res.* **2017**, *115*, 242–254.
9. Moreno-Fernandez, J.; Diaz-Castro, J.; Pulido-Moran, M.; Alferez, M.J.; Boesch, C.; Sanchez-Alcover, A.; Lopez-Aliaga, I. Fermented Goat's Milk Consumption Improves Duodenal Expression of Iron Homeostasis Genes during Anemia Recovery. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 2560–2568.
10. Reeves, P.G.; Nielsen, F.H.; Fahey, G.C., Jr. 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.
11. Pallares, I.; Lisbona, F.; Aliaga, I.L.; Barrionuevo, M.; Alferez, M.J.; Campos, M.S. Effect of iron deficiency on the digestive utilization of iron, phosphorus, calcium and magnesium in rats. *Br. J. Nutr.* **1993**, *70*, 609–620.
12. Raja, K.B.; Simpson, R.J.; Peters, T.J. Intestinal iron absorption studies in mouse models of iron-overload. *Br. J. Haematol.* **1994**, *86*, 156–162.
13. Moreno-Fernandez, J.; Diaz-Castro, J.; Alferez, M.J.M.; Lopez-Aliaga, I. Iron Deficiency and Neuroendocrine Regulators of Basal Metabolism, Body Composition and Energy Expenditure in Rats. *Nutrients* **2019**, *11*, 631.
14. Tolman, K.G.; Re, J.R. Liver function. In *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*; Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Eds.; W.B. Saunders, Philadelphia, PA., USA; **1999**; pp. 1125–1177.
15. Diaz-Castro, J.; Moreno-Fernandez, J.; Pulido-Moran, M.; Alferez, M.J.M.; Robles-Rebollo, M.; Ochoa, J.J.; Lopez-Aliaga, I. Changes in Adiposity and Body Composition during Anemia Recovery with Goat or Cow Fermented Milks. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 4057–4065.
16. Blankenhaus, B.; Braza, F.; Martins, R.; Bastos-Amador, P.; Gonzalez-Garcia, I.; Carlos, A.R.; Mahu, I.; Faisca, P.; Nunes, J.M.; Ventura, P.; et al. Ferritin regulates organismal energy balance and thermogenesis. *Mol. Metab.* **2019**, *24*, 64–79.
17. Trinder, D.; Oates, P.S.; Thomas, C.; Sadleir, J.; Morgan, E.H. 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*, 270–276.
18. Kelleher, S.L.; Lonnerdal, B. Low vitamin a intake affects milk iron level and iron transporters in rat mammary gland and liver. *J. Nutr.* **2005**, *135*, 27–32.

19. Alférez, M.J.M.; López-Aliaga, I.; Nestares, T.; Díaz-Castro, J.; Barrionuevo, M.; Ros, P.B.; Campos, M.S. Dietary goat milk improves iron bioavailability in rats with induced ferropenic anaemia in comparison with cow milk. *Int. Dairy J.* **2006**, *16*, 813–821.
20. Diaz-Castro, J.; Pulido, M.; Alferez, M.J.; Ochoa, J.J.; Rivas, E.; Hijano, S.; Lopez-Aliaga, I. Goat milk consumption modulates liver divalent metal transporter 1 (DMT1) expression and serum hepcidin during Fe repletion in Fe-deficiency anemia. *J. Dairy Sci.* **2014**, *97*, 147–154.
21. Nemeth, E.; Valore, E.V.; Territo, M.; Schiller, G.; Lichtenstein, A.; Ganz, T. Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood* **2003**, *101*, 2461–2463.
22. Ganz, T. Hepcidin and iron regulation, 10 years later. *Blood* **2011**, *117*, 4425–4433.
23. Ueda, N.; Takasawa, K. Impact of Inflammation on Ferritin, Hepcidin and the Management of Iron Deficiency Anemia in Chronic Kidney Disease. *Nutrients* **2018**, *10*, 1173.
24. Peng, Y.Y.; Uprichard, J. Ferritin and iron studies in anaemia and chronic disease. *Ann. Clin. Biochem.* **2017**, *54*, 43–48.
25. Lopez-Aliaga, I.; Garcia-Pedro, J.D.; Moreno-Fernandez, J.; Alferez, M.J.M.; Lopez-Frias, M.; Diaz-Castro, J. Fermented goat milk consumption improves iron status and evokes inflammatory signalling during anemia recovery. *Food Funct.* **2018**, *9*, 3195–3201.
26. Nasopoulou, C.; Smith, T.; Detopoulou, M.; Tsikrika, C.; Papaharisis, L.; Barkas, D.; Zabetakis, I. Structural elucidation of olive pomace fed sea bass (*Dicentrarchus labrax*) polar lipids with cardioprotective activities. *Food Chem.* **2014**, *145*, 1097–1105.
27. Tzorotioti, S.E.; Nasopoulou, C.; Detopoulou, M.; Sioriki, E.; Demopoulos, C.A.; Zabetakis, I. In vitro anti-atherogenic properties of traditional Greek cheese lipid fractions. *Dairy Sci. Technol.* **2014**, *94*, 269–281.
28. Maras, J.S.; Maiwall, R.; Harsha, H.C.; Das, S.; Hussain, M.S.; Kumar, C.; Bihari, C.; Rastogi, A.; Kumar, M.; Trehanpati, N.; et al. Dysregulated iron homeostasis is strongly associated with multiorgan failure and early mortality in acute-on-chronic liver failure. *Hepatology* **2015**, *61*, 1306–1320.
29. Diaz-Castro, J.; Perez-Sanchez, L.J.; Ramirez Lopez-Frias, M.; Lopez-Aliaga, I.; Nestares, T.; Alferez, M.J.; Ojeda, M.L.; Campos, M.S. Influence of cow or goat milk consumption on antioxidant defence and lipid peroxidation during chronic iron repletion. *Br. J. Nutr.* **2012**, *108*, 1–8.
30. Alferez, M.J.; Rivas, E.; Diaz-Castro, J.; Hijano, S.; Nestares, T.; Moreno, M.; Campos, M.S.; Serrano-Reina, J.A.; Lopez-Aliaga, I. Folic acid supplemented goat milk has beneficial effects on hepatic physiology, haematological status and antioxidant defence during chronic Fe repletion. *J. Dairy Res.* **2015**, *82*, 86–94.
31. Knutson, M.D. Iron transport proteins: Gateways of cellular and systemic iron homeostasis. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 12735–12743.
32. Muckenthaler, M.U.; Rivella, S.; Hentze, M.W.; Galy, B. A Red Carpet for Iron Metabolism. *Cell* **2017**, *168*, 344–361.
33. Gozzelino, R.; Soares, M.P. Coupling heme and iron metabolism via ferritin H chain. *Antioxid. Redox Signal.* **2014**, *20*, 1754–1769.



© 2020 by the authors. Submitted for possible open access publication under terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Supplementary Material

Table S1. Hematological parameters of control and anemic rats in the pre-experimental period (PEP).

| Hematological parameters | Control group (n = 40) | Anemic group (n = 40) |
|-----------------------------------|---------------------------|--------------------------|
| Total blood | | |
| Hb concentration (g/L) | 133.88 ± 2.98 | 60.22 ± 2.87 * |
| RBCs (10 ¹² /L) | 7.14 ± 0.20 | 3.08 ± 0.24 * |
| Hematocrit (%) | 40.01 ± 1.13 | 12.76 ± 1.33 * |
| MCV (fL) | 55.76 ± 0.53 | 36.91 ± 0.37 * |
| MCH (pg) | 19.47 ± 0.15 | 14.10 ± 0.63 * |
| MCHC (g/dl) | 35.54 ± 0.36 | 30.21 ± 0.82* |
| RDW (%) | 16.23 ± 0.35 | 19.16 ± 0.39 * |
| Platelets (10 ⁹ /L) | 733 ± 72.15 | 2123 ± 119 * |
| WBCs (10 ⁹ /L) | 8.91 ± 0.39 | 8.53 ± 0.88 |
| Lymphocytes (10 ⁶ /ml) | 7.98 ± 0.58 | 5.76 ± 0.84* |
| Serum | | |
| Fe (µg/L) | 1336 ± 99.12 | 601 ± 55.98 * |
| TIBC (µg/L) | 2675 ± 189 | 17935 ± 598 * |
| Transferrin saturation (%) | 49.02 ± 5.87 | 3.93 ± 0.41 * |
| Ferritin (µg/L) | 79.74 ± 2.12 | 49.65 ± 1.64 * |
| Hepcidin, ng/mL | 16.87 ± 0.46 | 13.48 ± 0.62* |

Values are means ± SEM. Hb, hemoglobin; RBCs, red blood cells; MCV, mean corpuscular volume; MCH, mean corpuscular Hb; MCHC, mean corpuscular Hb concentration; RDW, red cell distribution width; WBCs, white blood cells; TIBC, total Fe-binding capacity. *Significantly different from the control group (*, p < 0.001) Student's t test).



Moreno Fernández J, 2020
International Ph.D. Thesis

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Table S2. Hematological parameters from control and anemic rats fed for 30 days with fermented cow or goat milk-ba overload in the experimental period (EP).

| Hematological parameters | Fe content | Fermented cow milk | | Fermented goat milk | |
|--------------------------------|------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| | | Control group | Anemic group | Control group | Anemic group |
| Hb concentration (g/l) | Normal | 129.55 ± 2.89 | 129.33 ± 2.61 | 131.95 ± 2.76 | 129.15 ± 2.48 |
| | Overload | 142.63 ± 2.63 ^c | 141.10 ± 2.92 ^{AC} | 141.30 ± 2.98 ^c | 147.35 ± 3.01 ^{BC} |
| RBCs (10 ¹² /l) | Normal | 7.06 ± 0.18 | 7.08 ± 0.22 | 7.39 ± 0.21 | 7.21 ± 0.20 |
| | Overload | 6.94 ± 0.17 ^a | 7.19 ± 0.24 | 8.01 ± 0.30 ^{bc} | 7.11 ± 0.21 |
| Haematocrit (%) | Normal | 40.02 ± 1.19 ^a | 39.01 ± 0.97 ^A | 41.93 ± 1.23 ^b | 42.95 ± 0.98 ^B |
| | Overload | 39.37 ± 1.33 ^a | 44.89 ± 2.76 ^C | 44.86 ± 1.26 ^{bc} | 45.42 ± 1.35 ^C |
| MCV (fL) | Normal | 57.68 ± 0.54 | 55.34 ± 0.59 | 57.25 ± 0.56 | 55.04 ± 0.53 |
| | Overload | 56.79 ± 0.58 | 53.18 ± 0.55 ^A | 56.44 ± 0.53 | 56.15 ± 0.53 ^B |
| Platelets (10 ⁹ /l) | Normal | 933.00 ± 70.32 | 963.00 ± 66.45 | 926.00 ± 79.65 | 935.33 ± 66.89 |
| | Overload | 939.67 ± 71.37 | 965.50 ± 72.22 | 933.59 ± 81.32 | 945.86 ± 70.26 |
| Serum Fe (µg/l) | Normal | 1346 ± 86.18 | 1355 ± 86.35 | 1352 ± 88.96 | 1326 ± 94.35 |
| | Overload | 1591 ± 100 ^c | 1587 ± 102 ^C | 1556 ± 99 ^c | 1576 ± 97 ^C |
| TIBC (µg/l) | Normal | 2787 ± 158 | 2798 ± 137 | 2785 ± 144 | 2789 ± 166 |
| | Overload | 3145 ± 177 ^c | 3254 ± 175 ^C | 3251 ± 169 | 3195 ± 166 ^C |
| Transferrin saturation (%) | Normal | 45.98 ± 0.91 | 45.32 ± 0.89 | 46.65 ± 0.76 | 46.37 ± 0.94 |
| | Overload | 47.76 ± 1.32 ^c | 47.88 ± 1.02 ^C | 49.59 ± 0.98 ^c | 48.96 ± 1.05 ^C |
| Serum ferritin (µg/l) | Normal | 83.25 ± 1.75 | 82.97 ± 1.68 | 84.33 ± 1.77 | 82.34 ± 1.82 |
| | Overload | 87.73 ± 1.87 ^c | 86.87 ± 1.91 ^C | 87.91 ± 1.88 ^c | 86.65 ± 1.96 ^C |
| Serum hepcidin (ng/mL) | Normal | 14.25 ± 0.59 ^a | 14.42 ± 0.49 ^A | 16.85 ± 0.55 ^b | 16.66 ± 0.59 ^B |
| | Overload | 15.75 ± 0.62 ^{ac} | 14.98 ± 0.58 ^A | 17.01 ± 0.61 ^b | 16.73 ± 0.63 ^B |

Values are means ± SEM. (n=10) ¹NS, not significant.

^{a,b} Mean values among groups of controls rats fed with different diet and different lower case letters in the same row in ANOVA (Tukey's test).

^{A,B} Mean values among groups of anemic rats fed with different diet and different upper case letters in the same row in ANOVA (Tukey's test).

^c Mean values of controls rats were significantly different from the corresponding group of rats fed with normal Fe content.

^C Mean values of anaemic rats were significantly different from the corresponding group of rats fed with normal Fe content.



5.2 ARTÍCULO CIENTÍFICO III

Artículo científico III

Research Article



Received: 29 March 2016

Revised: 2 June 2016

Accepted article published: 6 July 2016

Published online in Wiley Online Library: 28 July 2016

(wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/jsfa.7882

Fermented goat milk improves antioxidant status and protects from oxidative damage to biomolecules during anemia recovery

Jorge Moreno-Fernandez,^{a,b} Javier Diaz-Castro,^{a,b} María JM Alférez,^{a,b}
Christine Boesch,^c Teresa Nestares^{a,b} and Inmaculada López-Aliaga^{a,b*}

Abstract

BACKGROUND: Iron deficiency anemia (IDA) is one of the most common nutritional problems in the world, and it is accepted that reactive oxygen species (ROS) production is altered during IDA. The aim of this study was to assess the influence of fermented goat and cow milks on enzymatic antioxidant activities and gene expression, and their role in protecting from oxidative damage during anemia recovery.

RESULTS: After feeding the fermented milks-based diets (cow or goat), a significant elevation of some antioxidant endogenous enzymes was found, together with an increase in total antioxidant status (TAS), and a decrease in 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) was recorded in animals consuming fermented goat milk-based diet. In contrast, DNA strand breaks, hydroperoxides, 15-F2t-isoprostanes and protein carbonyl groups were lower in some tissues in animals fed fermented goat milk-based diet, revealing an improvement in both systemic and cellular antioxidant activity of plasma and tissues due to fermented goat milk consumption.

CONCLUSION: Fermented goat milk consumption induces a protective increase in TAS together with lower oxidative damage biomarkers, revealing that the milk protects main cell bioconstituents (lipids, protein, DNA, prostaglandins) from evoked oxidative damage during anemia recovery.

© 2016 Society of Chemical Industry

Keywords: fermented milk; oxidative stress; gene expression; anemia

Publicado en Journal of the Science of Food and Agriculture. 2017; 97(5):1433-1442.

doi: 10.1002/jsfa.7882



Fermented goat milk improves antioxidant status and protects from oxidative damage to biomolecules during anemia recovery

Jorge Moreno-Fernandez^{ab}, Javier Diaz-Castro^{ab}, Maria.J.M. Alferez^{ab}, Christine Boesch^c, Teresa Nestares^{ab} and Inmaculada Lopez-Aliaga^{ab*}

^aDepartment of Physiology, University of Granada, Granada, Spain.

^bInstitute of Nutrition and Food Technology “José Mataix Verdú”, University of Granada, Granada, Spain.

^cSchool of Food Science and Nutrition, University of Leeds, Leeds, UK

Corresponding author:

*M^a Inmaculada López-Aliaga, Department of Physiology, Faculty of Pharmacy, Campus Universitario de Cartuja, University of Granada, 18071, Granada, Spain. Tel: 34-958-243880, Fax: 34-958-248959, *E-mail address*: milopez@ugr.es



ABSTRACT

BACKGROUND: Iron deficiency anemia (IDA) is one of the most common nutritional problems in the world, and it is accepted that reactive oxygen species (ROS) production is altered during IDA. The aim of this study was to assess the influence of fermented goat and cow milks on enzymatic antioxidant activities and gene expression, and their role in protecting from oxidative damage during anemia recovery.

RESULTS: After feeding the fermented milks-based diets (cow or goat), a significant elevation of some antioxidant endogenous enzymes was found, together with an increase in total antioxidant status (TAS), and a decrease in 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) was recorded in animals consuming fermented goat milk-based diet. In contrast, DNA strand breaks, hydroperoxides, 15-F2t-isoprostanes and protein carbonyl groups were lower in some tissues in animals fed fermented goat milk-based diet, revealing an improvement in both systemic and cellular antioxidant activity of plasma and tissues due to fermented goat milk consumption.

CONCLUSION: Fermented goat milk consumption induces a protective increase in TAS together with lower oxidative damage biomarkers, revealing that the milk protects main cell bioconstituents (lipids, protein, DNA, prostaglandins) from evoked oxidative damage during anemia recovery.

Key words: Fermented milks, Oxidative stress, Gene expression, Anemia.



INTRODUCTION

Nutrition is associated with oxidative metabolism, which beside production of energy is involved in a number of vital functions of the host. Under physiological conditions the reactive oxygen species (ROS) play a key role in primary immune defence by phagocytic cells against harmful microorganisms and inflammatory signalling¹. In this sense, a prolonged excess of ROS is highly damaging for the host biomolecules and cells, resulting in dysbalance of the functional antioxidative system of the organism and leading to substantial increase on the pathological inflammatory signalling and oxidative stress². Although the body has an inherently antioxidative system to protect itself from damage caused by peroxidants, these systems are not sufficiently effective to totally prevent such damage². Hence, there is an increasing interest in finding natural antioxidants from food, because it is believed that they can protect from the attack of free radicals and retard the progress of many chronic diseases. Antioxidants from natural sources are likely to be more desirable than those chemically produced, because some synthetic antioxidants have been reported to be side effects³.

On the other hand, Fe deficiency anemia (IDA) is one of the most common nutritional problems in the world, especially in developing countries. IDA is associated with mortality, hospitalization and health-related quality of life measures. There is controversy about the susceptibility to evoked oxidative stress of cells in IDA, however, it is accepted that ROS production play an important role in haemoglobin (Hb) oxidation and met-Hb production⁴. Therefore, the potential oxidative damage generated by the participation of Fe in redox reactions might be due to the improper Fe compartmentalization and trafficking during IDA rather than its total accumulation in the body.



Fermented milk constituents have become recognized as functional foods, suggesting their use has a direct and measurable effect on health outcome, existing some reports about the beneficial effects of fermented milk on immune system, metal ion chelation, enzyme inhibition and inhibition of ascorbate autoxidation ^{5, 6}, but lack of a comprehensive analysis of fermented milks influence in antioxidant status and its pathogenic role involved in attacking main biomolecules such as lipids, proteins, prostaglandins or DNA has been reported, although fermented milks are dietary sources of natural antioxidants because of the presence of antioxidant peptides. Most identified bioactive peptides were derived from casein and have been shown to exhibit free radical scavenging and inhibit enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation ⁷. The antioxidant peptides derived from whey protein are likely the result of the presence of cysteine-rich proteins that aid in the synthesis of glutathione, a potent intracellular antioxidant ⁸.

Taking into account all the mentioned above, the aim of the current study is to assess the influence of fermented goat or cow milk-based diets on gene expression and enzymatic antioxidant activities, and their role protecting main biomolecules such as lipids, proteins, or DNA from the oxidative damage during anemia recovery to verify the possible influence of fermented milks in oxidative stress due to modulation of the antioxidant defences.

MATERIALS AND METHODS

Fermentation and dehydration of the milks

Fermented milks were prepared according to the method previously described by Moreno-Fernandez et al., ⁹. Both milks types were inoculated with traditional yoghurt starters *Lactobacillus bulgaricus sub. delbruickii* and *Streptococcus thermophiles*



(initial concentration of 1×10^{11} cfu/ml; 1 % inoculum) and incubated at 37°C for approximately. Subsequently, fermented milk samples were subjected to a smooth industrial dehydration process, until the final moisture ranged between 2.5% and 4.5%.

Total nitrogen, dry matter, ash, total fat, lactose and minerals content

The N content was measured using the Kjeldahl method ¹⁰. Dry matter, ash and total fat were determined according to the methods described by AOAC ¹¹. Mineral content in the fermented milks and diets was assessed by multielemental analysis by inductively coupled plasma-optical emission spectrometer (ICP-OES). Samples were previously mineralized by wet method in a sand bath (J.R. Selecta, Barcelona, Spain) using HNO₃ followed by a mixture of HNO₃:HClO₄ (69%:70%, v/v; Merck KGaA, Darmstadt, Germany; ratio 1:4, v/v) until the total elimination of organic matter. Ca, P, Fe, Zn, Cu, Mg, Na and K analysis was undertaken using an ICP-OES Optima 8300 (PerkinElmer Inc. Waltham, USA) with a segmented-array charge-coupled Device (SCD) high-performance detector.

Animals

All animal care procedures and experimental protocols were approved by the Ethics Committee of the University of Granada (Ref. 11022011) in accordance with the European Community guidelines (Declaration of Helsinki; Directive 2010/63/EU for animal experiments). 40 male Wistar albino breed rats (21 d of age and weighing about 42 ± 5 g), purchased from the University of Granada Laboratory Animal Service (Granada, Spain) were used during the study. Animal assays were carried out in the

breeding unit of the Centre of Biomedical Research of the University of Granada in an area certified as free of pathogens and the animals were kept in conditions of high biological safety, with sanitary and environmental rigorously controlled parameters.

During the course of the study, the animals were housed in individual, ventilated, thermoregulated cages with an automatically controlled temperature (22-23°C), humidity (55-65%) and a 12-hour light-dark cycle (9:00 to 21:00). Diet intake was controlled, pair feeding all the animals (80% of the average intake) and bidistilled water was available ad libitum.

