



UNIVERSIDAD DE GRANADA

Programa de Doctorado en Nutrición y Ciencias de los Alimentos

**ESTUDIO DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INFLAMATORIA
DURANTE LA RECUPERACIÓN DE LA ANEMIA
FERROPENICA CON FERMENTADOS LÁCTEOS DE CABRA**

Tesis Doctoral para aspirar al grado de Doctor presentada por

JOSÉ DAVID GARCÍA PEDRO

2020

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

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

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales

Autor: José David García Pedro

ISBN: 978-84-1306-725-4

URI: <http://hdl.handle.net/10481/65384>



La presente 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

“La vida es una y ahora: vivámosla.
Vive el momento, no pensando en el futuro.
Y no tengamos miedo. Lo que tenga que ser será.
El tiempo que estemos aquí, disfrutémoslo.”

Pau Donés

“Si llevas tu infancia contigo, nunca envejecerás.”

Tom Stoppard

“Si tienes un sueño en tu corazón y
de verdad crees en él, corres el riesgo
de que se convierta en realidad.”

Walt Disney

“La sonrisa es mia,
pero el motivo sois vosotros.”

Toy Story

Agradecimientos

Dice el refranero que es de bien nacidos ser agradecidos y en estas palabras quería agradecer a todas las personas que de un modo u otro han formado parte de esta etapa de mi vida.

En primer lugar, quiero dar las gracias de corazón a mis directores, la Dra. D^a M^a Inmaculada López Aliaga y el Dr. D. Javier Díaz Castro por su incansable apoyo y empuje para llegar a buen puerto, incluso en los malos momentos. No habría sido posible sin vosotros.

También quiero agradecer al Departamento de Fisiología y al Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos “José Mataix” el haberme permitido formar parte de su increíble trayectoria investigadora.

A Santiago Pintos, un gran profesional que tanto me ha ayudado fuera y dentro del trabajo. Nunca olvidaré todo lo que has hecho por mí.

A Carla por llenar de alegría cada sitio por el que pasa. En poco tiempo hemos pasado muchos momentos juntos, algunos no muy buenos, estando a mi lado en el momento más duro de mis 33 años. No podré agradecértelo lo suficiente.

A mis hermanos. No sé qué sería sin vosotros.

A mi sobrino David, que aunque no lo sepa, llegó en el momento que más lo necesitábamos.

A mis padres, por la educación y valores que me han dado desde pequeño, por vuestro apoyo y confianza y cariño incondicional.

A mi padre, por orientarme para poder dedicarme hoy a la profesión que considero más bonita del mundo.

A mi madre, por su infinita paciencia. Por enseñarme a ser fuerte y valiente en los momentos duros. No sabes cuánto te echo de menos.

A todos los que han sido importantes en mi vida y han hecho de mi la persona que soy hoy. A todos, muchas gracias.

A mis padres y hermanos,
gracias por la infancia que he tenido.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	21
ÍNDICE DE TABLAS	22
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	24
I. RESUMEN	29
II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	35
1. EL HIERRO EN LA NUTRICIÓN	37
1.1. Metabolismo del hierro	40
1.1.1. Distribución del hierro en el organismo	40
1.1.2. Regulación del metabolismo corporal del hierro	43
1.1.3. Regulación de la expresión de hepcidina durante la anemia y la hipoxia.	48
1.1.4. Metabolismo celular	48
1.1.5. Almacenamiento celular de hierro	53
1.1.6. Exportación de hierro celular	56
2. EL PROCESO INFLAMATORIO	56
2.1. Marcadores biológicos de inflamación	58
2.2. Señalización de citoquinas	60
2.2.1. Interleucina-1	61
2.2.2. Factor de necrosis tumoral alfa	66
2.2.3. Interleucina-6	71
2.3. Señalización de quimiocinas	73
2.3.1. Interleucina-8	76

2.4. Citoquinas y quimiocinas en la inflamación	79
3. LECHE DE CABRA	82
3.1. Características organolépticas	83
3.2. Composición nutricional	84
3.2.1. Proteínas y aminoácidos	85
3.2.2. Lípidos	89
3.2.3. Hidratos de carbono	93
3.3.4. Minerales	95
3.2.5. Vitaminas	97
3.2.6. Factores bioactivos	98
3.3. Leches fermentadas	101
3.3.1. Valor nutritivo de las leches fermentadas	108
3.3.2. Beneficios sobre la salud de las leches fermentadas	110
III. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	115
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	121
4.1. Animales de experimentación	123
4.2. Diseño experimental	124
4.3. Elaboración y deshidratación de las leches fermentadas	126
4.3.1. Proceso de fermentación de la leche (cabra o vaca)	126
4.3.2. Proceso de deshidratación de las leches fermentadas	127

4.4. Determinación de materia seca y contenido de nitrógeno, cenizas, grasa total y lactosa.	128
4.5. Composición de aminoácidos	129
4.6. Composición de ácidos grasos	131
4.7. Determinación y composición mineral	133
4.8. Determinación y composición vitamínica	135
4.9. Dietas experimentales	137
4.10. Parámetros hematológicos	139
4.11. Hierro sérico, capacidad total de fijación de hierro y saturación de transferrina.	140
4.12. Ferritina sérica	140
4.13. Hepcidina sérica	140
4.14. Señalización pro y anti-inflamatoria	141
4.15. Tratamiento estadístico	143
V. TABLAS Y FIGURAS	145
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	163
6.1. Período pre-experimental	165
6.2. Período experimental	166
6.2.1. Parámetros hematológicos	166
6.2.2. Señalización pro y antiinflamatoria	167

VI. CONCLUSIONES	175
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	181

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	39
Absorción, distribución y reciclaje de hierro en el organismo e intercambio cuantitativo de hierro entre fuentes de hierro corporal.	
Figura 2.	43
Regulación del metabolismo sistémico del hierro.	
Figura 3.	48
Metabolismo celular del hierro.	
Figura 4.	60
Citocinas, quimiocinas y sus receptores.	
Figura 5.	65
Transducción de señal de la IL-1 para la activación del NF- κ B.	
Figura 6.	68
Señalización a través de los receptores 1 y 2 de TNF.	
Figura 7.	73
Vía de señalización de la IL-6	
Figura 8.	78
Vía de señalización de la IL-8.	
Figura 9.	106
Tecnología básica de la fabricación del yogur.	
Figura 10.	125
Diseño experimental del estudio.	
Figura 11.	142
Analizador Luminex mediante tecnología xMAP.	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	81
Acción de las citocinas inflamatorias.	
Tabla 2.	85
Composición de la leche de cabra.	
Tabla 3.	85
Comparación de la composición de la leche de cabra vaca.	
Tabla 4.	87
Comparación entre las fracciones proteicas de la leche de cabra y vaca.	
Tabla 5.	88
Composición de aminoácidos de leche de cabra y vaca.	
Tabla 6.	91
Composición de ácidos grasos de la leche de cabra y vaca.	
Tabla 7.	95
Comparación de la composición mineral de la leche de cabra y vaca.	
Tabla 8.	98
Comparación del contenido de vitaminas de la leche de cabra y vaca.	
Tabla 9.	100
Principales factores bioactivos en la leche de cabra.	
Tabla 10.	129
Composición química de las leches fermentadas y deshidratadas (vaca o cabra).	
Tabla 11.	131
Composición de aminoácidos de las leches fermentadas y deshidratadas (vaca o cabra).	
Tabla 12.	132
Composición de ácidos grasos de las leches fermentadas y deshidratadas (vaca o cabra).	
Tabla 13.	135
Composición mineral de las leches fermentadas y deshidratadas (vaca o cabra).	

Tabla 14. 137

Composición vitamínica de las leches fermentadas y deshidratadas (vaca o cabra

Tabla 15. 137

Composición de las dietas experimentales.

INDICE DE ABREVIATURAS

AC: Adenilato ciclasa

ADE: Amplitud de distribución eritrocitaria

ADN: Acido desoxirribonucleico

AID: Deficiencia absoluta de hierro

AIN-93G: Dieta del Instituto Americano de Nutrición para animales en período de crecimiento

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

BCDF: Factor de diferenciación de células B

BMP: Proteínas morfogenéticas óseas

BSF-2: Factor 2 estimulador de células B

CAM: Moléculas de adhesión celular

CAV: Caveolina

CAV-1: Caveolina 1

CRD: Dominios ricos en cisteína

CTGF: Factor de crecimiento del tejido conectivo

DAG: Diacilglicerol

DARC: Receptor de antígeno Duffy para quimiocinas

DD: Dominio de muerte

DCT1: Transportador de cationes divalente

DcytB: Citocromo duodenal b

DFO: Deferoxamina

DISC: Complejo de señalización inductora de muerte celular

DMT1: Transportador de metales divalentes 1

ECA: Enzima convertidora de angiotensina

EDTA: Acido etilendiamino tetraacético

EPO: Eritropoyetina

FIII: Fibronectina III

FADD: Proteína de dominio de muerte asociada a Fas

FCM: Carboximaltosa férrica

FPN: Ferroportina

FPN1: Ferroportina 1

Ftl1: Cadena ligera de ferritina

GABA: Acido gammaaminobutírico

GAG: Glicosaminoglicanos

GDF15: Factor de diferenciación de crecimiento 15

GOT (AST): Glutamato oxacetato transaminasa

GPCR: Receptores acoplados a proteína G transmembrana

GPT (ALT): Glutamato piruvato transaminasa

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

HAMP: Gen que codifica a la hepcidina, también péptido antimicrobiano de hepcidina

HCM: Hemoglobina corpuscular media

HCP1: Proteína transportadora de hemo 1

HFE2: Gen responsable de hemocromatosis en mutaciones

HIF: Factor inducible por hipoxia

HIF α : Factor inducible por hipoxia subunidad α .

HJV: Hemojuvelina

HO-1: Hemo oxigenasa 1

HO-2: Hemo oxigenasa 2

Hp: Hefestina

HSF: Factor estimulante de hepatocitos

HYF: Hiperferritinemia

ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular-1

ICD: Dominio intracelular

ICE: Enzima convertidora de IL-1

IDA: Anemia por deficiencia de hierro

IDR: Ingesta recomendada de hierro

IGD: Dominios inmunoglobulina extracelular

IKK: Kinasa del inhibidor de kappa B

IL-1: Interleucina 1

IL-1 α : Interleucina 1 α

IL-6: Interleucina 6

IL-8: Interleucina 8

INF- γ : Interferon γ

IP3: Trifosfato de inositol

IRAK: Cinasas asociadas a IL-1R

IRIDA: Anemia ferropénica refractaria a hierro

JH: Hemocromatosis juvenil

JNK: quinasa N-terminal Jun

LCT: Acidos grasos saturados de cadena larga

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

LIP: Hierro lábil citosólico

MAPK: Quinasa activadas por mitógenos

MCP-1: MOnocyte chemoattractant protein-1; proteína quimioatrayente de monocitos 1

MCT: Acidos grasos saturados de cadena media y corta

MMP: Metaloproteasas de la matriz

Módulo FIII: Módulo de fibronectina III

MPO: Mieloperoxidasa

NAP-1: Proteína activadora de neutrófilos

NCF: Factor quimiotáctico de neutrófilos.

NK: Natural killer

NLL: Receptores similares a NOD

NRAMP2: Proteína 2 de los macrófagos asociada a resistencia natural

NTBI: Hierro no transferido

O₂: Superóxido

OMS: Organización mundial de la salud

PE: Periodo experimental

PepT1: Tipo de proteína que actúa sobre el músculo esquelético

PI3K: Fosfatidilinositol-3 quinasa

PKA: Proteína quinasa A

PLAD: Preligando de ensamblaje de unión

PLC β : Fosfolipasa β

PPE: Periodo preexperimental

PRR: Reconocimiento de patrones receptores

QEPD: Proteína que interactúa con el receptor

RER: Retículo endoplásmico rugoso

ROS: Especies reactivas de oxígeno

s-E-Selectina: Selectina E soluble

sICAM-1: Molécula de adhesión intercelular soluble 1.

SLC: Proteína portadora de solutos

SODD: Silenciador de la muerte dominios

SPPL: Peptidasas de señal

STAT: Transductor de señal y activación de la transcripción

STEAP 3: Antígeno epitelial transmembrana de próstata-3

sTfR: Receptor soluble de transferrina

sTNF α : Fracción soluble de TNF α

sVEGFR2: Receptor soluble 2 del VEGF

TACE (ADAM 17): Enzima convertidora de TNF α

TAK: Proteína quinasa asociada al factor de crecimiento transformante β

TCM: Triglicéridos cadena media

Tf: Transferrina

TfR1: Receptor 1 de transferrina

TfR2: Receptor 2 de transferrina

Th: Células T helper

TIBC: Capacidad total de fijación de hierro

TIMP-1: Inhibidor de la metalopeptidasa 1

TLR: Receptores Toll-like

TNF α : Factor necrosis tumoral alfa

TNFR: Receptor soluble TNF

TRADD: Proteína adaptadora asociada al dominio de muerte del TNF-R

TRAF6: TNFR asociado a factor 6

Tsat: Índice de saturación de transferrina

TWSG1: Proteína homóloga de gastrulación -1

UCP-1: Proteína de desacoplamiento 1

VCM: Volumen corpuscular medio

VEGF: Factor de crecimiento endotelial

VHL: Enfermedad de Von Hippel-Lindau

I. RESUMEN

La anemia es un problema de salud pública a nivel mundial, siendo la deficiencia nutricional más común en todo el mundo. La anemia por deficiencia de hierro se estima que la padece un 15% de la población mundial y puede ocasionar retrasos en el desarrollo, alteraciones del comportamiento, complicaciones perinatales y deterioro de la capacidad de aprendizaje y la función cognitiva.

La disminución de las reservas de hierro en las enfermedades inflamatorias puede representar una verdadera deficiencia de hierro preexistente o una deficiencia funcional de hierro (anemia de estados inflamatorios). Los estados inflamatorios producen un aumento en los niveles de ferritina sérica así como la liberación de citocinas pro-inflamatorias y en última instancia, pueden conducir a hipoferremia a través de un aumento en la hepcidina con un secuestro de hierro en macrófagos y enterocitos duodenales.

La respuesta inflamatoria puede inducir anemia a través de la regulación negativa de la absorción de hierro y la eritropoyesis. Por lo tanto, está claro que muchos índices del estatus corporal de hierro se vean afectados por la inflamación, existiendo una relación estrecha entre el estado inflamaatorio y la anemia. La Organización Mundial de la Salud también ha publicado en numerosos informes que los biomarcadores inflamatorios deben evaluarse cuando se estudian los indicadores del estado nutricional de hierro.

Por otro lado, nuestro grupo de investigación ha demostrado que el consumo de leche fermentada de cabra es más beneficioso en comparación con la leche fermentada de vaca para paliar los efectos negativos de la



anemia ferropénica, debido a la mejora de las proteínas relacionadas con el metabolismo intestinal de hierro (citocromo duodenal b, transportador de metales divalentes 1 y ferroportina 1), mejorando la utilización digestiva y metabólica del hierro, aumentando los depósitos de hierro en los órganos diana y favoreciendo la recuperación de los parámetros hematológicos.

Sin embargo, a pesar de la clara relación entre homeostasis de hierro e inflamación, la señalización inflamatoria provocada durante la recuperación de la anemia aún no está completamente dilucidada y a pesar del papel crucial del estado inflamatorio en condiciones anémicas, hasta la fecha, ningún estudio ha evaluado la señalización inflamatoria durante la recuperación de la ferodeficiencia.

Teniendo en cuenta todas estas consideraciones, el objetivo general de este estudio ha sido evaluar los efectos del consumo de una dieta elaborada a base de leche fermentada de cabra en comparación con la de vaca, con contenido normal o sobrecarga de hierro, durante la recuperación de la anemia ferropénica nutricional, sobre la señalización celular inflamatoria durante la repleción crónica con hierro.

Los animales se sometieron a un PPE de 40 días, en los que un grupo se alimenta con dieta estándar, con un contenido normal de hierro (45 mg/Kg dieta) en el caso de los animales controles o con bajo contenido en hierro (5 mg/Kg dieta) en los animales anémicos. Las dietas empleadas en el PPE se han preparado con igual contenido de grasa (procedente de aceite de oliva, 10%) y proteína (aportada por caseína, 20%). Las diferencias entre las dietas empleadas en el PPE están determinadas por el corrector mineral, que en el

caso de la dieta que reciben los animales anémicos, se prepara omitiendo el hierro, para inducir la ferropdeficiencia, realizándose un estudio hematológico en ambos grupos experimentales al final de dicho periodo.

Posteriormente, los animales se someten a un PE, en los que son alimentados con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra (elaboradas con un 10% de grasa y un 20% de proteína, aportada por cada tipo de leche), con un contenido normal (45 mg/kg dieta) o sobrecarga de hierro (450 mg/Kg dieta). Tras 30 días de consumo de las dietas basadas en leche fermentada (cabra o vaca), se determina la señalización inflamatoria, evaluando la respuesta anti-inflamatoria (IL-13, IL-10 and IL-4) y pro-inflamatoria (IL-2, TNF- α , IL-1 β , IL-12p70 e IP-10).

Tanto la ferropdeficiencia como la sobrecarga de hierro inducen un estado inflamatorio generalizado. La dieta basada en leche fermentada de cabra mejora el estado hematológico y promueve respuestas metabólicas beneficiosas, que atenúan la inflamación sistémica durante la recuperación de la anemia y la sobrecarga hierro. Considerando el papel supresor de la hepcidina y la implicación en la recuperación de la anemia, la leche fermentada de cabra puede ser considerada como un alimento funcional con beneficios en la respuesta inflamatoria sistémica. Estos beneficios no se limitan a una recuperación de los parámetros hematológicos y del estatus corporal de hierro, sino también un ajuste homeostático en la señalización inflamatoria, que representa beneficios adicionales durante el curso de la recuperación de la anemia. La inclusión en la dieta de la leche fermentada de cabra podría ser una



estrategia dietética para disminuir la respuesta inflamatoria asociada a los suplementos tradicionales de hierro.

II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

1. EL HIERRO EN LA NUTRICIÓN

El hierro es un metal de transición y, como muchos de estos metales, puede asumir varios estados de oxidación. Las especies más comunes son el hierro ferroso divalente (Fe^{2+}) y el hierro férrico trivalente (Fe^{3+}). El potencial redox del hierro se puede modular en gran medida por la naturaleza de los ligandos unidos a este metal. Esto tiene implicaciones fisiológicas significativas ya que otros estados de oxidación, como el Fe^{4+} , pueden generarse transitoriamente como intermediarios clave durante las transformaciones oxidativas mediadas por metales. Otros elementos de transición como el cobre y el manganeso también pueden participar en reacciones redox biológicas (Theil et al. 1994). Sin embargo, durante la evolución, los organismos probablemente seleccionaron el hierro por las siguientes razones: 1) El hierro es el segundo metal más abundante en la corteza terrestre, quedando muy cerca del aluminio; 2) El hierro puede existir en múltiples estados de oxidación, lo cual es esencial para la transferencia de electrones y para unirse a ligandos biológicos; 3) El potencial redox del hierro varía de +1000 mV a -550 mV, dependiendo del entorno del ligando, mientras que el rango para otros elementos de transición es más estrecho; 4) Al explotar los estados de oxidación, el estado de rotación electrónica y el potencial redox, los sistemas biológicos pueden ajustar la reactividad química del hierro para satisfacer las necesidades fisiológicas (Wigglesworth et al., 1980; Theil et al., 1994).

La indispensabilidad del hierro para los organismos vivos se ejemplifica por el hecho de que sirve como cofactor para varias hemoproteínas y proteínas que no contienen hemo, incluidas muchas



enzimas. Las hemoproteínas están involucradas en numerosas funciones biológicas como la unión y el transporte de oxígeno (hemoglobinas), el metabolismo del oxígeno (catalasas, peroxidasas), la respiración celular y el transporte de electrones (citocromos). Las proteínas que contienen hierro no hemo son importantes para procesos celulares fundamentales como la síntesis de ADN, la proliferación y diferenciación celular (ribonucleótido reductasa), la regulación génica, el metabolismo de los fármacos y la síntesis de esteroides. Al principio de la evolución, antes de que el oxígeno emergiera como un componente abundante de la atmósfera, las células anaerobias adquirieron hierro ferroso soluble con relativa facilidad (Pereira et al., 2010). Más tarde, la acumulación de oxígeno oxidado ferroso a hierro férrico, que es prácticamente insoluble a pH fisiológico. Además, el ciclo redox del hierro ferroso y férrico en presencia de H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$, que se producen fisiológicamente durante la respiración aeróbica y las reacciones enzimáticas, produce radicales hidroxilo (reacción de Fenton). Estos a su vez atacan y dañan fácilmente las macromoléculas celulares. Por lo tanto, a pesar de su abundancia, la adquisición y el transporte de hierro plantea un desafío para las células y los organismos debido a su baja solubilidad y alta toxicidad. Para superar estos problemas, los organismos unicelulares, como las bacterias, sintetizan "sideróforos", quelantes de bajo peso molecular específicos del hierro que capturan el hierro extracelular y lo transfieren a la célula (Nielands et al., 1995; Hider et al., 2010). En contraste, las células de mamíferos adquieren hierro de proteínas transportadoras extracelulares (Hentze et al., 2010; Wang et al., 2011).

1.1. Metabolismo del hierro

1.1.1. Distribución del hierro en el organismo

El cuerpo humano contiene ~ 3-5 g de hierro (Wang et al., 2011). La mayor parte está presente como hemo en la hemoglobina de las células eritroides (>2 g) o en la mioglobina de los músculos (~300 mg). Los macrófagos en el bazo, el hígado y la médula ósea mantienen una fracción transitoria de hierro (~600 mg), mientras que el exceso de metal se almacena en el parénquima hepático dentro de la ferritina (~ 1000 mg). Se estima que todas las demás proteínas y enzimas que contienen hierro celular se unen a un total de ~ 8 mg de hierro (Figura 1).

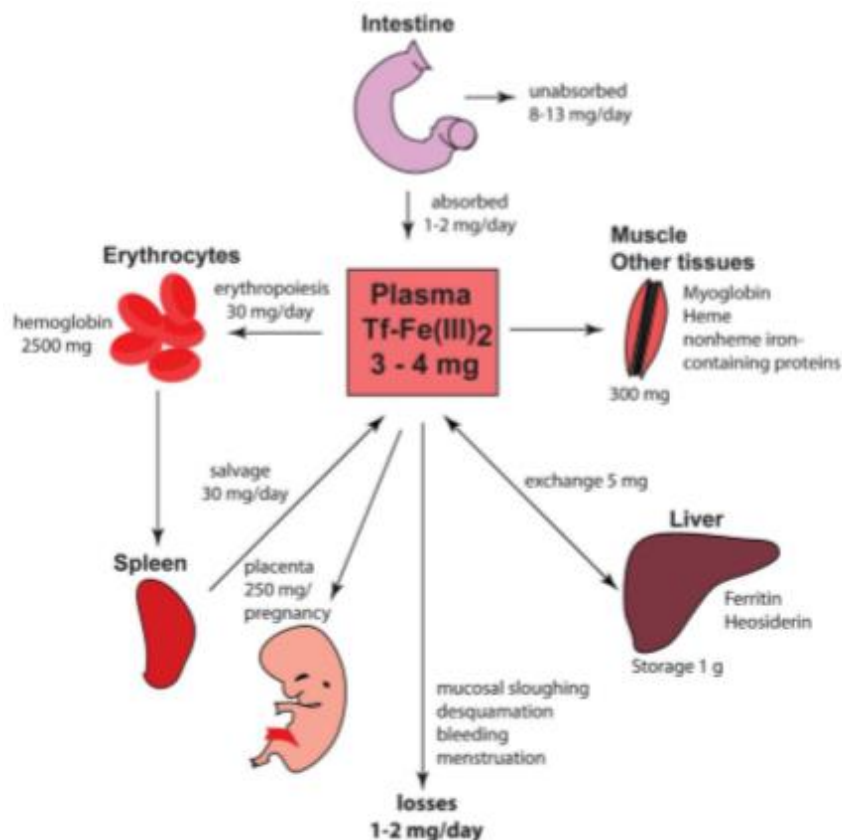


Figura 1. Absorción, distribución y reciclaje de hierro en el organismo e intercambio cuantitativo de hierro entre fuentes de hierro corporal.



Los niveles de hierro en el organismo se mantienen mediante la absorción diaria de ~1 a 2 mg de hierro en la dieta para dar cuenta de las pérdidas obligatorias de una cantidad similar de hierro a través del desprendimiento de las células de la mucosa y la piel, hemorragia y otras pérdidas. Aproximadamente 4 mg de hierro se encuentran en circulación unidos a transferrina, que representa el 0.1% del hierro total del cuerpo. La mayoría del hierro del cuerpo se encuentra en el compartimento eritroide de la médula ósea y en los eritrocitos maduros contenidos dentro del resto hemoglobina. Los macrófagos reticuloendoteliales esplénicos, que reciclan el hierro de los glóbulos rojos senescentes, proporcionan hierro para la nueva síntesis de glóbulos rojos. La Tf suministra hierro a los precursores eritroides en desarrollo, así como a otros sitios de utilización de hierro. Los hepatocitos hepáticos almacenan hierro en los depósitos de ferritina. Durante el embarazo, se transportan 250 mg de hierro a través de la placenta hasta el feto. La distribución de hierro en el cuerpo se ve alterada por la deficiencia de hierro y la sobrecarga de hierro (Hentze et al., 2010).

El hierro se suministra a los eritroblastos y a la mayoría de los tejidos a través de la transferrina (Tf) circulante, que transporta ~3 mg del metal. Teniendo en cuenta que el hierro unido a Tf se da vuelta > 10 veces al día, representa el grupo de hierro corporal más dinámico. El hierro plasmático se repone predominantemente por macrófagos reticuloendoteliales, y en pequeña medida (~1 a 2 mg / día) por absorción de la dieta, mediada por enterocitos duodenales. Los macrófagos adquieren hierro principalmente a través de la eritrofagocitosis y los enterocitos por internalización de hemo o hierro inorgánico de la luz intestinal (Knutson et al., 2003).

La absorción de hierro inorgánico implica la reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} por ascorbato y/o las ferrireductasas asociadas a la membrana como el citocromo B duodenal (DcytB) (McKie et al., 2008), acoplado al transporte de Fe^{2+} a través de la membrana apical por el transportador de metal divalente 1 (DMT1), también conocida como proteína 2 de los macrófagos asociada a resistencia natural (NRAMP2) o transportador de cationes divalente (DCT1) (Hentze et al., 2010; Wang et al., 2011). El mecanismo de internalización del

hierro hemo sigue estando mal definido y puede implicar el transporte directo del grupo hemo o endocitosis mediada por receptores (West et al., 2008). Los macrófagos y los enterocitos catabolizan el hemo en una reacción catalizada por las hemo oxigenasas-1 y -2 (HO-1 y HO-2), que liberan hierro inorgánico (Ryter et al., 2006). Ambos tipos de células exportan Fe^{2+} al plasma a través del transportador transmembrana, ferroportina (Hentze et al., 2010; Wang et al., 2011), en un proceso acoplado por la reoxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} . Este proceso está mediado por la ferroxidasa ceruloplasmina circulante o su homólogo, hephaestina, que se expresa en la membrana basolateral de los enterocitos duodenales, e interactúa físicamente con la ferroportina (Hentze et al., 2010; Wang et al., 2011).