Table 1. Composition of the experimental diets

| Component | g/Kg diet |
|--|-----------|
| Pre-experimental period, Standard (non-milk) diet^a | |
| Casein | 200 |
| Lactose | 0 |
| Fat (virgin olive oil) | 100 |
| Wheat starch | 500 |
| Constant ingredients ^b | 200 |
| Experimental period | |
| Fermented cow milk-based diet^c | |
| Protein | 205 |
| Lactose | 295 |
| Fat | 100 |
| Wheat starch | 200 |
| Constant ingredients ^b | 200 |
| Fermented goat milk-based diet^c | |
| Protein | 206 |
| Lactose | 291 |
| Fat | 100 |
| Wheat starch | 203 |
| Constant ingredients ^b | 200 |

^a The diets were prepared according to the recommendations of the AIN-93G for control rats (45 mg Fe/Kg diet) (Reeves et al., 1993), or with low Fe content (5 mg Fe/Kg diet) (Pallarés et al., 1993), for anemic groups.

^b The constant ingredients consisted of (g/Kg diet): fibre (micronized cellulose) 50, sucrose 100, choline chloride 2.5, L-cystine 2.5, mineral premix 35, vitamin premix 10.



^c Specific vitamin and mineral premixes supplements for fermented goat and cow milk-based diets were formulated taking into account the mineral and vitamin contents of the fermented milk powder supplied in order to meet the recommendations of the AIN-93G for normal-Fe diets (45 mg Fe/Kg diet) (Reeves et al., 1993) or Fe-overload (450 mg Fe/Kg diet) (Raja et al., 1994).

Experimental design

At the beginning of the study 40 rats were divided into two groups: the control group receiving the AIN-93G diet (44.72 ± 0.98 mg/kg by analysis)¹², and the anemic group receiving a low-Fe diet (5.91 ± 0.36 mg/kg by analysis), induced experimentally during 40 d by a method developed previously by our research group¹³.

After the induction of the anemia (d 40 of the study), the animals were then placed on an experimental period in which the control and anemic groups were further fed for 30 days with fermented milk-based diets, prepared with cow (Holstein breed) or goat milk (Murciano-granadina breed) powder (20% of protein and 10% of fat) (Table 1). The Fe content (mg/kg) in the diets by analysis were: 43.98 ± 0.39 (cow milk-based diet), 44.28 ± 0.76 (goat milk-based diet).

On day 70 of the study, urine samples were collected to measure 15-F2t-isoprostanes and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG). Subsequently animals were anesthetized intraperitoneally with sodium pentobarbital (Sigma Diagnostics, St Louis, MO), totally bled out by cannulation of the aorta and blood aliquots with EDTA were analysed to measure the hematological parameters and the rest of the blood was centrifuged ($1500 \times g$, 4°C , 15 min) to measure plasma total antioxidant status (TAS), hydroperoxides, carbonyl groups, 8-OHdG, The remaining blood was centrifuged without anticoagulant to separate the red blood cells from the serum and subsequent analysis of Fe, total iron binding capacity (TIBC), transferrin saturation and ferritin.



The liver, brain and duodenum were removed and washed with ice-cold saline solution (0.9% w/v, NaCl). Erythrocyte, liver, brain, and duodenal mucosa cytosolic and membrane fractions were prepared fresh the same day by successive differential centrifugations with hypotonic hemolysis according to the method of Hanahan and Ekholm¹⁴, preserving these cytosolic fractions at -80°C for further analyses of antioxidant enzymes activities, hydroperoxides and protein carbonyl groups. Antioxidant enzymes gene expression was assessed in liver and duodenal mucosa. DNA instability (strand breaks) was measured in isolated rat lymphocytes. Protein contents in the cytosolic fractions were measured following the method described by Lowry et al.,¹⁵.

Hematological test

All the hematological parameters studied were measured using an automated hematology analyzer Sysmex K-1000D (Sysmex, Tokyo, Japan).

Serum iron, total iron binding capacity (TIBC) and transferrin saturation

To calculate the rate of transferrin saturation, serum Fe concentration and TIBC were determined using Sigma Diagnostics Iron and TIBC reagents (Sigma Diagnostics). The absorbance of samples was read at 550 nm on a microplate reader (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA). The percentage of transferrin saturation was calculated from the equation:

$$\text{Transferrin saturation (\%)} = \text{serum Fe concentration (\mu g/L)} / \text{TIBC (\mu g/L)} \times 100$$



Serum ferritin

Serum ferritin concentration was determined using the Rat Ferritin ELISA Kit (Biovendor GmbH, Heidelberg, Germany). The absorbance of the reaction was read at 450 nm using a microplate reader (Bio-tek, Vermont, USA). Colour intensity developed was inversely proportional to the concentration of serum ferritin.

RNA isolation and real time qPCR

Total RNA was isolated from duodenal mucosa and liver samples using TRIsure lysis reagent (Bioline, Luckenwalde, Germany) according to manufacturer's instructions. RNA quantity and purity were determined by spectrophotometer (NanoDrop 1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) at 260/280nm. Complementary DNA (cDNA) was synthesized using iScript cDNA Synthesis kit (Bio-Rad) in a 20 μ l reaction, with 1 μ g of total RNA following the protocol supplied by the manufacturer.

Quantitative real time PCR was carried out as two step procedure in a total reaction volume of 20 μ l using the CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) and SYBR Green detection using Sso Advanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Primer sequences for quantitative real-time PCR were designed by use of standard tools (Spidey, Primer3, NCBI Blast). Primer pairs were obtained from Eurofins MWG Biotech (Ebersberg, Germany). The selected rat genes, detailed in Table 2, were as follows: superoxide dismutase 1 (SOD1), catalase (CAT), glutathione peroxidase 1(GPx1) and glutathione reductase (GR). Measurements were done in duplicate and the expression of the target genes was normalized to the housekeeping



gene β -actin which was consistently expressed across the groups. Serial dilutions of control samples were used to determine the efficacy of amplification. Melt curve analysis and gel electrophoresis were used to confirm PCR product size.

Table 2. PCR primer sequences and annealing temperatures

| Gene | Forward Sequence | Reverse Sequence | Annealing temperature (°C) |
|----------------|----------------------|----------------------|----------------------------|
| β -Actin | GGGGTGTTGAAGGTCTCAA | TGTCACCAACTGGGACGATA | 57 |
| SOD1 | ACACAAGGCTGTACCACTGC | CCTTTCCAGCAGCCACATTG | 59 |
| CAT | GTGCATGCATGACAACCAGG | GAATGTCCGCACCTGAGTGA | 59 |
| GPx1 | CCGTGCAATCAGTTCGGACA | CTCACCATTACCTCGCACT | 59 |
| GR | GTATCACGCTGTGACCACGA | TGGATGCCAACCACCTTCTC | 59 |

Antioxidant enzymes activities

Superoxide dismutase (SOD) activity was determined according to the method of Crapo et al. ¹⁶, based on its inhibition in the reduction of cytochrome c, measured spectrophotometrically (Thermo Spectronic, Rochester, USA) at 550 nm.

Catalase (CAT) activity was determined following the method described by Aebi ¹⁷, monitoring at 240 nm spectrophotometrically (Thermo Spectronic, Rochester, USA) the H₂O₂ decomposition, as a consequence of the catalytic activity of CAT.

Glutathione peroxidase (GPx) activity was measured by the method of Flohé and Gunzler ¹⁸, based on the instantaneous formation of oxidized glutathione during the reaction catalysed by glutathione peroxidase. The oxidation of NADPH to NADP⁺ was monitored spectrophotometrically (Thermo Spectronic, Rochester, USA) at 340 nm.

Glutathione reductase (GR) activity was determined using the method of Worthington and Rosemeyer ¹⁹, based on the oxidation of NADPH to NADP, catalyzed by a limiting concentration of GR. In this reaction oxidized glutathione reduction was



determined indirectly by measuring spectrophotometrically (Thermo Spectronic, Rochester, USA) NADPH consumption at 340 nm.

Total antioxidant status (TAS)

Freshly thawed batches of plasma were analysed using TAS Randox kit (Randox laboratories, Ltd, Crumlin, UK). Results were expressed in mM of Trolox equivalents. Measurements in duplicate were used to determine intra-assay variability.

Plasma and membrane lipid hydroperoxides

Peroxide level in test samples was determined by calculation from the known extinction coefficient of the XO-Fe complex or by reference to a standard curve prepared with hydrogen peroxide solution using a commercial kit (Pierce™ Quantitative Peroxide Assay Kits, Thermo Scientific, Rockford, USA)..

Protein oxidation (carbonyl groups) measurement

The plasma, liver, brain and duodenal mucosa protein oxidation was measured according to a method based on the spectrophotometric detection of the reaction of 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) with protein carbonyl (PC) to form protein hydrazones

20.

15-F2t-isoprostanes

Isoprostanes in urine were measured using a commercial kit Enzyme Immunoassay for Urinary Isoprostane (Oxford Biomedical Research, Oxford, England).



Urine samples are mixed with an enhanced dilution buffer that essentially eliminates interference due to non-specific binding. Plate was read spectrophotometrically (Biotek, Vermont, USA) at 450 nm.

8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)

8-OHdG in plasma and urine was measured using a commercial kit (8OHdG Check, Japan Institute for the Control of Aging, Shizuoka, Japan). To separate interfering substances, filtration of serum using an ultra filter (cut off molecular weight 10000) was done. Results were read at 450 nm on a microplate reader (Biotek, Vermont, USA).

Alkaline single cell gel electrophoresis (Comet assay)

Among the available genotoxicity tests, comet assay is recognized due to their robustness sensitivity and statistical power to evaluate DNA breaks, which can be considered hallmarks of mutagenicity ²¹, and in our case, DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) was used as staining method, due to the increase in the sensitivity of DNA damage detection ²², making the assay more accurate. DNA instability (strand breaks) was measured in rat lymphocytes at day 70 of the study, according to the method previously described ²³. Isolated rat lymphocytes were stained with 20 µL of 4,6-diamidine-2-phenylindol dihydrochloride (DAPI) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). DAPI-stained nucleoids were scored using a Leica DMLS fluorescence microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany using computerized image analysis (Komet 3.0; Kinetic Imaging Ltd, Liverpool, UK) and the percentage of fluorescence in



the comet head, tail and Olive Tail Moment (OTM, defined as the product of the tail length and the fraction of total DNA in the tail, $OTM = [\text{Tail mean} - \text{Head mean}] \times \text{Tail \% DNA}/100$) were measured.

Statistical analysis

Data are reported as means \pm standard error of the mean (SEM). Statistical analyses were performed using the SPSS computer program (version 22.0, 2013, SPSS Inc., Chicago, IL). Differences between groups fed normal-Fe- or low-Fe-content diets during the PEP were tested for statistical significance with Student's t test. Variance analysis by one-way ANOVA was used to compare the different diets supplied to the animals. Following a significant F-test ($P < 0.05$), individual means were tested by pairwise comparison with the Tukey's multiple comparison test, when main effects and interactions were significant. The level of significance was set at $P < 0.05$.

RESULTS

After Fe deprivation during 40 d, all the hematological parameters were consistent with a severe induced anemia in the experimental group and different from their counterpart controls ($P < 0.001$), except white blood cells that remained unchanged after severe Fe deprivation (Table 3).

Table 3. Hematological parameters of control and anemic rats (day 40 of PEP)

| Parameter | Normal-Fe Control group (n = 20) | Low-Fe Anemic group (n = 20) |
|--------------------------------|--|------------------------------------|
| Total blood | | |
| Hb concentration (g/L) | 129.8 ± 3.01 | 60.01 ± 2.94 * |
| RBCs (10 ¹² /L) | 7.14 ± 0.17 | 3.10 ± 0.21 * |
| Hematocrit (%) | 40.01 ± 1.15 | 11.45 ± 1.23 * |
| MCV (fL) | 56.41 ± 0.57 | 37.90 ± 0.37 * |
| MCH (pg) | 19.81 ± 0.13 | 14.12 ± 0.69 * |
| MCHC (g/dl) | 35.41 ± 0.37 | 29.97 ± 0.85* |
| RDW (%) | 16.86 ± 0.33 | 19.31 ± 0.39 * |
| Platelets (10 ⁹ /L) | 763 ± 72.12 | 2197 ± 120 * |
| WBCs (10 ⁹ /L) | 8.90 ± 0.37 | 8.41 ± 0.96 |
| Serum | | |
| Fe (µg/L) | 1342 ± 115 | 599 ± 57.22 * |
| TIBC (µg/L) | 2750 ± 195 | 18031 ± 663 * |
| Transferrin saturation (%) | 48.66 ± 6.51 | 3.77 ± 0.38 * |
| Ferritin (µg/L) | 81.01 ± 2.22 | 49.24 ± 1.47 * |

Data are shown as the mean values ± SEM.

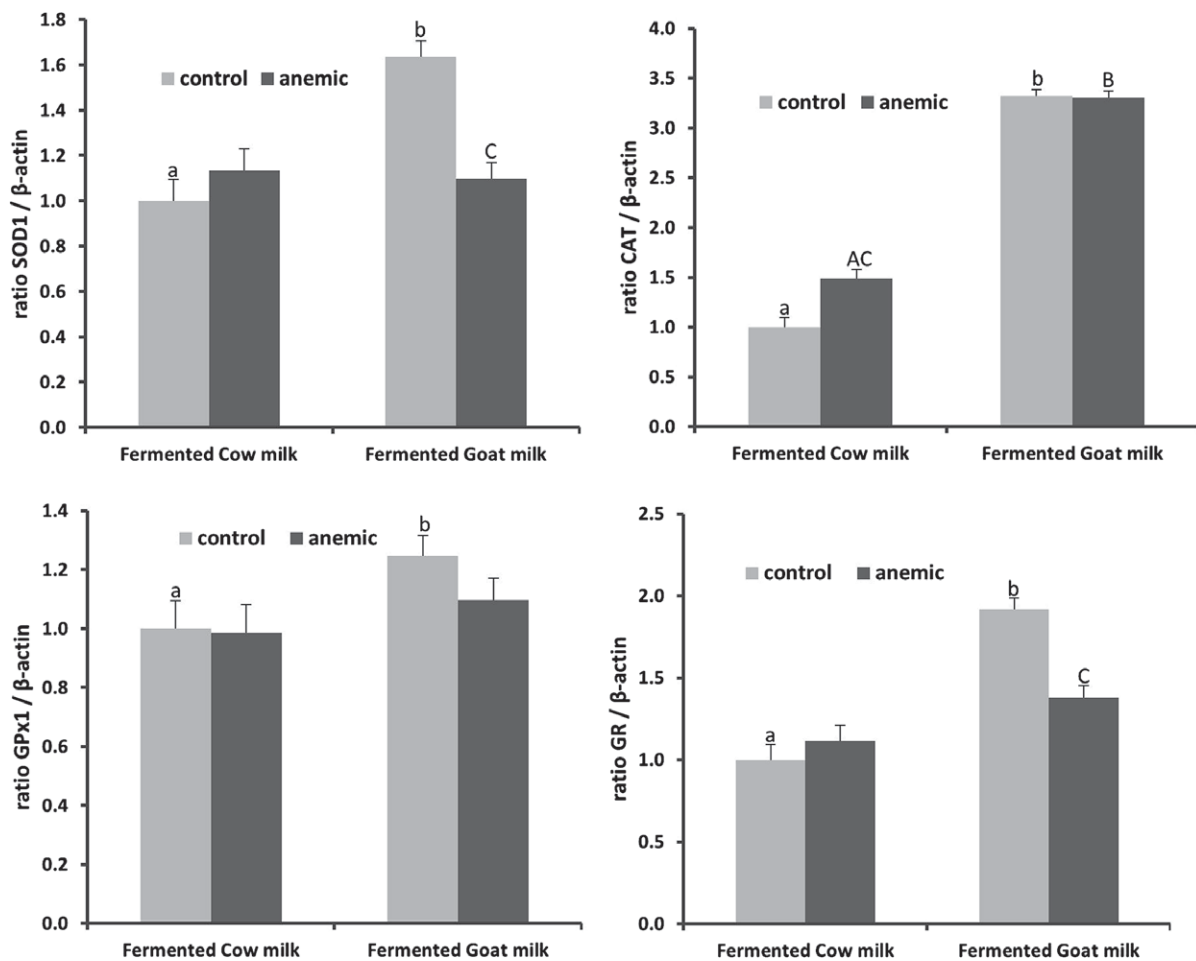
Hb, hemoglobin; RBCs, red blood cells; MCV, mean corpuscular volume; MCH, mean corpuscular Hb; MCHC, mean corpuscular Hb concentration; RDW, red cell distribution width; WBCs, white blood cells; TIBC, total Fe-binding capacity.

*Significantly different from the control group ($P < 0.001$, Student's t test).

SOD gene expression increased in liver of control animals and CAT gene expression increased in liver of control and anemic fed fermented goat milk ($P < 0.001$) (Figure 1A and B) and decreased in duodenal mucosa of both groups of animals fed either fermented goat or cow milk ($P < 0.001$) (Figure 2A and B). GPx mRNA increased in liver of control animals ($P < 0.001$) (Figure 1C) and in duodenal mucosa of

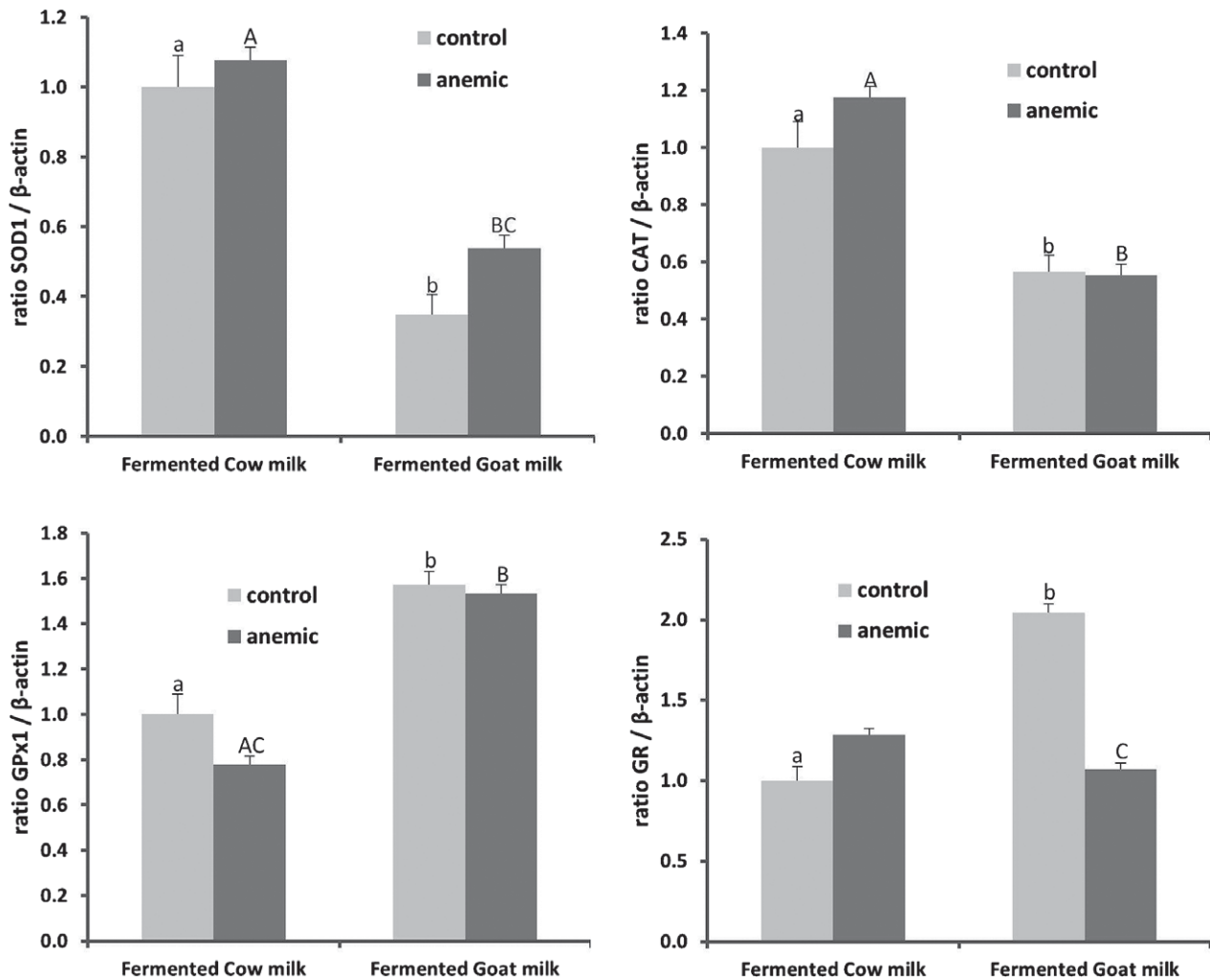
both groups of animals ($P < 0.001$) (Figure 2C) fed fermented goat milk. GR gene expression increased in liver and duodenal mucosa of control animals fed fermented goat milk ($P < 0.001$). Anemia decreased GR gene expression in liver and duodenal mucosa of rats fed fermented goat milk ($P < 0.001$) (Figure 1D; Figure 2D).

Figure 1. Effect of fermented cow and goat milk in control and anemic rats on liver mRNA levels of (A) SOD1, (B) CAT, (C) GPx1 and (D) GR.



Data are mean with SEM of ten animals per group. a,bMean values among groups of controls rats with different letters are significantly different ($P < 0.05$, Tukey's test). A,BMean values among groups of anemic rats with different letters are significantly different ($P < 0.05$, Tukey's test). CMean values from the corresponding group of control rats are significantly different ($P < 0.05$, Student's t test).

Figure 2. Effect of fermented cow and goat milk in control and anemic rats on duodenal mucosa mRNA levels of (A) SOD1, (B) CAT, (C) GPx1 and (D) GR.



Data are mean with SEM of ten animals per group. a,b Mean values among groups of controls rats with different letters are significantly different ($P < 0.05$, Tukey's test). A,B Mean values among groups of anemic rats with different letters are significantly different ($P < 0.05$, Tukey's test). C Mean values from the corresponding group of control rats are significantly different ($P < 0.05$, Student's t test).