El hierro exportado se elimina mediante la Tf plasmática que lo mantiene en un estado inerte redox y lo suministra a los tejidos. La carga de apo-Tf con hierro puede ser facilitada por las gastrinas. Estas hormonas peptídicas estimulan la secreción de ácido gástrico y también se ha propuesto que actúen como chaperonas transitorias de Fe^{3+} (Kovac et al., 2011). La Tf contiene dos sitios de unión férrica y está solo parcialmente saturada con hierro (30%) en condiciones fisiológicas. La concentración de Tf diferencial en plasma es de $\sim 5 \mu\text{mol/L}$, que corresponde a aproximadamente una décima parte de la Tf circulante total (Gkouvatsos et al., 2012).

La gran abundancia de apo-Tf insaturada permite una amortiguación eficaz de los niveles de hierro en plasma cuando están aumentados y evita la acumulación de hierro no transferido (NTBI), que es absorbido por las células del parénquima tisular y promueve el daño oxidativo (Brissot et al., 2011). El



NTBI se genera en estados de sobrecarga de hierro, como en la hemocromatosis hereditaria, donde la transferrina se satura gradualmente con hierro y pierde su capacidad de amortiguación.

1.1.2. Regulación del metabolismo corporal del hierro

El tráfico de hierro al plasma está controlado en gran medida por la hormona reguladora del hierro hepcidina, que primero se purificó del plasma (Krause et al., 2000) y la orina (Park et al., 2001) en función de su actividad antimicrobiana. Este péptido derivado del hígado se une a la ferroportina en la membrana plasmática de los enterocitos, macrófagos, hepatocitos y otras células, promoviendo su fosforilación e internalización dependiente de las Janus quinasas (Jak) que conduce a su degradación lisosómica (Nemeth et al., 2004; De Domenico et al., 2007). La ferroportina es el único exportador de hierro inorgánico en células de mamíferos. Por lo tanto, la inactivación de ferroportina causa retención de hierro intracelular (Weiss et al., 2009; Brasse-Lagnel et al., 2011). También se ha demostrado que la hepcidina promueve la degradación proteosómica de DMT1 (Brasse-Lagnel et al., 2011). La sobreexpresión patológica de hepcidina en condiciones inflamatorias prolongadas se asocia con la anemia de enfermedades crónicas, que se caracteriza por el desvío de hierro a los sitios de almacenamiento, hipoferremia y disponibilidad reducida de hierro para la eritropoyesis (Weiss et al., 2009) (Figura 2).

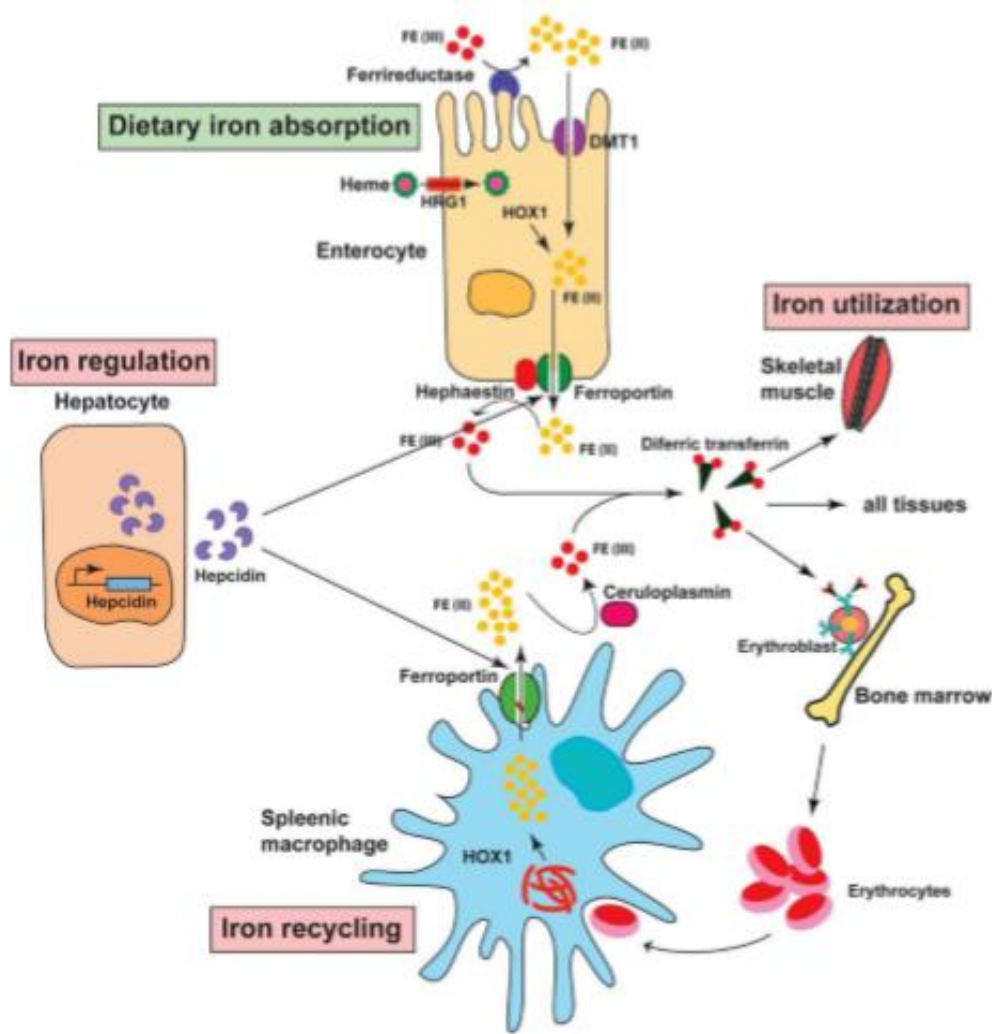


Figura 2. Regulación del metabolismo sistémico del hierro.

Se muestran los órganos y los tipos celulares implicados en el equilibrio sistémico del hierro. Los enterocitos duodenales absorben el hierro de la dieta a través de DMT1 ubicado en la superficie apical tras la reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} por DcytB. Los macrófagos reticuloendoteliales del bazo reciclan el hierro de los glóbulos rojos senescentes. Ambos tipos de células liberan hierro a través de la ferroportina con la ayuda de la hephaestina, que oxida el Fe^{2+} a Fe^{3+} . El hierro también se oxida por la ceruloplasmina en la circulación. La Tf captura y transporta el hierro en el organismo. La hormona hepática hepcidina regula el flujo de salida de hierro de estas células al regular la estabilidad de la ferroportina. La síntesis y secreción de hepcidina por los hepatocitos está influenciada por los niveles de hierro en el organismo, así como por las condiciones que afectan el metabolismo del hierro indirectamente, como la inflamación, la eritropoyesis y la hipoxia (Pantopoulos et al., 2012).



Una redistribución de hierro aún más severa ocurre en pacientes con anemia hereditaria por deficiencia de hierro refractaria al hierro (IRIDA), una enfermedad causada por la interrupción genética del gen *TMPRSS6* que codifica la serina proteasa matriptasa-2 transmembrana que regula negativamente la expresión de hepcidina (Finberg et al., 2008).

Por el contrario, la deficiencia de hepcidina, o en casos raros la resistencia a la ferroportina o a la hepcidina, son características de la hemocromatosis, que se asocia con la absorción de hierro en la dieta no controlada y la sobrecarga progresiva de hierro en los tejidos (Ganz y Nemeth, 2011; Sebastiani and Pantopoulos, 2011). Los pacientes con mutaciones sin sentido poco frecuentes en los genes *HAMP* que codifican para la hepcidina (Roetto et al., 2003) o con alto contenido de hierro del gen 2 (*HFE2*) (Papanikolaou et al., 2004), que codifican la síntesis de hepcidina o su activador la hemojuvelina (*HJV*), respectivamente, desarrollan hemocromatosis juvenil de inicio temprano (*JH*). El tipo más frecuente de hemocromatosis se asocia con mutaciones en el gen *HFE* (Feder et al., 1996), lo que conduce a una insuficiencia hepcidina más leve (Bridle et al., 2003). Otros tipos de hemocromatosis son causados por la inactivación del gen *TFR2* que codifica el receptor 2 de transferrina (*TfR2*) (Camaschella et al., 2000), o por mutaciones específicas en el gen *SLC40A1* que codifica para la ferroportina, que impiden la unión de hepcidina (De Domenico et al., 2005; Mayr et al., 2011). El primero está asociado con una expresión inadecuadamente baja de hepcidina y el segundo con resistencia a la hepcidina (De Domenico et al., 2005; Mayr et al., 2011).

La hepcidina se genera en los hepatocitos y otros tipos de células, como un prepéptido precursor de 84 aminoácidos (Ganz, 2011). Después de la escisión por la prohormona convertasa furina (Valore y Ganz, 2008), un precursor maduro biológicamente activo se secreta al plasma donde interactúa con la macroglobulina α_2 (Peslova et al., 2009). La expresión de hepcidina se regula a nivel transcripcional. La proteína de unión al potenciador CCAAT α (CEBP α) se une a un motivo CCAAT dentro del promotor HAMP y mantiene la actividad transcripcional basal (Courselaud et al., 2002). Alk3, un receptor de proteína morfogenética ósea (BMP) tipo I, también parece ser crítico para la expresión basal de hepcidina (Steinbicket et al., 2011). La transcripción de hepcidina es inducida por hierro o por la inflamación y es inhibida por deficiencia de hierro, aumento de las necesidades eritropoyéticas o hipoxia (Ganz and Nemeth, 2011).

La capacidad de respuesta de la expresión de hepcidina al hierro se estableció durante su descubrimiento inicial como un péptido inducido por hierro. Posteriormente, se descubrió que la administración oral de hierro aumenta el ARNm de hepcidina en humanos y ratones (Ganz and Nemeth, 2011). Sin embargo, los pacientes con hemocromatosis exhiben respuestas de hepcidina deterioradas a la ingestión de hierro (Piperno et al., 2007; Girelli et al., 2011), asociadas con una baja expresión de hepcidina, desproporcionada a su carga de hierro (Bridle et al., 2003, Gehrke et al., 2003). Del mismo modo, los modelos de hemocromatosis en ratones demuestran insuficiencia de hepcidina (Huang et al., 2005, Wallace et al., 2005). Existe evidencia de que el hierro hepático y el hierro circulante



inducen la expresión de hepcidina por distintas vías (Coorradini et al., 2011; Ramos et al., 2011).

1.1.3. Regulación de la expresión de hepcidina durante la anemia y la hipoxia

Es conocido que el aumento de las necesidades eritropoyéticas durante la anemia y la eritropoyesis ineficaz suprimen la síntesis de hepcidina (Wang and Pantopoulos, 2011). Si bien la eritropoyetina (EPO) puede reducir la expresión de hepcidina al atenuar la unión de C/EBP α al promotor HAMP, los experimentos con ratones proporcionaron evidencia de que los efectos inhibitorios de la EPO sobre la hepcidina son indirectos y requieren actividad eritropoyética (Pak et al., 2006; Vokurka et al., 2006). El factor de diferenciación de crecimiento 15 (GDF15) y la proteína homóloga de gastrulación-1 (TWSG1) son mediadores potenciales de la señalización de la médula ósea, ya que suprimen la hepcidina en las talasemias y otras anemias por carga de hierro (Tanno et al., 2007; 2009). Sin embargo, se ha excluido una función general de estas proteínas como "reguladores eritroides" de la hepcidina (Santini et al., 2011). Los pacientes con talasemia expresan niveles bajos de hepcidina a pesar de la sobrecarga de hierro, lo que indica un predominio de la señal eritroide sobre el hierro (Papanikolaou et al., 2005; Kattamis et al., 2006). En línea con estos datos, los experimentos en ratones confirmaron que el estímulo eritropoyético podría inhibir la inducción de hepcidina en respuesta al hierro o la inflamación (Wang and Pantopoulos, 2011).

También es conocido que la hipoxia suprime la hepcidina (Wang and Pantopoulos 2011). Los estudios genéticos en ratones con alteración hepática específica del gen VHL (von Hippel-Lindau), un regulador negativo de la expresión de la subunidad HIF α (factor inducible por hipoxia α), sugirieron un papel clave para los HIF en la regulación de la hepcidina (Peyssonnaud et al., 2007). Sin embargo, los datos bioquímicos no respaldan una actividad transcripcional directa de los HIF en el promotor HAMP (Volke et al., 2009). Es concebible que los efectos inhibitorios de la hipoxia sobre la expresión de hepcidina se desencadenen principalmente por el aumento del impulso eritropoyético. De acuerdo con este punto de vista, nuevos experimentos sugieren que HIF2 α hepático inhibe la expresión de hepcidina a través del aumento de la eritropoyesis mediada por EPO (Mastrogiannaki et al., 2012). Además, los estudios bioquímicos demostraron que la hipoxia regula negativamente la expresión de hepcidina al inhibir la señalización de SMAD4 (Chaston et al., 2011).

1.1.4. Metabolismo celular

Las células han desarrollado estrategias metabólicas para importar y utilizar el hierro de manera segura. La regulación de la absorción de hierro, el almacenamiento, el tráfico intracelular y la utilización son críticos para el mantenimiento de la homeostasis celular del hierro (Figura 3).

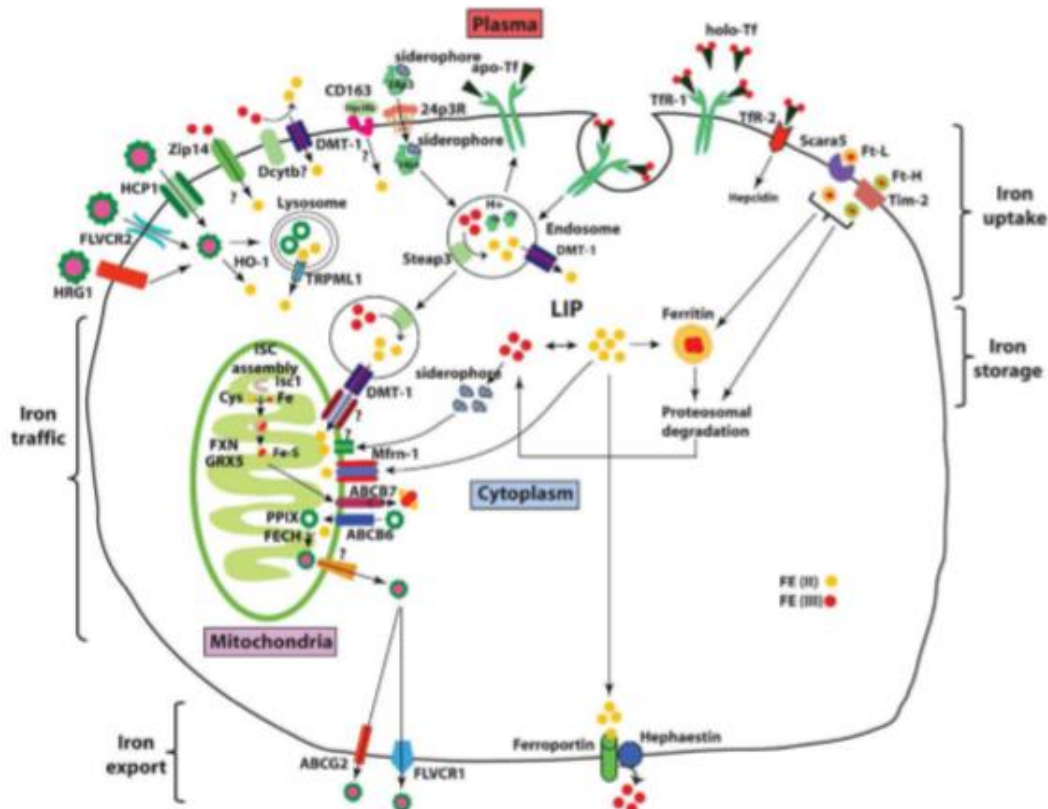


Figura 3. Metabolismo celular del hierro.

La mayoría de las células obtienen hierro de la Tf circulante. La holo-Tf cargada de hierro se une a TfR1 en la superficie celular y el complejo sufre endocitosis a través de fosas recubiertas de clatrina. Una bomba de protones acidifica el endosoma dando como resultado la liberación de Fe³⁺, que posteriormente se reduce a Fe²⁺ por Steap3 y DMT1 transporta a través de la membrana endosómica al citosol. DMT1 también facilita la absorción de hierro en la dieta. Apo-Tf se recicla de nuevo a la superficie celular y se libera de TfR1 al plasma para repetir otro ciclo. El hierro recién adquirido entra en el "grupo de hierro lábil" citosólico (LIP), que es redox-activo. El LIP está quelado por el sideróforo intracelular que facilita el tráfico intracelular de hierro a las mitocondrias a través de un receptor desconocido para la utilización metabólica (como la síntesis de grupos de hemo), y el hierro celular que no se utiliza se almacena en ferritina o se exporta a través de ferroportina. Las células también exportan hierro contenido en ferritina y hemo (Pantopoulos et al., 2012).

Las membranas celulares y las uniones estrechas entre las células impiden el paso libre de hierro. Las células por lo tanto, tienen transportadores, chaperones y quelantes, que permiten el paso del hierro a

través de membranas y facilitan el tráfico intracelular. Con pocas excepciones, la mayoría de estos transportadores pertenecen a la familia de proteínas portadoras de solutos (SLC). La mayoría de las células de mamíferos adquieren el hierro de la Tf circulante, al unirse al receptor de transferrina 1 (TfR1) (Hentze et al., 2010; Wang and Pantopoulos, 2011).

La Tf, una glicoproteína de 80 kDa, se sintetiza y secreta principalmente en el hígado. Cantidades variables son también producidas en los ganglios linfáticos, timo, bazo, glándulas salivales, médula ósea y testículos. La Tf une el hierro en plasma y fluidos extracelulares como linfa y líquido cefalorraquídeo. Está distribuida equitativamente entre plasma y fluidos extracelulares y tiene una vida media de 8 días. La Tf es una β -globulina homodimérica, que une dos moléculas de hierro férrico con alta afinidad. La unión y la liberación van acompañadas de un cambio conformacional. Además, la interacción entre el hierro y la Tf depende del pH: a un pH fisiológico en plasma, la Tf se une al hierro con mucha fuerza; mientras que la interacción es esencialmente abolida a pH ácido (<5). En condiciones fisiológicas, solo una fracción de Tf (~ 30%) está saturada de hierro.

El catabolismo de Tf tiene lugar principalmente en el hígado por degradación lisosómica o glomerular, filtración seguida de reabsorción y degradación en los túbulos renales (Aisen, 1998). Ratones y humanos portando mutaciones en el gen Tf desarrollan anemia severa (Hentze et al., 2010). Curiosamente, las células no hematopoyéticas muestran una sobrecarga masiva de hierro (Andrews, 200). Estos estudios destacan la



importancia de la liberación de hierro mediada por Tf para la eritropoyesis e implica la existencia de mecanismos alternativos para la captación celular de hierro por las células no hematopoyéticas.

El receptor de Tf1 (TfR1) proporciona la ruta fisiológica para la entrada de hierro unido a Tf en las células. Se expresa en la mayoría de las células de mamíferos nucleados y sus niveles se correlacionan con los requerimientos de hierro celular. El TfR1 es una glucoproteína transmembrana unida por disulfuro que forma un homodímero con una masa molecular de 180 kDa, donde cada subunidad se une a una molécula de Tf (Aisen, 2004). En contraste, la endocitosis de los complejos Tf-TfR1 es un proceso dependiente de energía que implica endocitosis a través de fosas recubiertas de clatrina. El hierro se libera de la Tf dentro de las vesículas endocíticas debido a la acidificación a través de la acción de una bomba de protones v-ATPasa. De esta manera, la Tf y el TfR1 experimentan cambios conformacionales en el endosoma acidificado que conducen a liberación de hierro (Dautry-Varsat et al., 1983; Bali et al., 1991). La reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} se produce por el antígeno epitelial transmembrana de próstata-3 (STEAP 3) (Ohgami et al., 2006). El DMT1 transporta el Fe^{2+} a través de la membrana endosómica hacia el citosol (Fleming et al., 1997; Gunshin et al., 1997). La DMT1 posee una función dual, que regula la homeostasis del hierro tanto sistémica como celular. La inactivación de DMT1 en ratones y humanos conduce a la anemia por deficiencia de hierro (Fleming et al., 1997; Gushin et al., 2005; Mims et al., 2005). Similarmente, las mutaciones espontáneas en STEAP3 o su ablación genética en ratones causan deficiencia de hierro en los eritroblastos pero no sistémicamente, lo que

sugiere la presencia de rutas alternativas para la captación de hierro (Ohgami et al., 2005; Lambe et al., 2009).

El hierro citosólico recién asimilado se transporta a sitios intracelulares para su uso local o para su almacenamiento en forma de ferritina. El complejo apoTf-TfR1 regresa después a la superficie celular donde la Tf se disocia del TfR1 (Aisen, 2004). La eliminación dirigida del gen Tfr1 del ratón causa letalidad embrionaria debido a anemia severa, lo que indica que el hierro mediado por la Tf es crítico para las células hematopoyéticas (Levy et al., 1999). Las mutaciones en el gen TfR1 en humanos no han sido descritas. Sin embargo, una enfermedad de tipo autoinmune con anticuerpos contra el TfR1 puede conducir a anemia severa (Larrick and Hyman, 1984).

Los hepatocitos pueden absorber el hierro unido a la Tf a través de los receptores TfR1 y TfR2. Este último comparte una similitud de secuencia de aminoácidos del 45% con la TfR1, pero difiere significativamente en términos de distribución de tejidos, afinidad por la Tf y regulación de hierro (Kawabata et al., 1999). El receptor TfR2 también es una glucoproteína transmembrana de tipo II con dominios citoplasmáticos y ectodominios y el complejo Tf-TfR2 también se internaliza a través de la endocitosis mediada por clatrina. Sin embargo, aunque el receptor TfR1 se expresa de forma casi ubicua, la expresión del receptor TfR2 está restringida a los hepatocitos hepáticos y a los eritroblastos diferenciados. Además, el receptor TfR2 se une a la Tf con una afinidad ~30 veces menor que el receptor TfR1 (West et al., 2000), lo que sugiere que representa solo una pequeña fracción de la absorción de hierro. Además, el receptor TfR2 es menos estable que el receptor TfR1, se



regula principalmente tras la traducción por degradación de proteínas y se estabiliza por la Tf diferencial (Johnson y Enss, 2004). La función principal del receptor TfR2 parece ser reguladora. El receptor TfR2 participa en la detección de la Tf cargada de hierro y el control de la expresión de hepcidina (Robb and Wessling-Resnick, 2004; Kawabata et al., 2005). Por lo tanto, las mutaciones en el gen TFR2 conducen a hemocromatosis debido a insuficiencia de hepcidina en humanos (De Domenico et al., 2005; Wallace et al., 2007).

Uno de los aspectos menos conocidos del metabolismo celular del hierro es el tráfico de hierro dentro de la célula. En general, se cree que el hierro absorbido por la célula se dirige a las mitocondrias a través del citoplasma. Se desconocen completamente los facilitadores del tráfico de hierro citosólico hacia las mitocondrias. El hierro absorbido por rutas dependientes o independientes de la Tf presumiblemente entra en un sistema lábil intermedio o pool de hierro lábil (LIP). El LIP también se conoce como pool de hierro "intercambiable", "regulador" o "quelable" porque su presencia ha sido documentada mediante el uso de quelantes metálicos (Wang et al., 2005). Se define como un grupo de bajo peso molecular de hierro débilmente quelado (Kruszewski, 2003), que incluye Fe^{2+} y Fe^{3+} , y representa una fracción menor de hierro celular (~ 3-5%). El LIP vincula la absorción celular de hierro con la utilización, almacenamiento o salida de hierro celular (Kruszewski, 2003). Se cree que el hierro dentro del LIP está en estado estacionario y equilibrio, y une diversos quelatos de bajo peso molecular, como los aniones orgánicos (fosfatos, citratos, carboxilatos) y ligandos polifuncionales (polipéptidos, sideróforos) (Petrat et al., 2002). Las

mitocondrias son los principales orgánulos consumidores de hierro celular. Aunque el hierro mitocondrial se une principalmente a proteínas o hemo, sí ha detectado hierro quelable dentro del orgánulo en hepatocitos y cardiomiocitos cultivados (Glicksteis et al., 2005). Se sospecha que una subpoblación de endosomas/lisosomas también contiene una gran cantidad de LIP, que deriva de la degradación de las proteínas transportadoras de hierro (Petrat et al., 2002).

El LIP está fácilmente disponible para la utilización de hierro y también puede contribuir a los efectos adversos como fuente de hierro redox-activo para la reacción de Fenton (Meneghini, 1997; Kruszewski, 2003). Además, el LIP funciona como mediador de la apoptosis. Por lo tanto, la escasez de hierro en la célula conduce a la apoptosis, mientras que se observan efectos similares al secuestrar el LIP con quelantes químicos como deferoxamina (DFO) o quelantes biológicos como la lipocalina 24p3 (Devireddy et al., 2005; Richardson, 2005). Además, la apoptosis inducida por estos agentes puede ser suprimida por la suplementación exógena con hierro (Devireddy et al., 2005).

1.1.5. Almacenamiento celular de hierro

El hierro celular que excede las necesidades inmediatas se almacena como óxido de hierro en la ferritina. La ferritina es una proteína ubicua conservada evolutivamente que puede acomodar hasta 4500 átomos de hierro. En los mamíferos, la ferritina es un heteropolímero de 24 subunidades de dos tipos, pesada (H) y ligera (L), que se ensamblan para formar una



carcasa esférica hueca (Arosio et al., 2006). La L-ferritina es predominante en los tejidos de almacenamiento de hierro, mientras que la H-ferritina se expresa preferentemente en células que absorben y liberan hierro rápidamente. Diferentes proporciones de subunidades de ferritina dan lugar a la heterogeneidad de la holoproteína en varios tipos de tejidos. La subunidad de L-ferritina glicosilada circula en el suero y presenta baja saturación con hierro. Los niveles de ferritina sérica aumentan en respuesta a la carga sistémica de hierro o a la infección (Wang and Pantopoulos, 2011). La secreción de ferritina puede proporcionar un mecanismo para limitar el almacenamiento de hierro (Arosio et al., 2006).

Los canales en la cubierta de ferritina pueden facilitar la entrada y salida de hierro. La actividad ferroxidasa de la H-ferritina convierte el Fe^{2+} en Fe^{3+} , que es necesaria para la deposición de hierro en la L-ferritina, induce la nucleación de hierro y aumenta la actividad ferroxidasa (Shi et al., 2009). La liberación de hierro de la ferritina está mediada por múltiples mecanismos (Arosio et al., 2006). Fisiológicamente, la degradación de ferritina se combina con el suministro de hierro metabólico disponible bajo condiciones de déficit de hierro (Zhang et al., 2010). El tratamiento con quelantes de hierro o la expresión de la ferroportina aceleran la degradación de la ferritina (De Domenico et al., 2006; 2009).