The antioxidant enzymes activities are shown in Table 4. SOD activity increased in liver ($P < 0.001$), erythrocyte ($P < 0.001$) and plasma ($P < 0.001$) of both groups fed



fermented goat milk. Anemia increased SOD activity in duodenal mucosa ($P < 0.001$) and decreased in erythrocyte ($P < 0.001$) of rats fed both fermented milks. CAT activity increased in duodenal mucosa ($P < 0.001$) of control rats and brain ($P < 0.01$) of control and anemics rats fed fermented goat milk. Anemia decreased CAT activity in duodenal mucosa of rats fed both fermented milks ($P < 0.001$) and in erythrocyte of rats fed fermented cow milk ($P < 0.001$) and increased in erythrocyte of rats fed fermented goat milk ($P < 0.001$). GPx increased in liver ($P < 0.05$) and brain ($P < 0.001$) of control animals and duodenal mucosa of control and anemic animals fed fermented goat milk ($P < 0.001$) and in erythrocyte of anemic rats fed fermented goat milk ($P < 0.001$). Anemia decreased GPx activity in duodenal mucosa and erythrocyte ($P < 0.001$) of rats fed fermented cow milk and in liver ($P < 0.01$) of animals fed fermented goat milk. GR activity increased in liver, duodenal mucosa and brain in both groups of animals fed fermented goat milk ($P < 0.001$), meanwhile no differences were recorded in erythrocyte. Anemia increased GR activity in duodenal mucosa and brain with both fermented milks ($P < 0.001$) and decreased in liver of animals fed fermented goat milk ($P < 0.001$).

Table 4. Antioxidant enzymes activities (U/mg protein) in plasma, cytosolic fractions of liver, brain and duodenal mucosa from control and anemic rats fed for 30 days with fermented cow or goat milk-based diets¹

| | Fermented cow milk-based diet | | Fermented goat milk-based diet | |
|-----------------|-------------------------------|------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| | Control group | Anemic group | Control group | Anemic group |
| SOD | | | | |
| Erythrocyte | 0.678 ±0.44 ^a | 0.342 ±0.033 ^{AC} | 1.338±0.067 ^b | 0.807±0.047 ^{BC} |
| Liver | 1.206 ±0.107 ^a | 0.970 ±0.065 ^A | 1.780 ±0.104 ^b | 1.551 ±0.111 ^B |
| Brain | 1.051 ±0.051 | 0.740 ± 0.096 ^C | 1.085 ±0.091 | 0.908 ± 0.089 |
| Duodenal mucosa | 2.278 ±0.193 | 3.289 ±0.144 ^C | 2.119 ±0.103 | 3.281±0.163 ^C |
| Plasma | 20.057 ±0.298 ^a | 19.385±0.420 ^A | 23.679±0.993 ^b | 22.564±0.710 ^B |
| CAT | | | | |
| Erythrocyte | 2.607±0.595 | 0.840±0.086 ^{AC} | 2.378±0.346 | 3.493±0.512 ^{BC} |
| Liver | 10.285±0.758 | 10.672±0.477 ^A | 12.858±0.872 | 13.241±1.011 ^A |
| Brain | 0.570±0.062 ^a | 0.599±0.024 ^A | 0.811±0.070 ^b | 0.933±0.097 ^B |
| Duodenal mucosa | 47.440±2.753 ^a | 33.425±2.344 ^C | 95.537±7.643 ^b | 36.622±1.128 ^C |
| GPx | | | | |
| Erythrocyte | 0.533±0.094 | 0.385±0.064 ^{AC} | 0.699±0.062 | 0.706±0.077 ^B |
| Liver | 0.820±0.064 ^a | 0.697±0.038 | 1.076±0.063 ^b | 0.736±0.088 ^C |
| Brain | 0.070±0.016 ^a | 0.088±0.009 | 0.134±0.014 ^b | 0.123±0.039 |
| Duodenal mucosa | 0.149±0.042 ^a | 0.050±0.007 ^{AC} | 0.320±0.033 ^b | 0.250±0.051 ^B |
| GR | | | | |
| Erythrocyte | 18.940 ± 1.142 | 22.534 ± 1.739 | 15.080 ± 1.052 | 19.132 ± 1.049 |
| Liver | 27.445 ± 0.886 ^a | 26.488 ±0.871 ^A | 49.305 ± 1.313 ^b | 36.928 ±1.667 ^{BC} |
| Brain | 20.479 ± 1.123 ^a | 33.570 ± 1.820 ^{AC} | 35.813 ± 1.377 ^b | 43.051 ± 1.825 ^{BC} |
| Duodenal mucosa | 27.954 ± 0.634 ^a | 80.893 ±1.903 ^{AC} | 38.989 ± 1.040 ^b | 129.996 ± 3.822 ^{BC} |

¹Data are shown as the mean ± SEM for ten animals per group

^{a,b} Mean values within a row and within control groups with different superscript lowercase letters differ ($P < 0.05$) by Student's *t* test.

^{A,B} Mean values within a row and within anemic groups with different superscript capital letters differ ($P < 0.05$) by Student's *t* test.

^C Indicates difference ($P < 0.05$) for control vs. anemic group within a diet by the Tukey's test.



Table 5 shows that after 30 days of feeding the milk-based diets (day 70 of the study), TAS was higher ($P < 0.01$ for control and anemic), plasma 8-OHdG was lower ($P < 0.001$ for control and $P < 0.01$ for anemic) and urine 8-OHdG and 15-F2t-isoprostanes were lower ($P < 0.001$ for control and anemic) in animals fed fermented goat milk in comparison with fermented cow milk. In general, anemia did not show effects on TAS, plasma and urine 8-OHdG and urine 15-F2t-isoprostanes.

With regard to the oxidative stress-mediated damage to lipids (Table 6), hydroperoxides levels were higher in plasma, erythrocyte ($P < 0.001$) and liver ($P < 0.01$) for control and anemic animals fed with fermented cow milk-based diet, showing no effect in brain and duodenal mucosa. In general, anemia increased susceptibility to lipid oxidation in all the tissues of animals fed fermented goat or cow milk ($P < 0.001$ for erythrocyte, liver and brain; $P < 0.01$ for duodenal mucosa).



Moreno Fernández J, 2020
International Ph.D. Thesis

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Table 5. Oxidative/antioxidant biomarkers in plasma and urine from control and anemic rats fed for 30 days with control and fermented cow milk-based diets¹

| Biomarker | Fermented cow milk-based diet | | Fermented Control group |
|------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| | Control group | Anemic group | |
| Plasma TAS (mM Trolox eq/ml) | 0.490 ± 0.009 ^a | 0.464 ± 0.003 ^A | 0.559 ± 0.00 |
| Plasma 8-OHdG (ng/ml) | 1.051 ± 0.010 ^a | 1.184 ± 0.060 ^A | 0.871 ± 0.07 |
| Urine 8-OHdG (ng/ml) | 12.411 ± 0.274 ^a | 11.105 ± 0.502 ^A | 6.109 ± 0.26 |
| Urine isoprostanes (ng/ml) | 6.321 ± 0.432 ^a | 3.370 ± 0.418 ^{AC} | 0.921 ± 0.09 |

TAS, total antioxidant status; 8-OHdG, 8-hydroxy guanosine

¹Data are shown as the mean ± SEM for ten animals per group

^{a,b} Mean values within a row and within control groups with different superscript lowercase letters differ ($P < 0.05$)

^{A,B} Mean values within a row and within anemic groups with different superscript capital letters differ ($P < 0.05$)

^C Indicates difference ($P < 0.05$) for control vs. anemic group within a diet by the Tukey's test.



Moreno Fernández J, 2020
International Ph.D. Thesis

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Table 6. Hydroperoxides (nmol/mg protein) in plasma, cytosolic fractions of liver, brain, duodenal mucosa of anemic rats fed for 30 days with fermented cow or goat milk-based diets¹

| Hydroperoxides | Fermented cow milk-based diet | | Fermented goat milk-based diet |
|-----------------|-------------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| | Control group | Anemic group | Control group |
| Plasma | 11.19 ± 0.47 ^a | 10.32 ± 0.36 ^A | 5.37 ± 0.46 ^b |
| Erythrocyte | 78.55 ± 4.88 ^a | 179.36 ± 7.47 ^{AC} | 50.96 ± 5.32 ^b |
| Liver | 282.52 ± 17.61 ^a | 346.59 ± 17.68 ^{AC} | 194.35 ± 12.89 ^b |
| Brain | 16.55 ± 1.00 | 12.57 ± 0.52 ^C | 19.16 ± 1.20 |
| Duodenal mucosa | 11.94 ± 1.11 | 15.37 ± 0.95 ^C | 12.38 ± 1.11 |

¹Data are shown as the mean ± SEM for ten animals per group

^{a,b} Mean values within a row and within control groups with different superscript lowercase letters differ ($P < 0.05$) by the Tukey's test.

^{A,B} Mean values within a row and within anemic groups with different superscript capital letters differ ($P < 0.05$) by the Tukey's test.

^C Indicates difference ($P < 0.05$) for control vs. anemic group within a diet by the Tukey's test.



Protein oxidative damage is shown in Table 7. In plasma, fermented goat milk consumption reduced protein carbonyl levels ($P < 0.05$) and duodenal mucosa rats ($P < 0.01$) of control and anemic rats, while no statistical differences were recorded in liver and brain. Anemia had no effect on protein carbonyl values in the tissues studied.

DNA oxidative damage (Table 8) is lower when fermented goat milk is supplied, as revealed by the percentage of DNA in the head, tail and OTM ($P < 0.001$), compared with those rats that consumed the fermented cow milk. Anemia had no effect on head and Tail DNA, however increased OTM in animals fed fermented cow milk ($P < 0.001$) and decreased this parameter in animals fed fermented goat milk ($P < 0.05$).



Moreno Fernández J, 2020
International Ph.D. Thesis

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Table 7. Protein carbonyl groups (nmol/mg protein) in plasma, cytosolic fractions of liver, brain and duodenum of rats fed for 30 days with fermented cow or goat milk-based diets¹

| Protein carbonyl groups | Fermented cow milk-based diet | | Fermented goat milk-based diet | |
|-------------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------------|--------------------------|
| | Control group | Anemic group | Control group | Anemic group |
| Plasma | 10.80 ± 1.34 ^a | 8.28 ± 1.25 ^A | 7.21 ± 1.18 ^b | 5.12 ± 0.85 ^B |
| Liver | 3.87 ± 0.71 | 2.57 ± 0.60 | 3.17 ± 0.69 | 2.89 ± 0.58 |
| Brain | 4.42 ± 0.71 | 4.87 ± 0.64 | 3.67 ± 0.79 | 4.15 ± 0.68 |
| Duodenal mucosa | 6.01 ± 0.77 ^a | 5.90 ± 0.69 ^A | 3.61 ± 0.40 ^b | 3.85 ± 0.42 ^B |

¹Data are shown as the mean ± SEM for ten animals per group

^{a,b} Mean values within a row and within control groups with different superscript lowercase letters differ ($P < 0.05$)

^{A,B} Mean values within a row and within anemic groups with different superscript capital letters differ ($P < 0.05$)



Moreno Fernández J, 2020
International Ph.D. Thesis

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Table 8. DNA damage in lymphocytes of peripheral blood of control and anemic rats fed for 30 days with diets.

| | Fermented cow milk-based diet | | Fermented goat milk-based diet | |
|------------------|-------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|---------------|
| | Control group | Anaemic group | Control group | Anaemic group |
| Head DNA (%) | 87.81 ± 0.70 ^a | 86.70 ± 0.67 ^A | 96.12 ± 0.38 ^b | 96.9 |
| Tail DNA (%) | 12.19 ± 0.70 ^a | 13.30 ± 0.67 ^A | 3.88 ± 0.38 ^b | 3.06 |
| OTM ¹ | 0.212 ± 0.011 ^a | 0.384 ± 0.015 ^{AC} | 0.054 ± 0.002 ^b | 0.030 |

¹OTM, Olive tail moment.

¹Data are shown as the mean ± SEM for ten animals per group

^{a,b} Mean values within a row and within control groups with different superscript lowercase letters differ ($P < 0.05$).

^{A,B} Mean values within a row and within anemic groups with different superscript capital letters differ ($P < 0.05$).

^C Indicates difference ($P < 0.05$) for control vs. anemic group within a diet by the Tukey's test.



DISCUSSION

The underlying research hypothesis of this study was that the fermented cow or goat milk, because they are dietary sources of natural antioxidants, would influence the oxidative/antioxidant status during anemia recovery. The findings amply confirm the hypothesis revealing significant elevation of TAS, SOD, CAT, GPx and GR (hepatic gene expression), SOD, GPx, GR, (hepatic activity) together with a decrease in isoprostanes, DNA strand breaks and 8-OHdG and the repression of lipid and protein oxidation in rats consuming fermented goat milk highlights the improvement of both systemic and cellular antioxidant activity of plasma due to fermented goat milk consumption.

In agreement with previous reports ²⁴, the current study shows a significantly higher level of lipid oxidation biomarkers (hydroperoxides) in IDA compared to the control groups. This finding can be attributed to permanent structural membrane alterations in cells, during the Fe-deficiency ^{25, 26}, however, in the current study, this oxidative damage seems to be lipid-specific because no increase of oxidative damage to proteins, prostaglandins or DNA has been recorded due to Fe-deficiency in the tissues studied, which is in agreement with previous results ²³.

It has been previously reported that SOD and CAT levels were significantly lower in anemia situation ²⁷, however, in our study this reduction in SOD and CAT activities was recorded especially when fermented cow milk was consumed. Previous studies reported conflicting results regarding the levels of these antioxidant enzymes in IDA. While Adalakun et al. ²⁸, did not find significant differences in SOD and CAT, Hundekar et al., ²⁹ reported an increased SOD level and other studies have reported decreased levels of SOD and CAT in situation of anemia ^{30, 31}. Reductions in SOD and



CAT levels are related to the severity of oxidative stress ^{30,31}, therefore the results of the current study reveal that oxidative stress is lower when fermented goat milk is supplied.

Fermented goat milk contains casein together with short-chain and medium chain fatty acids (capric, caprylic and caproic acids) ⁹. The antioxidative enzymes, so-called primary scavengers, in red blood cells and serum include SOD, CAT, GPx and GR. The highly aggressive and toxic hydroxyl radicals have been proposed to play important pathogenic roles involved in attacking main biomolecules such as lipids, proteins, or DNA. SOD is considered the first intracellular defence against reactive oxygen molecules. This enzyme causes a dismutation of the superoxide anion radical to H₂O₂ ³², which is further degraded by CAT and peroxidase actions. However, CAT conjugated to SOD represses the conversion of hydrogen peroxide to hydroxyl radicals. Superoxide anion radicals are dismutated by SOD to hydrogen peroxide and oxygen. Under physiological conditions, the conjugation of CAT to SOD ensures that, as soon as a superoxide dismutation reaction occurs, the resultant H₂O₂ is removed by the immediate proximity of the CAT molecule ³³. A high level of lipid peroxides certainly leads to both a decreased activity of antioxidative mechanisms and an excess of substrate, which can undergo abnormal oxidative modifications ³⁴. Goat milk has a better lipid quality than cows' milk, therefore, the generation of free radicals is lower. This trend to prevent lipid peroxidation in animals fed the fermented goat milk can be due to its beneficial nutritional characteristics which provide a lower substrate for lipid peroxidation and consequently decreases the generation of free radicals ³⁵. Additionally, some milk proteins can act as antioxidants ³⁶. The ability of peptides to inhibit deleterious changes caused by lipid oxidation appears to be related to certain amino acid residues in the peptides, such as tyrosine, methionine, histidine, lysine, and tryptophan,



which are capable of chelating pro-oxidative metal ions ³⁷. In this sense, as previously reported ⁹, fermented goat milk has higher amounts of tyrosine, methionine, histidine, lysine, and tryptophan, therefore, peptides deriving from fermented goat milk could inhibit lipid oxidation, reducing the hydroperoxydes output and contributing to the improvement in the TAS, limiting oxidative damage to the biomolecules.

In addition, fermented goat milk has higher amounts of antioxidant minerals (especially Mg, Zn and Se) ⁹, which play a positive role in antioxidant status ^{38, 39} and higher amounts of vitamin A ⁹, which can be incorporated into plasma and contribute to plasma antioxidative capacity ⁴⁰. Finally, goat milk has bioactive peptides ^{41, 42}, which have also some antioxidative properties, explaining the lower rate of 8-OHdG, carbonyl groups and isoprostanes achieved in the current study with fermented goat milk.

On the other hand, fermented goat milk has higher amounts of vitamin D ^{9, 43}, which is a membrane antioxidant with the potential to inhibit lipid peroxidation. In addition, vitamin D administration to rats resulted in a marked elevation of SOD activity in hepatic and renal tissues ⁴⁴. Vitamin D reduces oxidative stress by up-regulating antioxidative molecules, including glutathione, GPx and SOD, and this effect may be comparable to that of vitamin E ⁴⁵. Cytokines also have a regulatory role over circulating SOD. For example, tumour necrosis factor- α down-regulates extracellular SOD expression, whereas interferon- γ and interleukin-4 up-regulate extracellular SOD expression ⁴⁶. Vitamin D, by decreasing tumour necrosis factor- α and increasing interleukin-4 secretion, up-regulate SOD activity ⁴⁷. The higher amount of vitamin D in fermented goat milk explains also the improvement in TAS, SOD and GPx over-expression.



It has been also previously reported that fermented goat milk consumption increase melatonin plasma levels ⁴⁸, a tryptophan derivative is a potent, endogenously produced and diet-derived free radical scavenger and broad-spectrum antioxidant and its protective role has been reported in various experimental models by reducing oxidative stress and lipid peroxidation ⁴⁹. Melatonin has also been reported to alter the activities of enzymes that improve the total antioxidative defense capacity of the organism, including the activities of SOD, GR, GPx, and nitric oxide synthase ⁵⁰. The increase in melatonin levels could also explain the increase in TAS and antioxidant enzymes activities in the different tissues studied, protecting cell biomolecules from oxidation.

We have assessed the three measures of DNA migration which are commonly used: percent of the DNA in tail and head (tail and head intensity) and OTM, being OTM appeared the most representative measurement, because OTM incorporates a measure of both the smallest detectable size of migrating DNA (reflected in the comet tail length) and the number of relaxed/broken pieces (represented by the intensity of DNA in the tail) ⁵¹. In addition, also 8-OHdG, an oxidized nucleoside of DNA, excised during the repair of oxidative damage to deoxyguanosine sites in DNA, was recorded as an additional measurement of DNA damage. In the current study, a positive role on genomic stability of the fermented goat milk has been recorded, reducing strand breaks, and 8-OHdG. These results which are in agreement with those reported previously by our research group ^{38, 39} and that can be explained by the high bioavailability of Mg and Zn from goat milk. The improvement of Mg metabolism enhances genomic stability, acting as an essential cofactor in several pathways and for double-strand break repair. On the other hand, Zn can reduce the Fe-mediated oxidation of lipids, proteins and DNA, improving its stability ³⁹. In addition, as mentioned above, fermented goat milk



consumption has positive effects on enzymatic TAS, limiting the generation of free radicals and the oxidative-induced damage to DNA.

CONCLUSIONS

The antioxidant status is associated with the biomarkers of oxidative stress hydroperoxydes, isoprostanés, 8-OHdG and DNA strand breaks during nutritional ferropenic anemia recovery. Fermented goat milk consumption induces a protective effect, increasing total antioxidant status together with a decrease in the oxidative damage biomarkers, which directly correlates with the expression/activity of the antioxidant enzymes in liver, revealing that protects the main cell bioconstituents (lipids, protein, prostaglandins and DNA) from evoked oxidative damage during anemia recovery.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Andalusian Government, Excellence Research Project No. P11-AGR-7648. Jorge Moreno-Fernandez was supported by a grant from the University of Granada and International Excellence Campus (CEI-Biotic) during his stay at the University of Leeds, and is grateful to the Excellence Ph.D. Program “Nutrición y Ciencias de los Alimentos” from the University of Granada.



REFERENCES

- 1 Halliwell B and Gutteridge JM, Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* **246**:501–514 (1986).
- 2 Petrof EO, Kojima K, Ropeleski MJ, Musch MW, Tao Y, De Simone C, et al., Probiotics inhibit nuclear factor- κ B and induce heat shock proteins in colonic epithelial cells through proteasome inhibition. *Gastroenterology* **127**:1474–1487 (2004).
- 3 Osuntoki A and Korie I, Antioxidant activity of whey from milk fermented with *Lactobacillus* species isolated from Nigerian fermented foods. *Food Technol Biotechnol* **48**:505–511 (2010).
- 4 Ansarihadipour H and Dorostkar H, Comparison of plasma oxidative biomarkers and conformational modifications of hemoglobin in patients with diabetes on hemodialysis. *Iran Red Crescent Med J* **16**:e22045 (2014).
- 5 Lin MY and Yen CL, Antioxidative ability of lactic acid bacteria. *J Agric Food Chem* **47**:1460–1466 (1999).
- 6 Sharma R, Kapila R and Kapila S, Probiotics as anti-immunosenescence agents. *Food Rev Int* **29**:201–216 (2013).
- 7 Korhonen H and Pihlanto A, Bioactive peptides: production and functionality. *Int Dairy J* **16**:945–960 (2006).



- 8 Hayes M, Stanton C, Fitzgerald GF and Ross RP, Putting microbes to work: dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides. Part II: Bioactive peptide functions. *Biotechnol J* **2**:435–449 (2007).
- 9 Moreno-Fernandez J, Diaz-Castro J, Alferez MJ, Hijano S, Nestares T and Lopez-Aliaga I, Production and chemical composition of two dehydrated fermented dairy products based on cow or goat milk. *J Dairy Res* **83**:81–88 (2016).
- 10 AOAC, Official Methods of Analysis of AOAC International (18th edn). Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA (2005).
- 11 AOAC, Official Methods of Analysis of AOAC International (16th edn). Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA (1995).
- 12 Reeves PG, Nielsen FH and Fahey Jr 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* **123**:1939–1951 (1993).
- 13 Pallares I, Lisbona F, Aliaga IL, Barrionuevo M, Alferez MJ and Campos MS, Effect of iron deficiency on the digestive utilization of iron, phosphorus, calcium and magnesium in rats. *Br J Nutr* **70**:609–620 (1993).
- 14 Hanahan DJ and Ekholm JE, The preparation of red cell ghosts (membranes). *Meth Enzymol* **31**:168–172 (1974).



- 15 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ, Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**:265–275 (1951).
- 16 Crapo JD, McCord JM and Fridovich I, Preparation and assay of superoxide dismutases. *Meth Enzymol* **53**:382–393 (1978).
- 17 Aebi H, Catalase in vitro. *Meth Enzymol* **105**:121–126 (1984).
- 18 Flohé L and Gunzler WA, Assays of glutathione peroxidase. *Meth Enzymol* **105**:114–121 (1984).
- 19 Worthington DJ and Rosemeyer MA, Human glutathione reductase: purification of the crystalline enzyme from erythrocytes. *Eur J Biochem* **48**:167–177 (1974).
- 20 Reznick AZ and Packer L, Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Meth Enzymol* **233**:357–363 (1994).
- 21 Heuser VD, de Andrade VM, Peres A, Gomes de Macedo Braga LM and Bogo Chies JA, Influence of age and sex on the spontaneous DNA damage detected by micronucleus test and comet assay in mice peripheral blood cells. *Cell Biol Int* **32**:1223–1229 (2008).
- 22 Rojas E, Lopez MC and Valverde M, Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *J Chromatogr B* **722**:225–254 (1999).
- 23 Diaz-Castro J, Alferez MJ, Lopez-Aliaga I, Nestares T, Granados S, Barrionuevo M, et al., Influence of nutritional iron deficiency anemia on DNA stability and lipid peroxidation in rats. *Nutrition* **24**:1167–1173 (2008).



- 24 Hundekar P, Suryakar A, Karnik A, Ghone R and Vasaikar M, Antioxidant status and lipid peroxidation in sickle cell anaemia. *Biomed Res India* **21**:461–464 (2010).
- 25 Kumerova A, Lece A, Skesters A, Silova A and Petuhovs V, Anaemia and antioxidant defence of the red blood cells. *Mater Med Pol* **30**:12–15 (1998).
- 26 Tamer L, Polat G, Yücebilgiç G and Güvenç B, The levels of seramaldialdehyde, erythrocyte membrane $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{/Mg}^{++}$ and $\text{Ca}^{++}\text{/Mg}^{++}$ adenosine 5' triphosphatase in patients with sickle cell anemia. *Turk J Hematol* **17**:23–26 (2000).
- 27 Al-Naama LM, Hassan MK and Mehdi JK, Association of erythrocytes antioxidant enzymes and their cofactors with markers of oxidative stress in patients with sickle cell anemia. *Qatar Med J* **2015**(2):14 (2015).
- 28 Adalakun A, Ajani O, Ogunleye T, Disu E, Kosoko A and Arinola G, Respiratory burst enzymes and oxidant-antioxidant status in Nigerian children with sickle cell disease. *Br Biotechnol J* **4**:270–278 (2014).
- 29 Hundekar P, Suryakar A, Karnik A, Valvi R, Ghone R and Bhagat S, The effect of antioxidant supplementation on the oxidant and antioxidant status in sickle cell anemia. *J Clin Diagn Res* **57**:1339–1342 (2011).
- 30 Gizi A, Papassotiriou I, Apostolakou F, Lazaropoulou C, Papastamataki M, Kanavaki I, et al., Assessment of oxidative stress in patients with sickle cell disease: the glutathione system and the oxidant–antioxidant



- status. *Blood Cells Mol Dis* **46**:220–225 (2011).
- 31 Alsultan AI, Seif MA, Amin TT, Naboli Mand Alsuliman AM, Relationship between oxidative stress, ferritin and insulin resistance in sickle cell disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **14**:527–538 (2010).
- 32 Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBDF, Manfredini V, Benfato MDS and Kubota LT, Reactive oxygen and nitrogen species, antioxidants and markers of oxidative damage in human blood: main analytical methods for their determination. *Quim Nova* **30**:1323–1338 (2007).
- 33 Liczmanski AE, Oxygen toxicity. II. Defense mechanisms. *Postepy Biochem* **34**:293–310 (1988) (in Polish).
- 34 Jessup W, Dean RT, de Whalley CV, Rankin SM and Leake DS, The role of oxidative modification and antioxidants in LDL metabolism and atherosclerosis. *Adv Exp Med Biol* **264**:139–142 (1990).
- 35 Diaz-Castro J, Perez-Sanchez LJ, Ramirez Lopez-Frias M, Lopez-Aliaga I, Nestares T, Alferez MJM, et al., Influence of cow or goat milk consumption on antioxidant defence and lipid peroxidation during chronic iron repletion. *Br J Nutr* **108**:1–8 (2012).
- 36 Hattori M, Yamaji-Tsukamoto K, Kumagai H, Feng Y and Takahashi K, Antioxidative activity of soluble elastin peptides. *J Agric Food Chem* **46**:2167–2170 (1998).



- 37 Karel M, Tannenbaum SR, Wallace DH and Maloney H, Autoxidation of methyl linoleate in freeze-dried model systems. III. Effects of added amino acids. *J Food Sci* **31**:892–896 (1966).
- 38 Díaz-Castro J, Hijano S, Alférez MJM, López-Aliaga I, Nestares T, López-Frías M, et al., Goat milk consumption protects DNA against damage induced by chronic iron overload in anaemic rats. *Int Dairy J* **20**:495–499 (2010).
- 39 Diaz-Castro J, Sanchez-Alcover A, Hijano S, Alferez MJ, Nestares T, Moreno M, et al., Goat milk supplemented with folic acid protects cell biomolecules from oxidative stress-mediated damage after anaemia recovery in comparison with cow milk. *Eur J Nutr* **53**:1165–1175 (2014).
- 40 Banala RR and Karnati PR, Vitamin A deficiency: an oxidative stress marker in sodium fluoride (NaF) induced oxidative damage in developing rat brain. *Int J Dev Neurosci* **47B**:298–303 (2015).
- 41 Epand RM and Vogel HJ, Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim Biophys Acta* **1462**:11–28 (1999).
- 42 Hancock RE and Diamond G, The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol* **8**:402–410 (2000).
- 43 Diaz-Castro J, Ramirez Lopez-Frias M, Campos MS, Lopez-Frias M, Alferez MJ, Nestares T, et al., Goat milk during iron repletion improves bone turnover impaired by severe iron deficiency. *J Dairy Sci* **94**:2752–2761 (2011).



- 44 Hamden K, Carreau S, Jamoussi K, Miladi S, Lajmi S, Aloulou D, et al., $1\alpha,25$ Dihydroxyvitamin D₃: therapeutic and preventive effects against oxidative stress, hepatic, pancreatic and renal injury in alloxan-induced diabetes in rats. *J Nutr Sci Vitaminol* **55**:215–222 (2009).
- 45 Sardar S, Chakraborty A and Chatterjee M, Comparative effectiveness of vitamin D₃ and dietary vitamin E on peroxidation of lipids and enzymes of the hepatic antioxidant system in Sprague–Dawley rats. *Int J Vitam Nutr Res* **66**:39–45 (1996).
- 46 Stralin P and Marklund SL, Multiple cytokines regulate the expression of extracellular superoxide dismutase in human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* **151**:433–441 (2000).
- 47 Nikooyeh B, Neyestani TR, Tayebinejad N, Alavi-Majd H, Shariatzadeh N, Kalayi A, et al., Daily intake of vitamin D- or calcium-vitamin D-fortified Persian yogurt drink (doogh) attenuates diabetes-induced oxidative stress: evidence for antioxidative properties of vitamin D. *J Hum Nutr Diet* **27**(Suppl. s2):276–283 (2014).
- 48 Moreno-Fernandez J, Diaz-Castro J, Alferez MJ, Nestares T, Ochoa JJ, Sanchez-Alcover A, et al., Fermented goat milk consumption improves melatonin levels and influences positively the antioxidant status during nutritional ferropenic anemia recovery. *Food Funct* **7**:834–842 (2016).
- 49 Ghosh G, De K, Maity S, Bandyopadhyay D, Bhattacharya S, Reiter RJ, et al., Melatonin



protects against oxidative damage and restores expression of GLUT4 gene in the hyperthyroid rat heart. *J Pineal Res* **42**:71–82 (2007).

50 Ciftci M, Bilici D and Kufrevioglu OI, Effects of melatonin on enzyme activities of glucose-6-phosphate ehydrogenase from

human erythrocytes in vitro and from rat erythrocytes in vivo. *Pharmacol Res* **44**:7–11 (2001).

51 Kumaravel TS and Jha AN, Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals. *Mutat Res* **605**:7–16 (2006).

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

Tras analizar los resultados obtenidos, se han alcanzado las siguientes conclusiones:

Primera conclusión

Las dietas basadas en leche fermentada de cabra aumentan la expresión génica y proteica de Dcytb, a nivel intestinal y DMT1 y FPN1 en duodeno e hígado, proteínas clave implicadas en la homeostasis del hierro, indicando no sólo una mejor recuperación hematológica, sino también una mayor movilización de hierro desde su almacenamiento hepático hasta los órganos diana, provocando un efecto hepatoprotector durante la sobrecarga de hierro.

Segunda conclusión

La baja regulación de la hepcidina a nivel duodenal, tras el consumo de las dietas basadas en leche fermentada de cabra, aumentó el flujo de hierro desde las células duodenales a los tejidos, favoreciendo la hematopoyesis lo que lleva a una mejor absorción de hierro y recuperación de la anemia. Además la menor expresión de la hepcidina hepática aumenta el flujo de salida de hierro de los hepatocitos a la circulación general, dada la correlación inversa entre la expresión de hepcidina y FPN1.

Tercera conclusión

Las dietas basadas en leche fermentada de cabra aumentan la expresión génica de FTL1 a nivel duodenal y hepático, asegurando un mayor secuestro intestinal de hierro y mejorando su almacenamiento hepático, hecho que se explica por el aumento de expresión de las proteínas DMT1 y FPN1. Además, la sobrecarga de hierro aumenta la expresión génica de FTL1, como un mecanismo compensatorio para evitar el daño oxidativo a las principales biomoléculas, debido al carácter pro-oxidante de este mineral.

Cuarta conclusión

La deficiencia de hierro conduce a una mayor producción de hidroperóxidos en eritrocitos, hígado y mucosa duodenal, como consecuencia de las alteraciones estructurales de la membrana celular. Sin embargo, este daño oxidativo es específico de los lípidos, ya que no se ha registrado un aumento de estrés oxidativo en las proteínas, prostaglandinas o ADN, debido a la deficiencia de hierro.

Quinta conclusión

El consumo de dieta basada en leche fermentada de cabra induce un efecto protector en plasma, eritrocitos, hígado y cerebro, disminuyendo los niveles de hidroperóxidos, grupos carbonilo e isoprostanos y aumentando el estado antioxidante total, lo que se correlaciona directamente con la mayor expresión génica y actividad hepática de las enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx, GR, revelando un menor estrés oxidativo inducido durante la recuperación de la anemia ferropénica nutricional.

Sexta conclusión

La dieta basada en leche fermentada de cabra tiene un papel positivo en la estabilidad genómica, reduciendo la fragmentación de la doble hélice de ADN y los niveles de 8-OHdG, debido a la alta biodisponibilidad de magnesio y zinc, que mejora la estabilidad genómica y promueve la reparación del material genético.

Conclusión General

La dieta basada en leche fermentada de cabra, en comparación con la de vaca, resulta ser más beneficiosa en la recuperación de los efectos nocivos causados por la deficiencia de hierro, ya que induce una adaptación fisiológica intestinal y hepática de los genes y proteínas clave relacionados con la homeostasis del hierro. Además, el consumo de esta dieta induce un efecto protector en las principales biomoléculas, al disminuir los biomarcadores de daño oxidativo y aumentar el estado antioxidante total, que se correlacionan directamente con la expresión y actividad de las enzimas antioxidantes, durante la recuperación de la anemia.

CONCLUSIONS



6. CONCLUSIONS

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

First conclusion

Fermented goat milk-based diets increase gene and protein expression of Dcytb (in duodenum), DMT1 and FPN1 (in duodenum and liver), key proteins involved in iron homeostasis, indicating not only a better hematological recovery, but also greater iron mobilization from liver storage to target organs, revealing a hepatoprotective effect during iron overload.

Second conclusion

The downregulation of hepcidin at duodenal level, after fermented goat milk-based diets consumption, increases the iron efflux from the duodenal cells to the target tissues, favoring hematopoiesis, which leads to better iron absorption and anemia recovery. Furthermore, the decreased expression of hepatic hepcidin increases iron efflux from hepatocytes to the general circulation, due the inverse correlation of hepcidin and FPN1 expression.



Third conclusion

Fermented goat milk-based diets increase FTL1 gene expression at the duodenal and hepatic level, ensuring greater intestinal iron sequestration and improving its hepatic storage, a fact that is explained by the increased protein expression of DMT1 and FPN1. Furthermore, iron overload increases FTL1 gene expression, as a compensatory mechanism to avoid oxidative damage to the main biomolecules, due to the pro-oxidative character of this mineral.

Fourth conclusion

Iron deficiency leads to an increased production of hydroperoxides in erythrocytes, liver and duodenal mucosa, as a consequence of structural alterations of the cell membrane. However, this oxidative damage is lipid-specific, since no increase in oxidative stress has been recorded in proteins, prostaglandins or DNA, due to iron deficiency.



Fifth conclusion

Fermented goat milk-based diet consumption induces a protective effect in plasma, erythrocytes, liver and brain, decreasing the levels of hydroperoxides, carbonyl groups and isoprostanes and increasing the total antioxidant status, which is directly correlated with the highest gene expression and liver activity of the antioxidant enzymes SOD, CAT, GPx, GR, revealing lower oxidative stress evoked during nutritional iron deficiency anemia recovery.

Sixth conclusion

Fermented goat milk-based diet has a positive role in genomic stability, reducing DNA strand breaks and 8-OHdG levels, due to the high bioavailability of magnesium and zinc, which improves genomic stability and promotes the genetic material repairing.

Overall conclusion

Fermented goat milk-based diet, compared to cow milk based diet, is more beneficial in the recovery of the deleterious effects caused by iron deficiency, since it induces a physiological intestinal and hepatic adaptation of the key genes and proteins related with iron homeostasis. Furthermore, the consumption of this diet induces a protective effect on the main biomolecules, by decreasing the oxidative damage biomarkers and increasing total antioxidant status, which are directly correlated with the expression and activity of antioxidant enzymes, during the anemia recovery.

REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS



7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AASA. (s.f.). Agencia Aragonesa de Seguridad Alimentaria. Leches Fermentadas: Aspectos Nutritivos, Tecnológicos y Probióticos más relevantes. In D. Pérez Cabrejas & L. Sánchez Paniagua (Eds.): Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos.
- Abbaspour, N., Hurrell, R., & Kelishadi, R. Review on iron and its importance for human health. *J Res Med Sci.* 2014; *19*(2), 164-174.
- Abeijón Mukdsi, M. C., Haro, C., González, S. N., & Medina, R. B. Functional goat milk cheese with feruloyl esterase activity. *J Funct Foods.* 2013; *5*(2), 801-809.
- Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; *105*, 121-126.
- Aggett, P. J. Population reference intakes and micronutrient bioavailability: a European perspective. *Am J Clin Nutr.* 2010; *91*(5), 1433s-1437s.
- Agnihotri, M. K., & Prasad, V. S. S. Biochemistry and processing of goat milk and milk products. *Small Rumin Res.* 1993; *12*(2), 151-170.
- Aisen, P., Enns, C., & Wessling-Resnick, M. Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001; *33*(10), 940-959.
- Al-Saadi, J. S., Shaker, K. A., & Ustunol, Z. Effect of heat and transglutaminase on solubility of goat milk protein-based films. *Int J Dairy Technol.* 2014; *67*(3), 420-426.
- Alfárez, M. J., Barrionuevo, M., López Aliaga, I., Sanz-Sampelayo, M. R., Lisbona, F., Robles, J. C., et al. Digestive utilization of goat and cow milk fat in malabsorption syndrome. *J Dairy Res.* 2001; *68*(3), 451-461.



- Alfárez, M. J. M., López-Aliaga, I., Nestares, T., Díaz-Castro, J., Barrionuevo, M., Ros, P. B., et al. Dietary goat milk improves iron bioavailability in rats with induced ferropenic anaemia in comparison with cow milk. *Int Dairy J.* 2006; 16(7), 813-821.
- Almaas, H., Cases, A. L., Devold, T. G., Holm, H., Langsrud, T., Aabakken, L., et al. In vitro digestion of bovine and caprine milk by human gastric and duodenal enzymes. *Int Dairy J.* 2006; 16(9), 961-968.
- Alleyne, M., Horne, M. K., & Miller, J. L. Individualized treatment for iron-deficiency anemia in adults. *Am J Med.* 2008; 121(11), 943-948.
- Amigo, L., & Fontecha, J. Milk. Goat Milk. In: J. W. Fuquay, editor. *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*. San Diego: Academic Press; 2011. p. 484-493.
- An, S. Y., Lee, M. S., Jeon, J. Y., Ha, E. S., Kim, T. H., Yoon, J. Y., et al. Beneficial effects of fresh and fermented kimchi in prediabetic individuals. *Ann Nutr Metab.* 2013; 63(1-2), 111-119.
- Anderson, G. J., & Frazer, D. M. Current understanding of iron homeostasis. *Am J Clin Nutr.* 2017; 106(Suppl 6), 1559S-1566S.
- Anderson, G. J., Frazer, D. M., & McLaren, G. D. Iron absorption and metabolism. *Curr Opin Gastroenterol.* 2009; 25(2), 129-135.
- AOAC. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 18th ed. Arlington: Association of Official Analytical Chemists; 2005.
- Arosio, P., Carmona, F., Gozzelino, R., Maccarinelli, F., & Poli, M. The importance of eukaryotic ferritins in iron handling and cytoprotection. *Biochem J.* 2015; 472(1), 1-15.



- Arosio, P., & Levi, S. Cytosolic and mitochondrial ferritins in the regulation of cellular iron homeostasis and oxidative damage. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1800(8), 783-792.
- Aryana, K. J., & Olson, D. W. A 100-Year Review: Yogurt and other cultured dairy products. *J Dairy Sci*. 2017; 100(12), 9987-10013.
- Asresie, A., & Adugna, M. Bioactive properties of goat milk: it's hypoallergenic, nutritional and therapeutic significance: a review. *Glob J Anim Sci Res*. 2014; 2(4), 315–320.
- Assis, P. O. A., Guerra, G. C. B., Araújo, D. F. d. S., Araújo Júnior, R. F., Machado, T. A. D. G., Araújo, A. A. d., et al. Intestinal anti-inflammatory activity of goat milk and goat yoghurt in the acetic acid model of rat colitis. *Int Dairy J*. 2016; 56, 45-54.
- Auerbach, M., & Adamson, J. W. How we diagnose and treat iron deficiency anemia. *Am J Hematol*. 2016; 91(1), 31-38.
- Auerbach, M., Strauss, W., Auerbach, S., Rineer, S., & Bahrain, H. Safety and efficacy of total dose infusion of 1,020 mg of ferumoxytol administered over 15 min. *Am J Hematol*. 2013; 88(11), 944-947.
- Balk, J., Connorton, J. M., Wan, Y., Lovegrove, A., Moore, K. L., Uauy, C., et al. Improving wheat as a source of iron and zinc for global nutrition. *Nutr Bull*. 2019; 44(1), 53-59.
- Ballabio, C., Chessa, S., Rignanese, D., Gigliotti, C., Pagnacco, G., Terracciano, L., et al. Goat milk allergenicity as a function of α S1-casein genetic polymorphism. *J Dairy Sci*. 2011; 94(2), 998-1004.



- Baró, L., Lara, F., & Corral, E. Composición y calidad nutritiva de los alimentos .
Lácteos y derivados lácteos. In: A. Gil Hernández, editor. Tratado de nutrición
(Tomo II). 2ª ed ed. Madrid: Médica Panamericana; 2010.
- Barragán-Ibañez, G., Santoyo-Sánchez, A., & Ramos-Peñañiel, C. O. Iron deficiency
anaemia. *Rev Med Hosp Gen (Mex)*. 2016; 79(2), 88-97.
- Barrionuevo, M., Alferez, M. J., Lopez, A. I., Sanz, S. M., & Campos, M. S. Beneficial
effect of goat milk on nutritive utilization of iron and copper in malabsorption
syndrome. *J Dairy Sci*. 2002; 85(3), 657-664.
- Barrionuevo, M., López Aliaga, I., Alférez, M. J., Mesa, E., Nestáres, T., & Campos, M.
S. Beneficial effect of goat milk on bioavailability of copper, zinc and selenium
in rats. *J Physiol Biochem*. 2003; 59(2), 111-118.
- Bauman, D. E., Tyburczy, C., O'Donnell, A. M., & Lock, A. L. Milk Lipids.
Conjugated Linoleic Acid. In: J. W. Fuquay, editor. Encyclopedia of Dairy
Sciences (Second Edition). San Diego: Academic Press; 2011. p. 660-664.
- Beard, J. L. Iron biology in immune function, muscle metabolism and neuronal
functioning. *J Nutr*. 2001; 131(2s-2), 568S-579S.
- Beard, J. L., & Dawson, H. D. Iron. In: B. L. O'Dell & R. A. Sunde, editors. Handbook
of Nutritionally Essential Mineral Elements. New York: CRC Press; 1997. p.
275-334.
- Belury, M. A. Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and
mechanisms of action. *Annu Rev Nutr*. 2002; 22, 505-531.
- Bentinger, M., Tekle, M., & Dallner, G. Coenzyme Q biosynthesis and functions.
Biochem Biophys Res Commun. 2010; 396(1), 74-79.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. Biochemistry. 6th ed. New York: W H
Freeman & Co; 2007.