Los cambios en la disponibilidad de hierro regulan la expresión del gen de ferritina principalmente a nivel postranscripcional. Además, la expresión de ferritina se regula transcripcionalmente, lo que determina la distribución tisular de las cadenas H y L. La homeostasis del hierro se altera profundamente durante la inflamación y la infección. Aunque múltiples

mecanismos influyen colectivamente en el equilibrio de hierro (como la inducción de hepcidina por la IL-6), la alteración de la expresión de ferritina por las citoquinas proinflamatorias como TNF α o IL-1 α contribuye sustancialmente a la reprogramación de la homeostasis del hierro (Wang and Pantopoulos, 2011). La ferritina se activa transcripcionalmente por el estrés oxidativo a través de un elemento de respuesta antioxidante en la región promotora de los genes de ferritina (Cozzi et al., 2004). En contraste, el H₂O₂ extracelular inhibe la traducción del ARNm de ferritina (Hentze et al., 2010; Wang y Pantopoulos, 2011). Al secuestrar el hierro redox activo, la ferritina juega un importante papel antioxidante y promueve la supervivencia celular. Por lo tanto, la sobreexpresión de ferritina disminuye el LIP y la generación de especies reactivas del oxígeno, y confiere resistencia al estrés oxidativo (Epsztein et al., 1999). Además, el agotamiento de la ferritina H desencadena efectos opuestos (Cozzi et al., 2004). La supresión genética de la ferritina H produce letalidad embrionaria, lo que sugiere que su actividad ferroxidasa es crítica (Arosio and Levi, 2010). La ablación condicional de H-ferritina en los hepatocitos produce daño oxidativo inducido por el hierro porque estas células no pueden secuestrar ni desintoxicar el hierro (Arosio and Levi, 2010). Las mutaciones en la L-ferritina están asociadas con un trastorno neurológico autosómico dominante (neuroferritinopatía), caracterizado por una sobrecarga de hierro en el cerebro y atrapamiento de hierro en los depósitos de ferritina, lo que causa deficiencia funcional de hierro (Arosio and Levi, 2010).



1.1.6. Exportación de hierro celular

La exportación celular de hierro ocurre rutinariamente en células especializadas como los enterocitos y macrófagos que están involucrados en la absorción y reciclaje de hierro, respectivamente. El principal propósito de la exportación de hierro es mantener niveles adecuados de hierro en plasma y cubrir los requerimientos sistémicos. La exportación de hierro implica la coordinación entre numerosas enzimas y proteínas. La ferroportina facilita la exportación de hierro desde los enterocitos, macrófagos, hepatocitos y del endodermo visceral extraembrionario. El hierro se reduce en los endosomas antes de su liberación al citoplasma. Por lo tanto, la ferroportina exporta el Fe^{2+} , que tiene que oxidarse a Fe^{3+} tras su liberación al plasma para unirse a la Tf (Ganz, 2005). Este proceso está mediado por ferroxidasas como la ceruloplasmina (soluble en suero o membrana plasmática asociada a algunos tipos de células) y la hefaestina (expresada en la membrana plasmática de los enterocitos y otros tipos de células). Estas enzimas trabajan en conjunto con la ferroportina para coordinar la exportación de hierro y la oxidación. Como el cobre es esencial para la actividad ferroxidasa, se requieren niveles adecuados de este metal para un metabolismo de hierro adecuado (De Domenico et al., 2008).

2. EL PROCESO INFLAMATORIO

La inflamación es un proceso fisiológico complejo cuya función es combatir agentes patógenos externos y/o remodelar los tejidos dañados mediante la secreción de diversos mediadores inflamatorios y el reclutamiento

de células inmunes. El proceso inflamatorio se caracteriza por la extravasación de líquido al sitio donde se ubica el daño, que produce edema (tumor), aumento del flujo sanguíneo (rubor), aumento en la temperatura local (calor) y activación de terminales aferentes (dolor), así como, ocasionalmente, la pérdida de la función local. Por su duración, la inflamación puede clasificarse en aguda y crónica. La inflamación aguda es crucial para la reparación del tejido, involucra el aumento en el calibre vascular, el incremento de la permeabilidad para proteínas plasmáticas, así como la activación y migración de leucocitos al sitio lesionado. Cuando el estímulo dañino persiste o no hay resolución satisfactoria de la inflamación, se convierte en inflamación crónica. Aunque la inflamación es importante para inducir la reparación del tejido y erradicación de patógenos, la no resolución de la inflamación lleva a un proceso crónico y se convierte en un proceso deletéreo para el huésped. Requiere una regulación muy precisa, de hecho, tanto deficiencias como excesos en esta respuesta pueden causar morbilidad y mortalidad (Tracey, 2002).

En respuesta al daño tisular se produce el reclutamiento y activación de leucocitos polimorfonucleares y de monocitos en el área afectada. Estas células inician la cascada inflamatoria mediante la producción de una gama diversa de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias que están implicadas en la comunicación autocrina, paracrina y endocrina. Las citoquinas estimulan la producción de reactantes de fase aguda y a través de la vía endocrina, consiguen expandir la respuesta inflamatoria a nivel sistémico (Koj, 1996).



En el curso natural de la respuesta inmune, las células circulantes inmunocompetentes reconocen el antígeno generando una respuesta inflamatoria rápida y eficaz que limita la agresión. Cuando cesa el estímulo antigénico se detiene la producción de señales proinflamatorias desencadenando una respuesta antiinflamatoria en la que las células inmunocompetentes mueren por apoptosis. Si el estímulo antigénico perdura en el tiempo o la red de control no actúa de manera eficaz, las células inflamatorias prolongan su supervivencia haciendo que la respuesta sea crónica (Nathan, 2002).

2.1. Marcadores biológicos de inflamación

Un marcador biológico o biomarcador se define como "una característica que es objetivamente medible y evaluada como un indicador de los procesos normales biológicos, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica objetiva". En definitiva, es una proteína medida en la sangre cuya concentración refleja la presencia y/o la gravedad de un estado de enfermedad. El biomarcador ideal debe ser preciso, reproducible, medible a un coste razonable y debe añadir información pronóstica relevante por encima de la proporcionada por factores de riesgo convencionales (Park et al., 2012).

Los conocimientos fisiopatológicos de la inflamación proporcionan objetivos potenciales de diferentes moléculas que pueden ser medidas. Así, es posible determinar citoquinas pro-inflamatorias como es la interleucina-1 (IL-1), TNF- α , moléculas de adhesión como la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) y selectinas; citoquinas con efecto a nivel hepático como es la IL-6 y

otros reactantes de fase aguda. Por último, pueden ser evaluados otros indicadores de la respuesta celular a la inflamación, como es el recuento elevado de leucocitos. La IL-6, citoquina pro-inflamatoria, es considerada clave en el proceso de inflamación. Es sintetizada localmente en el área de daño o de infección por los macrófagos, células T, células endoteliales y fibroblastos. Su liberación está inducida por la IL-1 y se incrementa en respuesta al TNF- α . Interviene en la producción de inmunoglobulinas, en la diferenciación de linfocitos B, activa a los linfocitos T citotóxicos, células plasmáticas y modula la hematopoyesis. Sus niveles aumentan rápidamente, típicamente a las 1,5-3 horas después del estímulo. Constituye el más poderoso inductor de la síntesis de reactantes de fase aguda por parte del hígado (Panichi et al., 2004; Rao et al., 2005; Tripepi et al., 2005; Kaptoge et al., 2012).

La ferritina sérica es una proteína que se une con el hierro siendo su función la de almacenar hierro en el organismo y liberarlo de manera controlada. Es considerada en la actualidad como la principal prueba para detectar estados de deficiencia o de sobrecargas de hierro corporal. Las concentraciones séricas oscilan entre 40 a 200 ng/mL en sujetos normales. Además, forma parte de los reactantes de fase aguda cuyos niveles aumentan en enfermedades hepáticas, infección, inflamación y malignidad. La síntesis y liberación de ferritina por las células hepáticas está directamente estimulada por citoquinas inflamatorias como es IL-1 y TNF- α (Tran et al., 1997).

2.2. Señalización de citoquinas

Las citoquinas son moduladores clave de la inflamación y participan en la inflamación crónica a través de una compleja y a veces aparentemente contradictoria red de interacciones. Una mejor comprensión de cómo estas vías están reguladas ayuda a facilitar una identificación más precisa de agentes que median la inflamación y el tratamiento de enfermedades inflamatorias. Es posible clasificar las citoquinas en función de la naturaleza de la respuesta del sistema inmune, con citoquinas individuales que también realizan roles específicos que dependen del tipo de célula y la ubicación. Las citoquinas proinflamatorias clave incluyen interleucina-1 (IL-1), IL-6 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), todas las cuales se transmiten a través de los receptores de la citoquina tipo I que son estructuralmente divergentes de otros receptores de citocinas. Por el contrario, la quimioquina proinflamatoria crítica, IL-8, envía señales a través de receptores acoplados a proteína G (GPCR) (Figura 4). Las principales citoquinas proinflamatorias, presentan vías de señalización mediadas por receptores.

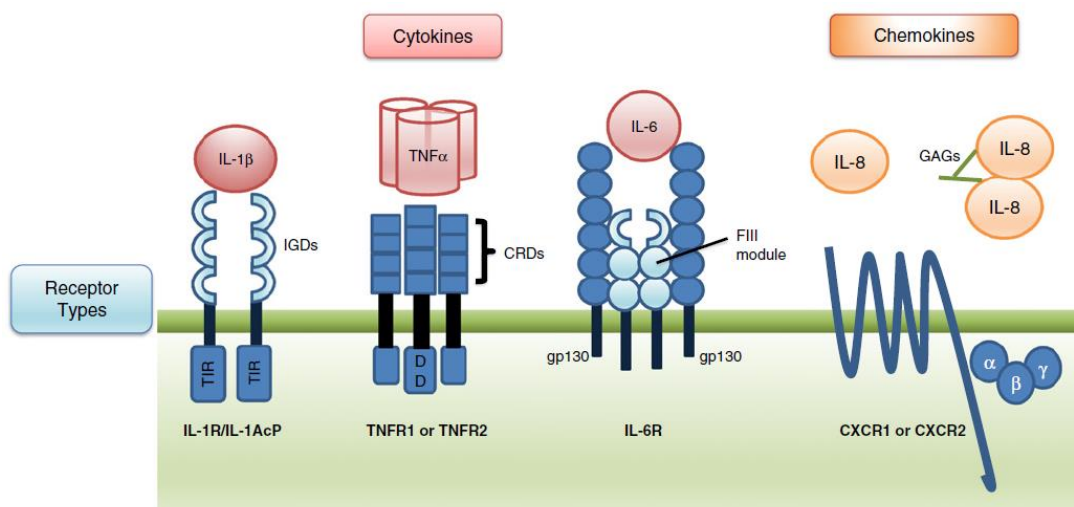


Figura 4. Citocinas, quimiocinas y sus receptores.

Las citocinas señalizan a través de oligómeros de un solo paso, receptores transmembrana de tipo I, con dominios extracelulares distintos para la unión del ligando y dominios intracelulares que permiten la transducción de señales. El receptor para IL-1 es un complejo de IL-1R1 y el IL-1RAcP formado después de la unión del ligando a la inmunoglobulina extracelular dominios (IGD); la señalización intracelular se media a través del dominio Toll / IL-1R (TIR). El TNF α trimérico se une a los dominios ricos en cisteína (CRD) de los condensadores preconfeccionados del receptor TNF (TNFR) y la señalización se media a través del dominio de muerte del receptor (DD). Finalmente, el IL-6R es una estructura multimérica con cadenas de IL-6R complejadas con gp130. La unión al ligando de la región está dentro de los módulos de fibronectina III (FIII) de las cadenas de IL-6R, pero la transducción de señal es a través de las moléculas de gp130 asociadas. La señalización de quimioquinas ocurre a través de la activación de los siete receptores acoplados a proteína G transmembrana (GPCR). La IL-8 se une a la cara extracelular de CXCR1 o CXCR2, lo que desencadena un cambio conformacional que da como resultado la activación de la proteína G (Turner et al., 2014).

2.2.1. Interleucina-1

La familia de la interleucina I (IL-1) ahora incluye 11 miembros: IL-1 α , IL-1 β , el receptor IL-1 antagonista (IL-1Ra), IL-18, IL-33, IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ , IL-36, IL-37 e IL-1Hy2 (Boraschi et al., 2011). Estas citocinas son expresadas por numerosos tipos de células, incluidos macrófagos y monocitos (Boraschi et al., 2011). La IL-1 β es una potente citocina proinflamatoria que originalmente se identificó como un pirógeno endógeno. Además, se ha encontrado que la IL-1 β tiene un efecto estimulante en células T CD4+ y promueve la diferenciación en los linajes de células T auxiliares, particularmente las células T helper (Th17) y un derivado no clásico del linaje de células Th1 (Santarlaschi et al., 2013).

Dado su papel central en la mediación de una amplia gama de respuestas de señalización inflamatorias, la IL-1 α y la IL-1 β son sintetizadas por múltiples tipos de células incluyendo monocitos, macrófagos, neutrófilos,

hepatocitos y macrófagos en todo el organismo (Arend et al., 2008). Mientras que la expresión de la IL-1 α es constitutiva en muchos tipos de células, por el contrario la expresión de la IL-1 β es inducida principalmente en respuesta a moléculas microbianas, aunque también puede estimular su propia expresión (Dinarello, 2009). La estimulación del reconocimiento de patrones receptores (PRR) que incluyen receptores Toll-like (TLR) y receptores similares a NOD (NLR) pueden ser inducidos tanto por moléculas virales como microbianas. Esto puede conducir a la inducción de la expresión de IL-1 β (Dinarello, 2009; Kawai and Akira, 2011). Miembros de la familia de la IL-1, incluyendo la IL-1 β , típicamente se sintetizan como precursores sin una secuencia secretora. Por lo tanto, la IL-1 β debe escindir-se para generar la citocina activa (Casanova et al., 2011) y esto se realiza mediante la conversión de la enzima convertidora de IL-1 (ICE), o caspasa-1, que está contenida en un complejo intracelular especializado denominado inflamasoma (Dinarello, 2009).

Por el contrario, la IL-1 α es activa tanto en su forma precursora como en la forma madura, pero típicamente permanece en el núcleo, el citoplasma o en la membrana celular (Casanova et al., 2011). A pesar de estas diferencias, la IL-1 α y la IL-1 β tienen afinidades similares para los dos receptores de IL-1, IL-1R1 e IL-1R2. El heterodimérico complejo de IL-1R1 y la proteína accesoria (IL-1RAcP) constituye el receptor funcional para la IL-1. Normalmente, la IL-1 β se une primero al receptor IL-1R1 en la superficie de las células diana y luego se recluta el IL-1RAcP, formando así un complejo de señalización trimolecular (Figura 5). La IL-1R pertenece a la superfamilia IL-1R/TLR debido a la presencia de un dominio en el citoplasma llamado dominio TIR (Toll/IL-1 Receptor). Después de la unión al ligando, la molécula adaptadora, MyD88,

interactúa con el receptor IL-1R1 a través de su dominio TIR (O'Neill, 2008). La transducción de señales conduce a la activación de ambos por la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) y el factor de transcripción NF- κ B, dando como resultado la expresión de citoquinas proinflamatorias. Además de esta vía clásica de señalización, también hay evidencia de que la proteólisis intramembrana del receptor IL-1R1 genera tanto un ectodominio soluble y un dominio intracelular, con este último modulando directamente la activación de MAPK (Elzinga et al., 2009). Por lo tanto, el procesamiento proteolítico de los receptores citosólicos podría contribuir a la señalización por un mecanismo no canónico.

La familia de la IL-1 también incluye miembros que tienen un papel inhibitorio, para suprimir la señalización y de ese modo limitar la respuesta inflamatoria. En primer lugar, el receptor IL-1R2 tiene un dominio intracelular mínimo que es inactivo y, por lo tanto, la señalización no se induce después de la unión del ligando. Por lo tanto, se piensa que el receptor IL-1R2 actúa como receptor señuelo, secuestrando la IL-1 en un mecanismo antiinflamatorio (Dinarello, 2009). En segundo lugar, el antagonista del receptor IL-1R (IL-1Ra) puede unirse al receptor IL-1R1 y evitar el reclutamiento de IL-1RAcP (Boraschi et al., 2011), lo que inhibe la transducción de señales. El IL-1Ra se expresa como una de las cuatro isoformas diferentes, generadas por una secuencia alternativa, que incluye una forma secretada (sIL-1Ra) y tres formas citosólicas (Planck et al., 2012). Es secretada por varios tipos de células, que incluyen neutrófilos, macrófagos, monocitos y hepatocitos (Planck et al., 2012). La sIL-1Ra es una de las proteínas de fase aguda secretadas por el hígado en respuesta a estímulos inflamatorios (Planck et al., 2012). Su ausencia es



perjudicial, y los ratones deficientes en IL-1Ra son propensos al desarrollo de varios trastornos inflamatorios (Pennica et al., 1984; Plank et al., 2012). A pesar de este hallazgo, se cree que la eficacia de IL-1Ra es mucho menor en relación con el agonista, lo que resulta en la necesidad de hasta 1000 veces el efecto del IL-1Ra para inhibir la señalización de la IL-1 (Gabay et al., 2010). Esto es debido al alto nivel de expresión del receptor IL-1R1 en la mayoría de células a las que se une IL-1Ra, mientras que la propia IL-1 solo necesita unirse a unos pocos receptores para activar la transducción de señales (Gabay et al., 2010). Dado que tres de las isoformas de IL-1Ra son intracelulares, se ha formulado la hipótesis de que el sitio crítico de IL-1Ra podría ser una ubicación citosólica donde podría bloquear la expresión de la IL-1 o la señalización al alterar la estabilidad del ARNm (Planck et al., 2012). Así, mientras que el IL-1Ra actúa como un supresor natural de la inflamación, por sí mismo podría ser insuficiente para suprimir la señalización de la IL-1 y su función podría ser más compleja, implicando la modulación intracelular de la IL-1.

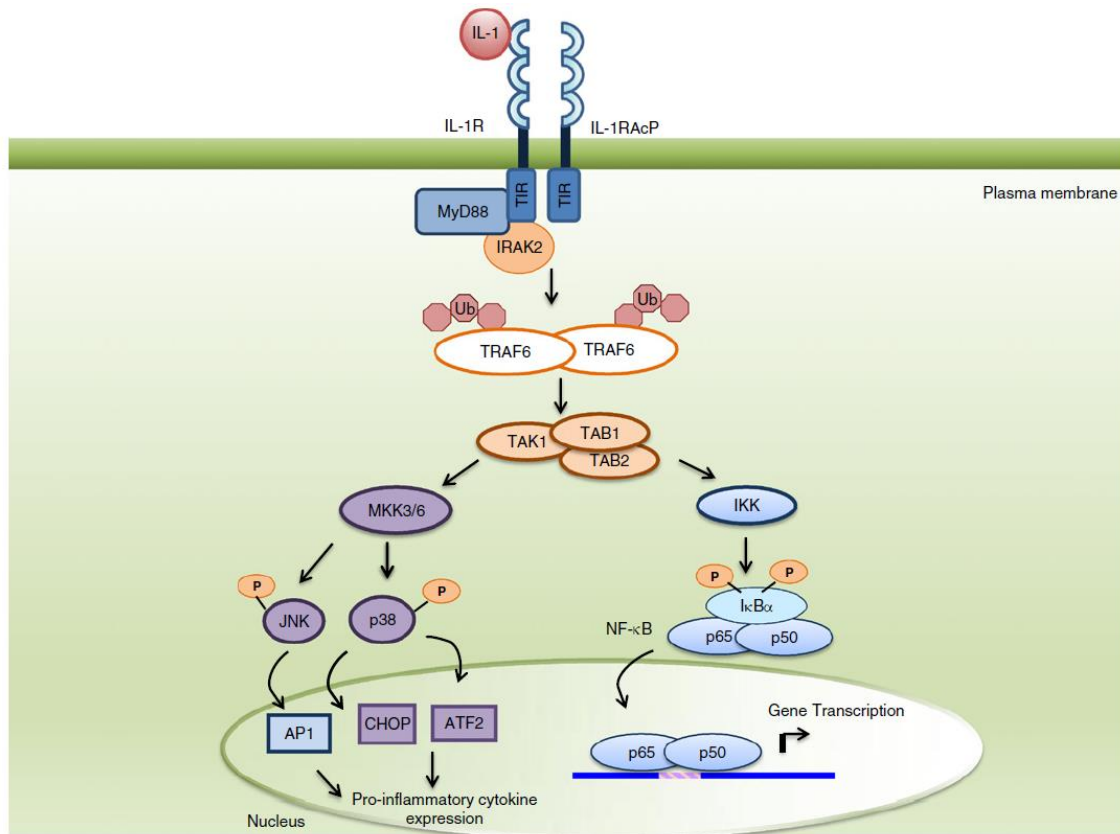


Figura 5. Transducción de señal de la IL-1 para la activación del NF-κB.

La IL-1 se une al IL-1R, que se asocia con el IL-1RAcP en la superficie de la célula, y las señales a través del adaptador TIR, MyD88, a través de interacciones TIR-TIR. Posteriormente, las cinasas asociadas a IL-1R (IRAK) se reclutan en el complejo receptor / MyD88. Los IRAK activados promueven la poliubiquitinación del factor 6 asociado a TNFR (TRAF6) a través de enlaces lisina. El TRAF6 poliubiquitinado interactúa con TAK1 en un complejo con TAB1 y TAB2, lo que finalmente conduce a la fosforilación de IκBα y su disociación de las subunidades NF-κB. El IκBα fosforilado se ubiquitina posteriormente para la degradación por el proteasoma. El heterodímero p65 / p50 fosforilado se transloca al núcleo, donde se une a los elementos de respuesta en los genes dependientes de NF-κB y conduce a la inducción de la expresión génica proinflamatoria. Además, la activación de TAK1 /TAB1 /TAB2 conduce a la fosforilación y activación de las proteína quinasas activadas por mitógenos (MAPK), JNK y p38. Estas quinasas luego fosforilan y activan la transcripción de factores, lo que induce la expresión de genes proinflamatorios. Abreviaturas: IKK, IκB cinasa; IκBα, inhibidor de κB; MyD88, factor de diferenciación mieloide 88; NF-κB, factor nuclear κB; TAB1, proteína de unión a TAK1 1; TAB2, proteína de unión a TAK1 2; TAK1, transformando la quinasa 1 activada por el factor β de crecimiento (Turner et al., 2014).



2.2.2. Factor de necrosis tumoral alfa

El término factor de necrosis tumoral se confirió inicialmente a dos moléculas, factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), un factor de necrosis tumoral derivado de monocitos y TNF β un factor de necrosis tumoral derivado de linfocitos. El TNF α se identificó inicialmente en la década de 1970 como un factor inducido por una endotoxina, siendo un factor sérico responsable de la necrosis de ciertos tumores *in vivo* e *in vitro* (Carswell et al., 1975). Posteriormente se aisló el TNF α (Aggarwal et al., 2003) y su gen clonado (Pennica et al., 1984). Es un potente mediador inflamatorio que es fundamental para la acción inflamatoria del sistema inmune innato, incluida la inducción de citoquinas, activación o expresión de moléculas de adhesión y estimulación del crecimiento (Rothe et al., 1992; Tartaglia et al., 1992; Smith et al., 1994; Locksley et al., 2001). Estimula la proliferación normal de células, ejerce actividad citolítica o citostática contra las células tumorales y causa efectos inflamatorios, antivirales e inmunorreguladores (Gupta, 2002). También se ha demostrado que el TNF α realiza varias funciones adicionales relacionadas con el metabolismo lipídico, la coagulación, la resistencia a la insulina y la función endotelial. De hecho, se ha demostrado que es una de las citocinas más importantes y con más efectos mediadores de la inflamación y la inmunidad, El TNF α es el miembro prototípico de la superfamilia de TNF de tipo II, proteínas de transmembrana que incluyen 30 receptores y 19 ligandos asociados con diversas funciones en la diferenciación celular, inflamación, inmunidad y apoptosis (Lobito et al., 2011). Se secreta principalmente desde macrófagos activados, aunque también puede ser secretado por otros tipos de células,

incluidos los monocitos, Células T, mastocitos, células NK, queratinocitos, fibroblastos y neuronas (Tracey et al., 2008).

El TNF α se sintetiza como un precursor de proteína transmembrana (mTNF α) con una masa molecular de 26 kDa (Tracey et al., 2008), después a través del retículo endoplásmico rugoso (RER), complejo de Golgi y el endosoma es transportado a la superficie de la célula (Stow, 2009). Los monómeros del TNF α están asociados a la membrana plasmática como trímeros no covalentes (Hehlgans and Männel, 2002; MacEwan, 2002) antes de ser escindido por una metaloproteasa, la enzima convertidora de TNF α (TACE o ADAM17) (Black et al., 1997). La escisión de la TACE da como resultado la producción del ectodominio soluble de 17 kDa de TNF α (sTNF α) que constituyen el potente ligando que activa los receptores del TNF (Lobito et al., 2011). Después de la escisión de la TACE, la porción de membrana es proteolíticamente procesada por las peptidasas de señal (SPPL) SPPL2a y SPPL2b (Friedmann et al., 2006). Esta escisión produce un dominio intracelular (ICD) que se transloca al núcleo e induce la señalización de citoquinas proinflamatorias, particularmente la expresión de la IL-12 (Friedmann et al., 2006). Por lo tanto, la molécula precursora del TNF α está sujeta a múltiples eventos de escisión para liberar potentes moduladores de la inflamación.

Las acciones moleculares del sTNF α extracelular y mTNF α ocurren a través de la unión a uno de los dos receptores: TNFR1 (TNFRSF1A, p55TNFR1, p60, CD120a) y TNFR2 (TNFRSF1B, p75TNFR, p80 o CD120b) (Lobito et al., 2011) (Figura 6). Los receptores se expresan en diferentes tipos de células, el receptor TNFR1 está ampliamente expresado, mientras que el

receptor TNFR2 se expresa predominantemente en leucocitos y células endoteliales (Bradley, 2008). Los dos receptores TNFR median distintos efectos biológicos.

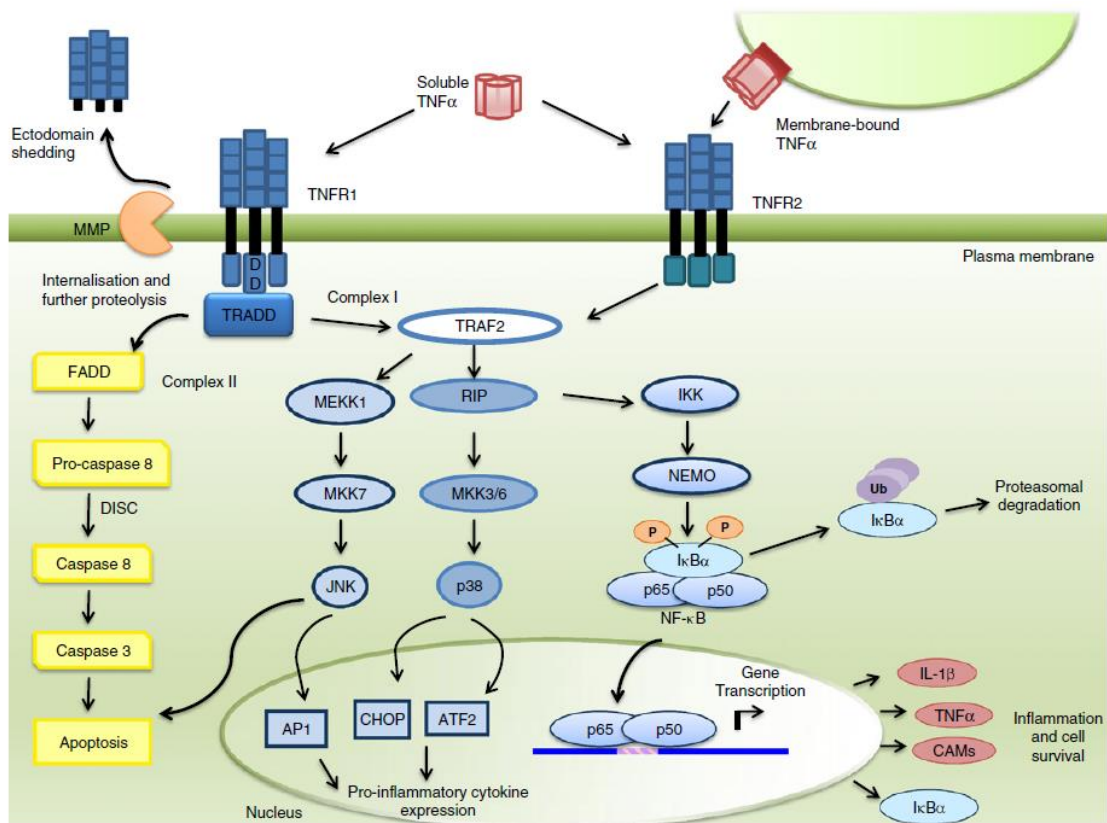


Figura 6. Señalización a través de los receptores 1 y 2 del TNF.

Después de la unión de TNF α a TNFR1, el receptor experimenta eliminación e internalización de ectodominio, eventos que están relacionados con la cascada de señalización intracelular. El desprendimiento del ectodominio está mediado por metaloproteasas de la matriz que residen en la membrana plasmática y va seguido de una proteólisis adicional. La siguiente señalización incluye la internalización del receptor que se considera una señal proapoptótica a través de la formación del complejo II (TRADD / FADD / Pro-Caspase-8). Se cree que la superficie celular antes de la internalización conduce a la formación del Complejo I (TRADD / TRAF2 / RIP), seguida por las cascadas de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) que conducen a la transcripción. La activación factorial JNK activa el heterodímero AP1 de c-Jun y Fos, mientras que p38 activa numerosos factores de transcripción. En adición, la señalización del complejo I conduce a la activación de IKK, que da como resultado la fosforilación y degradación de I κ B α por el sistema de ubiquitina-proteasoma. El heterodímero NF- κ B activado de p65 /p50 puede migrar al núcleo, unirse a elementos de respuesta e inducir la expresión de genes proinflamatorios. Es importante destacar que el resultado de las vías de

señalización del complejo I favorecen la expresión de citoquinas proinflamatorias y la supervivencia celular. Dicho esto, es bien sabido que MAPK JNK también puede contribuir a la inducción de la muerte celular. Abreviaturas: CAM, moléculas de adhesión celular; DISC, complejo de señalización inductora de muerte celular; FADD, proteína de dominio de muerte asociada a Fas; JNK, quinasa N-terminal Jun; MMP, metaloproteasa de la matriz; QEPD, proteína que interactúa con el receptor; TRADD, proteína del dominio de muerte asociado a TNFR1; TRAF2, proteína 2 asociada a TNFR (Turner et al., 2014).

Los ratones knockout para TNFRSF1A (TNFR1) son resistentes al choque endotóxico, pero son mucho más susceptibles que los ratones knockout para TNFRSF1B (TNFR2) para hacer frente a *Listeria monocytogenes* (Peschon et al., 1998). Por lo tanto, los efectos proinflamatorios del TNF α parecen estar mediados predominantemente a través del receptor TNFR1.

Tanto el receptor TNFR1 como el receptor TNFR2 son glicoproteínas de membrana únicas con un 28% de homología en sus dominios extracelulares (MacEwan, 2002). Características comunes en esta región incluyen cuatro dominios ricos en cisteína (CRD), cada uno de los cuales comprende tres enlaces disulfuro de cisteína-cisteína, y un preligando de ensamblaje de unión (PLAD) implicado en la trimerización del receptor (Chan et al., 2000). Es importante destacar que los receptores difieren por la presencia de un dominio de muerte intracelular (DD) en el extremo carboxilo del TNFR1 (MacEwan, 2002) que es capaz de impulsar la apoptosis o la inflamación a través de interacción con las moléculas adaptadoras asociadas (Fig. 6). El reclutamiento de TRADD al receptor TNFR1 es necesario para ambas vías de señalización (Pobezinskaya et al., 2008). Después, uno de los dos complejos se forma, ya sea en la superficie de la célula (complejo I) o después de la



internalización (complejo II) (Micheau and Tschopp, 2003). La formación del complejo I requiere el factor 2 asociado a TNFR (TRAF2) y la proteína de interacción con el receptor (RIP), lo que conduce a cascadas de proteínas cinasas que desencadenan la expresión génica proinflamatoria. Alternativamente, si el primer complejo no induce señal, el complejo II se forma para inducir la apoptosis. En el complejo II, la proteólisis y la internalización del receptor da como resultado el reclutamiento de FADD y la procaspasa-8 para dar lugar a la señalización que induce la inactivación del complejo (Micheau and Tschopp, 2003).

Es importante destacar que se ha encontrado que varios receptores de citoquinas se someten al desprendimiento del ectodominio por enzimas proteolíticas localizadas en la membrana. Este proceso libera una forma soluble del receptor que puede limitar la disponibilidad de citocinas a otras células. Tanto el receptor TNFR1 como el receptor TNFR2 son escindidos por TACE y después de la unión del ligando, finaliza la señal, disminuyendo la disponibilidad de los receptores de la membrana plasmática, así como la liberación del receptor TNFR soluble para secuestrar el TNF α libre (Porteu and Nathan, 1990; Müllberg et al., 2000). La producción del receptor TNFR1 soluble ha sido descrita en condiciones inflamatorias (Sakimoto et al., 2009). Como se ha mencionado previamente, el receptor TNFR1 forma un trímero antes de la unión del ligando, lo que podría conducir a la activación de la transducción de la señal a través del dominio de muerte DD. Esto puede ser suprimido por la asociación del dominio de muerte silenciador (SODD) con el DD del TNFR. Después de la unión al TNF α , el SODD se separa del receptor TNFR, permitiendo el reclutamiento de moléculas adaptadoras (Jiang et al.,

1999). Por lo tanto, existen mecanismos intrínsecos para limitar la señalización del receptor TNFR en ausencia de ligando, así como para reducir la señalización tras la unión al ligando.

2.2.3. Interleucina-6

La familia de la interleucina-6 (IL-6) son citoquinas pleiotrópicas que incluyen los miembros IL-6 e IL-11 (Peters et al., 1998). La IL-6 se expresa mediante una matriz de células, incluidas los fagocitos mononucleares, células T, células B, fibroblastos, células endoteliales, queratinocitos, hepatocitos y células de la médula ósea (Jücker et al., 1991). La IL-6 está involucrada en la hematopoyesis y es crítica en la transformación de células B en células plasmáticas productoras de anticuerpos (Kishimoto, 2010), activación de células T, diferenciación y regulación de los fenotipos Th2 y Treg (Takeda et al., 1998; Smith and Maizels, 2014). También es importante en la secreción de proteínas de fase aguda por el hígado (Gauldie et al., 1998), en cooperación con la IL-1 (Dinarello, 2009). Otros nombres que recibe la IL-6 ilustran algunas de estas actividades biológicas, incluyendo el factor estimulante de hepatocitos (HSF), factor 2 estimulador de células B (BSF-2) y factor de diferenciación de células B (BCDF). El descubrimiento y la clonación de BSF-2 en 1986 (Hirano et al., 1986) fue seguido por el reconocimiento del hecho de que estas actividades diversas se debieron a una sola citoquina, renombrada como IL-6 (Kishimoto, 2010). La codificación del gen de la IL-6 se mapeó en el cromosoma 7 en humanos y codifica una glucoproteína que varía en masa de 21 a 28 kDa, dependiendo del grado de modificación postraduccional (Parekh et al., 1992).



La IL-6 sigue una vía de señalización a través de una cadena α del receptor de IL-6 que se une al ligando (IL-6R) (gp80, CD126) y el componente transductor de señales gp130 (CD130) (Peters and Müller, 1998). El CD130 es el transductor de señal común para varias citoquinas en la familia IL-6 y se expresa de manera ubicua (Taga and Kishimoto, 1997), mientras que la IL-6R la subunidad está típicamente restringida a linfocitos y hepatocitos (Goette et al., 2010). Siguiendo la unión a la IL-6, la señal es traducida por las cadenas gp130 que activan la señalización JAK-STAT (Figura 7). Esta vía de señalización conduce a la fosforilación de STAT3, miembro de la familia STAT más amplia de factores de transcripción que están asociados con la señalización de citocinas, y como resultado la translocación nuclear STAT3 y expresión génica de IL-6. Además del receptor unido a la membrana, una forma soluble de IL-6R (sIL-6R) es generada por TACE mediada escisión y puede capturar la IL-6 circulante y hacer que esté disponible para unirse y activar a la glucoproteína gp130 a través de un proceso de señalización trans (Peters y Müller, 1998). Por el contrario, la forma soluble de la glucoproteína gp130 funciona como un receptor señuelo antiinflamatorio, bloqueando la señalización trans del receptor sIL-6R (Jostock et al., 2001). Más recientemente, la glucoproteína gp130 se ha encontrado que produce un pequeño fragmento C-terminal de 18 kDa que termina la transducción de la señal de la IL-6, posiblemente conduciendo a la apoptosis (Graf et al., 2008). Por lo tanto, un aspecto común de la señalización de citoquinas implica la división proteolítica del receptor que modula la señalización o produce un ectodominio soluble.

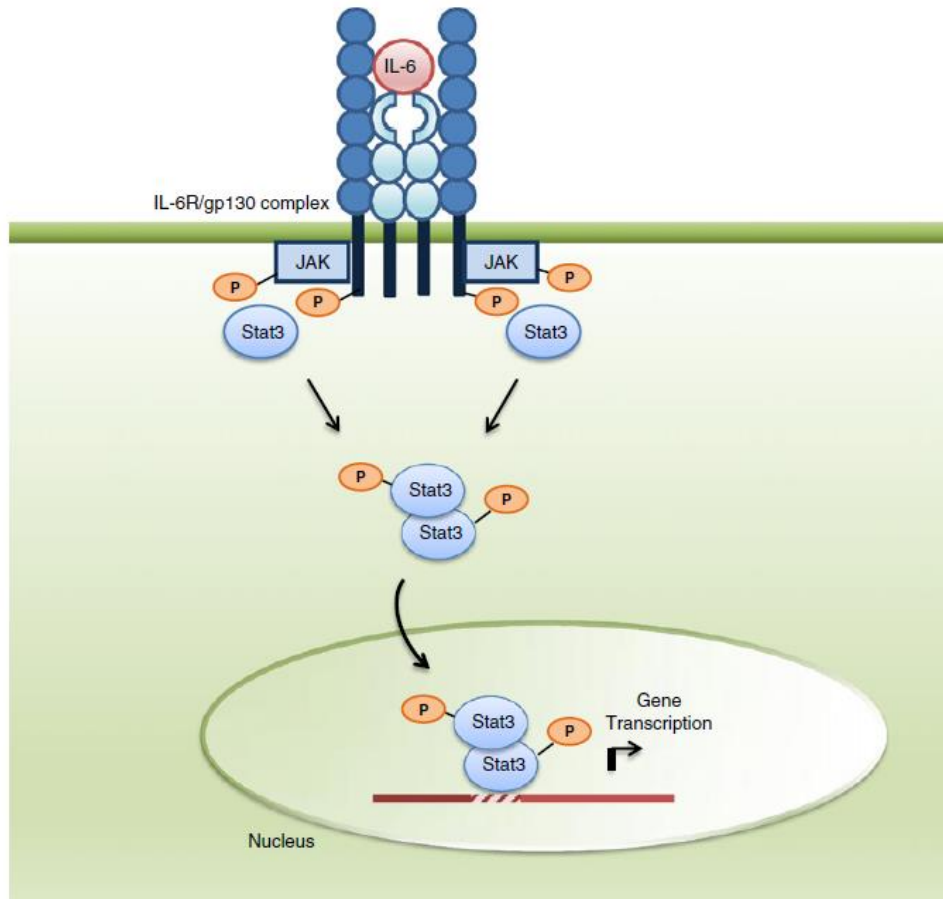


Figura 7. Vía de señalización de la IL-6.

La citocina se une a los dominios FIII de las cadenas IL-6R, activando finalmente la transducción de señales a través de las proteínas gp130. Esto lleva al reclutamiento de janus quinasas (JAK) al receptor, que fosforilan el receptor. Esto conduce a la fosforilación y dimerización de STAT3. Los dímeros de STAT3 fosforilados se translocan al núcleo y se unen a un sitio de activación de IFN γ (GAS) en genes sensibles. Esto conduce a la transcripción de genes proinflamatorios y moléculas de adhesión intracelular (Turner et al., 2014).

2.3. Señalización de quimiocinas

Las quimiocinas proinflamatorias son producidas por las células principalmente para reclutar leucocitos a los sitios de infección o lesión (Constantin et al., 2000). Aunque la quimiotaxis es la característica cardinal de las quimiocinas, su rol fisiológico es más complejo, y muchas tienen homeostático adicional o funciones intrínsecas en la hematopoyesis, inicio de



respuestas inmunitarias adaptativas y vigilancia inmunitaria (Moser et al., 2004). Inicialmente las quimiocinas se dividieron en grupos basados en tener funciones quimiotácticas u homeostáticas, pero varias quimiocinas de doble función se han descrito desde entonces (Constantin et al., 2000). Hasta la fecha, 44 quimiocinas y 23 quimiocinas receptores han sido identificados en el genoma humano (Nomiya et al., 2013). La expresión de receptores y moléculas de adhesión particulares a quimiocinas contribuyen a la migración selectiva y la especificidad tisular de los leucocitos. Las quimiocinas son un grupo de proteínas pequeñas (8-12 kDa) caracterizado por la presencia de tres a cuatro residuos de cisteína conservados.

Se pueden subdividir en cuatro familias según el posicionamiento de los residuos de cisteína N-terminales. La subfamilia C-X-C está caracterizada por la separación de las dos primeras cisteínas por un aminoácido variable, mientras que en la subfamilia C-C los residuos de cisteína son adyacentes el uno al otro. La mayoría de las quimiocinas conocidas están las subfamilias CXC y C-C, pero dos subgrupos de quimiocinas adicionales han sido descritos. El tercer grupo de quimiocinas (subfamilia C) carece de la primera y tercera cisteínas y por lo tanto posee sólo un único residuo de cisteína en la posición conservada. Esta subfamilia incluye el péptido quimiotáctico específico de linfocitos XCL1 (linfotactina) (Kelner et al., 1994). Una cuarta subfamilia (CX3C) tiene los dos residuos de cisteína N-terminal separados por tres aminoácidos variables (Bazan et al., 1997). En humanos, esta familia solo tiene un miembro: CX3CL1 (fractalquina), que es único en poseer una mucina parecida al tallo glicosilado que permite que exista como soluble o quimiocinas unidas a la membrana (Bazan et al., 1997).

Las señales de las quimiocinas se transducen a través de la unión a miembros de la superfamilia del receptor de proteína G (GPCR) (Moser et al., 2004), aunque también hay evidencia de que otras vías efectoras son posibles (Thelen, 2001). Hay heterogeneidad en la expresión del receptor de quimiocinas en las células y pueden formar complejos múltiples, como la demostración que CXCR4 y CCR5 pueden heterodimerizarse cuando son estimulados con sus respectivos ligandos (Isik et al., 2008). Las proteínas G se asocian con el grupo carboxilo terminal del receptor y cambios conformacionales inducidos por señales que activan la cascada mediada por proteína G (Thelen, 2001). En adición, hay varios receptores señuelo para las quimioquinas que no están acoplados a proteínas G y, por lo tanto, no participan de la señalización, incluyendo: receptor de antígeno Duffy para quimiocinas (DARC), D6 y CCX-CKR (Borroni and Bonocchi, 2009). Los receptores señuelo de quimiocinas desempeñan un papel en la amortiguación de los dos subgrupos generales en función de la presencia o ausencia del aminoácido dinámico (Glu-Leu-Arg) inmediatamente anterior a la primera cisteína (Baggiolini, 2001). Las quimioquinas ELR-positivas (CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7 y CXCL8/IL-8) son angiogénicas y actúan principalmente a través del receptor CXCR2 (Sarmiento et al., 2012). El dominio ELR, junto con los residuos CXC, son necesarios para la activación del receptor (Sarmiento et al., 2012). Por el contrario, las quimioquinas que no son ELR (CXCL4, CXCL9, CXCL10, CXCL11 y CXCL17) son angiostáticas y actúan principalmente a través del receptor CXCR3B (Lee et al., 2013). La excepción a esto es la CXCL12, una quimioquina que no es ELR pero es angiogénica y ejerce sus efectos sobre la musculatura vascular principalmente



a través de CXCR4 y CXCR7 (Kryczek et al., 2007). El papel de las quimiocinas se extiende así más allá de la quimiotaxis para incluir contribuciones a la vascularización y la angiogénesis en cáncer.

La liberación de quimiocinas de las células también puede desencadenar la invasión destructiva de células inmunitarias en tejidos y órganos esenciales. Esto ocurre en la diabetes tipo 1 y tipo 2 donde la glucotoxicidad activa las inflamasomas NLRP3 en las células del páncreas (Schroder et al., 2010), lo que impulsa la producción y la liberación de la IL-1 β (Maedler et al., 2002). Estas luego actúan de manera autocrina, vinculando al IL1R de células β y desencadenando la activación del factor de transcripción NF- κ B (Maedler et al., 2002), resultando en la síntesis y liberación de una serie de otras citoquinas y quimiocinas en las células de los islotes de Langerhans (Donath et al., 2010). Estas moléculas desencadenan la infiltración del páncreas por macrófagos y otras células inmunes (Eguchi and Manabe, 2013). En conjunto, este *pool* tóxico de citocinas liberadas por células endógenas e inmunes da como resultado la destrucción apoptótica de las células β secretoras de insulina (Suk et al., 2001; Lee, 2002).

2.3.1. Interleucina-8

También conocida como CXCL8, la interleucina 8 (IL-8) es una de las quimiocinas más estudiadas y es un mediador inflamatorio crítico. Fue originalmente identificada por su papel en la quimioatracción de neutrófilos, para lo cual fue nombrada como factor quimiotáctico de neutrófilos (NCF) y proteína activadora de neutrófilos 1 (NAP-1) (Baggiolini et al., 1992; Miller et al., 1992). La estructura genómica de la IL-8 fue la primera mapeada a fines de la

década de 1980 (Mukaida et al., 1989). La proteína IL-8 pesa de 6-8 kDa y pertenece a una subdivisión de las quimiocinas CXC (Hall et al., 1999). Actúa como un factor angiogénico en células endoteliales microvasculares humanas (Heidemann et al., 2003). El papel principal de la IL-8 en la inflamación es el reclutamiento de neutrófilos (Hammond et al., 1995), aunque también es responsable de la migración quimiotáctica y activación de monocitos, linfocitos, basófilos y eosinófilos en los sitios de inflamación (Miller et al., 1992). La IL-8 se puede encontrar en forma de monómero o dimérico y ambas son necesarias para la activación de los neutrófilos, aunque con cinética distinta (Das et al., 2010). Además, la unión de dímeros a glicosaminoglicanos (GAG) es más eficiente y, por lo tanto, facilita la unión al endotelio vascular, así como la unión a los receptores de quimiocinas CXCR1/2 en los neutrófilos (Das et al., 2010). De hecho, se descubrió que la heparina es la única proteína de tipo GAG asociada con la IL-8 para inducir quimiotaxis de neutrófilos (Schlorke et al., 20012). Aunque la IL-8 puede unirse a ambos receptores de quimiocinas CXCR1 y CXCR2, se ha encontrado que la señalización quimiotáctica es principalmente a través del receptor CXCR1 (Hammond et al., 1995; Hall et al., 1999; Heidemann et al., 2003). Después de unirse al receptor CXCR1 o CXCR2, una serie de cascadas de señalización intracelulares se activan dentro de las células diana para inducir quimiotaxis y desgranulación (Figura 8).

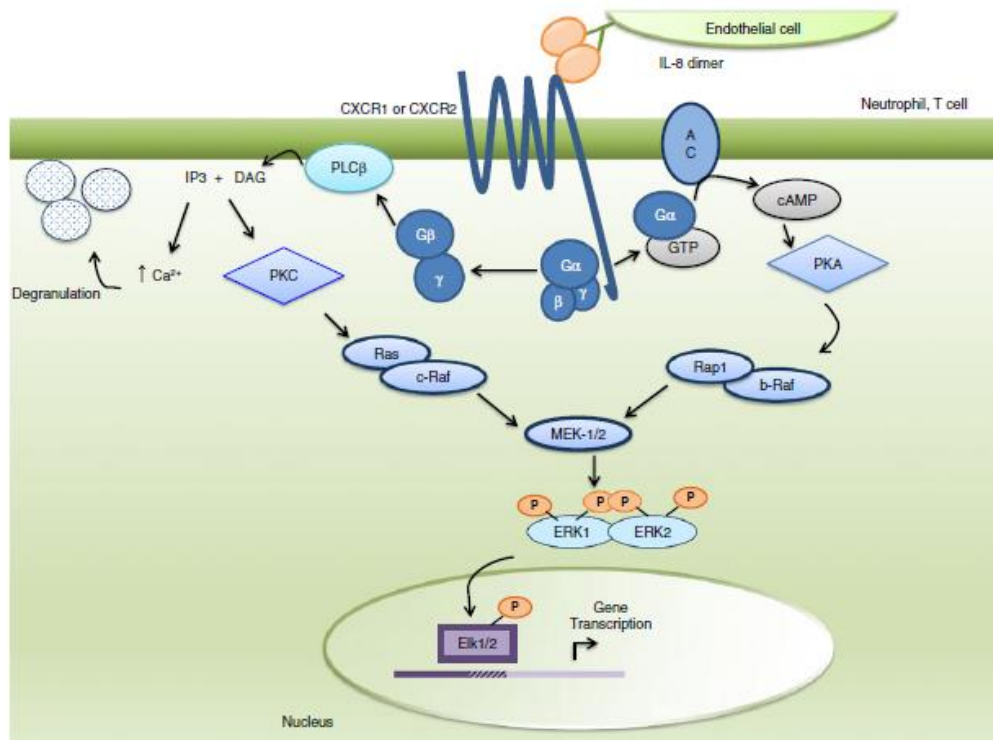


Figura 8. Vía de señalización de la IL-8.

Se cree que la IL-8 existe como monómeros en el plasma, pero que las concentraciones locales en los tejidos favorecen la formación de dímeros y estos dímeros son modificados por la adición de glicosaminoglicanos (GAG). Los GAG facilitan la unión de IL-8 a las células endoteliales; posteriormente pueden unirse a linfocitos de migración. La unión de IL-8 a los receptores de quimiocina CXCR1 o CXCR2 conduce a la activación de las proteínas G heterotriméricas ($G\alpha$, β , γ). La subunidad $G\alpha$ en particular activa la adenilato ciclasa unida a la membrana (AC), que genera AMP cíclico (cAMP) y cAMP puede activar la proteína quinasa A (PKA). Alternativamente, el heterodímero $G\beta\gamma$ puede dissociarse de la subunidad $G\alpha$ y estimular la fosfolipasa β ($PLC\beta$), que escinde fosfolípidos para producir inositol 3,4,5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). El DAG activa la proteína quinasa C (PKC), que induce la activación de proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) mientras que el IP3 desencadena la desgranulación al estimular la liberación de Ca^{2+} desde las reservas intracelulares (Turner et al., 2014).

Estas cascadas se inician principalmente a través de la activación de las proteínas G intracelulares, lo que resulta en la disociación de las proteínas del receptor y separación de las subunidades $G\alpha$ y $G\beta\gamma$. Las subunidades de la

proteína G posteriormente estimulan a las enzimas (adenilato ciclasa o fosfolipasa C) que puede activar la señalización proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) y altera la expresión génica para promover la supervivencia celular, la proliferación e inflamación. Es importante destacar que la producción de trifosfato de 3,4,5-inositol (IP3) desencadena la liberación de las reservas de calcio intracelular que estimula la desgranulación. Los gránulos de neutrófilos contienen varias moléculas efectoras, como las proteínas antimicrobianas mieloperoxidasa, defensinas y lisozima (Faurischou and Borregaard, 2003). Además, la señalización de la IL-8 a través de MAPK y fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K) induce la expresión de moléculas de adhesión como la integrina, Mac-1, que se requieren para la quimiotaxis (Takami et al., 2002). Por lo tanto, la IL-8 media el reclutamiento y la activación de neutrófilos a través de mecanismos complejos de señalización y adhesión.

2.4. Citocinas y quimiocinas en la inflamación

Se han descrito varias enfermedades en las que la aberrante o excesiva señalización por citoquinas contribuye a la patogénesis (Aggarwal, 1994). La regulación positiva de la IL-1 y la IL-6 se ha observado en una variedad de enfermedades crónicas, trastornos inflamatorios y autoinmunes como la diabetes tipo I, artritis reumatoide, nefritis lúpica, psoriasis y esclerosis sistémica (Park and Pillinger, 2007; Rosa et al., 2008; Brugos et al., 2012; Portugal-Cohen et al., 2012). Está bien establecido que el TNF α está directamente involucrado en la patología de varias enfermedades sistémicas, así como también afecta a varias patologías a través de efectos más localizados en los tejidos. Es importante destacar que los niveles adecuados



del TNF α también son esenciales para realizar funciones homeostáticas clave, ejerciendo una variedad de efectos sobre la función celular normal, incluida la proliferación celular, necrosis y apoptosis (MacEwan, 2009). El TNF α cumple una función clave regulando la respuesta inflamatoria (Bradley, 2008) que incluye respuestas tanto sistémicas como locales. Las acciones del TNF α incluyen desencadenar la vascularización y la expresión de células endoteliales con mediadores lipídicos que promueven el edema tisular, así como moléculas de adhesión de leucocitos que estimulan la infiltración de las células inmunes. La inducción temprana de la expresión de quimiocinas y la infiltración de linfocitos en respuesta a la infección microbiana se debe a las acciones del TNF α (Roach et al., 2002). Varios estudios han demostrado la eficacia de la terapia anti-TNF α en enfermedades inflamatorias. Es importante destacar que la función central del TNF α en la inflamación sinovial ha llevado a desarrollar estrategias terapéuticas como el desarrollo de bloqueadores del TNF α , que han demostrado ser altamente efectivos (Feldman et al., 2010).

También se ha descubierto que las quimiocinas específicas y sus receptores se encuentran elevados en los tejidos de pacientes con afecciones inflamatorias. La IL-8 se puede detectar en el líquido sinovial de pacientes con diversas enfermedades reumáticas inflamatorias (Seitz et al., 1992) y los niveles de IL-8 en la mucosa están elevados en pacientes con colitis ulcerosa activa (Mahida et al., 1994). Niveles elevados de quimiocinas CC, particularmente CCL2, CCL3 y CCL5 se encuentran en las articulaciones de pacientes con artritis reumatoide, coincidiendo con el reclutamiento de monocitos y células T en tejidos sinoviales (Loetscher et al., 1994; Shadidi et al., 2003). Además, los receptores de las quimiocinas CCR5, CCR6, CCR7,

CXCR3, CXCR4 y CXCR5 también se han implicado en la producción de linfocitos B activos y actividad de citoquinas sinoviales (Nanki et al., 2009). La fisiopatología de la psoriasis también está relacionada con la inflamación mediada por quimiocinas y el reclutamiento de linfocitos en la piel, como la infiltración de células T mediada por el ligando CXCR3 (Flier et al., 2001). La distribución diferencial de los receptores de quimiocinas en diferentes tipos de leucocitos también proporciona una herramienta para determinar el papel de las quimiocinas individuales en enfermedades particulares. Han pasado unos 60 años desde que se describió la primera citocina y desde ese momento, más de 300 citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento han sido descritos, con funciones variables no solo inmunes sino también de regulación homeostática. Sin embargo, a pesar de esto todavía falta dilucidar cómo estos factores, solos y en conjunto con otros factores, influyen en la homeostasis y eventos inflamatorios.