- Besarab, A., Hörl, W. H., & Silverberg, D. Iron metabolism, iron deficiency, thrombocytosis, and the cardiorenal anemia syndrome. *Oncologist*. 2009; 14 (1), 22-33.
- Bhagavan, H. N., & Chopra, R. K. Plasma coenzyme Q10 response to oral ingestion of coenzyme Q10 formulations. *Mitochondrion*. 2007; 7, S78-88.
- Bidot Fernández, A. La cabra como productora de leche. Memorias CD III Congreso Internacional sobre Mejoramiento Animal. La Habana, Cuba2006.
- Bidot Fernández, A. Composición, cualidades y beneficios de la leche de cabra: revisión bibliográfica. *Rev prod anim* 2017; 29, 32-41.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J*. 2012; 5(1), 9-19.
- Bircher, A. J., & Auerbach, M. Hypersensitivity from intravenous iron products. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2014; 34(3), 707-723.
- Blanco-Rojo, R., & Vaquero, M. P. Iron bioavailability from food fortification to precision nutrition. A review. *Innov Food Sci Emerg Technol*. 2019; 51, 126-138.
- Blatt, T., & Littarru, G. P. Biochemical rationale and experimental data on the antiaging properties of CoQ(10) at skin level. *Biofactors*. 2011; 37(5), 381-385.
- Bochkov, V. N., Oskolkova, O. V., Birukov, K. G., Levonen, A. L., Binder, C. J., & Stöckl, J. Generation and biological activities of oxidized phospholipids. *Antioxid Redox Signal*. 2010; 12(8), 1009-1059.
- Boyazoglu, J., & Morand-Fehr, P. Mediterranean dairy sheep and goat products and their quality. A critical review. *Small Rumin Res*. 2001; 40(1), 1-11.
- Breyman, C. Iron Deficiency Anemia in Pregnancy. *Semin Hematol*. 2015; 52(4), 339-347.



- Brieger, K., Schiavone, S., Miller, F. J., Jr., & Krause, K. H. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly*. 2012; 142, w13659.
- Brigelius-Flohé, R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med*. 1999; 27(9-10), 951-965.
- Bruick, R. K. Oxygen sensing in the hypoxic response pathway: regulation of the hypoxia-inducible transcription factor. *Genes Dev*. 2003; 17(21), 2614-2623.
- Burke, W., Imperatore, G., & Reyes, M. Iron deficiency and iron overload: effects of diet and genes. *Proc Nutr Soc*. 2001; 60(1), 73-80.
- Cadet, J., Davies, K. J. A., Medeiros, M. H., Di Mascio, P., & Wagner, J. R. Formation and repair of oxidatively generated damage in cellular DNA. *Free Radic Biol Med*. 2017; 107, 13-34.
- Cairo, G., Tacchini, L., Pogliaghi, G., Anzon, E., Tomasi, A., & Bernelli-Zazzera, A. Induction of ferritin synthesis by oxidative stress: transcriptional and post-transcriptional regulation by expansion of the “free” iron pool. *J Biol Chem*. 1995; 270(2), 700-703.
- Camaschella, C. Iron-deficiency anemia. *N Engl J Med*. 2015; 372(19), 1832-1843.
- Camaschella, C. New insights into iron deficiency and iron deficiency anemia. *Blood Rev*. 2017; 31(4), 225-233.
- Camaschella, C. Iron deficiency. *Blood*. 2019; 133(1), 30-39.
- Camaschella, C., & Nai, A. Ineffective erythropoiesis and regulation of iron status in iron loading anaemias. *Br J Haematol*. 2016; 172(4), 512-523.
- Cea Bonilla, A., del Arenal Mena, I. P., Riveros Rosas, H., & Vázquez-Contreras, E. Mensaje bioquímico. México: Dpto. Bioquímica. Fac. Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México; 2002.



- Ceapa, C., Wopereis, H., Rezaiki, L., Kleerebezem, M., Knol, J., & Oozeer, R. Influence of fermented milk products, prebiotics and probiotics on microbiota composition and health. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2013; 27(1), 139-155.
- Ceballos, L. S., Morales, E. R., de la Torre Adarve, G., Castro, J. D., Martínez, L. P., & Sampelayo, M. R. S. Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology. *J Food Compost Anal.* 2009; 22(4), 322-329.
- Clark, S., & Mora García, M. B. A 100-Year Review: Advances in goat milk research. *J Dairy Sci.* 2017; 100(12), 10026-10044.
- Clark, S., & Sherbon, J. W. Alphas1-casein, milk composition and coagulation properties of goat milk. *Small Rumin Res.* 2000; 38(2), 123-134.
- Coad, J., & Pedley, K. Iron deficiency and iron deficiency anemia in women. *Scand J Clin Lab Invest.* 2014; 74(244), 82-89.
- Coates, T. D. Physiology and pathophysiology of iron in hemoglobin-associated diseases. *Free Radic Biol Med.* 2014; 72, 23-40.
- Cohen-Solal, A., Damy, T., Terbah, M., Kerebel, S., Baguet, J. P., Hanon, O., et al. High prevalence of iron deficiency in patients with acute decompensated heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2014; 16(9), 984-991.
- Cook, J. D. Diagnosis and management of iron-deficiency anaemia. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2005; 18(2), 319-332.
- Cooney, R. V., Dai, Q., Gao, Y. T., Chow, W. H., Franke, A. A., Shu, X. O., et al. Low plasma coenzyme Q(10) levels and breast cancer risk in Chinese women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011; 20(6), 1124-1130.
- Corthier, G. Los beneficios de los probióticos para la salud: Danone Nutritopics; 2004.



- Couto, N., Malys, N., Gaskell, S. J., & Barber, J. Partition and turnover of glutathione reductase from *Saccharomyces cerevisiae*: a proteomic approach. *J Proteome Res.* 2013; 12(6), 2885-2894.
- Cracowski, J. L., Durand, T., & Bessard, G. Isoprostanes as a biomarker of lipid peroxidation in humans: physiology, pharmacology and clinical implications. *Trends Pharmacol Sci.* 2002; 23(8), 360-366.
- Crapo, J. D., McCord, J. M., & Fridovich, I. Preparation and assay of superoxide dismutases. *Methods Enzymol.* 1978; 53, 382-393.
- Cunsolo, V., Fasoli, E., Saletti, R., Muccilli, V., Gallina, S., Righetti, P. G., et al. Zeus, Aesculapius, Amalthea and the proteome of goat milk. *J Proteomics.* 2015; 128, 69-82.
- Chabory, E., Damon, C., Lenoir, A., Kauselmann, G., Kern, H., Zevnik, B., et al. Epididymis seleno-independent glutathione peroxidase 5 maintains sperm DNA integrity in mice. *J Clin Invest.* 2009; 119(7), 2074-2085.
- Cheeseman, K. H., & Slater, T. F. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull.* 1993; 49(3), 481-493.
- Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P. C. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci.* 2004; 61(2), 192-208.
- Chemmanur, A. T., & Bonkovsky, H. L. Hepatic porphyrias: diagnosis and management. *Clin Liver Dis.* 2004; 8(4), 807-838.
- Chondrogianni, N., Petropoulos, I., Grimm, S., Georgila, K., Catalgol, B., Friguet, B., et al. Protein damage, repair and proteolysis. *Mol Aspects Med.* 2014; 35, 1-71.
- Daddaoua, A., Puerta, V., Requena, P., Martínez-Férez, A., Guadix, E., de Medina, F. S., et al. Goat milk oligosaccharides are anti-inflammatory in rats with hapten-induced colitis. *J Nutr.* 2006; 136(3), 672-676.



- Dasa, F., & Abera, T. Factors Affecting Iron Absorption and Mitigation Mechanisms: A review. *Int J Agric Sc Food Technol* 2018; 4(1), 24-30.
- de Benoist, B., McLean, E., Egli, I., & Cogswell, M. Worldwide prevalence of anaemia 1993-2005. WHO Global Database on Anaemia. Geneva: World Health Organization; 2008.
- De Bont, R., & van Larebeke, N. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis*. 2004; 19(3), 169-185.
- de Oliveira, M. N. Fermented milks. Fermented Milks and Yogurt. In: C. A. Batt & M. L. Tortorello, editors. *Encyclopedia of Food Microbiology* (Second Edition). Oxford: Academic Press; 2014. p. 908-922.
- De Sandro, V., Chevrier, M., Boddaert, A., Melcion, C., Cordier, A., & Richert, L. Comparison of the effects of propylthiouracil, amiodarone, diphenylhydantoin, phenobarbital, and 3-methylcholanthrene on hepatic and renal T4 metabolism and thyroid gland function in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1991; 111(2), 263-278.
- Debski, B., Picciano, M. F., & Milner, J. A. Selenium content and distribution of human, cow and goat milk. *J Nutr*. 1987; 117(6), 1091-1097.
- Derrien, M., & van Hylckama Vlieg, J. E. Fate, activity, and impact of ingested bacteria within the human gut microbiota. *Trends Microbiol*. 2015; 23(6), 354-366.
- Déry, M. A., Michaud, M. D., & Richard, D. E. Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005; 37(3), 535-540.
- Detzel, P., & Wieser, S. Food fortification for addressing iron deficiency in filipino children: benefits and cost-effectiveness. *Ann Nutr Metab*. 2015; 66(2), 35-42.



- Dev, S., & Babitt, J. L. Overview of iron metabolism in health and disease. *Hemodial Int.* 2017; 21 (1), S6-S20.
- Devore, E. E., Harrison, S. L., Stone, K. L., Holton, K. F., Barrett-Connor, E., Ancoli-Israel, S., et al. Association of urinary melatonin levels and aging-related outcomes in older men. *Sleep Med.* 2016; 23, 73-80.
- Dhalla, N. S., Temsah, R. M., & Netticadan, T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens.* 2000; 18(6), 655-673.
- Díaz-Castro, J., Alférez, M. J. M., López-Aliaga, I., Nestares, T., & Campos, M. S. Effect of calcium-supplemented goat or cow milk on zinc status in rats with nutritional ferropenic anaemia. *Int Dairy J.* 2009; 19(2), 116-121.
- Díaz-Castro, J., Pérez-Sánchez, L. J., Ramírez López-Frías, M., López-Aliaga, I., Nestares, T., Alférez, M. J., 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), 1-8.
- Díaz-Castro, J., Ramírez López-Frías, M., Campos, M. S., López-Frías, M., Alférez, M. J. M., Nestares, T., et al. Goat milk during iron repletion improves bone turnover impaired by severe iron deficiency. *J Dairy Sci.* 2011; 94(6), 2752-2761.
- Diaz-Vivancos, P., de Simone, A., Kiddle, G., & Foyer, C. H. Glutathione--linking cell proliferation to oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2015; 89, 1154-1164.
- Drakesmith, H., & Prentice, A. Viral infection and iron metabolism. *Nat Rev Microbiol.* 2008; 6(7), 541-552.
- Drakesmith, H., & Prentice, A. M. Hepcidin and the iron-infection axis. *Science.* 2012; 338(6108), 768-772.
- Dröge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002; 82(1), 47-95.



- Du, J., Cullen, J. J., & Buettner, G. R. Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1826(2), 443-457.
- Eboh, A. S. Biochemistry of Free Radicals and Antioxidants. *Sch Acad J Biosci*. 2014; 2(2), 110-118.
- EFSA. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for iron. *EFSA Journal*. 2015; 13(10), 115.
- El-Agamy, E. I. The challenge of cow milk protein allergy. *Small Rumin Res*. 2007; 68(1), 64-72.
- Elstrott, B., Khan, L., Olson, S., Raghunathan, V., & DeLoughery, T. The role of iron repletion in adult iron deficiency anemia and other diseases. *Eur J Haematol*. 2020; 104(3), 153-161.
- Elwood, P. C., Pickering, J. E., Givens, D. I., & Gallacher, J. E. The consumption of milk and dairy foods and the incidence of vascular disease and diabetes: an overview of the evidence. *Lipids*. 2010; 45(10), 925-939.
- Ems, T., St Lucia, K., & Huecker, M. Biochemistry, Iron Absorption: Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020.
- Ercal, N., Gurer-Orhan, H., & Aykin-Burns, N. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr Top Med Chem*. 2001; 1(6), 529-539.
- Ercan, P., & El, S. N. Changes in content of coenzyme Q10 in beef muscle, beef liver and beef heart with cooking and in vitro digestion. *J Food Compost Anal*. 2011; 24(8), 1136-1140.
- FAO/WHO. CODEX Standard for Fermented Milks. 2nd ed. Rome: World Health Organization; 2010.



- FAO/STAT. (2012). Producción y productos lácteos: composición de la leche. Disponible en: www.fao.org/dairy-production-products/composicion-de-la-leche/es/.
- Fauci, A. S., & Morens, D. M. Zika Virus in the Americas — Yet Another Arbovirus Threat. *N Engl J Med.* 2016; 374(7), 601-604.
- Fazilah, N. F., Ariff, A. B., Khayat, M. E., Rios-Solis, L., & Halim, M. Influence of probiotics, prebiotics, synbiotics and bioactive phytochemicals on the formulation of functional yogurt. *J Funct Foods.* 2018; 48, 387-399.
- Fernández Fernández, E., Martínez Hernández, J. A., Martínez Suárez, V., Moreno Villares, J. M., Collado Yurrita, L. R., Hernández Cabria, M., et al. Documento de Consenso: importancia nutricional y metabólica de la leche. *Nutr Hosp.* 2015; 31, 92-101.
- Finkel, T., & Holbrook, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* 2000; 408(6809), 239-247.
- Fiocchi, A., Brozek, J., Schünemann, H., Bahna, S. L., von Berg, A., Beyer, K., et al. World Allergy Organization (WAO) Diagnosis and Rationale for Action against Cow's Milk Allergy (DRACMA) Guidelines. *World Allergy Organ J* 2010; 3(4), 57-161.
- Fleming, A. M., Alshykhly, O., Zhu, J., Muller, J. G., & Burrows, C. J. Rates of chemical cleavage of DNA and RNA oligomers containing guanine oxidation products. *Chem Res Toxicol.* 2015; 28(6), 1292-1300.
- Fleming, R. E., & Ponka, P. Iron overload in human disease. *N Engl J Med.* 2012; 366(4), 348-359.
- Flohé, L., & Günzler, W. A. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 1984; 105, 114-121.



- Forgione, M. A., Weiss, N., Heydrick, S., Cap, A., Klings, E. S., Bierl, C., et al. Cellular glutathione peroxidase deficiency and endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002; 282(4), H1255-1261.
- Fridovich, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem*. 1995; 64, 97-112.
- Ganz, T. Systemic iron homeostasis. *Physiol Rev*. 2013; 93(4), 1721-1741.
- García, V., Rovira, S., Boutoia, K., & López, M. B. Improvements in goat milk quality: A review. *Small Rumin*. 2014; 121, 51-57.
- Gaschler, M. M., & Stockwell, B. R. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017; 482(3), 419-425.
- Ge, C., Spänning, E., Glaser, E., & Wieslander, A. Import determinants of organelle-specific and dual targeting peptides of mitochondria and chloroplasts in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant*. 2014; 7(1), 121-136.
- Gill, S. S., Anjum, N. A., Hasanuzzaman, M., Gill, R., Trivedi, D. K., Ahmad, I., et al. Glutathione and glutathione reductase: a boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiol Biochem*. 2013; 70, 204-212.
- Gill, S. S., & Tuteja, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem*. 2010; 48(12), 909-930.
- Giorgio, D., Di Trana, A., & Claps, S. Oligosaccharides, polyamines and sphingolipids in ruminant milk. *Small Rumin Res*. 2018; 160, 23-30.
- Girelli, D., Marchi, G., & Camaschella, C. Anemia in the Elderly. *HemaSphere*. 2018; 2(3), e40.
- Goddard, A. F., James, M. W., McIntyre, A. S., & Scott, B. B. Guidelines for the management of iron deficiency anaemia. *Gut*. 2011; 60(10), 1309-1316.



- Godic, A., Poljšak, B., Adamic, M., & Dahmane, R. The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment. *Oxid Med Cell Longev*. 2014; 2014, 860479.
- Goodnough, L. T., Levy, J. H., & Murphy, M. F. Concepts of blood transfusion in adults. *Lancet*. 2013; 381(9880), 1845-1854.
- Góth, L., Rass, P., & Páy, A. Catalase enzyme mutations and their association with diseases. *Mol Diagn*. 2004; 8(3), 141-149.
- Gul, K., Tak, A., Singh, A. K., Singh, P., Yousuf, B., & Wani, A. A. Chemistry, encapsulation, and health benefits of β -carotene: a review. *Cogent Food Agric*. 2015; 1(1), 1-12.
- Gulec, S., Anderson, G. J., & Collins, J. F. Mechanistic and regulatory aspects of intestinal iron absorption. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2014; 307(4), G397-409.
- Gupta, R., Musallam, K. M., Taher, A. T., & Rivella, S. Ineffective Erythropoiesis: Anemia and Iron Overload. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2018; 32(2), 213-221.
- Gutteridge, J. M. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chem Biol Interact*. 1994; 91(2-3), 133-140.
- Guzik, T. J., West, N. E., Black, E., McDonald, D., Ratnatunga, C., Pillai, R., et al. Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ Res*. 2000; 86(9), E85-90.
- Haenlein, G. F. W. Goat milk in human nutrition. *Small Rumin Res*. 2004; 51(2), 155-163.
- Halterman, J. S., Kaczorowski, J. M., Aligne, C. A., Auinger, P., & Szilagyi, P. G. Iron deficiency and cognitive achievement among school-aged children and adolescents in the United States. *Pediatrics*. 2001; 107(6), 1381-1386.



- Halliwell, B. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Clarendon Press; 2006.
- Halliwell, B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans*. 2007; 35(5), 1147-1150.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. *Free radicals in biology and medicine*. 5th ed. Oxford: Clarendon Press; 2015.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M., & Cross, C. E. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med*. 1992; 119(6), 598-620.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. Lipid peroxidation: a radical chain reaction. . *Free radicals in biology and medicine*. Oxford: Clarendon Press; 1985. p. 189-193.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. *Free radicals in biology and medicine*. 4th ed. Oxford, UK: Clarendon Press; 2007.
- Hanahan, D. J., & Ekholm, J. E. The preparation of red cell ghosts (membranes). *Methods Enzymol*. 1974; 31, 168-172.
- Hasnain, B. I., & Mooradian, A. D. Recent trials of antioxidant therapy: what should we be telling our patients? *Cleve Clin J Med*. 2004; 71(4), 327-334.
- Heidelbaugh, J. J. Proton pump inhibitors and risk of vitamin and mineral deficiency: evidence and clinical implications. *Ther Adv Drug Saf*. 2013; 4(3), 125-133.
- Hercberg, S., Preziosi, P., & Galan, P. Iron deficiency in Europe. *Public Health Nutr*. 2007; 4(2b), 537-545.
- Hilimire, M. R., DeVlyder, J. E., & Forestell, C. A. Fermented foods, neuroticism, and social anxiety: An interaction model. *Psychiatry Res*. 2015; 228(2), 203-208.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., et al. Expert consensus document. The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014; 11(8), 506-514.



- Hodgkinson, A. J., Wallace, O. A. M., Boggs, I., Broadhurst, M., & Prosser, C. G. Gastric digestion of cow and goat milk: Impact of infant and young child in vitro digestion conditions. *Food Chem.* 2018; 245, 275-281.
- Holm, C. Intravenous iron treatment in the puerperium. *Dan Med J.* 2018; 65(4).
- Horton, S. Food fortification in developing countries the economics of food fortification *J Nutr.* 2006; 136 1068-1071.
- Hunt, J. R., Zito, C. A., & Johnson, L. K. Body iron excretion by healthy men and women. *Am J Clin Nutr.* 2009; 89(6), 1792-1798.
- Hurrell, R. How to ensure adequate iron absorption from iron-fortified food. *Nutr Rev.* 2002; 60(7), S7-15.
- Hurrell, R., & Egli, I. Iron bioavailability and dietary reference values. *Am J Clin Nutr.* 2010; 91(5), 1461S-1467S.
- Hurrell, R., & Egli, I. Fortification chapter. In: R. T. Means, editor. Nutritional anemia: Scientific principles, clinical practice, and public health. 16: Cambridge University Press; 2019.
- Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria J Med.* 2018; 54(4), 287-293.
- Imdad, A., Yakoob, M. Y., Sudfeld, C., Haider, B. A., Black, R. E., & Bhutta, Z. A. Impact of vitamin A supplementation on infant and childhood mortality. *BMC Public Health.* 2011; 11 (3), S3-S20.
- Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel,



- Silicon, Vanadium, and Zinc. Washington (DC): National Academies Press (US); 2001.
- Iwasa, M., Aoi, W., Mune, K., Yamauchi, H., Furuta, K., Sasaki, S., et al. Fermented milk improves glucose metabolism in exercise-induced muscle damage in young healthy men. *Nutr J.* 2013; 12, 83.
- Jaeggi, T., Kortman, G. A., Moretti, D., Chassard, C., Holding, P., Dostal, A., et al. Iron fortification adversely affects the gut microbiome, increases pathogen abundance and induces intestinal inflammation in Kenyan infants. *Gut.* 2015; 64(5), 731-742.
- Jain, S., Yadav, H., & Sinha, P. R. Probiotic dahi containing *Lactobacillus casei* protects against *Salmonella enteritidis* infection and modulates immune response in mice. *J Med Food.* 2009; 12(3), 576-583.
- Jankowska, E. A., Malyszko, J., Ardehali, H., Koc-Zorawska, E., Banasiak, W., von Haehling, S., et al. Iron status in patients with chronic heart failure. *Eur Heart J.* 2013; 34(11), 827-834.
- Jasińska, B. The comparison of pepsin and trypsin action on goat, cow, mare and human caseins. *Rocz Akad Med Bialymst.* 1995; 40(3), 486-493.
- Jay, J. M. *Microbiología moderna de los alimentos.* 4^a ed: Editorial Acribia; 2002.
- Jenkins, T. C., & McGuire, M. A. Major advances in nutrition: impact on milk composition. *J Dairy Sci.* 2006; 89(4), 1302-1310.
- Jimenez, K., Kulnigg-Dabsch, S., & Gasche, C. Management of Iron Deficiency Anemia. *Gastroenterol Hepatol.* 2015; 11(4), 241-250.
- Joosten, E. Iron deficiency anemia in older adults: A review. *Geriatr Gerontol Int.* 2018; 18(3), 373-379.