En la Tabla 1 se muestran las principales citosinas inflamatorias y sus acciones.

Tabla 1. Acción de las citocinas inflamatorias (Anderson, 1996).

IL-6	Incrementa la transcripción de hepcidina (vía STAT) Induce la transcripción de ferritina
INF-γ	Disminuye la proliferación y diferenciación de los precursores eritroides Altera la respuesta de los precursores eritroides a la EPO Disminuye la expresión de la ferroportina Estimula la expresión del DMT1
TNF-α	Inhibe la producción de EPO renal Disminuye la respuesta de los precursores eritroides a la EPO Disminuye la proliferación y diferenciación de los precursores eritroides Disminuye la vida media de los hematíes (diseritropoyesis, daño

	celular, aumento de eritrofagocitosis)
	Induce la transcripción de ferritina
	Disminuye la transcripción de hemojuvelina
	Aumenta la expresión del DMT1
IL-1	Inhibe la producción de EPO renal
	Disminuye la respuesta de los precursores eritroides a la EPO
	Disminuye la proliferación y diferenciación de los precursores eritroides
	Induce la transcripción de ferritina
IL-10 <u>20,21</u>	Aumenta el TFR-1 en los macrófagos
	Estimula la traducción de ferritina

DMT-1: transportador 1 de metales divalentes; EPO: eritropoyetina; IL: interleucina; INF: interferón; STAT: transductor de señal y activador de la transcripción; TNF: factor de necrosis tumoral; TFR: receptor de la transferrina.

3. LECHE DE CABRA

A través de estudios arqueológicos, se ha considerado que, desde la prehistoria, la especie humana pasó paulatinamente de la recolección y caza a la agricultura y ganadería. En un inicio, la ganadería era trashumante, que consiste en una forma de pastoreo en continuo movimiento, adaptándose a las condiciones climáticas. Hay evidencias arqueológicas de la existencia de cabras entre los animales de este tipo de ganadería en la cultura Natufia (años 11000 hasta 9300 A.C. (Vega, 2003).

La cabra es considerada uno de los animales domésticos más aprovechables por su leche, carne y piel (Sánchez, 2004). Además, su talla pequeña, adaptabilidad y docilidad hicieron de la cabra un animalpreciado por el hombre primitivo como se puede apreciar en las distintas pinturas y tallas del arte rupestre (Boza y Sazn-Sampelayo, 1997).

Desde el punto de vista nutricional, la leche es una fuente importante de macro y micronutrientes. Además, la leche contiene factores bioactivos con un

papel protector de la salud y desarrollo (Boza y Sanz-Sampelayo, 1997), por lo que cobra una gran importancia sobre todo en la infancia y adolescencia. Es por esta razón que la leche de cabra es un alimento en estudio por el grupo de investigación AGR-206 del PAIDI desde hace 20 años, con numerosas publicaciones relacionadas con su consumo y la prevención de la anemia, osteoporosis y arterioesclerosis (Alfárez et al., 2001; López Aliaga et al., 2005).

Además, el consumo de leche de cabra o derivados de la misma es una alternativa en aquellos grupos de personas que presentan alergia a la proteína de leche de vaca (Infante et al., 2003) o intolerancia a la lactosa (Bevilacqua et al., 2001; Lara-Villoslada et al., 2004).

3.1. Características organolépticas

Las principales propiedades organolépticas que caracterizan la leche de cabra, desde un punto de vista comercial, son el color, el sabor y el olor.

La leche de cabra tiene un color blanco mate ya que su grasa no contiene β - carotenos, y es de aspecto limpio y sin grumos.

La leche de cabra tiene un sabor y olor característico, que se le confiere durante la obtención y manipulación. Esta característica es poco atractiva, pero puede corregirse mediante desodorización al vacío (Borras, 1968).

El sabor suele ser dulzón, por la lactosa, agradable y “sui generis” y se debe a los ácidos grasos libres, sobre todo a los de cadena ramificada 4-etiloctanoico y 4-metiloctanoico. También se debe a la mayor concentración de ácidos grasos, cáprico y caprílico, así como mirístico y palmítico



fundamentalmente (Quiles y Hevia, 2000; Clark and García, 2017). Además, la leche de cabra también posee ácidos grasos libres de cadena ramificada con menos de 11 átomos de carbono, que son prácticamente inexistentes en la leche de vaca. Estos ácidos grasos libres son los responsables de los sabores “caprinos” característicos de estos productos lácteos (Amigo y Fontecha, 2011).

Presenta mayor concentración de cloro y otros minerales, lo que le confiere un sabor más salobre.

El olor de la leche de cabra recién ordeñada suele ser un olor neutro, si bien sobre todo en la leche del final de la lactación, algunas veces aparece un olor característico llamado cáprico, debido en gran parte a los ácidos grasos capróico, cáprico y caprílico, característicos de la leche de cabra (Quiles y Hevia, 2000)

Por último, también hay que tener en cuenta la alimentación caprina al hablar del sabor y del olor. Diversos tipos de vegetales como especies de *los géneros Lupinus sp., Brassica sp., Digital sp., Capsella sp.*, así como diversas plantas aromáticas hacen del sabor de la leche de cabra poco atractivo (Arbiza, 1986).

3.2. Composición nutricional

La composición de la leche de cabra presenta una naturaleza dinámica que varía según la genética (especie, raza, individuo), estado de lactación, estado de salud del animal y factores medioambientales (alimento, clima, estación, método de ordeño), entre otros factores (Huppertz and Kelly, 2009; Claeys et al., 2014). En líneas generales, su composición se encuentra en los siguientes rangos (Tabla 2).

Tabla 2. Composición de la leche de cabra.

Composición de la leche de cabra (%)	
Sólidos totales	11,70-15,21
Proteína (Nx6,38)	2,90-4,60
Grasa	3,00-6,63
Lactosa	3,80-5,12
Cenizas	0,69-0,89
pH	6,41-6,70

Fuente: Boza et al., 1992.

La cantidad de grasa en la leche está influenciada por el clima, siendo la leche de final de verano la que mayor cantidad de ácidos grasos C18:1, C18:2 y C18:3, y la que menos de ácidos grasos C:4 y C:16 (Chandan et al., 1992; Chacón, 2005) probablemente por la distinta alimentación, así como el momento de la lactación (Parkash and Jenness, 1968).

La dieta del animal también tiene repercusión sobre la composición de la leche, sobre todo en su contenido proteico, graso y vitamínico (Boza, 1992).

La Tabla 3 muestra la comparación de la leche de cabra y vaca en cuanto a su composición aproximada.

Tabla 3. Comparación de la composición de la leche de cabra y vaca.

Composición	Leche cabra %	Leche vaca %	Diferencias en %
Sólidos totales	13,57	11,36	16,3 +
Proteínas	3,48	2,82	19 +
Grasa	5,23	3,42	34,6 +
Cenizas	0,75	0,65	13,3 +
Lactosa	4,11	4,47	8,8 -

Fuente: Modificada de Sanz Ceballos et al., 2009.

3.2.1. Proteínas y aminoácidos



Las proteínas van a estar ligados a la genética, ya que varían mucho de una raza a otra (Martin, 1996).

Las leches de cabra y vaca difieren esencialmente en sus micelas de caseína (estructura, composición y tamaño), proporción de fracciones de proteínas individuales, y el mayor contenido de nitrógeno no proteico y compuestos minerales que se encuentran en la leche de cabra.

A grandes rasgos, la calidad y composición proteica es parecida en la leche de vaca y cabra, aunque estudios como los de Belewu and Aiyegbusi, 2002 afirman que la proteína caprina puede tener mayor valor biológico.

Por otro lado, las caseínas de la leche de cabra son más solubles, siendo así su absorción más fácil (Boza y Sanz-Sampelayo, 1997). Tras esta premisa, López- Aliaga y col. (2003) demostraron en un estudio realizado en ratas, la mayor calidad de la proteína de la leche de cabra en comparación con la leche de vaca mediante la resección parcial de intestino delgado y administrando dietas basadas en leche de cabra o vaca, siendo las del primer grupo las que presentaban mayor crecimiento, así como una mejor utilización digestiva y metabólica de la proteína.

Los diferentes tipos de proteína que se encuentran en la leche de cualquier tipo son: proteínas termorresistentes, coagulables o caseínas, pudiendo dividirse estas últimas en α -caseína, β -caseína y κ -caseína., que van a precipitar a un pH= 4,6.

Las proteínas que permanecen diluidas a pH= 4,6 son las hidrosolubles, termosensibles y las no coagulables, que son: α -lactoalbúmina, β -lactoalbúmina, albúmina, inmunoglobulinas, péptidos. Estas se van a

desnaturalizar en la fabricación de queso por los distintos tratamientos térmicos.

En la Tabla 4 se muestra la comparación entre las distintas fracciones proteicas de la leche de cabra y vaca.

Tabla 4. Comparación entre las fracciones proteicas de la leche de cabra y vaca.

	Leche de cabra (g/100g)	Leche de vaca (g/100g)	Diferencias para leche de cabra (%)
Caseína	82,7	82,65	Similar
α1-caseína	18,92	30,8	62,8 -
α2-caseína	8,52	7,5	Similar
β+κ-caseína	55,26	44,35	19,7 +
Proteínas séricas	17,3	17,35	Similar

Fuente: Modificada de Sanz Ceballos et al.,2009.

El contenido total de proteínas en la leche de cabra varía de 2,6 a 4,1 g/l. La caseína se compone de cuatro fracciones: α1-caseína, α2-caseína, β-caseína y κ-caseína (Selvaggi et al., 2014). Las proporciones de las fracciones de caseína de la leche difieren entre las especies de rumiantes y las características de las micelas también difieren en cuanto a tamaño, hidratación y mineralización.

La α1-caseína se ha identificado como uno de los principales alérgenos de la leche de vaca (Bianca-María et al., 2001). Esta proteína aparece en menor concentración en la leche de cabra que en la de vaca (Martín, 1996). Puede ser esta la razón del resultado de los estudios realizados en los que se sustituye la leche de vaca por la de cabra, con mejoría del 93% de niños con

alergia a leche de vaca (Bevilacqua et al., 2001; Haenelein 2004; Lara-Villoslada et al., 2004).

Las caseínas de la leche caprina se caracterizan por un mayor contenido en glicina, así como menos arginina y aminoácidos sulfurados (Chacón, 2005).

Otra característica de las proteínas de la leche de cabra con respecto a la leche de otros animales es la conformación estructural y la cantidad y subtipos de micelas, que son más pequeñas (180nm), que las de la leche de vaca (260nm) y similar a las de la leche de oveja (193nm) (Park et al., 2007).

Se ha descrito que la β -caseína comprende la mayor parte del total de caseína de la leche de cabra. Aunque la α 2-caseína es relativamente más alta en la leche de cabra, la fracción α 1 de la leche de vaca sola es más alta que las fracciones de la α 1 y α 2 de la caseína presentes en la leche de cabra. Estas diferencias podrían ayudar a explicar las propiedades de formación de cuajada blanda de la leche de cabra, así como su mejor digestibilidad y la menor frecuencia de reacciones alérgicas en los niños (Yadav et al., 2016).

En comparación con la leche de vaca, la leche de cabra tiene niveles más altos de aminoácidos esenciales como treonina, leucina, lisina, cistina, tirosina, finlalanina, valina y prolina, así como prolina y ácido glutámico (Tabla 5).

Tabla 5. Composición de aminoácidos de leche de cabra y vaca.

	Leche cabra	Leche vaca
Aminoácidos esenciales		
Thr	138,67	115,81
Ileu	160,54	128,04

Leu	341,01	266,23
Lys	342,86	252,59
Met	77,95	71,15
Cys	30,62	23,20
Phe	175,45	133,51
Tyr	162,51	159,99
Val	210,23	147,34
TOTAL	1639,84	1298,36
Aminoácidos no esenciales		
Arg	135,65	114,44
Hist	122,73	93,06
Asp	117,95	96,08
Ala	250,15	214,22
Glu	694,58	554,30
Gly	55,83	49,24
Pro	310,61	253,38
Ser	152,65	147
TOTAL	1840,15	1522,58

Fuente: Ceballos et al., 2009.

La concentración enzimática en la leche de vaca y cabra también son diferentes (Chandan et al., 1992), por lo que la actividad proteolítica también es diferente, siendo más alta en la leche de cabra, mientras que la actividad xantina-oxidasa es 10% menor en esta leche.

3.2.2. Lípidos

Al comparar el contenido graso de distintas leches, Boza y Sanz-Pelayo (1997), objetivaron que en la leche de cabra es mayor que en la de vaca (4,14% vs 3,34%), similar a la humana (4,38%) e inferior que el de oveja (7%).

Al producirse la emulsión lipídica aparecen unos glóbulos grasos que están formados por un núcleo de triglicéridos, rodeado de una capa externa de lípidos polares (fosfolípidos principalmente) y proteínas. Los glóbulos grasos de



la leche de cabra son más pequeños en comparación con los de la leche de vaca (2 μm vs 3-5 μm). Estos glóbulos de grasa de menor tamaño proporcionan una mejor dispersión y una mezcla más homogénea de grasa en la leche. Las investigaciones indican que está más involucrada en la capacidad cremosa de la leche que en el tamaño físico de los glóbulos de grasa. Parece que su agrupación se ve favorecida por la presencia de una aglutinina en la leche que falta en la leche de cabra, lo que crea una pobre capacidad de cremoso, especialmente a temperaturas bajas.

Además, la ausencia de aglutinina en la leche de cabra (que se encarga de agrupar a los glóbulos grasos) permite que las lipasas (enzimas digestivas) puedan acceder más fácilmente, siendo la digestión más rápida (Chacón, 2005).

Otra razón para una mejor digestión de la leche de cabra es la mayor cantidad de enzima lipoprotein-lipasa (LPL) en comparación con la leche de vaca. Esta proteína participa en la lipólisis espontánea de la leche (hidrólisis de triglicéridos, principalmente en posición 3, para producir ácidos grasos libres). En la leche de vaca, la LPL aparece ligada a moléculas de caseína, mientras que en la leche de cabra aparece más unida a glóbulos de grasa, con lo que se facilita la hidrólisis. Esta puede ser la razón del mayor porcentaje de ácidos grasos libres en la leche de cabra con respecto a la leche de vaca (0,6% del total vs 0,4%), siendo su digestibilidad mayor (Chilliard, 1996).

También hay diferencias en el tipo de ácidos grasos que componen los triglicéridos. El perfil medio de grasas de la leche de cabra presentó niveles de butírico (C4:0), caproico (C6: 0), caprílico (C8: 0), cáprico (C10: 0), láurico

(C12: 0), mirístico (C14:0), ácido palmítico (C16:0) y linoleico (C18:2) superiores a los que presenta la leche de vaca. En contraste, la grasa de leche de cabra presentó concentraciones más bajas de ácido esteárico (C18: 0) y oleico (C18: 1) en comparación con la grasa de leche de vaca.

La composición promedio de ácidos grasos (g/100g de leche) de las leches de cabra y vaca se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6. Composición de ácidos grasos de la leche de cabra y vaca.

Perfil lipídico (mg/100 g de leche)	Leche cabra	Leche vaca
C4:0	66,55	116,44
C6:0	171,68	77,86
C8:0	192,20	57,80
C10:0	579,10	114,91
C11:0	7,46	7,29
C12:0	232,61	130,87
C14:0	518,56	384,41
C14:1	7,19	16,87
C15:0	28,11	35,23
C15:1	3,01	2,74
C16:0	1340,97	1102,72
C16:1	51,58	52,32
C16:2 n-4	1,57	0,57
C17:0	18,44	6,27
C17:1	4,32	2,85
C18:0	493,56	378,25
C18:1 n-9 trans	19,22	55,75
C18:1 n-9 cis	1245,92	742,71
C18:2 n-6	142,39	82,31
CLA n-7 Cis-9, trans-11	18,70	13,79
CLA n-6 trans -10, cis- 12	3,53	1,82
CLA n-7, cis-9,cis-11	1,05	-
CLA n-5, cis-11, trans-13	12,42	-
CLA total	35,75	15,62
C18:3 n-3	27,72	8,55
C20:0	2,49	3,76
C20:1 n-9	1,57	1,03
C20:2 n-6	5,49	1,48



C20:3 n-6	-	0,80
C21:0	1,44	0,23
C22:0	4,05	3,99
C23:0	0,26	0,91
C24:0	0,66	0,68
C24:1 n-9	0,92	-
C6-14	1695,70	790,02
SFA	3683,10	2436,41
MUFA	1342,67	874,27
PUFA	213,25	109,32
PUFA n-6	146,97	86,41
PUFA n-3	26,81	8,55
PUFA n-6/n-3	5,49	10,49
SFA: Ac grasos saturados; MUFA: ac grasos monoinsaturados; PUFA: ac grasos poliinsaturados.		

Fuente: Haenlein, 2004.

Los triglicéridos de cadena media (MCT) se absorben directamente en el intestino delgado proximal sin necesidad de sales biliares. Es por esta razón por lo que son útiles en pacientes con resecciones intestinales, insuficiencia pancreática, hepatitis crónica, cirrosis, fibrosis quística, ictericia obstructiva e hiperlipoproteinemia (Boza y Sanz-Sampelayo, 1997). A nivel mitocondrial, para la oxidación de estos ácidos grasos no es necesaria la presencia de carnitina, lo que es una ventaja en casos de déficits de esta enzima (Odle, 1997).

Los ácidos grasos derivados de estos MCT se oxidan rápidamente en el hígado, estimulando la saciedad rápidamente y disminuyen los depósitos de grasa, con lo que facilitan el control de peso sin modificar el aporte energético (St-Onge and Jones, 2002).

En el estudio de Díaz-Castro et al., (2013) se concluye que el consumo de leche de cabra mejora el perfil lipídico y reduce los niveles de colesterol LDL circulante en ratas que consumen leche de cabra en comparación a las que consumen leche de vaca, debido a una mayor excreción vía biliar y una disminución de la síntesis de forma endógena del mismo. Con respecto a la disminución del LDL, López-Aliaga et al. (2005) concluyen que además de mejorar los niveles de LDL, también mejoran los niveles de triglicéridos, colesterol HDL y transaminasas, por lo que la leche de cabra tiene un efecto cardiosaludable.

3.2.3. Hidratos de carbono

La lactosa es el hidrato de carbono mayoritario en todos los tipos de leche. Este, antes de ser absorbido en el intestino delgado, tiene que ser degradado en azúcares simples, que son la glucosa y la galactosa. Este proceso se lleva a cabo por medio de la lactasa en las células de la mucosa intestinal. Cuando hay una insuficiencia de esta enzima, la lactosa se acumula en el intestino, donde se fermenta, produciendo gas. Además, al acumularse, produce heces diarreicas por retener agua en la luz intestinal al ser un disacárido osmóticamente activo. Es por esta razón por lo que valores bajos de lactasa se asocian a intolerancia a la leche (Ganong, 2004).

Si se compara la leche de cabra con otras leches animales en cuanto al contenido de lactosa, este es más bajo en la leche de cabra (del 1 al 13% menor que la leche de vaca, y hasta el 41% menor que la humana), lo que está



directamente relacionado con menos problemas asociados con la intolerancia (Chacón, 2005).

La lactosa de la leche de cabra pasa más rápido por el sistema digestivo, con menor tiempo para la fermentación en el colon, lo que causa menos problemas de intolerancia (Haenlein, 2002). La mayor tolerancia de la lactosa de la leche de cabra, puede ser debido a su mayor digestibilidad global comparada con la de la leche de vaca, pudiendo en este sentido existir una interacción entre cantidad y calidad de la proteína y la naturaleza de su coagulación y en consecuencia, tasas más adecuadas de liberación de nutrientes desde el estómago al intestino, que optimizarán la utilización digestiva de la lactosa (Palma Parodi, 2015).

Otra diferencia importante en la composición glucídica entre la leche de vaca y cabra está en los oligosacáridos. La leche de vaca solo tiene trazas de oligosacáridos, mientras que se encuentran en concentraciones 10 veces mayores en la leche de cabra. Estos compuestos llegan al intestino grueso sin digerir y actúan como prebióticos, es decir, ayudan al desarrollo de una flora probiótica que compite con la flora bacteriana patógena, eliminándola.

Además, los oligosacáridos presentes en la leche de cabra presentan gran variabilidad estructural, con lo que se asemeja más a la leche materna (Martínez-Férez, 2006; Giorgio et al. 2018). In vitro, se ha demostrado que los oligosacáridos de la leche de cabra inducen la maduración de la mucosa intestinal, favoreciendo la diferenciación de las células Caco-2 (Martínez-Férez, 2004).

La galactosa también está presente en unos niveles elevados en la leche de cabra. Martínez-Ferez (2004) demostró que la galactosa es importante en el desarrollo cerebral en las primeras etapas de la vida.

3.2.4. Minerales

La diferencia en cuanto a la composición mineral de la leche de vaca y cabra no es muy grande (Haenlein, 2001), con mayor cantidad de calcio, y fósforo (con una ratio Ca/P normal en leche de 1.20), potasio, magnesio y cloro, y menor de sodio y azufre, de la leche de cabra respecto a la de vaca (Park, 2006).

En la Tabla 7 se muestra la comparación de la composición mineral entre la leche de cabra y vaca.

Tabla 7. Comparación de la composición mineral de la leche de cabra y vaca.

	Leche de cabra (g/100g)	Leche de vaca (g/100g)	Diferencias para leche de cabra (%)
Calcio	158,57	113,58	28,4+
Fósforo	118,97	87,04	26,8+
Magnesio	12,92	9,4	27,2+
Hierro	0,15	0,09	40,0+
Cobre	0,042	0,014	66,6+
Zinc	0,528	0,463	12,3+

Fuente: Modificada de Sanz Ceballos et al., 2009.

La leche de cabra aporta más cantidad de calcio que la leche de vaca (Chacón, 2006). Además, dado el mayor contenido de vitamina D (Alfárez et al., 1996) y lisina (Díaz-Castro et al., 2007) la absorción del calcio está favorecida.



El contenido de fósforo es mayor en la leche de cabra que en la de vaca. El fósforo junto con las proteínas de la leche de cabra, confieren una alta capacidad buffer a la misma, lo que será útil en úlceras gástricas, sobre todo si son por irritación por los jugos gástricos (Chacón, 2005).

López-Aliaga et al. (2010) revisaron la biodisponibilidad mineral, los coeficientes de digestibilidad aparente y el balance de calcio, fósforo, magnesio, hierro, cobre y zinc después del consumo de una dieta basada en leche de cabra en comparación con la dieta de leche de vaca en ratas con resección intestinal. En este trabajo concluyeron que en base a las características biológicas, nutricionales y metabólicas particulares, la leche de cabra puede ser un excelente alimento natural en pacientes con síndrome de malabsorción y presentar una alternativa dietética a la leche bovina.

La cantidad de hierro en la leche de cabra es ligeramente mayor con respecto a la de vaca, pero la biodisponibilidad es mucho mayor en la primera.

Un estudio llevado a cabo por López-Aliaga et al. (2000) comparó la utilización digestiva de hierro y calcio, así como su depósito en órganos diana, siendo superior en los animales que ingirieron dietas basadas en leche de cabra.

En otro estudio realizado por Alférez et al. (2006) se comparó el efecto de la leche de cabra con la de vaca en ratas con anemia ferropénica inducida, siendo el resultado final un mayor depósito de hierro en órganos diana y mejoría de los parámetros hematológicos en los animales que tomaron dietas basadas en leche de cabra con respecto a los que tomaron dieta a base de leche de vaca.

La mejor utilización del hierro de la leche de cabra puede deberse a varios factores nutricionales de la misma, como la presencia de cisteína y lisina, que inducen la solubilización del hierro ferroso o férrico, formando quelatos tridentados, siendo mayor la posibilidad del metal (Van Campen, 1973). También hay una mayor cantidad de ácido ascórbico en la leche de cabra, que ayuda a la formación de un quelato vitamina C-Fe, permaneciendo soluble a un pH más alto en el intestino delgado (Czajka-Narins, 1998).

El selenio está presente en una cantidad similar en la leche de cabra que en la leche materna (13,3 μL vs 15,2 μL), y muy superior a la presente en la leche de vaca (9,5 μL). El selenio tiene una acción antioxidante (Food and Nutrition Board, 2004), actuando como cofactor del glutatión peroxidasa, enzima implicada en la eliminación de radicales libres del organismo.

3.2.5. Vitaminas

La leche de cabra tiene niveles más elevados de vitaminas del grupo B con respecto a la leche de vaca, excepto las vitaminas B₆ y B₁₂, que se encuentran disminuidas (Jauber and Kalantzopoulos, 1996).

El contenido de ácido nicotínico y de vitamina D también es superior en la leche de cabra.

Con respecto a la vitamina A, está casi en el doble de cantidad en la leche de cabra en comparación con la de vaca, hecho que está asociado a la ausencia de carotenoides. Además, tiene un elevado contenido de riboflavina, que es un importante factor de crecimiento (Chacón, 2005).

La leche de cabra tiene un bajo contenido en ácido fólico (vitamina B₉) en comparación con la leche de vaca y la humana. Esta carencia se debe a la ausencia de una glicoproteína con capacidad de unir ácido fólico (Chandan et al., 1992).

En la Tabla 8 se muestra la comparación del contenido de vitaminas en los dos tipos de leche.

Tabla 8. Comparación del contenido de vitaminas de la leche de cabra y vaca.

Vitaminas	Leche de cabra	Leche de vaca
A, UI/L	2030	1260
D, µg/L	0,6	0,3
E, mg/L	0,3	1
K, µg/L	12	-
B1, mg/L	0,5	0,1
B2, mg/L	1,4	1,4
Niacina, mg/L	2,7	0,8
Ácido ascórbico, mg/L	21	15,6
Ácido pantoténico, mg/L	3,1	3
B6, mg/L	0,5	0,7
B12, µg/L	0,7	3,5
Ácido fólico, µg/L	6	50
Colina, mg/L	119,9	120
Inositol, mg/L	110,5	109,3

Fuente: Modificada de Sanz Ceballos et al., 2009.

3.2.6. Factores bioactivos

Los péptidos bioactivos se han definido como fragmentos de proteínas específicos que tienen un impacto positivo en las funciones o condiciones corporales, pudiendo influir así en la salud (Huang et al., 2013). Algunos de los péptidos y proteínas de la leche presentan actividad biológica directa, mientras que otras tienen una actividad latente, que se van a activar con la acción

proteolítica. Un ejemplo son las formas activas de la calmodulina caprina, que es una proteína de unión al calcio, son los terminales C solubles que se obtienen como subproducto de la acción de la quimosa sobre la κ -caseína durante el proceso de coagulación de la leche en la elaboración del queso. Estos péptidos son también una fuente importante de péptidos inhibidores y antihipertensivos bioactivos de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) (Espejo-Carpio et al., 2013; Hernández-Galán et al., 2016).

Además, la leche de cabra posee otras proteínas menores que incluyen inmunoglobulinas, lactoferrina, ferritina, prolactina y proteína fijadora de folato con actividad biológica.

Entre los compuestos bioactivos de la leche están las poliaminas (espermidina, espermina y putrescina), que son compuestos nitrogenados que tienen un papel importante en el desarrollo intestinal de los neonatos de las distintas especies. Su concentración es distinta según el periodo de lactancia. Este hecho es menos evidente en la leche de cabra, ya que permanece estable durante toda la lactación, a excepción de la putrescina, que va a disminuir en las primeras semanas (Ploszaj et al., 1997).