- Juarez, M., & Ramos, M. Physico-chemical characteristics of goat milk as distinct from those of cow milk. *Int Dairy Bull.* 1986; 202, 54-67.
- Kalyankar, S. D., Khedkar, C. D., & Patil, A. M. Goat: Milk. In: B. Caballero, P. M. Finglas & F. Toldrá, editors. *Encyclopedia of Food and Health.* Oxford: Academic Press; 2016. p. 256-260.
- Karuppanapandian, T., Moon, J. C., Kim, C., Manoharan, K., & Kim, W. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Aust J Crop Sci.* 2011; 5, 709.
- Kassebaum, N. J., Jasrasaria, R., Naghavi, M., Wulf, S. K., Johns, N., Lozano, R., et al. A systematic analysis of global anemia burden from 1990 to 2010. *Blood.* 2014; 123(5), 615-624.
- Kato-Kataoka, A., Nishida, K., Takada, M., Kawai, M., Kikuchi-Hayakawa, H., Suda, K., et al. Fermented milk containing lactobacillus casei strain shirota preserves the diversity of the gut microbiota and relieves abdominal dysfunction in healthy medical students exposed to academic stress. *Appl Environ Microbiol.* 2016; 82(12), 3649-3658.
- Kautz, L., Jung, G., Valore, E. V., Rivella, S., Nemeth, E., & Ganz, T. Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism. *Nat Genet.* 2014; 46(7), 678-684.
- Khan, A., Singh, J., Upadhyay, V. K., Singh, A. V., & Shah, S. Microbial biofortification: a green technology through plant growth promoting microorganisms. In: S. Shah, V. Venkatramanan & R. Prasad, editors. *Sustainable green technologies for environmental management.* Singapore: Springer Singapore; 2019. p. 255-269.



- Khlebnikov, A. I., Schepetkin, I. A., Domina, N. G., Kirpotina, L. N., & Quinn, M. T. Improved quantitative structure-activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. *Bioorg Med Chem.* 2007; *15*(4), 1749-1770.
- Kiskini, A., & Difilippo, E. Oligosaccharides in goat milk: Structure, health effects and isolation. *Cell Mol Biol.* 2013; *59*(1), 25-30.
- Klaenhammer, T. R., Kleerebezem, M., Kopp, M. V., & Rescigno, M. The impact of probiotics and prebiotics on the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2012; *12*(10), 728-734.
- Kohen, R., & Nyska, A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol.* 2002; *30*(6), 620-650.
- Kojo, S. Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. *Curr Med Chem.* 2004; *11*(8), 1041-1064.
- Koletzko, S., Niggemann, B., Arato, A., Dias, J. A., Heuschkel, R., Husby, S., et al. Diagnostic approach and management of cow's-milk protein allergy in infants and children: ESPGHAN GI Committee practical guidelines. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012; *55*(2), 221-229.
- Korhonen, H., & Pihlanto, A. Technological options for the production of health-promoting proteins and peptides derived from milk and colostrum. *Curr Pharm Des.* 2007; *13*(8), 829-843.
- Krebs, J. E., Lewin, B., Kilpatrick, S. T., & Goldstein, E. S. Lewin's genes XI. Burlington, Mass: Jones & Bartlett Learning; 2014.
- Krishnamurthy, P., & Wadhvani, A. Antioxidant enzymes and human health. Antioxidant enzyme: InTech; 2012.



- Lad, S. S., Aparnathi, K. D., Mehta, B. M., & Velpula, S. Goat milk in human nutrition and health: a review. *Int J Curr Microbiol Appl Sci.* 2017; 6, 1781-1792.
- Lamounier, J. A., Capanema, F. D., Rocha Dda, S., de Oliveira, J. E., da Silva, M. C., & de Almeida, C. A. Iron fortification strategies for the control of childhood anemia in Brazil. *J Trop Pediatr.* 2010; 56(6), 448-451.
- 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(3), 477-488.
- Larocque, R., Casapia, M., Gotuzzo, E., & Gyorkos, T. W. Relationship between intensity of soil-transmitted helminth infections and anemia during pregnancy. *Am J Trop Med Hyg.* 2005; 73(4), 783-789.
- Laudon, M., & Frydman-Marom, A. Therapeutic effects of melatonin receptor agonists on sleep and comorbid disorders. *Int J Mol Sci.* 2014; 15(9), 15924-15950.
- Lavigne, C., Zee, J. A., Simard, R. E., & Béliveau, 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(1), 30-34.
- Le Blanc, S., Garrick, M. D., & Arredondo, M. Heme carrier protein 1 transports heme and is involved in heme-Fe metabolism. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2012; 302(12), C1780-1785.
- Lee, B.-J., Huang, Y.-C., Chen, S.-J., & Lin, P.-T. Coenzyme Q10 supplementation reduces oxidative stress and increases antioxidant enzyme activity in patients with coronary artery disease. *Nutrition* 2012; 28(3), 250-255.



- Lee, T., Clavel, T., Smirnov, K., Schmidt, A., Lagkouvardos, I., Walker, A., et al. Oral versus intravenous iron replacement therapy distinctly alters the gut microbiota and metabolome in patients with IBD. *Gut*. 2017; 66(5), 863-871.
- Levri, K. M., Ketvertis, K., Deramo, M., Merenstein, J. H., & D'Amico, F. Do probiotics reduce adult lactose intolerance? A systematic review. *J Fam Pract*. 2005; 54(7), 613-620.
- Li, W., Yang, Z., & Talashek, T. Blends for fermented milk products. *US Patents* 20130059032 A1. 2012.
- Lindsay, D. G., & Astley, S. B. European research on the functional effects of dietary antioxidants - EUROFEDA. *Mol Aspects Med*. 2002; 23(1-3), 1-38.
- Linster, C. L., & Van Schaftingen, E. Vitamin C. Biosynthesis, recycling and degradation in mammals. *Febs J*. 2007; 274(1), 1-22.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*. 2010; 4(8), 118-126.
- López-Alarcón, C., & Denicola, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. *Anal Chim Acta*. 2013; 763, 1-10.
- Lopez-Aliaga, I., Alferez, M. J., Barrionuevo, M., Nestares, T., Sanz Sampelayo, M. R., & Campos, M. S. Study of nutritive utilization of protein and magnesium in rats with resection of the distal small intestine. Beneficial effect of goat milk. *J Dairy Sci*. 2003; 86(9), 2958-2966.
- López-Aliaga, I., Alferez, M. J. M., Nestares, M. T., Ros, P. B., Barrionuevo, M., & Campos, M. S. Goat milk feeding causes an increase in biliary secretion of cholesterol and a decrease in plasma cholesterol levels in rats. *J Dairy Sci*. 2005; 88(3), 1024-1030.



- López-Aliaga, I., Díaz-Castro, J., Alférez, M. J. M., Barrionuevo, M., & Campos, M. S. A review of the nutritional and health aspects of goat milk in cases of intestinal resection. *Dairy Sci Technol.* 2010; 90(6), 611-622.
- López-Aliaga, I., García-Pedro, J. D., Moreno-Fernandez, J., Alférez, M. J. M., López-Frías, M., & Díaz-Castro, J. Fermented goat milk consumption improves iron status and evokes inflammatory signalling during anemia recovery. *Food Funct.* 2018; 9(6), 3195-3201.
- Lopez, A., Cacoub, P., Macdougall, I. C., & Peyrin-Biroulet, L. Iron deficiency anaemia. *Lancet.* 2016; 387(10021), 907-916.
- López Aliaga, I., Alférez, M. J., Barrionuevo, M., Lisbona, F., & Campos, M. S. Influence of goat and cow milk on the digestive and metabolic utilization of calcium and iron. *J Physiol Biochem.* 2000; 56(3), 201-208.
- Lorea Baroja, M., Kirjavainen, P. V., Hekmat, S., & Reid, G. Anti-inflammatory effects of probiotic yogurt in inflammatory bowel disease patients. *Clin Exp Allergy.* 2007; 149(3), 470-479.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193(1), 265-275.
- Lucca, P., Hurrell, R., & Potrykus, I. Fighting iron deficiency anemia with iron-rich rice. *J Am Coll Nutr.* 2002; 21(3), 184s-190s.
- Lynch, S. R. The impact of iron fortification on nutritional anaemia. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2005; 18(2), 333-346.
- Marco, M. L., Heeney, D., Binda, S., Cifelli, C. J., Cotter, P. D., Foligné, B., et al. Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Curr Opin Biotechnol.* 2017; 44, 94-102.



- Marcos, A. Puesta al día. Mesa redonda de nutrición y alimentos funcionales. *An Pediatr.* 2002; 56, 11-13.
- Maree, H. P. Goat milk an its use as hypo-allergenic infant food. *Dairy Goat Jour.* 1978; 43, 363-365.
- Marklund, S. L. Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *Biochem J.* 1984; 222(3), 649-655.
- Martín-Masot, R., Nestares, M. T., Diaz-Castro, J., López-Aliaga, I., Alférez, M. J. M., Moreno-Fernandez, J., et al. Multifactorial etiology of anemia in celiac disease and effect of gluten-free diet: a comprehensive review. *Nutrients.* 2019; 11(11), 2557.
- Martinez-Navarrete, N., Camacho, M. M., Martinez-Lahuerta, J., Martinez-Monzo, J., & Fito, P. Iron deficiency and iron fortified foods--a review. *Food Res Int.* 2002; 35(2/3), 225-231.
- Mataix, J., & Rivas, J. C. Leche y derivados lácteos. In: J. Mataix, editor. *Nutrición y alimentación humana (Tomo I)*. 2ª edición ed. Madrid: Ergon; 2015. p. 391-406.
- Matés, J. M., Pérez-Gómez, C., & Núñez de Castro, I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem.* 1999; 32(8), 595-603.
- Maulik, N., McFadden, D., Otani, H., Thirunavukkarasu, M., & Parinandi, N. L. Antioxidants in longevity and medicine. *Oxid Med Cell Longev.* 2013, 820679.
- May, J. M. Vitamin C transport and its role in the central nervous system. *Subcell Biochem.* 2012; 56, 85-103.
- Mayer, H. K., & Fiechter, G. Physicochemical characteristics of goat's milk in Austria – seasonal variations and differences between six breeds. *Dairy Sci Technol.* 2012; 92(2), 167-177.



- Mayo Clinic Medical Information. Drugs and supplements. Vitamin E. 2005.
- McBain, J. A., Eastman, A., Nobel, C. S., & Mueller, G. C. Apoptotic death in adenocarcinoma cell lines induced by butyrate and other histone deacetylase inhibitors. *Biochem Pharmacol.* 1997; 53(9), 1357-1368.
- McClelland, D. B. L. Handbook of transfusion medicine. . 4 ed: TSO (The Stationery Office); 2007.
- McCord, J. M. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med.* 2000; 108(8), 652-659.
- McDowell, L. Minerals in Animal and Human Nutrition 2nd Edition. Amsterdam: Elsevier Science; 2003.
- Mena, S., Ortega, A., & Estrela, J. M. Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. *Mutat Res.* 2009; 674(1-2), 36-44.
- Milne, G. L., Musiek, E. S., & Morrow, J. D. F2-isoprostanes as markers of oxidative stress in vivo: an overview. *Biomarkers.* 2005; 10 (1), S10-23.
- Miller, A. L. Antioxidant Flavonoids: Structure, Function and Clinical Usage. *Alt Med Rev.* 1996; 1, 103-111.
- Miller, E., Mrowicka, M., Malinowska, K., Mrowicki, J., Saluk-Juszczak, J., & Kędziora, J. The effects of whole-body cryotherapy on oxidative stress in multiple sclerosis patients. *J Therm Biol.* 2010; 35(8), 406-410.
- Miller, J. L. Iron deficiency anemia: a common and curable disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013; 3(7).
- Miyoshi, N., Oubrahim, H., Chock, P. B., & Stadtman, E. R. Age-dependent cell death and the role of ATP in hydrogen peroxide-induced apoptosis and necrosis. *Proc Natl Acad Sci.* 2006; 103(6), 1727-1731.



- Montuschi, P., Barnes, P. J., & Roberts, L. J., 2nd. Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *Faseb J.* 2004; *18*(15), 1791-1800.
- Moreiras, O., Carbajal, A., Cabrera, L., & Cuadrado, C. Tablas de composición de alimentos. Guía de prácticas. 19ª ed: Ediciones Pirámide (Grupo Anaya, SA); 2018.
- Moreno-Fernandez, J., Alférez, M. J. M., López-Aliaga, I., & Diaz-Castro, J. Protective effects of fermented goat milk on genomic stability, oxidative stress and inflammatory signalling in testis during anaemia recovery. *Sci Rep.* 2019b; *9*(1), 2232-2232.
- Moreno-Fernández, J., Díaz-Castro, J., Alférez, M. J., Hijano, S., Nestares, T., & López-Aliaga, I. Production and chemical composition of two dehydrated fermented dairy products based on cow or goat milk. *J Dairy Res.* 2016; *83*(1), 81-88.
- Moreno-Fernandez, J., Diaz-Castro, J., Pulido-Moran, M., Alferez, M. J. M., Nestares, T., & Lopez-Aliaga, I. Fermented goat milk consumption during anaemia recovery: ergogenic effect and improvement of skeletal muscle homeostasis. *Eur J Nutr.* 2017; *56*(7), 2277-2287.
- Moreno-Fernández, J., López-Aliaga, I., García-Burgos, M., Alférez, M. J. M., & Díaz-Castro, J. Fermented Goat Milk Consumption Enhances Brain Molecular Functions during Iron Deficiency Anemia Recovery. *Nutrients.* 2019a; *11*(10), 2394.
- Moreno-Fernandez, J., Ochoa, J. J., Latunde-Dada, G. O., & Diaz-Castro, J. Iron deficiency and iron homeostasis in low birth weight preterm infants: a systematic review. *Nutrients.* 2019c; *11*(5), 1090.



- Moretti, D., Goede, J. S., Zeder, C., Jiskra, M., Chatzinakou, V., Tjalsma, H., et al. Oral iron supplements increase hepcidin and decrease iron absorption from daily or twice-daily doses in iron-depleted young women. *Blood*. 2015; 126(17), 1981-1989.
- Morillas-Ruiz, J. M. Los antioxidantes en la prevención del estrés oxidativo en la actividad física. Spain: Editorial Planeta; 2010.
- Morón, Ú. M., & Castilla-Cortázar, I. Protection against oxidative stress and “IGF-I deficiency conditions. *Antioxidant Enzyme: IntechOpen*; 2012.
- Moya Arnao, M., Blanquer Blanquer, M., & Moraleda Jiménez, J. M. Anemias carenciales. *Medicine. Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*. 2016; 12(20), 1136-1147.
- Mozaffarian, D., Hao, T., Rimm, E. B., Willett, W. C., & Hu, F. B. Changes in diet and lifestyle and long-term weight gain in women and men. *N Engl J Med*. 2011; 364(25), 2392-2404.
- Muckenthaler, M. U., Rivella, S., Hentze, M. W., & Galy, B. A Red Carpet for Iron Metabolism. *Cell*. 2017; 168(3), 344-361.
- Muñoz Alférez, M. J., Muñoz-García, A., Moreno-Fernández, J., López-Aliaga, I., & Díaz-Castro, J. Fermented goat milk consumption improves cardiovascular health during anemia recovery. *J Sci Food Agric*. 2019; 99(1), 473-481.
- Muñoz, M., García-Erce, J. A., & Remacha Á, F. Disorders of iron metabolism. Part II: iron deficiency and iron overload. *J Clin Pathol*. 2011; 64(4), 287-296.
- Muñoz, M., Gómez-Ramírez, S., & Bhandari, S. The safety of available treatment options for iron-deficiency anemia. *Expert Opin Drug Saf*. 2018; 17(2), 149-159.
- Murray-Kolb, L., Chen, L., Chen, P., Shapiro, M., & Caulfield, L. (2012). *CHERG Iron report: maternal mortality, child mortality, perinatal mortality, child cognition,*



- and estimates of prevalence of anemia due to iron deficiency. Baltimore: CHERG.
- Musiek, E. S., Brooks, J. D., Joo, M., Brunoldi, E., Porta, A., Zanoni, G., et al. Electrophilic cyclopentenone neuroprostanes are anti-inflammatory mediators formed from the peroxidation of the omega-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid. *J Biol Chem.* 2008; 283(29), 19927-19935.
- Naidu, K. A. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *Nutr J.* 2003; 2, 1-10.
- Nandi, A., & Yan, L. J. Role of catalase in oxidative stress and age-associated degenerative diseases. 2019; 2019, 9613090.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. Fosforilación oxidativa y fotofosforilación. . Lehninger. Principios de Bioquímica. 5th ed. Barcelona: Ediciones Omega; 2008. p. 690–696.
- Nestares, T., Barrionuevo, M., Díaz-Castro, J., López-Aliaga, I., Alférez, M. J. M., & Campos, M. S. Calcium-enriched goats' milk aids recovery of iron status better than calcium-enriched cows' milk, in rats with nutritional ferropenic anaemia. *J Dairy Res.* 2008; 75(2), 153-159.
- Neuberger, A., Okebe, J., Yahav, D., & Paul, M. Oral iron supplements for children in malaria-endemic areas. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016; 2(2), Cd006589.
- Nguyen, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. Chiral drugs: an overview. *Int J Biomed Sci.* 2006; 2(2), 85-100.
- Nielsen, O. H., Ainsworth, M., Coskun, M., & Weiss, G. Management of iron-deficiency anemia in inflammatory bowel disease: a systematic review. *Medicine.* 2015; 94(23), e963-e963.



- Niki, E. Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. *Free Radic Biol Med.* 2009; 47(5), 469-484.
- Niki, E. Biomarkers of lipid peroxidation in clinical material. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1840(2), 809-817.
- Nongonierma, A. B., O'Keeffe, M. B., & FitzGerald, R. J. Milk Protein Hydrolysates and Bioactive Peptides. In: P. L. H. McSweeney & J. A. O'Mahony, editors. *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1B: Proteins: Applied Aspects.* New York: Springer; 2016. p. 417-482.
- Nouira, W., Park, Y. W., Guler, Z., & Terrill, T. H. Comparison of free fatty acid composition between low-fat and full-fat goat milk cheeses stored for 3 months under refrigeration. *Open J Anim Sci.* 2011; 2, 17-23.
- Nunomura, A., Moreira, P. I., Takeda, A., Smith, M. A., & Perry, G. Oxidative RNA damage and neurodegeneration. *Curr Med Chem.* 2007; 14(28), 2968-2975.
- O'Brien, T. X. Iron metabolism, anemia, and heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2011; 58(12), 1252-1253.
- Olivares, M., & Walter, T. Causas y consecuencias de la deficiencia de hierro. *Rev Nutr.* 2004; 17, 05-14.
- Omagari, K., Sakaki, M., Tsujimoto, Y., Shiogama, Y., Iwanaga, A., Ishimoto, M., et al. Coffee consumption is inversely associated with depressive status in Japanese patients with type 2 diabetes. *J Clin Biochem Nutr.* 2014; 55(2), 135-142.
- Oppenheimer, S. J. Iron and its relation to immunity and infectious disease. *J Nutr.* 2001; 131(2s-2), 616S-633S.
- Ordway, G. A., & Garry, D. J. Myoglobin: an essential hemoprotein in striated muscle. *J Exp Biol.* 2004; 207(Pt 20), 3441-3446.



- Ostling, O., & Johanson, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984; 123(1), 291-298.
- Ozdinc, S., Oz, G., Ozdemir, C., Kilic, I., Karakaya, Z., Bal, A., et al. Melatonin: is it an effective antioxidant for pulmonary contusion? *J Surg Res.* 2016; 204(2), 445-451.
- Pallarés, I., Lisbona, F., Aliaga, I. L., Barrionuevo, M., Alférez, M. J., & Campos, M. S. Effect of iron deficiency on the digestive utilization of iron, phosphorus, calcium and magnesium in rats. *Br J Nutr.* 1993; 70(2), 609-620.
- Panesar, P. S. Fermented dairy products: Starter cultures and potential nutritional benefits. *Food Sci Nutr.* 2011; 2, 47-51.
- Pantopoulos, K., Porwal, S. K., Tartakoff, A., & Devireddy, L. Mechanisms of mammalian iron homeostasis. *Biochemistry.* 2012; 51(29), 5705-5724.
- Park, Y. W. Goat milk-chemistry and nutrition. In: Y. W. Park & G. F. W. Haenlein, editors. *Handbook of Milk of Non-bovine Mammals.* Ames, Iowa: Blackwell Publishing; 2006. p. 34–58.
- Park, Y. W. Bioactive components in goat milk. In: Y. W. Park, editor. *Bioactive components in milk and dairy products:* Wiley-Blackwell; 2009. p. 43-81.
- Park, Y. W. Goat milk: composition and characteristics. In: D. E. Ullrey, C. K. Baer & W. G. Pond, editors. *Encyclopedia of Animal Science.* 2nd ed. Boca Raton: CRC Press; 2011. p. 537–540.
- Park, Y. W. Goat Milk – Chemistry and Nutrition. In: Y. W. Park, G. F. W. Haenlein & W. L. Wendorff, editors. *Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals* 2017. p. 42-83.



- Park, Y. W., Juárez, M., Ramos, M., & Haenlein, G. F. W. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Rumin Res.* 2007; 68(1), 88-113.
- Park, Y. W., Mahoney, A. W., & Hendricks, D. G. Bioavailability of iron in goat milk compared with cow milk fed to anemic rats. *J Dairy Sci.* 1986; 69(10), 2608-2615.
- Parvez, S., Malik, K. A., Ah Kang, S., & Kim, H. Y. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J Appl Microbiol.* 2006; 100(6), 1171-1185.
- Pasricha, S., Flecknoe-Brown, S., Allen, K., Gibson, P., McMahon, L., Olynyk, J., et al. Diagnosis and management of iron deficiency anaemia: a clinical update. *Med J Aust.* 2010; 193(9), 525-532.
- Pasricha, S. R., & Drakesmith, H. Iron Deficiency Anemia: Problems in Diagnosis and Prevention at the Population Level. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2016; 30(2), 309-325.
- Pasricha, S. R., Drakesmith, H., Black, J., Hipgrave, D., & Biggs, B. A. Control of iron deficiency anemia in low- and middle-income countries. *Blood.* 2013; 121(14), 2607-2617.
- Paul, B., & Nesbitt, I. D. Anaemia and blood transfusion. *Surgery.* 2016; 34(2), 66-73.
- Pereira, P. C. Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition.* 2014; 30(6), 619-627.
- Perkins, H. A., & Busch, M. P. Transfusion-associated infections: 50 years of relentless challenges and remarkable progress. *Transfusion.* 2010; 50(10), 2080-2099.
- Persson, T., Popescu, B. O., & Cedazo-Minguez, A. Oxidative stress in alzheimer's disease: why did antioxidant therapy fail? *Oxid Med Cell Longev.* 2014; 2014, 427318.