Una concentración más alta de estos factores bioactivos se relaciona con una disminución del riesgo de padecer alergias del tipo alimentario al favorecer la maduración intestinal e impedir el paso de alérgenos.

En la leche de cabra también vamos a encontrar más cantidad de nucleótidos. El patrón de secreción es similar en la leche de cabra, vaca y humana, siendo su máxima concentración en el calostro, disminuyendo posteriormente de forma progresiva.



Martínez-Férez et al (2004) sugirieron que los oligosacáridos de la leche de cabra pueden tener una acción antiinflamatoria. Su investigación tenía como objetivo estudiar si estos oligosacáridos podían inhibir la adhesión de los monocitos a las células endoteliales a nivel de la vena umbilical humana. Los resultados indicaron que los oligosacáridos de la leche de cabra pueden actuar incluso como agentes antiinflamatorios en el recién nacido, un efecto que ya había sido demostrado para los oligosacáridos de la leche humana, y que pueden atribuirse a las similitudes estructurales entre estos dos tipos de leche.

Los principales factores bioactivos presentes en la leche de cabra se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Principales factores bioactivos en la leche de cabra.

Factor bioactivo	Funcionalidad
Linfocitos B	Producción de anticuerpos
Macrófagos	Respuesta inmune
Neutrófilos	Respuesta inmune
Linfocitos T	Respuesta inmune
Anticuerpos IgA/IgG	Respuesta inmune
Proteína ligante de B12	Evita proliferación bacteriana
Factor Bifidum	Promueve el desarrollo de Bifidobacterium en colon
Fibronectina y Interferón	Favorece a los macrófagos
Lisozima	Ruptura de paredes celulares microbianas
Mucinas y oligosacáridos	Probióticos
Factores de crecimiento	Estímulo del sistema digestivo y del crecimiento

Fuente: Chacón, 2005.

3.3 Leches fermentadas

Según la Norma del Codex Alimentarius las leches fermentadas se definen como aquellos productos lácteos obtenidos mediante fermentación de la leche, que pueden haber sido elaborados a partir de productos obtenidos de la leche con o sin modificadores en la composición, por medio de la acción de microorganismos adecuados y teniendo como resultado la reducción del pH con o sin coagulación. Los microorganismos serán viables, activos y abundantes en el producto salvo si es tratado térmicamente tras la fermentación (Codex Stan).

Todos los compuestos descritos presentes en la leche están en un medio acuoso formando parte de una de las 3 fases:

4. Materia grasa: Forma los glóbulos blancos, que con el agua, da lugar a una emulsión, dando el color blanco a la leche.
5. Suspensión coloidal: En esta se engloban a las caseínas (que forman micelas, ligada a la presencia de sales, siendo la principal el fosfato cálcico), y a las seroproteínas, ambas también en la fase acuosa.
6. Solución de lactosa y sales minerales solubles.

Las leches fermentadas se consiguen mediante la inoculación de microorganismos específicos que van a fermentar la lactosa, produciendo modificaciones nutricionales y organolépticas del producto final. En la fermentación, parte de la lactosa se transforma en ácido láctico, siendo el producto final más ácido. Otros productos resultantes de esta reacción son anhídrido carbónico, acetaldehído, diacetilo, ácido acético y otros compuestos,



que en su conjunto van a dar como resultado unas características organolépticas al producto final.

Hay bacterias fermentadoras que van a producir polisacáridos, dándole a la leche una textura cremosa y suave (Staff, 2000; Stack et al., 2010).

El proceso de fabricación comprende las siguientes fases, que pueden variar según el tipo de producto final (Mahaut, 2011):

- 1º. Enriquecimiento de la leche en extracto seco: La cantidad de este extracto seco variará según la leche, sobre todo si es desnatada o semidesnatada, a las que se les suele adicionar proteínas del suero o leche en polvo desnatada para aumentarlo.
- 2º. Tratamiento térmico: Se realiza para disminuir la carga microbiana a niveles de inocuidad.
- 3º. Homogeneización: Sobre todo cuando la leche es entera para impedir la separación de la materia grasa.
- 4º. Siembra: Se añaden los fermentos lácticos. La leche deberá tener deberá de estar libre de sustancias antibióticas y no contaminada por bacteriófagos.
- 5º. Incubación y fermentación: La temperatura y tiempo serán los adecuados para el desarrollo de los cultivos. La fermentación láctica se lleva a cabo por microorganismos que van a transformar la lactosa en ácido láctico, disminuyendo así el pH, y por consiguiente una coagulación de la leche.

6º. Adición de ingredientes: Se incorporan azúcares y aromatizantes. En yogures firmes se realiza justo después de la siembra. En los yogures batidos, esta adición se realiza tras el enfriamiento.

La Federación Internacional Lechera se basa en el tipo de fermentación y el tipo de microorganismos utilizados, para clasificar los productos lácteos fermentados:

- Microorganismos termófilos, con fermentación entre 30-45°C:
 - Leche acidófila: *Lactobacillus acidophilus*.
 - Yogur: *Lactobacillus delbruecki sub. bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*.
- Microorganismos mesófilos, con fermentación por debajo de 30°C:
 - Fermentación láctica: *Lactococcus lactis*.
 - Fermentación láctica y alcohólica: *Lactobacillus acidophilus* y *Kluyveromyces marxianus*, que dan lugar al kéfir.

Dentro de la gran cantidad de productos lácteos fermentados, el yogur es uno de los más consumidos.

Las propiedades de este producto están reguladas en el Real Decreto 179/2003, definiendo el yogur como “el producto de leche coagulada obtenida por fermentación láctica mediante la acción de *Lactobacillus bulgaricus* (*Lactobacillus delbruecki sub. bulgaricus*) y *Streptococcus thermophilus* a partir de leche pasteurizada, leche concentrada pasteurizada, leche total o parcialmente desnatada, con o sin adición de nata pasteurizada, leche en polvo



entera, semidesnatada o desnatada, suero n polvo, proteínas de leche y/u otros productos procedentes del fraccionamiento de la leche”.

Esta norma indica que:

- Los microorganismos fermentadores deben ser viables, y estar presentes en el producto final en al menos en 10^{10} colonias por gramo o mililitro.
- pH igual o inferior a 4,6.
- Desde su fabricación hasta la adquisición por el consumidor, debe mantenerse en temperaturas comprendidas entre 1 y 8°C.
- Deberá ser vendido como máximo dentro de los 28 días tras su fabricación.

Este último requisito fue derogado por el Real Decreto 176/2013 de 29 de marzo de 2013, siendo actualmente responsabilidad de las industrias lácteas estimar el tiempo de vida de sus yogures.

El 27 de mayo de 2011, por medio del Real Decreto 752/2011, se establece la normativa básica de control a cumplir por parte del sector de la leche de oveja y cabra.

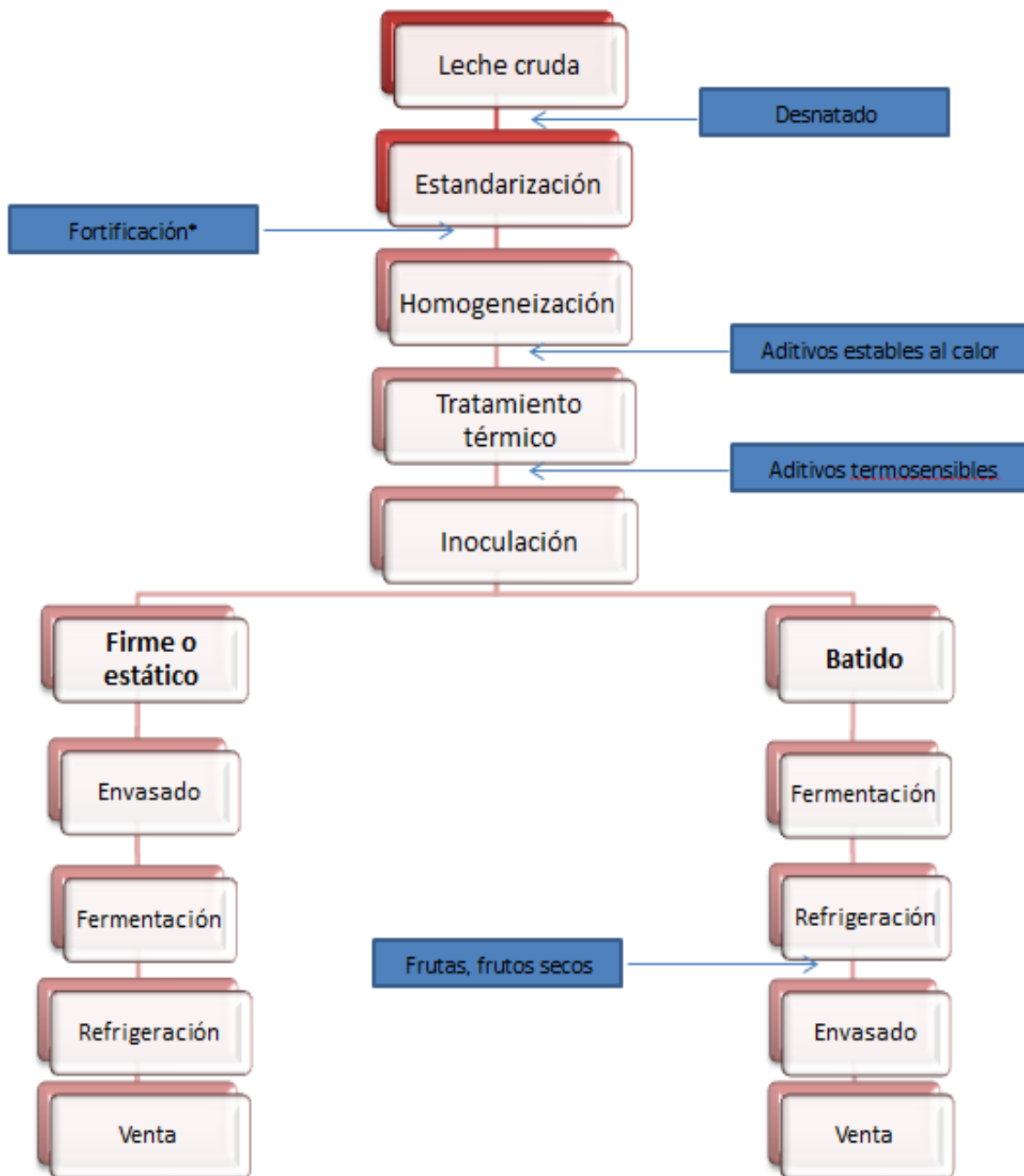
Dentro del grupo de yogures, se incluyen distintas clasificaciones:

A. Según su tratamiento tras la fermentación:

- a. Fresco: No se aplica ningún tratamiento térmico posterior a la fermentación.

- b. Pasterizado: Se aplica un tratamiento térmico, lo que hace que se pierda la viabilidad de las bacterias lácticas, manteniéndose las características nutricionales.
- B. Proceso de elaboración:
- a. Firme: La fermentación se realiza en el mismo recipiente donde se va a consumir.
 - b. Batido: La fermentación se produce en un tanque industrial y se envasará tras ser agitado.
- C. Contenido de materia grasa:
- a. Enriquecido: Se añade nata.
 - b. Entero: Se elabora con leche entera.
 - c. Semidesnatado: Se elabora con leche semidesnatada.
 - d. Desnatado: Se elabora con leche desnatada.
- D. Consistencia:
- a. Líquido: El yogur es batido hasta una consistencia líquida.
 - b. Mousse de yogur: Una vez hecha la fermentación, el yogur se bate y se añaden sustancias aromatizantes y aire u otros gases para dar una consistencia espumosa.

En la Figura 9 se muestra la tecnología básica de fabricación del yogur.



*Solo algunos tipos de yogur

Figura 9. Tecnología básica de la fabricación del yogur (Condony et al., 1998).

Las leches fermentadas en general y el yogur en particular han sido considerados alimentos funcionales.

Se define como alimentos funcionales aquellos en los que se ha demostrado de forma satisfactoria que tienen un efecto beneficioso sobre una o más funciones específicas del organismo más allá de los efectos nutricionales habituales, que serán relevantes para la mejora de la salud y/o disminución del riesgo de enfermedad. Estos alimentos deben ejercer ese efecto beneficioso siendo consumido en cantidades normales en la dieta.

Las leches fermentadas tienen unas características idóneas como base para incorporar ingredientes y/o nutrientes para una mejora no solo nutricional, siendo las más importantes:

- Probióticos: Son los alimentos que contienen una serie de microorganismos definidos en grado suficiente para modificar la flora intestinal del consumidor aportando un efecto beneficioso. Estas bacterias suelen ser *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Para considerarse probiótico, el microorganismo debe permanecer vivo durante el paso por el tracto digestivo (Silveira et al., 2003).
- Prebióticos: Se refiere a aquellos ingredientes que no van a ser digeridos, y que participarán como sustrato trófico de microorganismos intestinales (Silveira et al., 2003; Sanz et al., 2003)
- Simbióticos: Contienen un ingrediente prebiótico y uno probiótico, aportando el efecto de ambos (Silveira et al., 2003).
- Enriquecidos en fibra: Hace referencia a la presencia de sustancias de origen vegetal, mayoritariamente hidratos de carbono, que no van a ser digeribles por las enzimas humanas. Hay 2 tipos de fibras, la



soluble y la insoluble. La fibra va a incrementar el bolo fecal, mejorando la motilidad intestinal (Silveira et al., 2003).

- Enriquecidos en vitaminas y minerales.
- Con fitoesteroles: Son componentes de células vegetales que tienen una estructura y función similar a la del colesterol animal, lo que puede disminuir su absorción.

3.3.1 Valor nutritivo de las leches fermentadas

El valor nutritivo de los productos lácteos depende de diversos factores entre ellos la leche de partida que se utiliza para su elaboración, efectos del procesado, tratamiento térmico, desnatado, etcétera (Juárez, 1999).

En las leches fermentadas en general, y en el yogur en particular, los microorganismos que participan en la fermentación también repercuten en el valor nutricional y biológico del producto final (Juárez, 1999).

La fermentación hace que entre el producto inicial y el producto final pueda haber algunas diferencias:

En cuanto a su composición:

- Contenido de lactosa: La cantidad de lactosa está disminuida por el proceso de fermentación, hidrolizando la lactosa y dando lugar a ácido láctico. El contenido de lactosa disminuye en torno a un 50% (Juárez, 1999).

- Vitaminas: El contenido final de vitaminas depende de varios factores. Por un lado, los microorganismos fermentadores asimilan unas vitaminas y sintetizan otras (Rota et al., 2001). Estos microorganismos favorecen la síntesis de

vitaminas del grupo B. Su acción disminuye el contenido vitamínico en global, excepto el de ácido fólico (Condony et al., 1989).

Por otro lado, el tratamiento aplicado a la leche de partida como es el térmico y almacenamiento, suele destruir parte de las vitaminas (Rota et al. 2001).

- Proteínas: La cantidad de proteínas en las leches fermentadas es similar al de las leches de partida.

En cuanto a los aspectos nutritivos:

- Energía: En el proceso de fermentación no se producen grandes cambios en el aporte energético (Rota et al., 2001), por lo que este va a depender de la leche natural utilizada y los ingredientes añadidos.

- Digestibilidad: La digestibilidad puede estar mejorada en los fermentos de la leche ya que hay una mayor presencia de enzimas proteolíticas de los microorganismos fermentadores (Juárez, 2001; Rota et al., 2001). Además, las grasas también van a ser más fácilmente digeribles debido a que las bacterias fermentadoras van a hidrolizar una pequeña porción del contenido graso, produciendo ácidos grasos libres (Aranceta et al., 2004).

Por otro lado, los fermentos de leche van a tener menor contenido en lactosa ya que los microorganismos fermentadores van a producir β -galactosidasa (Jay, 2002).

- Modificación del pH: El consumo de fermentos de leche produce menos subida del pH estomacal, por lo que va a disminuir la probabilidad de supervivencia de ciertos patógenos.



3.3.2 Beneficios sobre la salud de las leches fermentadas

A los fermentos de la leche se les han atribuido gran cantidad de propiedades saludables más allá de las puramente nutricionales. Algunas de estas son:

- Mejora de la digestión de la lactosa: Se ha visto que personas intolerantes a la lactosa pueden consumir fermentos lácteos sin tener efectos negativos (Moreno et al., 2013). Esto puede ser debido a los niveles bajos de lactosa y a la producción de β -galactosidasa por parte de los microorganismos fermentadores (Jay et al., 2009).

- Equilibrio en la flora intestinal y alteraciones gástricas: Las bacterias ácido lácticas llegan al intestino, van a contribuir a la regulación de la flora a este nivel combatiendo la aparición de microorganismos nocivos mediante la alteración de sus membranas celulares, efecto de barrera, modificación de pH del medio o la producción de bacteriocinas (González-Martínez et al., 2001; Amores et al., 2004). El yogur ha llegado a ser recomendado por la OMS en ciertos tipos de diarreas en niños (Saloff-Coste, 1997). También parece tener un efecto beneficioso en las diarreas que aparecen durante el tratamiento con ciertos antibióticos (Condon et al., 1998).

También se ha observado que en niños con diarrea por rotavirus, el consumo de *Lactobacillus casei* o *Lactobacillus rhamnosus* puede disminuir la duración de la misma (Saloff-Coste, 1997).

En pacientes con gastritis producida por *Helicobacter pylori*, se ha demostrado que el consumo de leches fermentadas con *L. johnsonii* L40 puede ser positivo (Obregón et al., 2003).

- Estimulación del sistema inmune: Hay algunas especies de bifidobacterias que estimulan la respuesta inmune natural y adquirida reforzando así las defensas de la población anciana y disminuyendo las alergias en infantes (Requena et al., 2005)

Además, se ha observado un posible efecto antiinflamatorio *in vitro* y en animales (Rota et al., 2001).

- Reducción del riesgo de neoplasia: Algunos estudios relacionan la producción de metabolitos como ácido láctico y enzimas, con la inhibición del desarrollo de células tumorales (Condoy et al., 1998). Son estudios observacionales, pero pueden ser una vía de estudio. Un ejemplo es la relación de la ingesta de bifidobacterias, que disminuye a la enzima glucoronidasa, que se asocia al cáncer de colon (Amores et al., 2004).

- Disminución del colesterol: Tampoco hay estudios que verifiquen este hecho, pero estudios observacionales relacionan la ingesta de grandes cantidades de leches fermentadas con la disminución del colesterol LDL sanguíneo (Jay et al., 2009).

- Caries dentales: El riesgo de caries dentales es menor ya que el pH, a pesar de ser bajo, no daña el esmalte. Esto es debido a que las bacterias lácticas que hay en la cavidad oral no sintetizan dextranos pegajosos a partir de la lactosa y sí que lo hacen a partir de la sacarosa.

En un estudio publicado recientemente por Moreno-Fernández et al., (2016a), se han identificado las diferencias entre micronutrientes y



macronutrientes en leches fermentadas deshidratadas de cabra y vaca, teniendo en cuenta grasas, proteínas, vitaminas y minerales.

La leche de cabra fermentada tenía mayor contenido de proteína y menor de cenizas. Todos los aminoácidos excepto la alanina fueron más altos en fermentos de cabra que en los de vaca. La cantidad total de ácidos grasos saturados y monoinsaturados era muy parecida.

Los fermentos de leche de cabra presentaban más cantidad de calcio, magnesio, zinc, hierro, cobre y selenio, no siendo así con el ácido fólico, que estaba en menor cantidad.

Los derivados de leche de cabra tenían mayor concentración de vitaminas A, D₃, B₆ y B₁₂, pero menor cantidad de vitamina C y E.

Con este estudio se demuestra que las características nutricionales de los fermentos de leche de cabra son mejores que las de los fermentos de leche de vaca.

En otro estudio realizado por los mismos investigadores (Moreno-Fernández et al., 2016b) se evaluó la influencia de la leche fermentada de vaca o de cabra sobre el estado antioxidante durante la recuperación de la anemia ferropénica. Tras los resultados, se puede concluir que durante la recuperación de la anemia, la leche fermentada de cabra tiene efectos positivos sobre el estado antioxidante total y sobre la melatonina, incluso con sobrecarga de hierro, disminuyendo así el daño oxidativo.

En otro estudio realizado por Moreno-Fernández et al., (2017) se evaluó la influencia de la leche fermentada de cabra y vaca sobre las actividades enzimáticas antioxidantes, la expresión génica, y la protección contra el daño

oxidativo en el periodo de recuperación de la anemia ferropénica. Los resultados mostraron que el consumo de fermentados de leche de cabra aumenta el estado antioxidante total y disminuyó los biomarcadores de estrés oxidativo, concluyendo que el consumo de estos fermentos lácteos protege a las principales biomoléculas (lípidos, proteínas, ADN,) del daño oxidativo producido durante la recuperación de la anemia ferropénica, en mayor medida que lo fermentos de leche de vaca.

El consumo de leche fermentada de cabra durante la recuperación de la anemia disminuye los depósitos de adiposidad y mejora la lipólisis, aumentando la expresión de las proteínas UCP1 y PepT1 e irisina, presentando un efecto ergogénico, con mejoría de la homeostasis del musculo esquelético (Moreno-Fernández et al., 2017).

El consumo de leche fermentada de cabra disminuyó los niveles séricos de TNF- α , IL-6 y TIMP-1, que están involucrados en todas las etapas del proceso de aterosclerosis, desde la disfunción endotelial hasta la rotura de la placa y trombosis. El consumo de fermentados de leche de cabra también condujo a una disminución de los niveles plasmáticos de VEGF, SICAM-1, sE-selectina, MCP-1 y CTGF, aumentando los niveles de adiponectina y CAV-1, reduciendo el riesgo cardiovascular y el daño vascular durante la recuperación de la anemia. La leche fermentada de cabra es un candidato natural como agente nutracético que puede tener un papel beneficioso en la salud cardiovascular durante la recuperación de la deficiencia de hierro para disminuir la respuesta inflamatoria, la activación de macrófagos y el desarrollo de aterosclerosis (Muñoz-Alfárez et al., 2019).

III. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La anemia es un problema de salud pública a nivel mundial, siendo la deficiencia nutricional más común en todo el mundo. La anemia por deficiencia de hierro se estima que la padece un 15% de la población mundial y puede ocasionar retrasos en el desarrollo, alteraciones del comportamiento, complicaciones perinatales y deterioro de la capacidad de aprendizaje y la función cognitiva.

La disminución de las reservas de hierro en las enfermedades inflamatorias puede representar una verdadera deficiencia de hierro preexistente o una deficiencia funcional de hierro (anemia de estados inflamatorios). Los estados inflamatorios producen un aumento en los niveles de ferritina sérica así como la liberación de citocinas pro-inflamatorias y en última instancia, pueden conducir a hipoferremia a través de un aumento en la hepcidina con un secuestro de hierro en macrófagos y enterocitos duodenales.

La respuesta inflamatoria puede inducir anemia a través de la regulación negativa de la absorción de hierro y la eritropoyesis. Por lo tanto, está claro que muchos índices del estatus corporal de hierro se vean afectados por la inflamación, existiendo una relación estrecha entre el estado inflamaatorio y la anemia. La Organización Mundial de la Salud también ha publicado en numerosos informes que los biomarcadores inflamatorios deben evaluarse cuando se estudian los indicadores del estado nutricional de hierro.

Por otro lado, nuestro grupo de investigación ha demostrado que el consumo de leche fermentada de cabra es más beneficioso en comparación



con la leche fermentada de vaca para paliar los efectos negativos de la anemia ferropénica, debido a la mejora de las proteínas relacionadas con el metabolismo intestinal de hierro (citocromo duodenal b, transportador de metales divalentes 1 y ferroportina 1), mejorando la utilización digestiva y metabólica del hierro, aumentando los depósitos de hierro en los órganos diana y favoreciendo la recuperación de los parámetros hematológicos.

Sin embargo, a pesar de la clara relación entre homeostasis de hierro e inflamación, la señalización inflamatoria provocada durante la recuperación de la anemia aún no está completamente dilucidada y a pesar del papel crucial del estado inflamatorio en condiciones anémicas, hasta la fecha, ningún estudio ha evaluado la señalización inflamatoria durante la recuperación de la ferrodeficiencia.

En base a todas estas consideraciones se ha planteado un objetivo general y los correspondientes objetivos específicos.

Objetivo general

Evaluar los efectos del consumo de una dieta elaborada a base de leche fermentada de cabra en comparación con la de vaca, con contenido normal o sobrecarga de hierro, durante la recuperación de la anemia ferropénica nutricional, sobre la señalización celular inflamatoria durante la repleción crónica con hierro.

Objetivos específicos

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

1. Evaluar los cambios en los biomarcadores relacionados con la respuesta pro y antiinflamatoria tras la recuperación de la ferropénica, con una dieta basada en leche fermentada de cabra, en comparación con la de vaca.
2. Estudiar el efecto de la sobrecarga de hierro, tras la recuperación de la anemia ferropénica nutricional con dieta basada en un fermentado lácteo de cabra o vaca, sobre la señalización celular inflamatoria y el estatus corporal de hierro.
3. Estudiar la relación entre hepcidina, estatus de hierro y perfil plasmático de marcadores inflamatorios, durante la recuperación de la ferropénica, tras el consumo de una dieta basada en leche fermentada de cabra o vaca con contenido normal o sobrecarga de hierro.
4. Evaluar la influencia del consumo de leche fermentada de cabra o vaca, con contenido normal o sobrecarga de hierro, sobre los mecanismos homeostáticos adaptativos en la señalización inflamatoria, durante la recuperación de la anemia ferropénica nutricional.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se han utilizado 80 ratas macho (*Ratus norvegicus*, raza Wistar albina), recién destetadas (21 días de edad y un peso inicial de $\approx 42 \pm 5$ g), procedentes del Servicio de Animales de Laboratorio de la Universidad de Granada. Los ensayos biológicos se han llevado a cabo en la Unidad de Experimentación Animal del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Granada, en una zona de producción libre de patógenos (SPF), y los animales se han mantenido en condiciones de alta seguridad biológica, con un riguroso control sanitario y medioambiental.

Desde el comienzo del estudio, los animales fueron alojados en células individuales de metabolismo situadas en una habitación aireada y termorregulada ($21 \pm 2^{\circ}\text{C}$) con fotoperíodo controlado de 12 horas (luz-oscuridad) y una humedad relativa promedio de 55-60%. El agua bidestilada estaba disponible *ad libitum*, mientras que la ingesta de alimento era controlada (*pair feed*), de manera que los animales ingieran el 80% de la ingesta media de cada periodo al día, para evitar las diferencias debidas a la cantidad de dieta ingerida.

Los protocolos de manejo, cuidado y sacrificio de animales empleados fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de Granada y de acuerdo con las directrices comunitarias de la Unión Europea (Declaración de Helsinki; Directiva UE 2010/63/EU para experimentos con animales).

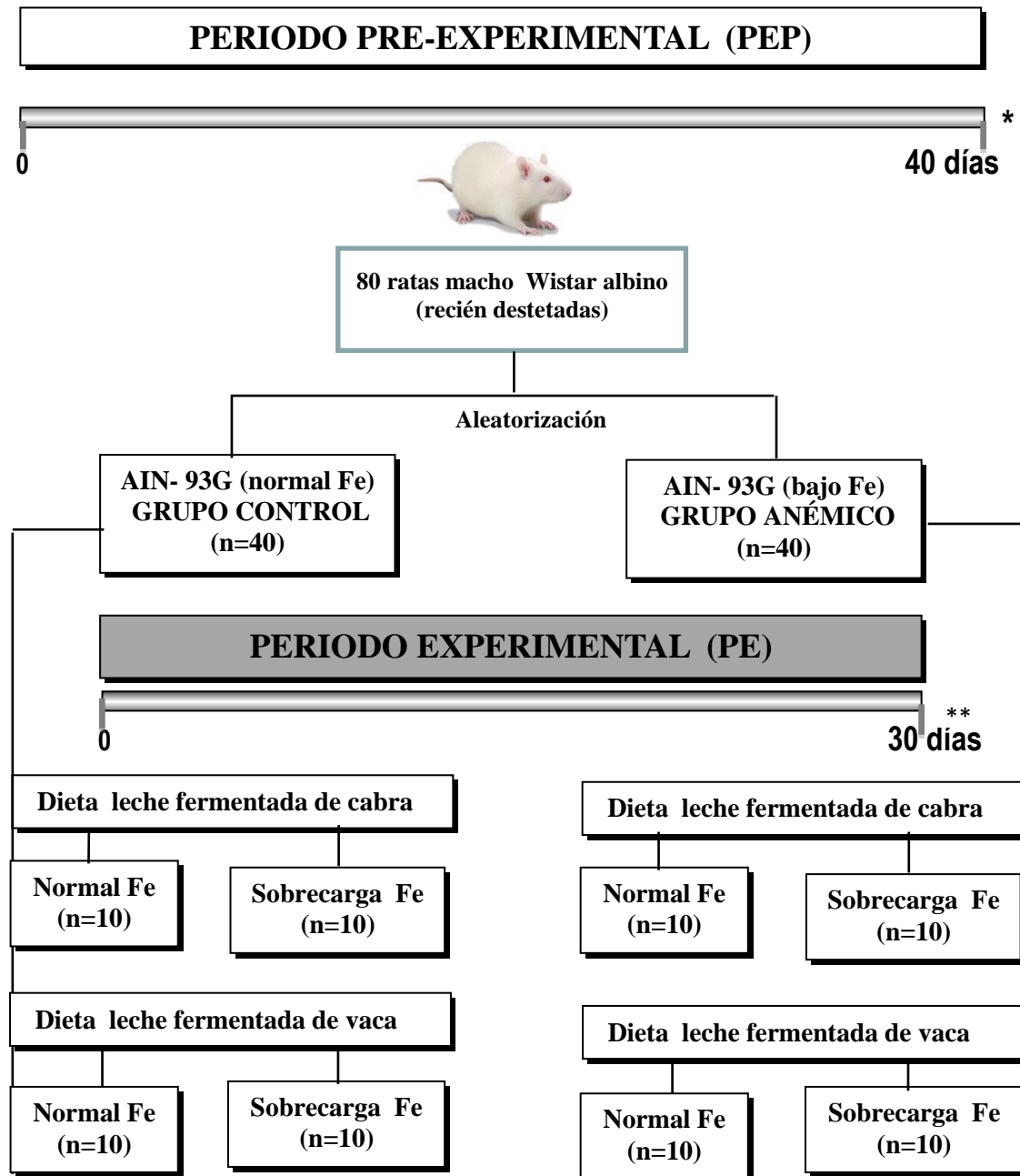
4.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

PERÍODO PRE-EXPERIMENTAL (PPE): Tras el destete, las ratas fueron distribuidas al azar en dos grupos experimentales (control y anémico). El grupo control recibió la dieta AIN-93G con contenido normal en hierro (44.72 ± 0.98 mg/Kg por análisis) (Reeves et al., 1993). La ferropdeficiencia fue inducida en el grupo anémico por la técnica desarrollada previamente por nuestro grupo de investigación (Pallarés et al., 1993): las ratas son sometidas a un periodo pre-experimental (PPE) de 40 días, en los cuales se les suministra la dieta AIN-93G pero con bajo contenido en hierro (5.91 ± 0.36 mg/Kg por análisis). La dieta baja en hierro utilizada para inducir la anemia se obtuvo omitiendo el hierro del suplemento mineral de la dieta.

En el día 40 del PPE, se tomaron muestras de sangre periférica de la vena caudal en tubos con EDTA como anticoagulante, para el control hematológico de la anemia.

PERÍODO EXPERIMENTAL (PE): Tras el PPE, los animales (n=80) se sometieron a un PE en el cual, el grupo control y el grupo anémico eran divididos en cuatro subgrupos, alimentados durante 30 días con cuatro tipos diferentes de dieta: basadas en leche fermentada de cabra (raza Murciano-Granadina) o leche fermentada de vaca (raza Holstein), y con contenido normal (45 mg/kg dieta) o sobrecarga de hierro (450 mg/kg dieta). La dosis de 450 mg hierro/kg dieta es la más común para inducir la sobrecarga crónica de hierro en modelos de experimentación animal (Raja et al., 1994).

En la Figura 10 se muestra el diseño experimental del estudio.



* Extracción sangre vena caudal. Control hematológico de la anemia

** Sacrificio. Control hematológico de la anemia y perfil plasmático de citocinas pro y anti-inflamatorias
 Normal Fe: 45mg/Kg dieta; Bajo Fe: 5mg/Kg dieta; Sobrecarga Fe: 450 mg/Kg dieta

Figura 10. Diseño experimental del estudio



El contenido medio de hierro (mg/Kg) en las dietas fue por análisis: dieta normal en hierro: 44.28 ± 0.76 (dieta basada en leche fermentada de cabra), 43.98 ± 0.39 (dieta basada en leche fermentada de vaca), y dietas con sobrecarga de hierro: 470.82 ± 2.35 (dieta basada en leche fermentada de cabra), 469.82 ± 2.25 (dieta basada en leche fermentada de vaca).

Al final del PE, los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico a la dosis de 35 mg/Kg por vía intraperitoneal (Sigma Diagnostic, St Louis, MO), totalmente desangrados mediante canulación de la aorta abdominal y se analizaron alícuotas de sangre con EDTA para el control hematológico de la anemia y el resto de la sangre se centrifugó (1500g, 4°C, 15 min) para medir el perfil plasmático de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias. Otra porción de sangre se centrifugó sin anticoagulante para separar los glóbulos rojos del suero y el posterior análisis de hierro, capacidad total de fijación de hierro (TIBC), saturación de transferrina, ferritina y hepcidina.

4.3. ELABORACIÓN Y DESHIDRATACIÓN DE LAS LECHE FERMENTADAS

4.3.1. Proceso de fermentación de la leche (cabra o vaca)

- Control de la calidad de la materia prima. Se han realizado controles microbiológicos oportunos (recuentos de aerobios mesófilos totales) y controles físico-químicos (grasas, proteínas, ácidos grasos,...).

- Homogeneización y pasteurización de la leche. Se aplica un tratamiento térmico de 85°C durante 20 minutos, en agitación continua para favorecer la homogeneización. Según los criterios establecidos por la legislación vigente para leche pasteurizada y otros productos lácteos líquidos, para comprobar la eficiencia del tratamiento térmico se han realizado los controles microbiológicos; recuento de enterobacterias y recuento de *Listeria monocytogenes*, y la prueba de la fosfatasa.
- Adición de los microorganismos fermentadores y por último, incubación a temperatura adecuada para favorecer la fermentación hasta alcanzar el pH final deseado ($\approx 4,7$). Ambos tipos de leches fueron inoculadas con iniciadores de yogur tradicional *Lactobacillus bulgaricus* subsp. *delbruickii* y *Streptococcus thermophiles* (concentración inicial de 1×10^{11} UFC/mL de inóculo) y se incubaron a 37°C aproximadamente.

4.3.2. Proceso de deshidratación de las leches fermentadas

Previamente al proceso de deshidratación, la muestra de yogur se acondicionó y trató adecuadamente, para ello se homogeneizó calentando a 20°C y agitando vigorosamente con la ayuda de un vortex. Una vez preparado el producto se deshidrató a una temperatura suave (50°C) para evitar cambios nutricionales negativos.

Para conservar en perfectas condiciones, el producto deshidratado se mantuvo en la oscuridad a una temperatura entre 19° y 20 °C y una humedad ambiental entre 30 y 40%. Se procedió a su reconstitución usando suero salino.



Posteriormente se realizó un análisis organoléptico completo para comprobar el estado óptimo del yogur, valorando parámetros tales como: olor, sabor, textura y color.

4.4. DETERMINACIÓN DE MATERIA SECA Y CONTENIDO DE NITRÓGENO, CENIZAS, GRASA TOTAL Y LACTOSA

La materia seca fue determinada por el método gravimétrico directo (AOAC, 2005). Este método se fundamenta en la evaporación del agua de una muestra de peso conocido y después pesar el residuo. Se realizó por desecación en estufa a presión normal y una temperatura de aproximadamente 100°C, para luego pesar el residuo seco remanente.

El contenido de nitrógeno se midió usando el método Kjeldahl (AOAC, 2005). Este método se fundamenta en la oxidación de la materia orgánica por acción del ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado, el cual digiere la materia dando lugar a dióxido de carbono (CO_2) y agua (H_2O).

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 grasa total se determinó mediante el método de extracto etéreo descrito por la AOAC (2005), cuyo fundamento se basa en extraer la grasa con éter y proceder a evaporarlo continuamente.

El contenido de carbohidratos disponible se determinó por diferencia, mediante la siguiente fórmula:

$$100 - (\% \text{ grasa} + \% \text{ proteína} + \% \text{ humedad} + \% \text{ cenizas})$$

La determinación de las cenizas se realizó por el método gravimétrico en mufla (AOAC, 2005), cuyo fundamento se basa en la acción directa del calor sobre los componentes orgánicos, quedando sin destruir las sustancias minerales o cenizas.

La composición química de las leches fermentadas de vaca y cabra se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10. Composición química de las leches fermentadas y deshidratadas (vaca o cabra).

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

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

4.5. COMPOSICIÓN DE AMINOÁCIDOS

Las leches fermentadas deshidratadas se suspendieron en agua de modo que la concentración fue de aproximadamente 7g de polvo/100 ml. Seguidamente 1.28 ml de leche de cabra fermentada y 1.21 ml de leche de vaca fermentada (de manera que había una cantidad igual de proteína de cada muestra) se dividieron en partes alícuotas por duplicado en dos series de tubos



de hidrólisis. Una serie se sometió a análisis para los aminoácidos estables en medio ácido y la otra se sometió a análisis para los aminoácidos azufrados. No se intentó eliminar la grasa de las muestras. Todos los tubos se secaron usando bomba de vacío. Los tubos utilizados para determinar los aminoácidos estables en medio ácido tenían 1 ml de HCl 6 M que contenía 0.1% de fenol añadido antes de eliminar el gas (usando una bomba de vacío) y se sellaron fundiendo el estrechamiento del cuello del tubo de muestra. Después de la hidrólisis, los tubos se agrietaron y se añadió norleucina como patrón interno antes de volver a secarse. Una vez secos, los aminoácidos se disolvieron mediante la adición de tampón de carga (citrato sódico 67 mM, pH 2,2, con fenol al 0.1% (p/v)) antes de analizarse usando un sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento Waters de intercambio iónico (Waters Corporation, Milford, MA, EE. UU.), Utilizando derivatización y detección de ninhidrina en la columna con una absorbancia a 570 nm (440 nm para la prolina). Los tubos utilizados para determinar los aminoácidos de azufre se trataron con ácido perfórmico antes de la hidrólisis para oxidar cuantitativamente la cisteína y la metionina a los compuestos más estables, ácido cisteico y metionina sulfona. Estos tubos se prepararon por triplicado. Primero se enfriaron en hielo, antes de agregar 1 ml de ácido perfumado enfriado en hielo (proporción 9: 1 de ácido fórmico al 88%: peróxido de hidrógeno al 30%). Los tubos se incubaron en hielo en un refrigerador durante 16 h. Después de la incubación, se añadieron 0,15 ml de bromuro de hidrógeno a los tubos, que luego se secaron. Una vez secos, los tubos se sometieron a hidrólisis ácida como se ha descrito en el primer paso (Tabla 11).

Tabla 11. Composición de aminoácidos de las leches fermentadas y deshidratadas (vaca o cabra).

Aminoácidos (g/100 g leche)	Leche fermentada de vaca	Leche fermentada de cabra
Aminoácidos esenciales		
Thr	1.51	1.85
Ileu	1.90	2.25
Leu	2.81	4.11
Lys	2.48	2.86
Met	0.81	1.36
Cys	0.05	0.08
Phe	1.21	1.98
Tyr	0.49	0.88
Val	1.92	2.76
Aminoácidos no esenciales		
Arg	0.75	1.39
His	0.77	1.42
Ala	1.52	1.48
Asp	2.71	3.40
Glu	5.41	9.46
Gly	0.53	0.86
Pro	2.91	4.12
Ser	1.77	2.33

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

4.6. COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

Los ésteres metílicos de ácidos grasos se prepararon mediante metanolisis básica catalizada por glicéridos (KOH en metanol) de acuerdo con el procedimiento ISO-IDF (ISO-IDF, 2002). El análisis de ésteres metílicos de ácidos grasos con cromatografía de gases con un detector de ionización de llama (GC-FID) se realizó en un cromatógrafo de gas-líquido (sistema de red Agilent 6890 N) con un autoinyector. El perfil de ésteres metílicos de ácidos grasos se determinó mediante inyección dividida (1: 100) en una columna capilar de sílice fundida CP-Sil 88 (100 mx 0,25 mm con película de 0.20 μ m,

Varian, Middelburg, Países Bajos) usando un programa de temperatura de gradiente. La temperatura inicial del horno fue de 160 ° C. Después de 80 min, la temperatura del horno se elevó a 10 ° C min⁻¹ a 210 ° C y luego se mantuvo durante 35 min. El helio era el gas portador, y el inyector y el detector estaban a 250°C (Tabla 12).

Tabla 12. Composición de ácidos grasos de las leches fermentadas y deshidratadas (vaca o cabra).

Ácidos grasos (g/100g)	Leche fermentada de vaca	Leche fermentada de cabra
C4:0	3.61	2.63
C6:0	2.29	3.21
C8:0	1.38	3.59
C10:0	3.30	11.11
C11:0	0.10	0.11
C12:0	3.61	4.59
C13:0	0.11	0.12
C14:0	12.31	8.02
C14:1	1.07	0.41
C15:0	2.39	0.89
C16:0	34.81	26.77
C16:1	2.09	1.11
C17:0	1.22	0.39
C18:0	8.22	8.64
C18:1 n-9	19.41	24.23
C18:2 n-6	2.29	3.42
C18:0	0.20	0.21
C18:3 n-3	0.71	0.42
C18:3 n-6	0.22	0.12
C20:5	0.10	0.08
C22:5	0.09	0.11
SFA	73.60	72.90
MUFA	20.80	20.00
PUFA	2.90	3.50
PUFA n-3	0.40	0.70
PUFA n-6	2.30	2.90

SFA: ácidos grasos saturados; MUFA: ácidos grasos monoinsaturados, PUFA: ácidos grasos poliinsaturados

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

4.7. DETERMINACIÓN Y COMPOSICIÓN MINERAL

El contenido mineral en las leches fermentadas y en las dietas (PPE y PE) se evaluó mediante análisis multielemental en un espectrofotómetro de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES). Las muestras se mineralizaron previamente por método húmedo en un baño de arena (JR Selecta, Barcelona, España), usando HNO₃ seguido de una mezcla de HNO₃: HClO₄ (69%: 70%, v/v; Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) en una proporción 1:4 v/v, hasta la eliminación total de la materia orgánica y posteriormente se diluyeron en agua bidestilada Milli-Q ultrapura.

El análisis multielemental por espectrómetro de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) (Perkin-Elmer Optima 8300, Perkin-Elmer, Shelton, CT) se llevó a cabo para medir Ca, P, Mg, Zn, K, Fe, Cu, Se, I (Tabla 13).

Las muestras de leche fermentada fueron previamente mineralizadas por método húmedo en un baño de arena (JR Selecta, Barcelona, España); las muestras se colocaron en un matraz resistente y se disolvieron usando ácido nítrico seguido de una mezcla de HNO₃: HClO₄ (69%: 70%, v/v; Merck KGaA, Darmstadt, Alemania; en relación 1:4, v/v) hasta la eliminación total de materia orgánica. Finalmente, las muestras se diluyeron con agua Milli-Q ultrapura bidestilada. Todas las mineralizaciones se realizaron por triplicado, y los blancos se prepararon y analizaron siguiendo el mismo procedimiento. Para disminuir el riesgo de contaminación, se utilizaron placas de polipropileno y puntas de pipeta de plástico, reduciéndose al mínimo el material de vidrio.



Todos los materiales se lavaron en ácido nítrico y se enjuagaron varias veces con agua desionizada bidestilada. Todo el análisis de la muestra de leche fermentada se llevó a cabo utilizando un Optima 8300 (PerkinElmer Inc. Waltham, EE. UU.) Con un detector de alto rendimiento de dispositivo de carga segmentada (SCD) de matriz segmentada. Los elementos Ca, P, Mg, Zn, K, Fe, Cu, Se, I no se midieron todos en el mismo análisis, porque todos los elementos pueden reaccionar de manera diferente en ciertas soluciones ácidas o en ciertas condiciones de plasma acoplado inductivamente y, por lo tanto, los elementos compatibles analizados juntos bajo un conjunto optimizado de condiciones. Se utilizaron seis métodos analíticos diferentes donde la preparación de la muestra y/o las condiciones del instrumento se optimizaron para el conjunto de elementos que se analizaban. Para la calibración del aparato, se usaron soluciones multielementales de calibración de Astasol (Analytika, Khodlova, Praga). Para preparar la curva de calibración, se prepararon las siguientes diluciones de trabajo del patrón analítico: 0.1, 1.0, 10, 20, 50 mg / L. Como "estándar de verificación", se usó la solución estándar (10 mg/L) después de cada serie de 5 muestras. El resultado aceptable se evaluó como 10%. Las muestras examinadas se midieron en tres repeticiones. El resultado final fue una media aritmética, que difería menos del 5%.

Las concentraciones de fósforo se analizaron mediante espectrofotometría visible (espectrómetro UV / VIS de Perkin-Elmer lambda 16) utilizando la técnica de Fiske-Subbarow (Fiske and Subbarow, 1925).

Tabla 13. Composición mineral de las leches fermentadas y deshidratadas (vaca o cabra).

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

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

4.8. DETERMINACIÓN Y COMPOSICIÓN VITAMÍNICA

La vitamina A, la vitamina E, la vitamina B₆, la vitamina B₁₂, vitamina D₃ y la vitamina C se determinaron en un sistema de HPLC (Hewlett-Packard, Waldbronn, Alemania) que consistía en un dispositivo de degasificación de la serie HP 1050, un HP 1100 (para análisis hidrosoluble), o un automuestreador Waters 717 (para análisis liposoluble) (Waters, Milford, MA), ambos con 20 mL de 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), con un cartucho protector a juego. Ambos análisis se llevaron a cabo de forma isocrática a un caudal de 1 ml/min. Las vitaminas hidrosolubles se determinaron a partir de 10 g de leches fermentadas deshidratadas con 10 ml de agua Milli-Q. La fase móvil utilizada en la HPLC contenía ácido octanosulfónico (reactivo de emparejamiento iónico) 5 mM, trietilamina al 0.5%,



ácido acético glacial al 2.4% y 15% de metanol en agua Milli-Q. La vitamina B₆, la vitamina B₁₂, vitamina D₃ y la vitamina C se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). La vitamina A y la vitamina E se determinaron a partir de 15 g de leches fermentadas deshidratadas disueltas con 100 mL de agua Milli-Q y se saponificaron a temperatura ambiente durante la noche usando etanol absoluto, solución de hidróxido de potasio y ácido ascórbico como antioxidante. Las muestras se extrajeron con n-hexano y se añadió hidroxitolueno butilado (BHT) como antioxidante, luego se evaporó y se redisolvió en metanol. Los extractos se inyectaron en el sistema de HPLC. Se utilizó agua-acetonitrilo-metanol (4: 1: 95, v /v /v) como fase móvil. Las condiciones de trabajo involucraban poca luz y atmósfera de nitrógeno para evitar la degradación de las vitaminas. Trans-Retinol (vitamina A) y tocoferol (vitamina E) se compraron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

El ácido fólico se determinó en un sistema de HPLC (Hewlett-Packard, Waldbronn, Alemania) acoplado a un detector de masas en tándem Quattro Ultima (Waters-Micromass, Manchester, Reino Unido). 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 B, seguido de un aumento lineal a 100% de B en 4.5 minutos. Después de una retención isocrática al 100% de B durante 5.9 minutos, el gradiente volvió al 10% de 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 fue operado a 750 V. Al comienzo de cada serie, se inyectan patrones de trabajo que contienen ácido fólico para verificar el rendimiento del instrumento (Tabla 14).

Tabla 14. Composición vitamínica de las leches fermentadas y deshidratadas (vaca o cabra).

Composición (µg/100g)	Leche fermentada de vaca	Leche fermentada de cabra
Vitaminas liposolubles		
Vitamina A	207.25	498.33
Vitamina D ₃	0.02	0.07
Vitamina E	0.09	0.03
Vitaminas hidrosolubles		
B ₆ Piridoxina	42.71	33.25
B ₁₂ Cobalamina	0.08	0.45
B ₉ Ácido fólico	2.21	0.73
C Ácido ascórbico	931.12	759.65

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

4.9. DIETAS EXPERIMENTALES

La Tabla 15 muestra la composición de las dietas ensayadas durante el PPE y PE.

Tabla 15. Composición de las dietas experimentales.

PERÍODO PRE-EXPERIMENTAL (PPE)	
Dieta AIN-93G ¹	(g/kg dieta)
Ingredientes	
Caseína (> 85% proteína)	200.0
Almidón de trigo	500.0
Sacarosa	100.0
Aceite de oliva virgen	100.0



Fibra (Celulosa)	50.0
Corrector mineral (AIN-93G) ²	35.0
Corrector vitamínico (AIN-93G) ³	10.0
L-Cisteína	3.0
Bitratrato de colina (41% colina)	2.5
Tert-butilhidroquinona	1.0

Composición nutrientes

Energía total (Kcal/Kg)	3828.0
Proteína (%)	17.8
Carbohidratos (%)	65.8
Lípidos (%)	16.4

¹ Las dietas fueron preparadas de acuerdo con las recomendaciones del Instituto Americano de Nutrición AIN-93G para ratas en período de crecimiento (Reeves et al.,1993).

² Composición (mg/Kg de dieta). Minerales esenciales: hierro, 45 (contenido normal de hierro para ratas controles) y hierro, 5 (contenido bajo en hierro para ratas anémicas); calcio, 5000; fósforo, 1561; potasio, 3600; azufre, 300; sodio, 1019; cloro, 1571; magnesio, 507; zinc, 30; manganeso, 10; cobre, 6; yodo, 0.2; molibdeno, 0.15; selenio, 0.15. Minerales potencialmente beneficiosos: silicio, 5; cromo, 1; flúor, 1; níquel, 0.5, boro, 0.5; litio, 0.1; vanadio, 0.1.

³ Composición (mg/Kg de dieta): ácido nicotínico, 30; pantotenato, 15; piridoxina, 6; tiamina, 5; riboflavina, 6; ácido fólico, 2. Composición (g/kg dieta): vitamina K, 750; D-biotina, 200; vitamina B₁₂, 25; vitamina A, 4000; vitamina D₃, 1000; vitamina E, 75.

PERÍODO EXPERIMENTAL (PE)

Dieta basada en leche fermentada de vaca (contenido normal o sobrecarga de Fe)^c

	(g/kg dieta)
Proteína de leche de vaca	200.5
Lactosa de leche de vaca	290.5
Grasa de leche de vaca	100.0
Almidón de trigo	200.0
Ingredientes constantes ^b	200.0

Dieta basada en leche fermentada de cabra (contenido normal o sobrecarga de Fe)^c

	(g/kg dieta)
Proteína de leche de cabra	200.6
Lactosa de leche de cabra	290.1
Grasa de leche de cabra	100.0
Almidón de trigo	200.3
Ingredientes constantes ^b	200.0

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

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

^c Para las dietas basadas en leche de vaca o cabra fermentada del PE se formularon correctores minerales específicos teniendo en cuenta el contenido mineral que aportaban las leches fermentadas para alcanzar las citadas recomendaciones. Las dietas se prepararon de acuerdo a las recomendaciones del Instituto Americano de Nutrición (Reeves et al., 1993) para los grupos control (45 mg/kg dieta) y con elevado contenido en Fe (450 mg/kg dieta) para los grupos con sobrecarga (Raja et al., 1994).

La dieta estándar AIN 93-G del PPE y los suplementos minerales y vitamínicos fueron preparados de acuerdo a las recomendaciones del Instituto Americano de Nutrición (Reeves et al, 1993) pero con ligeras modificaciones en la fuente y nivel de grasa: la grasa proviene de aceite de oliva en lugar de soja (debido a sus conocidos efectos beneficiosos sobre la salud y por ser la más comúnmente consumida en nuestro país) y la proporción de grasa es del 10% en lugar del 7%. La fuente de hierro empleada fue citrato férrico.

4.10. PARAMÉTROS HEMATOLÓGICOS

Las determinaciones hematológicas realizadas fueron las siguientes: recuento leucocitario, recuento de hematíes, hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM), concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), amplitud de distribución eritrocitaria (ADE) y recuento plaquetario. Para su análisis se



empleó el autoanalizador hematológico Mythic 22CT (C2 Diagnostics, Grabels, France).

4.11. HIERRO SÉRICO, CAPACIDAD TOTAL DE FIJACIÓN HIERRO Y SATURACIÓN DE TRANSFERRINA

La concentración sérica de hierro y la capacidad total de fijación de hierro (TIBC) se determinaron utilizando los reactivos Sigma Diagnostics Iron y TIBC (Sigma Diagnostics). La absorbancia de las muestras se leyó a 550 nm en un lector de microplacas (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA). El porcentaje de saturación de transferrina se calculó a partir de la siguiente ecuación:

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

4.12. FERRITINA SÉRICA

La concentración de ferritina sérica se determinó usando el kit Rat Ferritin ELISA (Biovendor GmbH, Heidelberg, Germany). La absorbancia de la reacción se leyó a 450 nm usando un lector de microplacas (Bio-tek, Vermont, EE. UU). La intensidad del color desarrollada fue inversamente proporcional a la concentración de ferritina sérica.

4.13. HEPCIDINA SÉRICA

La concentración de hepcidina-25 se determinó usando un kit DRG ELISA (DRG Instruments GmbH, Marburg, Germany). Los pocillos de

microtitulación se recubrieron con anticuerpo monoclonal (de ratón) dirigido hacia un sitio antigénico de la molécula de hepcidina-25. La hepcidina-25 endógena de una muestra compitió con un conjugado de hepcidina-25-biotina para unirse al anticuerpo recubierto. Después de la incubación, el conjugado no unido se retiró por lavado y se añadió un complejo de enzima estreptavidina-peroxidasa a cada pocillo. Después de la incubación, el complejo de enzima libre se eliminó por lavado y se añadió la solución de sustrato. El desarrollo del color azul se detuvo después de un corto tiempo de incubación, cambiando el color de azul a amarillo. La microplaca se leyó a 450 nm en un lector de microplacas (Bio-Rad Laboratories Inc.) y la intensidad del color desarrollado fue inversamente proporcional a la concentración de hepcidina en la muestra.