- Peyssonnaud, C., Nizet, V., & Johnson, R. S. Role of the hypoxia inducible factors HIF in iron metabolism. *Cell Cycle*. 2008; 7(1), 28-32.
- Pietrangelo, A. Iron and the liver. *Liver Int*. 2016; 36 (1), 116-123.
- Plé, C., Breton, J., Richoux, R., Nurdin, M., Deutsch, S. M., Falentin, H., et al. Combining selected immunomodulatory *Propionibacterium freudenreichii* and *Lactobacillus delbrueckii* strains: reverse engineering development of an anti-inflammatory cheese. *Mol Nutr Food Res*. 2016; 60(4), 935-948.
- Poljsak, B., Šuput, D., & Milisav, I. Achieving the Balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxid Med Cell Longev*. 2013; 2013, 956792.
- Portugal, S., Carret, C., Recker, M., Armitage, A. E., Gonçalves, L. A., Epiphanyo, S., et al. Host-mediated regulation of superinfection in malaria. *Nat Med*. 2011; 17(6), 732-737.
- Pulina, G., Milán, M. J., Lavín, M. P., Theodoridis, A., Morin, E., Capote, J., et al. Invited review: Current production trends, farm structures, and economics of the dairy sheep and goat sectors. *J Dairy Sci*. 2018; 101(8), 6715-6729.
- Puniya, A. K., Kumar, S., Puniya, M., & Malik, R. Fermented milk and dairy products: an overview. In: A. Puniya, editor. *Fermented Milk and Dairy Products*. Boca Raton: CRC Press; 2016.
- Quera Salva, M. A., Hartley, S., Barbot, F., Alvarez, J. C., Lofaso, F., & Guilleminault, C. Circadian rhythms, melatonin and depression. *Curr Pharm Des*. 2011; 17(15), 1459-1470.
- Quintero-Gutiérrez, A. G., González-Rosendo, G., Sánchez-Muñoz, J., Polo-Pozo, J., & Rodríguez-Jerez, J. J. Bioavailability of heme iron in biscuit filling using piglets as an animal model for humans. *Int J Biol Sci*. 2008; 4(1), 58-62.



- Raja, K. B., Simpson, R. J., & Peters, T. J. Intestinal iron absorption studies in mouse models of iron-overload. *Br J Haematol.* 1994; 86(1), 156-162.
- Ramos, E., De la Torre, G., Carmona, F. D., Gil, F., Sanz Sampelayo, M. R., & Boza, J. Nutritional value of goat and cow milk protein. *Options Mediterr.* 2005; 67, 167-170.
- Rao, A. L., Bharani, M., & Pallavi, V. Role of antioxidants and free radicals in health and disease. *Adv Pharmacol Toxicol.* 2006; 7, 29-38.
- Rayman, M. P. Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action. *Proc Nutr Soc.* 2005; 64(4), 527-542.
- Raynal-Ljutovac, K., Lagriffoul, G., Paccard, P., Guillet, I., & Chilliard, Y. Composition of goat and sheep milk products: an update. *Small Rumin. Res.* 2008; 79(1), 57-72.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999; 26(9-10), 1231-1237.
- Recalcati, S., Gammella, E., Buratti, P., & Cairo, G. Molecular regulation of cellular iron balance. *IUBMB Life.* 2017; 69(6), 389-398.
- Recalcati, S., Gammella, E., & Cairo, G. New perspectives on the molecular basis of the interaction between oxygen homeostasis and iron metabolism. *Hypoxia (Auckl).* 2015; 3, 93-103.
- Recalcati, S., Minotti, G., & Cairo, G. Iron regulatory proteins: from molecular mechanisms to drug development. *Antioxid Redox Signal.* 2010; 13(10), 1593-1616.
- Reeves, P. G., Nielsen, F. H., & Fahey, G. C., Jr. 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(11), 1939-1951.
- Refsgaard, H. H., Tsai, L., & Stadtman, E. R. Modifications of proteins by polyunsaturated fatty acid peroxidation products. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97(2), 611-616.
- Remus, D. M., Kleerebezem, M., & Bron, P. A. An intimate tête-à-tête - how probiotic lactobacilli communicate with the host. *Eur J Pharmacol.* 2011; 668 (1), S33-42.
- Reznick, A. Z., & Packer, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* 1994; 233, 357-363.
- Ribeiro, A. C., & Ribeiro, S. D. A. Specialty products made from goat milk. *Small Rumin Res.* 2010; 89(2), 225-233.
- Richardson, C. W. (2004). Let's learn about dairy goats and goat's milk. In O. C. E. Service (Ed.), (Vol. 424).
- Roberts, L. J., 2nd, Moore, K. P., Zackert, W. E., Oates, J. A., & Morrow, J. D. Identification of the major urinary metabolite of the F2-isoprostane 8-isoprostaglandin F2alpha in humans. *J Biol Chem.* 1996; 271(34), 20617-20620.
- Roberts, L. J., & Morrow, J. D. Measurement of F(2)-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radic Biol Med.* 2000; 28(4), 505-513.
- Rodden, D. (2004). Dairy goat composition from <https://drinc.ucdavis.edu/goat-dairy-foods/dairy-goat-milk-composition>
- Roseff, S. D., Luban, N. L., & Manno, C. S. Guidelines for assessing appropriateness of pediatric transfusion. *Transfusion.* 2002; 42(11), 1398-1413.
- Rouault, T. A. The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nat Chem Biol.* 2006; 2(8), 406-414.



- Rupani, D. N., & Connell, G. J. Transferrin receptor mRNA interactions contributing to iron homeostasis. *Rna*. 2016; 22(8), 1271-1282.
- Saloff-Coste, C. J. Beneficios de las leches fermentadas y de los probióticos sobre la salud.: Danone World Newsletter; 1997.
- Salva, S., Nuñez, M., Villena, J., Ramón, A., Font, G., & Alvarez, S. Development of a fermented goats' milk containing *Lactobacillus rhamnosus*: in vivo study of health benefits. *J Sci Food Agric*. 2011; 91(13), 2355-2362.
- Sanderson, P. A new method of analysis of feeding stuffs for the determination of crude oils and fat. In: W. Haresing & D. J. A. Cole, editors. Recent advances in animal nutrition. London, UK: Butterworths; 1986. p. 77–86.
- Sanz , M. R., Fernández, J., De La Torre, G., Ramos, E., Carmona, F., & Boza, J. Calidad de la leche de los pequeños rumiantes. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*. 162003. p. 155-166.
- Savard, P., Lamarche, B., Paradis, M. E., Thiboutot, H., Laurin, É., & Roy, D. Impact of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and, *Lactobacillus acidophilus* LA-5-containing yoghurt, on fecal bacterial counts of healthy adults. *Int J Food Microbiol*. 2011; 149(1), 50-57.
- Sazawal, S., Black, R. E., Ramsan, M., Chwaya, H. M., Stoltzfus, R. J., Dutta, A., et al. Effects of routine prophylactic supplementation with iron and folic acid on admission to hospital and mortality in preschool children in a high malaria transmission setting: community-based, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2006; 367(9505), 133-143.
- Scatamburlo, T. M., Yamazi, A. K., Cavicchioli, V. Q., Pieri, F. A., & Nero, L. A. Spoilage potential of *Pseudomonas* species isolated from goat milk. *J. Dairy Sci*. 2015; 98(2), 759-764.



- Schaafsma, G. Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition. *Int Dairy J.* 2008; 18(5), 458-465.
- Schaffer, S. W., Ito, T., & Azuma, J. Clinical significance of taurine. *Amino Acids.* 2014; 46(1), 1-5.
- Schlemmer, U., Frølich, W., Prieto, R. M., & Grases, F. Phytate in foods and significance for humans: food sources, intake, processing, bioavailability, protective role and analysis. *Mol Nutr Food Res.* 2009; 53 (2), S330-375.
- Schönfeld, P., & Wojtczak, L. Short- and medium-chain fatty acids in energy metabolism: the cellular perspective. *J Lipid Res.* 2016; 57(6), 943-954.
- 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.
- Semba, R. D., Kumwenda, N., Taha, T. E., Mtimavalye, L., Broadhead, R., Garrett, E., et al. Impact of vitamin A supplementation on anaemia and plasma erythropoietin concentrations in pregnant women: ^{[[L]]}_{SEP}a controlled clinical trial. *Eur J Haematol.* 2001; 66(6), 389-395.
- Semenza, G. L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3(10), 721-732.
- Seren, S., Lieberman, R., Bayraktar, U. D., Heath, E., Sahin, K., Andic, F., et al. Lycopene in cancer prevention and treatment. *Am J Ther.* 2008; 15(1), 66-81.
- Shiby, V. K., & Mishra, H. N. Fermented milks and milk products as functional foods-- a review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2013; 53(5), 482-496.
- Sies, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med.* 1991; 91(3c), 31s-38s.



- Silanikove, N., Leitner, G., Merin, U., & Prosser, C. G. Recent advances in exploiting goat's milk: Quality, safety and production aspects. *Small Rumin Res.* 2010; 89(2), 110-124.
- Simpson, R. J., & McKie, A. T. Iron and oxygen sensing: a tale of 2 interacting elements? *Metallomics.* 2015; 7(2), 223-231.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988; 175(1), 184-191.
- Skorokhod, O. A., 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(20), 4328-4337.
- Soedamah-Muthu, S. S., Masset, G., Verberne, L., Geleijnse, J. M., & Brunner, E. J. Consumption of dairy products and associations with incident diabetes, CHD and mortality in the Whitehall II study. *Br J Nutr.* 2013; 109(4), 718-726.
- Solomons, N. W. Present Knowledge in Nutrition, 7th ed. *Am J Clin Nutr.* 1997; 65(5), 1575-1576.
- Song, W.-L., Paschos, G., Fries, S., Reilly, M. P., Yu, Y., Rokach, J., et al. Novel eicosapentaenoic acid-derived F3-isoprostanes as biomarkers of lipid peroxidation. *J Biol Chem.* 2009; 284(35), 23636-23643.
- Songisepp, E., Kals, J., Kullisaar, T., Mändar, R., Hütt, P., Zilmer, M., et al. Evaluation of the functional efficacy of an antioxidative probiotic in healthy volunteers. *Nutrition journal.* 2005; 4, 22-22.
- Stadtman, E. R. Role of oxidant species in aging. *Curr Med Chem.* 2004; 11(9), 1105-1112.
- Stadtman, E. R. Protein oxidation and aging. *Free Radic Res.* 2006; 40(12), 1250-1258.



- Stadtman, E. R., & Levine, R. L. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*. 2003; 25(3-4), 207-218.
- Stadtman, E. R., Van Remmen, H., Richardson, A., Wehr, N. B., & Levine, R. L. Methionine oxidation and aging. *Biochim Biophys Acta*. 2005; 1703(2), 135-140.
- Steijns, J. M. Dairy products and health: Focus on their constituents or on the matrix? *Int Dairy J*. 2008; 18(5), 425-435.
- Stoffel, N. U., Cercamondi, C. I., Brittenham, G., Zeder, C., Geurts-Moespot, A. J., Swinkels, D. W., et al. Iron absorption from oral iron supplements given on consecutive versus alternate days and as single morning doses versus twice-daily split dosing in iron-depleted women: two open-label, randomised controlled trials. *Lancet Haematol*. 2017; 4(11), e524-e533.
- Stoltzfus, R. J. Iron deficiency: global prevalence and consequences. *Food Nutr Bull*. 2003; 24(4), S99-103.
- Sung, C. C., Hsu, Y. C., Chen, C. C., Lin, Y. F., & Wu, C. C. Oxidative stress and nucleic acid oxidation in patients with chronic kidney disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2013; 2013, 301982.
- Tachon, S., Lee, B., & Marco, M. L. Diet alters probiotic *Lactobacillus* persistence and function in the intestine. *Environ Microbiol*. 2014; 16(9), 2915-2926.
- Tamime, A. Y. *Fermented Milks*. Oxford: Blackwell Science Ltd; 2006.
- Tapiero, H., Gaté, L., & Tew, K. D. Iron: deficiencies and requirements. *Biomed Pharmacother*. 2001; 55(6), 324-332.
- Tapsell, L. C. Fermented dairy food and CVD risk. *Br J Nutr*. 2015; 113 (2), S131-135.



- Taylor, M. W., & MacGibbon, A. K. H. Milk lipids. General characteristics. In: J. W. Fuquay, editor. *Encyclopedia of Dairy Sciences* (Second Edition). San Diego: Academic Press; 2011. p. 649-654.
- Theil, E. C. Ferritin: the protein nanocage and iron biomineral in health and in disease. *Inorg Chem.* 2013; 52(21), 12223-12233.
- Toda, S. Polyphenol content and antioxidant effects in herb teas. *Chin Med.* 2011; 2, 29-31.
- Tosha, T., Behera, R. K., Ng, H. L., Bhattasali, O., Alber, T., & Theil, E. C. Ferritin protein nanocage ion channels: gating by N-terminal extensions. *J Biol Chem.* 2012; 287(16), 13016-13025.
- Toxqui, L., Piero, A. D., Courtois, V., Bastida, S., Sánchez-Muniz, F. J., & Vaquero, M. P. Deficiencia y sobrecarga de hierro: implicaciones en el estado oxidativo y la salud cardiovascular. *Nutr Hosp.* 2010; 25, 350-365.
- Turkmen, N. Chapter 35. The nutritional value and health benefits of goat milk components. In: R. R. Watson, R. J. Collier & V. R. Preedy, editors. *Nutrients in Dairy and their Implications on Health and Disease*: Academic Press; 2017. p. 441-449.
- Turner, N. D., & Lloyd, S. K. Association between red meat consumption and colon cancer: A systematic review of experimental results. *Exp Biol Med* 2017; 242(8), 813-839.
- Turrens, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 2003; 552(Pt 2), 335-344.
- Ulusu, N. N., & Tandoğan, B. Purification and kinetic properties of glutathione reductase from bovine liver. *Mol Cell Biochem.* 2007; 303(1-2), 45-51.



- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39(1), 44-84.
- Vamvakas, E. C., & Blajchman, M. A. Transfusion-related mortality: the ongoing risks of allogeneic blood transfusion and the available strategies for their prevention. *Blood.* 2009; 113(15), 3406-3417.
- Veal, E. A., Day, A. M., & Morgan, B. A. Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Mol Cell.* 2007; 26(1), 1-14.
- Verruck, S., Dantas, A., & Prudencio, E. S. Functionality of the components from goat's milk, recent advances for functional dairy products development and its implications on human health. *J Funct Foods.* 2019; 52, 243-257.
- Wang, W., Knovich, M. A., Coffman, L. G., Torti, F. M., & Torti, S. V. Serum ferritin: Past, present and future. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1800(8), 760-769.
- Waris, G., & Ahsan, H. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *J Carcinog.* 2006; 5, 14-14.
- Wenger, M. J., & DellaValle, D. M. Effect of iron deficiency on simultaneous measures of behavior, brain activity, and energy expenditure in the performance of a cognitive task. *Nutr Neurosci.* 2019; 22(3), 196-206.
- WHO. (2006). Guidelines on food fortification with micronutrients. In L. Allen, B. de Benoist, O. Dary & R. Hurrell (Eds.), (pp. 341). Geneva.
- WHO. (2007). Iron supplementation of young children in regions where malaria transmission is intense and infectious disease highly prevalent Geneva.
- WHO. (2015). The global prevalence of anaemia in 2011. Geneve.



- WHO/FAO. (2004). Vitamin and mineral requirements in human nutrition: report of a joint FAO/WHO expert consultation (pp. 362). Bangkok: World Health Organization.
- Widiada, P. A. Iron-deficiency anemia: a review of diagnosis and management. *Intisari Sains Medis*. 2020; 11(1), 92-96.
- Wilcox, C. S., & Pearlman, A. Chemistry and antihypertensive effects of tempol and other nitroxides. *Pharmacol Rev*. 2008; 60(4), 418-469.
- Willcox, J. K., Ash, S. L., & Catignani, G. L. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2004; 44(4), 275-295.
- Winterbourn, C. C., & Hampton, M. B. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radic Biol Med*. 2008; 45(5), 549-561.
- Wood, R. J., & Ronnenberg, A. Iron. In: M. E. Shils, M. Shike, A. C. Ross, B. Caballero & R. J. Cousins, editors. *Modern Nutrition in Health And Disease*. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p. 248-270.
- Worthington, D. J., & Rosemeyer, M. A. Human glutathione reductase: purification of the crystalline enzyme from erythrocytes. *Eur J Biochem*. 1974; 48(1), 167-177.
- Worwood, M. Anemia ferropénica y sobrecarga de hierro. In: M. S. Lewis, B. J. Bain & I. Bates, editors. *Hematología práctica*. 10 ed. Madrid: Elsevier España, S.A.; 2008. p. 113-137.
- Wu, P., Nielsen, T. E., & Clausen, M. H. FDA-approved small-molecule kinase inhibitors. *Trends Pharmacol Sci*. 2015; 36(7), 422-439.
- Xue, X., Ramakrishnan, S. K., Weisz, K., Triner, D., Xie, L., Attili, D., et al. Iron uptake via DMT1 Integrates cell cycle with JAK-STAT3 Signaling to promote colorectal tumorigenesis. *Cell Metab*. 2016; 24(3), 447-461.



- Yadav, A. k., Singh, J., & Yadav, S. K. Composition, nutritional and therapeutic values of goat milk: a review. *Asian J Dairy Food Res.* 2016; 35, 96-102.
- Yangilar, F. As a potentially functional food: goats' milk and products. *J Food Nutr Res.* 2013; 1(4), 68-81.
- Ye, H., & Rouault, T. A. Human iron-sulfur cluster assembly, cellular iron homeostasis, and disease. *Biochemistry.* 2010; 49(24), 4945-4956.
- Yin, H., Xu, L., & Porter, N. A. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chem Rev.* 2011; 111(10), 5944-5972.
- Yu, B. P., Suescun, E. A., & Yang, S. Y. Effect of age-related lipid peroxidation on membrane fluidity and phospholipase A2: Modulation by dietary restriction. *Mech Ageing Dev.* 1992; 65(1), 17-33.
- Zhang, C., Derrien, M., Levenez, F., Brazeilles, R., Ballal, S. A., Kim, J., et al. Ecological robustness of the gut microbiota in response to ingestion of transient food-borne microbes. *ISME J.* 2016; 10(9), 2235-2245.
- Zhang, D. L., & Wu, J. Erythrocytic ferroportin reduces intracellular iron accumulation, hemolysis, and malaria risk. *Science.* 2018; 359(6383), 1520-1523.
- Zheng, M., & Storz, G. Redox sensing by prokaryotic transcription factors. *Biochem Pharmacol.* 2000; 59(1), 1-6.
- Zibil, S., Zoratti, O., Palmero, S., Gómez, L., Juárez, A., Grille, L., et al. Leche de cabra: producción, tecnología, nutrición y salud. U. d. C. d. I. U. d. I. R. Ucur, editor. Uruguay: Ciencias de la Salud; 2016.
- Zimmermann, M. B., & Hurrell, R. F. Nutritional iron deficiency. *Lancet.* 2007; 370(9586), 511-520.
- Zúñiga Cabrera, A., & Orera Clemente, M. A. Genética de las sobrecargas férricas. *An Med Interna.* 2002; 19, 51-57.

MÉRITOS
INVESTIGADORES



8. MÉRITOS INVESTIGADORES DEL DOCTORANDO

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral el doctorando ha estado involucrado en varias líneas de investigación del Departamento de Fisiología de la Universidad de Granada, así como en otras líneas afines del School of Food Science and Nutrition de la Universidad de Leeds y del Nutrition Department del King's College de Londres, lo que le ha permitido complementar su formación y experiencia científica e investigadora, como se detalla brevemente a continuación.

Participación en proyectos

1. Efecto de la suplementación con ácido fólico en productos fermentados de leche de cabra sobre el estado oxidativo, estabilidad del ADN y expresión génica durante la recuperación de la ferropdeficiencia (P11-AGR-7648). Proyectos de Excelencia Junta de Andalucía.
2. Estudio multidisciplinar del efecto de la dieta sin gluten en niños celíacos para el desarrollo de productos adaptados a sus requerimientos (P12-AGR-2581). Proyectos de Excelencia Junta de Andalucía.
3. Efecto de dos derivados lácteos fermentados sobre la funcionalidad del tejido adiposo y músculo esquelético tras la recuperación de la ferropdeficiencia (BS26-2015). Campus de Excelencia Internacional BIOTIC. Universidad de Granada



Publicaciones

1. María García-Burgos; **Jorge Moreno-Fernandez**; María J.M. Alférez; Javier Díaz-Castro; Inmaculada López-Aliaga. New perspectives in fermented dairy products and their health relevance. *J Funct Food*. 2020;72:104059
2. **Jorge Moreno-Fernandez**; María J. M. Alférez; Inmaculada López-Aliaga; Javier Díaz-Castro. Role of Fermented goat milk on liver gene and protein profiles related to iron metabolism during anemia recovery. *Nutrients* 2020; 12(5):1336.
3. Javier Diaz-Castro; **Jorge Moreno-Fernández**; Ignacio Chiroso; Luis Javier Chiroso; Rafael Guisado; Julio J, Ochoa. Beneficial Effect of Ubiquinol on Hematological and Inflammatory Signaling during Exercise. *Nutrients*. 2020;12(2):424.
4. María Robles Rebollo; M^a Inmaculada Lopez Aliaga; Javier Diaz Castro; **Jorge Moreno Fernández**; M^a Jose Muñoz Alferez. Iron status, weight changes and body composition during anemia recovery in an experimental model: the effect of fermented goat or cow milk. *Nutr Hosp*. 2020;37(3):568-576.
5. Estefania Marin Alvarez; Javier Diaz Castro; Manuela Peña Caballero; Laura Serrano Lopez; **Jorge Moreno Fernández**; Belen Sanchez Martinez; Francisca Martín Peregrina; Mercedes Alonso Moya; Jose Maldonado Lozano; Jose Antonio Hurtado Suazo; Julio Ochoa Herrera. Oropharyngeal colostrum positively modulates the inflammatory response in preterm neonates. *Nutrients*. 2020;12(2): 413.



6. María J. M. Alférez; María Robles-Rebollo; **Jorge Moreno-Fernández**; Javier Diaz-Castro; Inmaculada Lopez-Aliaga. Effect of fermented goat milk on body composition, basal metabolism, and food intake control in rats. *Nutr Hosp.* 2020; 37(1):123-128.
7. **Jorge Moreno-Fernández**; Belen Sanchez-Martinez; Laura Serrano-Lopez; Estefania Marin-Alvarez; Javier Diaz-Castro; Manuela Peña-Caballero; Francisca Martín-Peregrina; Mercedes Alonso-Moya; Jose Maldonado; Julio Ochoa; Jose A. Hurtado. Enhancement of immune response mediated by oropharyngeal colostrum administration in preterm neonates. *Pediatr Allergy Immunol.* 2019;30: 234-241.
8. **Jorge Moreno Fernández**; M^a Inmaculada Lopez Aliaga; María García Burgos; M^a Jose Muñoz Alferez; Javier Diaz Castro. Fermented goat milk consumption enhances brain molecular functions during iron deficiency anemia recovery. *Nutrients.* 2019;11(10): 1-14.
9. **Jorge Moreno-Fernandez**; Javier Diaz-Castro; Mario Pulido-Moran; Maria J. M. Alferez; Christine Boesch; Ana Sanchez-Alcover; Inmaculada López-Aliaga. Fermented goat milk consumption improves cardiovascular health during anemia recovery. *J. Agric. Food Chem.* 2016, 64, 12, 2560–2568.
10. Pedro Acosta-Manzano; Irene Coll-Risco; Mireille N. M. Van Poppel; Víctor Segura-Jiménez; Pedro Femia; Lidia Romero-Gallardo; Milkana Borges-Cosic; Javier Díaz-Castro; **Jorge Moreno-Fernández**; Julio J. Ochoa-Herrera; Virginia A. Aparicio. Influence of a concurrent exercise training intervention during



- pregnancy on maternal and arterial and venous cord serum cytokines: the GESTAFIT project. *J Clin Med.* 2019; 8(11): 1862.
11. **Jorge Moreno-Fernandez**; Julio J. Ochoa; Gladys O. Latunde-Dada; Javier Diaz-Castro. Iron deficiency and iron homeostasis in low birth weight preterm infants: a systematic review. *Nutrients.* 2019; 11(5): 1090.
 12. **Jorge Moreno-Fernandez**; Javier Díaz-Castro; María J M Alférez; Inmaculada López-Aliaga. Iron deficiency and neuroendocrine regulators of basal metabolism, body composition and energy expenditure in rats. *nutrients.* *Nutrients.* 2019;11(3):631.
 13. Javier Diaz-Castro; Carlota Muriel-Neyra; Rafael Martin-Masot; **Jorge Moreno-Fernandez**; José Maldonado; Teresa Nestares. Oxidative stress, DNA stability and evoked inflammatory signaling in young celiac patients consuming a gluten-free diet. *Eur J Nutr.* 2020;59(4):1577-1584.
 14. **Jorge Moreno-Fernandez**; María J M Alférez; Inmaculada López-Aliaga; Javier Diaz-Castro. Protective effects of fermented goat milk on genomic stability, oxidative stress and inflammatory signalling in testis during anaemia recovery. *Sci Rep.* 2019; 9(1):2232.
 15. Inmaculada López-Aliaga; José D García-Pedro; **Jorge Moreno-Fernandez**; M^a José M Alférez; Magdalena López-Frías; Javier Díaz-Castro. Fermented goat milk consumption improves iron status and evokes inflammatory signalling during anemia recovery. *Food Funct.* 2018; 9(6):3195-3201.
 16. María Robles-Almazan; Mario Pulido-Moran; **Jorge Moreno-Fernandez**; Cesar Ramirez-Tortosa; Carmen Rodriguez-Garcia; Jose L Quiles; MCarmen Ramirez-



- Tortosa. Hydroxytyrosol: bioavailability, toxicity, and clinical applications. *Food Res Int.* 2018;105:654-667.
17. Virginia A Aparicio; Olga Ocón; Javier Diaz-Castro; Pedro Acosta-Manzano; Irene Coll-Risco; Milkana Borges-Cósic; Lidia Romero-Gallardo; **Jorge Moreno-Fernández**; Julio J Ochoa-Herrera. Influence of a concurrent exercise training program during pregnancy on colostrum and mature human milk inflammatory markers: findings from the GESTAFIT project. *J Hum Lact.* 2018;34(4):789-798.
18. Javier Diaz-Castro; **Jorge Moreno-Fernandez**; Mario Pulido-Moran; María J M Alférez; María Robles-Rebollo; Julio J Ochoa; Inmaculada López-Aliaga. Changes in adiposity and body composition during anaemia recovery with goat or cow fermented milks. *J Agric Food Chem.* 2017;65(20): 4057-4065.
19. **Jorge Moreno-Fernandez**; Javier Diaz-Castro; María Jm Alférez; Christine Boesch; Teresa Nestares; Inmaculada López-Aliaga. Fermented goat milk improves antioxidant status and protects from oxidative damage to biomolecules during anemia recovery. *J Sci Food Agric.* 2017;97(5): 1433-1442.
20. Teresa Nestares; Macarena Salinas; Carlos De Teresa; Javier Díaz-Castro; **Jorge Moreno-Fernández**; Magdalena López-Frías. Risk factors related with lifestyle in patients with musculoskeletal disorders. *Nutr Hosp.* 2017;34(2): 444-453.
21. Mario Pulido-Moran; **Jorge Moreno-Fernandez**; Cesar Ramirez-Tortosa; M Carmen Ramirez-Tortosa. Curcumin and health. *Molecules.* 2016;21(3): 264.
22. **Jorge Moreno-Fernandez**; Javier Diaz-Castro; Mario Pulido-Moran; Maria J M Alferez; Christine Boesch; Ana Sanchez-Alcover; Inmaculada López-Aliaga.



- Fermented goat milk consumption improves duodenal expression of iron homeostasis genes during anemia recovery. *J Agric Food Chem.* 2016;64(12): 2560-2568.
23. **Jorge Moreno-Fernandez**; Javier Diaz-Castro; Mario Pulido-Moran; Maria J M Alferez; Teresa Nestares; Inmaculada Lopez-Aliaga. Fermented goat milk consumption during anaemia recovery: ergogenic effect and improvement of skeletal muscle homeostasis. *Eur J Nutr.* 2017;56(7): 2277-2287.
24. **Jorge Moreno-Fernandez**; Javier Diaz-Castro; M José M Alférez; Teresa Nestares; Julio J Ochoa; Ana Sánchez-Alcover; Inmaculada López-Aliaga. Fermented goat milk consumption improves melatonin levels and influences positively the antioxidant status during nutritional ferropenic anemia recovery. *Food Funct.* 2016;7(2): 834-42.
25. Javier Diaz-Castro; Mario Pulido-Moran; **Jorge Moreno-Fernandez**; Naroa Kajarabille; Catalina de Paco; Maria Garrido-Sanchez; Sonia Prados; Julio J Ochoa. Gender specific differences in oxidative stress and inflammatory signaling in healthy term neonates and their mothers. *Pediatr Res.* 2016;80(4): 595-601.
26. **Jorge Moreno-Fernández**; Javier Díaz-Castro; Maria J M Alférez; Silvia Hijano; Teresa Nestares; Inmaculada López-Aliaga. Production and chemical composition of two dehydrated fermented dairy products based on cow or goat milk. *J Dairy Res.* 2016;83(1): 81-88.
27. Alvaro Sarmiento; Javier Diaz-Castro; Mario Pulido-Moran; **Jorge Moreno-Fernandez**; Naroa Kajarabille; Ignacio Chiroso; Isabel M Guisado; Luis Javier



Chirosa; Rafael Guisado; Julio J Ochoa. Short-term ubiquinol supplementation reduces oxidative stress associated with strenuous exercise in healthy adults: a randomized trial. *Biofactors*. 2016;42(6): 612-622.

28. **Jorge Moreno-Fernández**; Javier Diaz-Castro; M J M Alferez; Silvia Hijano; Teresa Nestares; Inmaculada Lopez-Aliaga. Assessment of genomic stability of folic acid supplemented goat or cow milk-based diets. *Proc Nutr Soc*. 2015;74-OCE5: E295.

29. Javier Diaz-Castro; **Jorge Moreno-Fernández**; Naroa Kajarabille; Mario Pulido-Moran; Julio J. Ochoa. DHA supplementation: a nutritional strategy to improve prenatal Fe homeostasis and prevent birth outcomes related with Fe-deficiency. *J Funct Foods*. 2015;19: 385-393.



Trabajos presentados en congresos nacionales o internacionales

Durante el desarrollo de la Tesis Doctoral, parte de los resultados de la investigación se han divulgado en 32 comunicaciones a congresos, de las cuales 18 en congresos internacionales y 14 en congresos nacionales.

1. **Moreno-Fernández J**, Morales-Sanchez RM, Peña M, Diaz-Castro J, Hurtado JA, Martin-Alvarez, et al., Maternal DHA supplementation improves transplacental Fe homeostasis and supply to the foetus. 2nd Euro-Global Conference on Pediatrics and Neonatology. London, United Kingdom. 2019.
2. **Moreno-Fernández J**, Martin-Alvarez E, Morales-Sanchez RM, Ochoa JJ, Hurtado JA, Peña M, et al., Maternal DHA supplementation improves neonatal bone turnover. 2nd Euro-Global Conference on Pediatrics and Neonatology. London, United Kingdom 2019.
3. Maria Garcia Burgos; **Jorge Moreno Fernández**; Maria Jose Muñoz Alferez; Javier Diaz Castro; Inmaculada Lopez Aliaga. Efecto protector de los fermentados lácteos de cabra o vaca sobre la señalización inflamatoria en testículos durante la recuperación de la anemia ferropénica. II Congreso Nacional y IV Jornadas de Investigadores en Formación. Granada, España. 2019.
4. **Jorge Moreno Fernández**; Maria Garcia Burgos; Javier Diaz Castro; Maria Jose Muñoz Alferez; Inmaculada Lopez Aliaga. El consumo de leche fermentada de cabra reduce el daño oxidativo a nivel testicular, durante la recuperación de la anemia ferropénica nutricional. II Congreso Nacional y IV Jornadas de Investigadores en Formación. Granada, España. 2019.



5. Manuela Peña Caballero; **Jorge Moreno Fernández**; Javier Diaz Castro; Belén Sánchez Martínez; José Antonio Hurtado Suazo; Estefanía Martín Álvarez; et al., Colostrum enhances immune response in preterm neonates. International Congress on Pediatrics & Neonatology. Venecia, Italia. 2019.
6. **Jorge Moreno Fernández**; Julio Ochoa Herrera; José Antonio Hurtado Suazo; Estefanía Martín Álvarez; Belén Sánchez Martínez; Manuela Peña Caballero; et al., Improvement of gastrointestinal tract development mediated by oropharyngeal colostrum in preterm neonates. International Congress on Pediatrics & Neonatology. Venecia, Italia. 2019.
7. Rafael Martín Masot; García Soto L; Javier Diaz Castro; Carlota Muriel Neyra; **Jorge Moreno Fernández**; Jose Maldonado Lozano; et al., Señalización inflamatoria en niños celíacos que realizan dieta sin gluten estricta. XXVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica. Santander, Andalucía, España. 2019
8. J. Diaz-Castro, E. Martínez-Alvarez, **J. Moreno-Fernandez**, J.A. Hurtado, M. Garcia-Burgos, M. Peña, et al., DHA supplementation improves neonatal bone turnover at delivery. 6th International conference on nutrition and growth. Valencia, España. 2019.
9. **J. Moreno-Fernandez**, J.A. Hurtado, J. Diaz-Castro, M. Peña, M. Garcia-Burgos, E. Martínez-Alvarez, et al., DHA supplementation improves placental DMT1 transporter. 6th International conference on nutrition and growth. Valencia, España. 2019.
10. **J. Moreno-Fernandez**, M. Peña, J.J. Ochoa, J.A. Hurtado, M. Garcia-Burgos, E. Martínez-Alvarez, et al., Erythrocyte mineral profile is improved in mothers taking a dha supplement. 6th International conference on nutrition and growth. Valencia, España. 2019
11. Ana Soriano Lerma; **Jorge Moreno Fernández**; Miguel Soriano; Javier Diaz Castro; Maria Garcia Burgos; Maria Jose Muñoz Alferez; et al., Analysis of the gut microbiome during the recovery of iron deficiency anaemia with fermented



- goat's milk-based diet. I Congreso Nacional de Investigadores del PTS. Granada, España. 2019.
12. Maria Garcia Burgos; **Jorge Moreno Fernández**; Maria Jose Muñoz Alferez; Javier Diaz Castro; Inmaculada Lopez Aliaga. Efecto modulador del consumo de fermentados lácteos de cabra o vaca sobre la adiposidad durante la recuperación de la anemia ferropénica. I Congreso Nacional de Investigadores del PTS. Granada, España. 2019.
13. **Jorge Moreno Fernández**; Maria Garcia Burgos; Javier Diaz Castro; Maria Jose Muñoz Alferez; Inmaculada Lopez Aliaga. La leche de cabra fermentada mejora el estado oxidativo/antioxidante durante la recuperación de la anemia ferropénica nutricional. I Congreso Nacional de Investigadores del PTS. Granada, España. 2019.
14. Maria Garcia Burgos; Maria Jose Muñoz Alferez; Javier Diaz Castro; **Jorge Moreno Fernández**; Inmaculada Lopez Aliaga. Efecto del consumo de fermentados lácteos de cabra y vaca sobre los sustratos lipídicos durante la recuperación de la anemia ferropénica. I Congreso Nacional y III Jornadas de Investigadores en Formación Granada, España. 2018.
15. **Jorge Moreno Fernández**; Javier Diaz Castro; Maria Jose Muñoz Alferez; Teresa Nestares Pleguezuelo; Maria Garcia Burgos; Inmaculada Lopez Aliaga. Efecto protector de la leche de cabra fermentada sobre el daño oxidativo en la anemia ferropénica nutricional. I Congreso Nacional y III Jornadas de Investigadores en Formación. Granada, España. 2018.
16. M^a Inmaculada Lopez Aliaga; Jose Pascual Lopez Navarro; Javier Diaz Castro; **Jorge Moreno Fernández**; Teresa Nestares Pleguezuelo; M^a Jose Muñoz Alferez. Body composition assessment during anemia recovery with fermented milks. XII Congreso Internacional de Nutrición, Alimentación y Dietética Y XXII Jornadas Internacionales de Nutrición Práctica. Madrid, España. 2018.
17. Javier Diaz Castro; M^a Jose Muñoz Alferez; **Jorge Moreno Fernández**; Ana Soriano Lerma; Alberto Gonzalez Muñoz; M^a Inmaculada Lopez Aliaga. Bone turnover biomarkers in nutritional iron deficiency anemia. XII Congreso



- Internacional de Nutrición, Alimentación y Dietética Y XXII Jornadas Internacionales de Nutrición Práctica. Madrid. 2018.
18. M^a Jose Muñoz Alferez; Alberto Gonzalez Muñoz; Javier Diaz Castro; **Jorge Moreno Fernández**; Teresa Nestares Pleguezuelo; M^a Inmaculada Lopez Aliaga. Brain and liver oxidative status in iron deficiency evolution during growing period. XII Congreso Internacional de Nutrición, Alimentación y Dietética Y XXII Jornadas Internacionales de Nutrición Práctica. Madrid, España. 2018.
 19. Ana Soriano Lerma; **Jorge Moreno Fernández**; Javier Diaz Castro; Miguel Soriano; Jose Antonio Garcia Salcedo; M^a Inmaculada Lopez Aliaga. Study of intestinal microbiome during the recovery of iron deficiency anemia with fermented goat's and cow's milks. XII Congreso Internacional de Nutrición, Alimentación y Dietética y XXII Jornadas Internacionales de Nutrición Práctica. Madrid, España. 2018.
 20. Maria Jose Muñoz Alferez; Javier Diaz Castro; **Jorge Moreno Fernández**; Teresa Nestares; Inmaculada Lopez Aliaga. La leche de cabra fermentada mejora la funcionalidad del tejido adiposo. IX Foro Nacional de Caprino. Córdoba, España. 2018.
 21. Virginia A Aparicio, Javier Díaz-Castro, Pedro Acosta-Manzano, Irene Coll-Risco, Lidia Romero-Gallardo, Olga Ocón, Milkana Borges-Cóscic, **Jorge Moreno-Fernández** and Julio J Ochoa-Herrera. Effects of a concurrent exercise training program during pregnancy on colostrum and mature breast milk fractalkine concentrations. The GESTAFIT Project. International Symposium Active Brains for all: Exercise, Cognition and Mental Health. Granada, España. 2017.
 22. Carlos De Teresa Galvan; Teresa Nestares Pleguezuelo; Javier Diaz Castro; **Jorge Moreno Fernández**. La práctica de pádel mejora la respuesta inmune tras la competición. II Congreso Nacional de Investigación en Pádel. Granada, España. 2016.



23. Teresa Nestares Pleguezuelo; Carlos De Teresa Galvan; Javier Diaz Castro; **Jorge Moreno Fernández**; Magdalena López Frias. A Cardiac rehabilitation program enhances catalase activity in patients suffering from cardiovascular disease. I Congreso Internacional y VI Encuentros Hispano-Cubanos en Ciencias de la Salud. Granada, España. 2016.
24. Teresa Nestares Pleguezuelo; Javier Diaz Castro; M^a Jose Muñoz Alferez; **Jorge Moreno Fernández**; M^a Inmaculada Lopez Aliaga. Fermented goat milk improves total antioxidant status. I Congreso Internacional y VI Encuentros Hispano-Cubanos en Ciencias de la Salud. Granada, España. 2016.
25. Carlos De Teresa Galvan; Javier Diaz Castro; Salinas, Macarena; **Jorge Moreno Fernández**; Magdalena López Frias; Teresa Nestares Pleguezuelo. Increased oxidative damage in patients suffering knee pain in comparison with patients suffering neck pain. I Congreso Internacional y VI Encuentros Hispano-Cubanos en Ciencias de la Salud. Ciudad de celebración: Granada, España. 2016.
26. Javier Diaz Castro; Mario Pulido Moran; **Jorge Moreno Fernández**; Julio Jose Ochoa. Ubiquinol supplementation reduces oxidative damage associated to strenuous exercise. 8th Conference of the Coenzyme Q10 Association. Bologna, Italia. 2015.
27. **Jorge Moreno Fernández**; Javier Diaz Castro; M^a Jose Muñoz Alferez; Teresa Nestares Pleguezuelo; M^a Inmaculada Lopez Aliaga. Assessment of genomic stability of folic acid supplemented goat or cow milk-based diets. Summer meeting of the Nutrition Society: the future of animal products in the human diet: health and environmental concerns. Nottingham, United Kingdom. 2015.
28. Javier Diaz Castro; **Jorge Moreno Fernández**; Julio Jose Ochoa Herrera. Efecto de una suplementación a corto plazo con ubiquinol durante un ejercicio extenuante sobre la resorción ósea. Nombre del congreso: III Congreso Internacional de Investigación en Salud y Envejecimiento & I Congreso Internacional de Investigación en Salud. Almería, España. 2015.



29. Rosa María Morales Sánchez, Javier Gazquez Garcia, Pablo Javier Mira Rufino, **Jorge Moreno Fernandez**, Javier Diaz Castro. Efecto del sexo del recién nacido sobre la agresión oxidativa sufrida durante el nacimiento. III Congreso Internacional de Investigación en Salud y Envejecimiento & I Congreso Internacional de Investigación en Salud. Almería, España. 2015.
30. **Jorge Moreno Fernández**; Javier Diaz Castro; M^a Jose Muñoz Alferez; Teresa Nestares Pleguezuelo; M^a Inmaculada Lopez Aliaga. Efecto beneficioso del consumo de leche de cabra suplementada en ácido fólico sobre la defensa antioxidante y peroxidación lipídica durante la recuperación de la ferropénica. III Congreso FESNAD. Sevilla, España. 2015.
31. **Jorge Moreno Fernández**; Javier Diaz Castro; M^a Jose Muñoz Alferez; Teresa Nestares Pleguezuelo; M^a Inmaculada Lopez Aliaga. Influencia del consumo de leche de cabra suplementada en ácido fólico sobre enzimas hepáticas en plasma durante la recuperación de la ferropénica. III Congreso FESNAD. Sevilla, España. 2015.
32. M^a Jose Muñoz Alferez; Javier Diaz Castro; Teresa Nestares Pleguezuelo; **Jorge Moreno Fernández**; M^a Inmaculada Lopez Aliaga. La leche de cabra suplementada en ácido Fólico acelera la recuperación de la anemia ferropénica nutricional. X Congreso Internacional de Nutrición, Alimentación y Dietética Y XIX Jornadas Internacionales de Nutrición Práctica. Madrid, España. 2015.



Estancias de investigación

1. Entidad de realización: King's College London

Tipo de entidad: Universidad

Facultad, Instituto, Centro: Diabetes & Nutritional Sciences

Ciudad entidad realización: Londres, Inner London, Reino Unido

Fecha de inicio-fin: 18/06/2019 - 17/12/2019 Duración: 6 meses

2. Entidad de realización: King's College London

Tipo de entidad: Universidad

Facultad, Instituto, Centro: Diabetes & Nutritional Sciences

Ciudad entidad realización: Londres, Inner London, Reino Unido

Fecha de inicio-fin: 15/09/2018 - 15/12/2018 Duración: 3 meses

3. Entidad de realización: University of Leeds

Tipo de entidad: Universidad

Facultad, Instituto, Centro: School of Food Science and Nutrition

Ciudad entidad realización: Leeds, North Yorkshire, Reino Unido

Fecha de inicio-fin: 01/04/2015 - 30/06/2015 Duración: 3 meses



Premios y distinciones

1. Premio al mejor póster en el 2nd Edition of Euro-Global Conference on Pediatrics and Neonatology (Septiembre 2019).
2. Premio al mejor póster I Congreso Nacional y III Jornadas de Investigadores en Formación: Fomentando la interdisciplinariedad (Junio 2018).
3. Premio al mejor póster en el I Congreso Internacional y VI Encuentros Hispano-Cubanos en Ciencias de la Salud (Marzo, 2016).