4.14. SEÑALIZACIÓN PRO Y ANTIINFLAMATORIA

Para la determinación de las citocinas pro y antiinflamatorias se utilizó la tecnología Luminex xMAP (Millipore, Darmstadt, Germany) (Figura 11), la cual está construida sobre tecnologías existentes y probadas, la citometría de flujo, uso de microesferas, tecnología láser, procesamiento de las señales digitales y la química tradicional del inmunoensayo. El sistema Luminex es la combinación de tres tecnologías xMAP básicas. La primera es la de microesferas xMAP, una familia de 100 microesferas de poliestireno de 5.6 micrómetros, coloreadas mediante fluorescencia, que actúan como identificador, y superficie sólida para desarrollar el ensayo. La segunda, es un instrumento basado en citometría de flujo, que integra componentes como láseres, óptica, fluidos avanzados y procesadores de señal digital de alta velocidad. El tercer componente es el

software, diseñado para la adquisición de datos mediante "templates", con un sólido análisis de regresión de datos.

Esta tecnología presenta ciertas ventajas como reducción de coste y trabajo, reducción de tiempo, resultados más reproducibles que con arrays sólidos y posible determinación de entre 1-100 analitos.



Figura 11. Analizador Luminex mediante tecnología xMAP

Se usó el panel de microesferas magnéticas de señalización inflamatoria RECYTMAG-65K Milliplex MAP Kit Rat Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel (Millipore Corporation, Missouri, EE.UU.), con el siguiente panel de analitos: interleukina (IL)-4, IL-13, IL-10, IL-1 β , IL-2, IL-12p70, proteína inducible por IFN- γ 10 (IP-10) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Estos se basan en inmunoensayos en la superficie de esferas fluorescentes codificadas (microesferas), siguiendo las especificaciones del fabricante (50 eventos por perla, 50 μ l de muestra, configuración de compuerta: 8000-15000, tiempo de espera 60 segundos).

La placa se leyó en el analizador LABScan 100 (Luminex Corporation, Texas, EE.UU.) con el software xPONENT para adquisición de datos.

Los valores promedio para cada conjunto de muestras o estándares duplicados se encontraban dentro del 15% de la media. Curva estándar: IL-4e IL-13: 4.9–20 000 pg/mL; IP-10 y TNF α : 2.4–10 000 pg/mL; IL-2, IL-12p70 e IL-1 β : 12.2–50 000 pg/mL; IL-10: 7.3–30 000 pg/mL.

Las concentraciones de analitos en muestras de plasma se determinaron comparando la media de muestras duplicadas con la curva estándar para cada ensayo.

4.15. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como la media \pm error estándar de la media (EEM), siendo “n” el número de muestras utilizadas.

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa informático SPSS (versión 26.0, 2019, SPSS Inc., Chicago, IL). Las diferencias entre los grupos alimentados con dietas con contenido normal de hierro o bajo en hierro durante el PPE se evaluaron con significación estadística con la prueba de la *t* de Student. Los datos se analizaron mediante ANOVA de 2 vías para determinar los efectos del tipo de la dieta, la anemia y el contenido de hierro en la dieta. Las medias individuales se probaron mediante comparación por pares con la prueba de comparación múltiple de Tukey cuando los efectos principales y las interacciones fueron significativos. Se consideró como diferencia estadísticamente significativa un valor de $P < 0,05$.

V. TABLAS Y FIGURAS

Tabla I. Parámetros hematológicos en sangre total de ratas controles y anémicas tras 40 días de suministro de dieta con contenido normal o bajo en hierro (PPE).

	Grupo Control (n = 40)	Grupo Anémico (n = 40)
Concentración de Hb (g/L)	133.88 ± 2.98	60.22 ± 2.87 *
Recuento de hematíes (10¹²/L)	7.14 ± 0.20	3.08 ± 0.24 *
Hematocrito (%)	40.01 ± 1.13	12.76 ± 1.33 *
VCM (fL)	55.76 ± 0.53	36.91 ± 0.37 *
HCM (pg)	19.47 ± 0.15	14.10 ± 0.63 *
CHCM (g/dL)	35.54 ± 0.36	30.21 ± 0.82*
ADE (%)	16.23 ± 0.35	19.16 ± 0.39 *
Recuento de plaquetas (10⁹/L)	733 ± 72.15	2123 ± 119 *
Recuento de leucocitos (10⁹/L)	8.91 ± 0.39	8.53 ± 0.88
Recuento de linfocitos (10⁶/mL)	7.98 ± 0.58	5.76 ± 0.84*

Los resultados se muestran como valores medios ± EEM.

Hb, hemoglobina; VCM, volumen corpuscular medio; HCM, hemoglobina corpuscular media; CHCM, concentración de hemoglobina corpuscular media; ADE, amplitud de distribución eritrocitaria.

*Diferencias significativas con respecto al grupo control ($P < 0.001$, test de la t de Student).



Tabla II. Parámetros séricos relacionados con el metabolismo de hierro en ratas controles y anémicas tras 40 días de suministro de dieta con contenido normal o bajo en hierro (PPE).

	Grupo Control (n = 40)	Grupo Anémico (n = 40)
Hierro ($\mu\text{g/L}$)	1336 \pm 99.12	601 \pm 55.98 *
CTFH ($\mu\text{g/ L}$)	2675 \pm 189	17935 \pm 598 *
Saturación de transferrina (%)	49.02 \pm 5.87	3.93 \pm 0.41 *
Ferritina ($\mu\text{g/L}$)	79.74 \pm 2.12	49.65 \pm 1.64 *
Hepcidina (ng/mL)	13.65 \pm 0.35	15.48 \pm 0.71 *

Los resultados se muestran como valores medios \pm EEM.

CTFH, capacidad total de fijación del hierro.

*Diferencias significativas con respecto al grupo control ($P < 0.001$, test de la t de Student).

Tabla III. Parámetros hematológicos en sangre total en ratas controles y anémicas alimentadas durante 30 días con leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro.

		LECHE FERMENTADA DE VACA		LECHE FERMENTADA DE CABRA	
		Grupo Control (n = 10)	Grupo Anémico (n = 10)	Grupo Control (n = 10)	Grupo Anémico (n = 10)
Concentración de Hb (g/L)	Normal	129.55 ± 2.89	129.33 ± 2.61	131.95 ± 2.76	129.15 ± 2.48
	Sobrecarga	142.63 ± 2.63 ^C	141.10 ± 2.92 ^{AC}	141.30 ± 2.98 ^C	147.35 ± 3.01 ^{BC}
Recuento de hematíes (10¹²/L)	Normal	7.06 ± 0.18	7.08 ± 0.22	7.39 ± 0.21	7.21 ± 0.20
	Sobrecarga	6.94 ± 0.17 ^a	7.19 ± 0.24	8.01 ± 0.3 ^{bC}	7.11 ± 0.21
Hematocrito (%)	Normal	40.02 ± 1.19 ^a	39.01 ± 0.97 ^A	41.93 ± 1.23 ^b	42.95 ± 0.98 ^B
	Sobrecarga	39.37 ± 1.33 ^a	44.89 ± 2.76 ^C	44.86 ± 1.26 ^{bC}	45.42 ± 1.35 ^C
VCM (fL)	Normal	57.68 ± 0.54	55.34 ± 0.59	57.25 ± 0.56	55.04 ± 0.53
	Sobrecarga	56.79 ± 0.58	53.18 ± 0.55 ^A	56.44 ± 0.53	56.15 ± 0.53 ^B
Recuento de plaquetas (10⁹/L)	Normal	933.00 ± 70.32	963.00 ± 66.45	926.00 ± 79.65	935.33 ± 66.89
	Sobrecarga	939.67 ± 71.37	965.50 ± 72.22	933.59 ± 81.32	945.86 ± 70.26

Los resultados se muestran como valores medios ± EEM.

Hb, hemoglobina; VCM, volumen corpuscular medio.

^{a,b} Valores medios entre grupos controles con distinto superíndice minúscula son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

^{A,B} Valores medios entre grupos anémicos con distinto superíndice mayúscula son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

^C Valores medios del correspondiente grupo de ratas con contenido normal de Fe son significativamente diferentes ($P < 0.05$).



Tabla IV. Parámetros séricos relacionados con el metabolismo de hierro en ratas controles y anémicas alimentadas con leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro.

		LECHE FERMENTADA DE VACA		LECHE FERMENTADA DE CABRA	
	Contenido de Fe	Grupo Control (n = 10)	Grupo Anémico (n = 10)	Grupo Control (n = 10)	Grupo Anémico (n = 10)
Hierro (µg/L)	Normal	1346 ± 86.18	1355 ± 86.35	1352 ± 88.96	1326 ± 94.35
	Sobrecarga	1591 ± 99.51C	1587 ± 102.13C	1556 ± 98.95C	1576 ± 96.98C
CTFH (µg/L)	Normal	2787 ± 158	2798 ± 137	2785 ± 144	2789 ± 166
	Sobrecarga	3145 ± 177C	3254 ± 175C	3251 ± 169C	3195 ± 166C
Saturación transferrina(%)	Normal	45.98 ± 0.91	45.32 ± 0.89	46.65 ± 0.76	46.37 ± 0.94
	Sobrecarga	47.76 ± 1.32C	47.88 ± 1.02C	49.59 ± 0.98C	48.96 ± 1.05C
Ferritina (µg/L)	Normal	83.25 ± 1.75	82.97 ± 1.68	84.33 ± 1.77	82.34 ± 1.82
	Sobrecarga	87.73 ± 1.87C	86.87 ± 1.91C	87.91 ± 1.88C	86.65 ± 1.96C
Hepcidina (ng/mL)	Normal	16.35 ± 0.59a	16.39 ± 0.49A	14.25 ± 0.55b	14.24 ± 0.59B
	Sobrecarga	17.75 ± 0.62a	16.87 ± 0.58A	15.01 ± 0.61b	14.42 ± 0.63B

Los resultados se muestran como valores medios ± EEM.

¹NS, no significativo

CTFH, capacidad total de fijación de hierro

^{a,b} Valores medios entre grupos controles con distinto superíndice minúscula son significativamente diferentes ($P < 0.05$)

^{A,B} Valores medios entre grupos anémicos con distinto superíndice mayúscula son significativamente diferentes ($P < 0.05$)

^C Valores medios del correspondiente grupo de ratas con contenido normal de Fe son significativamente diferentes ($P < 0.05$)

Tabla V. Citoquinas proinflamatorias en plasma de ratas controles y anémicas alimentadas durante 30 días con leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro.

	Contenido de Fe	LECHE FERMENTADA DE VACA		LECHE FERMENTADA DE CABRA		Diferencia
		Grupo Control (n = 10)	Grupo Anémico (n = 10)	Grupo Control (n = 10)	Grupo Anémico (n = 10)	
IL-1β (pg/mL)	Normal	36.87 \pm 1.57	34.29 \pm 0.79A	38.19 \pm 0.70	29.99 \pm 1.25BC	< 0.05
	Sobrecarga	158.30 \pm 6.93aD	92.15 \pm 3.33ACD	116.66 \pm 5.88bD	41.02 \pm 4.44BCD	< 0.05
IL-2 (pg/mL)	Normal	1590.49 \pm 59.70a	1561.94 \pm 44.26A	1101.22 \pm 15.23b	1031.15 \pm 22.26B	< 0.05
	Sobrecarga	1687.88 \pm 61.66a	1426.22 \pm 37.56AC	1194.86 \pm 21.25b	1115.10 \pm 21.10B	< 0.05
IL-12p70 (pg/mL)	Normal	142.99 \pm 1.53a	148.65 \pm 2.23A	112.77 \pm 3.43b	113.27 \pm 3.73B	< 0.05
	Sobrecarga	142.80 \pm 2.93A	143.89 \pm 2.02A	116.30 \pm 2.86b	119.91 \pm 3.86B	< 0.05
IP-10 (pg/mL)	Normal	68.07 \pm 3.57a	106.44 \pm 4.65AC	46.19 \pm 2.27b	83.56 \pm 4.36BC	< 0.05
	Sobrecarga	112.40 \pm 5.32aD	101.42 \pm 5.51	76.52 \pm 3.84bD	104.97 \pm 5.46D	< 0.05
TNF-α (pg/mL)	Normal	8.51 \pm 0.47a	9.01 \pm 0.48A	6.19 \pm 0.38b	6.30 \pm 0.60B	< 0.05
	Sobrecarga	8.43 \pm 0.34a	8.65 \pm 0.32A	6.31 \pm 0.32b	6.20 \pm 0.37B	< 0.05

Los resultados se muestran como valores medios \pm EEM.

¹NS, no significativo

^{a,b} Valores medios entre grupos controles con distinto superíndice minúscula son significativamente diferentes ($P < 0.05$, test de la *t*)

^{A,B} Valores medios entre grupos anémicos con distinto superíndice mayúscula son significativamente diferentes ($P < 0.05$, test de la *t*)

^C Valores medios del correspondiente grupo de ratas controles son significativamente diferentes ($P < 0.05$, test de la *t*)

^D Valores medios del correspondiente grupo de ratas con contenido normal de Fe son significativamente diferentes ($P < 0.05$, test de la *t*)



Tabla VI. Citoquinas antiinflamatorias en plasma de ratas controles y anémicas alimentadas durante 30 días con leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de Fe (n=10 animales por grupo).

		LECHE FERMENTADA DE VACA		LECHE FERMENTADA DE CABRA		
	Contenido de Fe	Grupo Control (n = 10)	Grupo Anémico (n = 10)	Grupo Control (n = 10)	Grupo Anémico (n = 10)	Diferencia
IL-4 (pg/mL)	Normal	28.75 ± 2.18a	27.05 ± 1.19A	36.19 ± 1.05b	35.82 ± 1.03B	< 0.05
	Sobrecarga	32.73 ± 1.01a	34.62 ± 2.77AD	43.01 ± 1.08bD	55.74 ± 2.09BCD	< 0.05
IL-13 (pg/mL)	Normal	24.55 ± 1.48a	31.58 ± 1.94AC	36.04 ± 1.61b	41.43 ± 0.58BC	< 0.05
	Sobrecarga	30.68 ± 1.68aD	65.14 ± 1.68ACD	46.74 ± 0.76bD	93.83 ± 1.96BCD	< 0.05
IL-10 (pg/mL)	Normal	33.48 ± 0.77a	16.09 ± 0.66AC	38.07 ± 1.94b	23.48 ± 1.19BC	< 0.05
	Sobrecarga	35.65 ± 2.03a	41.19 ± 1.83ACD	44.79 ± 1.04bD	74.59 ± 3.05BCD	< 0.05

Los resultados se muestran como valores medios ± EEM.

^{a,b} Valores medios entre grupos controles con distinto superíndice minúscula en la misma fila son significativamente diferentes ($P < 0.05$, test de la t).

^{A,B} Valores medios entre grupos anémicos con distinto superíndice mayúscula en la misma fila son significativamente diferentes ($P < 0.05$, test de la t).

^C Valores medios del correspondiente grupo de ratas controles son significativamente diferentes ($P < 0.05$, test de la t).

^D Valores medios del correspondiente grupo de ratas con contenido normal de Fe son significativamente diferentes ($P < 0.05$, test de la t).

Figura I. Concentración de hemoglobina (g/L) en sangre total en ratas controles y anémicas alimentadas durante 30 días con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro.

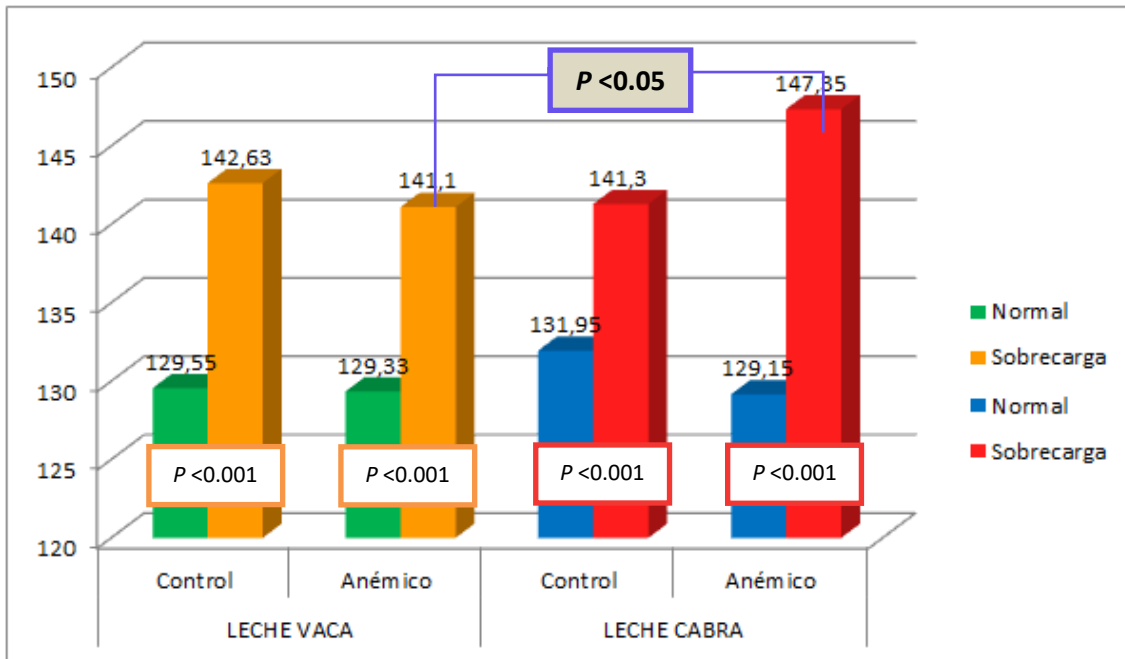


Figura II. Recuento de hematíes ($10^{12}/L$) en sangre total en ratas controles y anémicas alimentadas durante 30 días con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro.

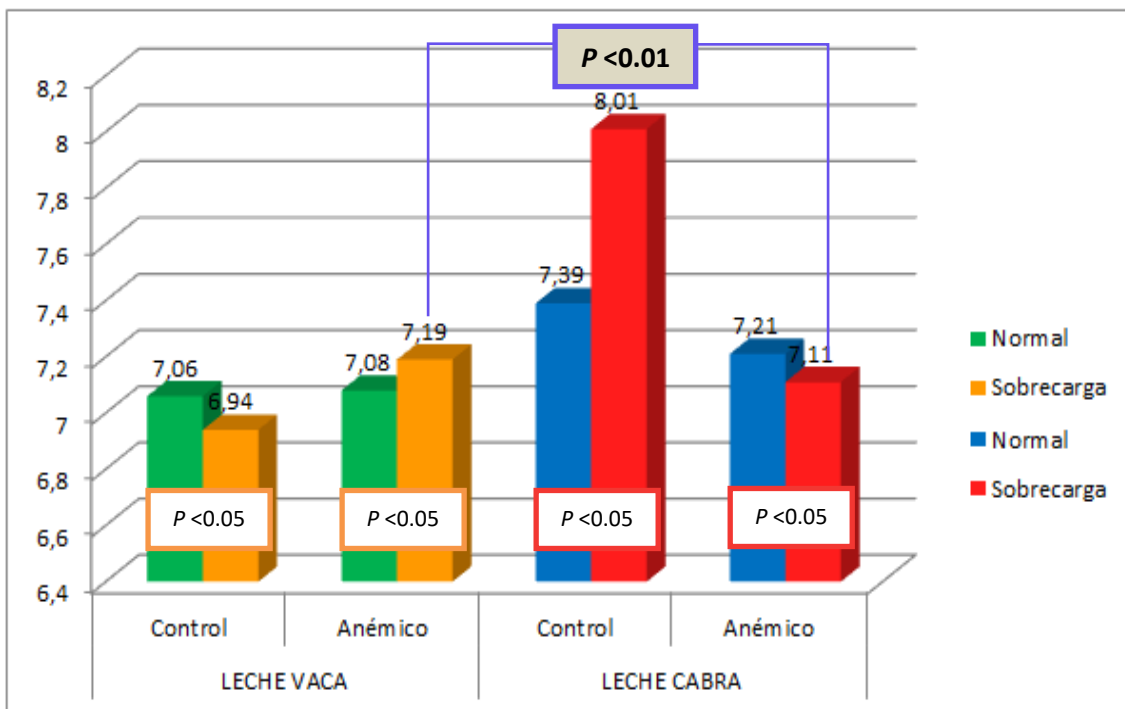


Figura III. Hematocrito (%) en sangre total en ratas controles y anémicas alimentadas durante 30 días con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro.

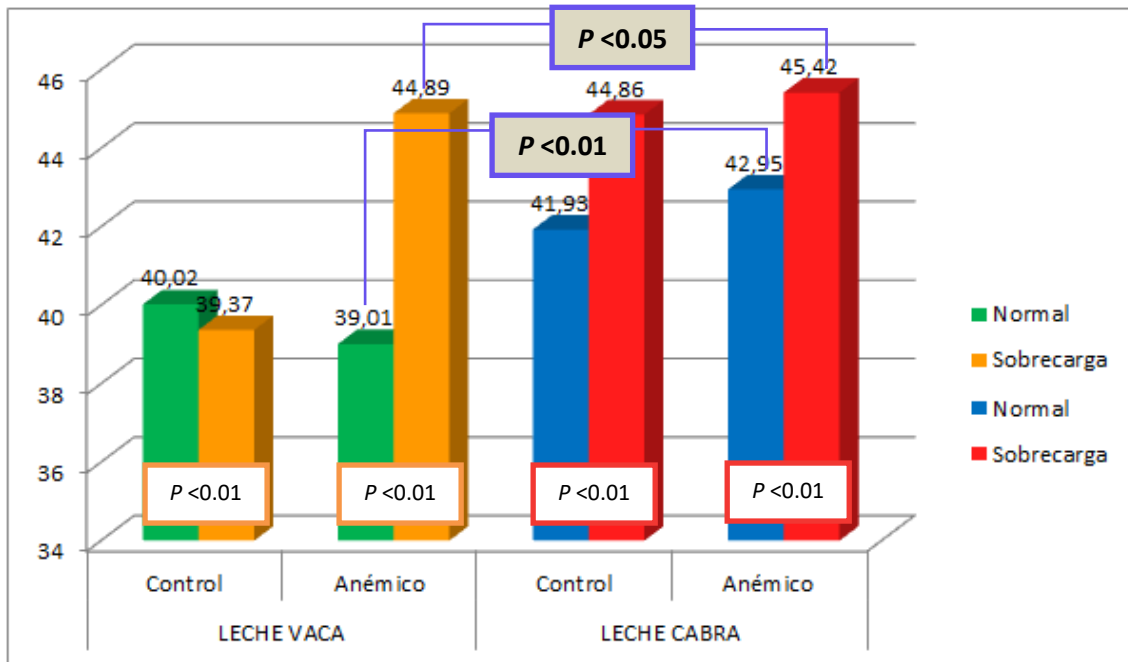


Figura IV. VCM (fL) en sangre total en ratas controles y anémicas alimentadas durante 30 días con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro.

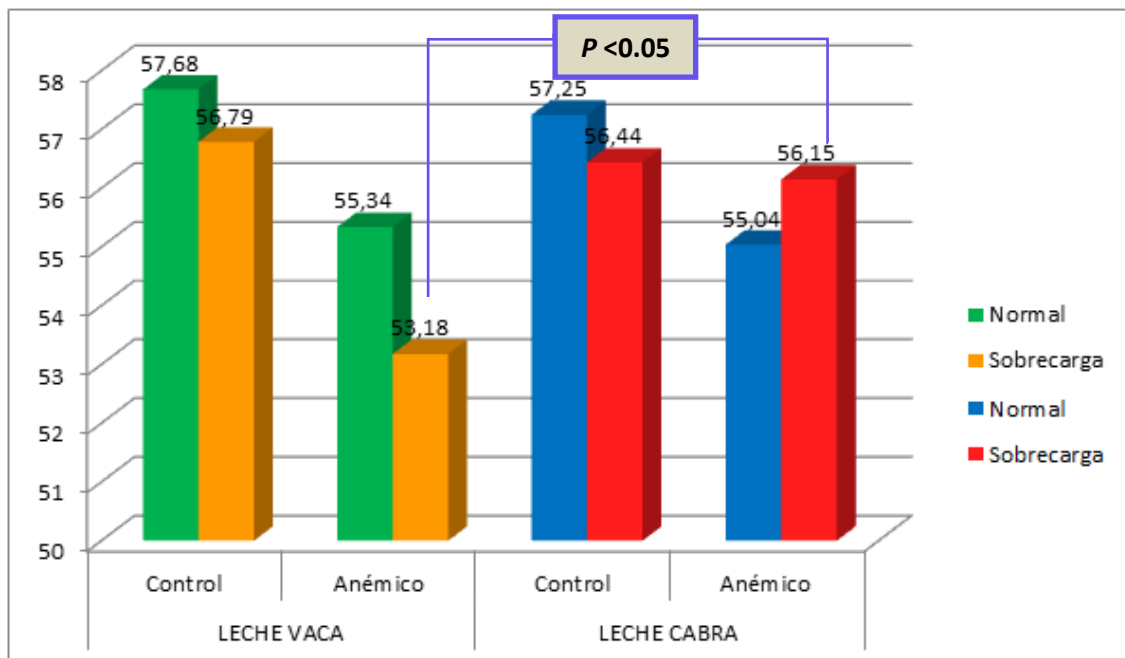


Figura V. Recuento de plaquetas ($10^9/L$) en sangre total en ratas controles y anémicas alimentadas durante 30 días con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro.

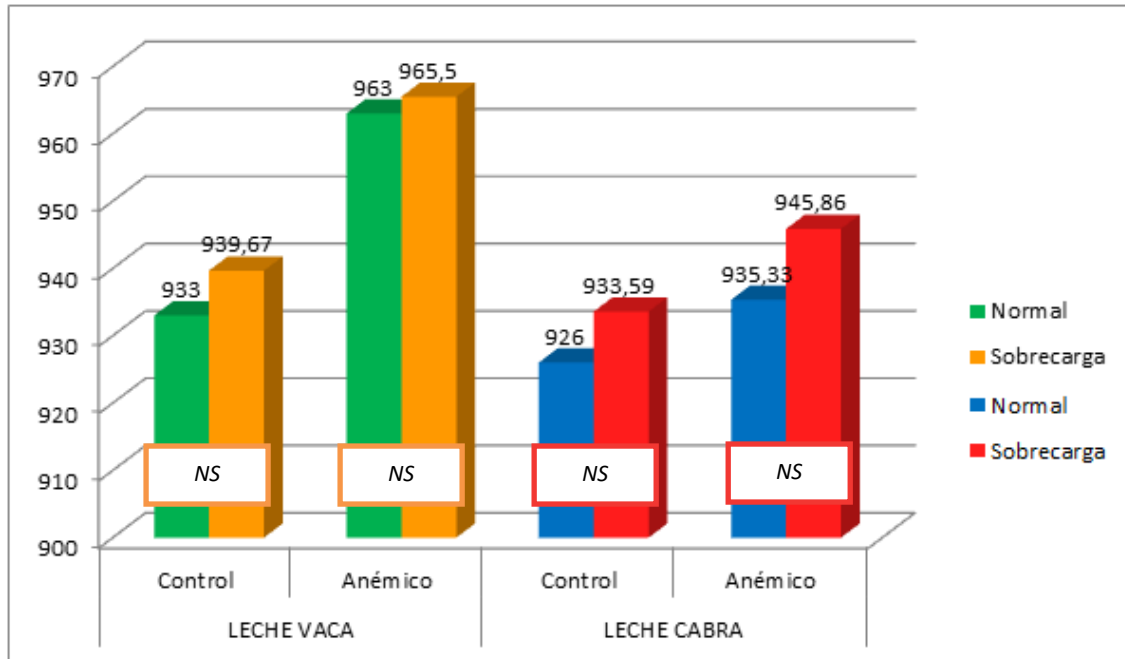


Figura VI. Contenido de hierro ($\mu g/L$) en ratas controles y anémicas alimentadas durante 30 días con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro (n=10 animales por grupo).

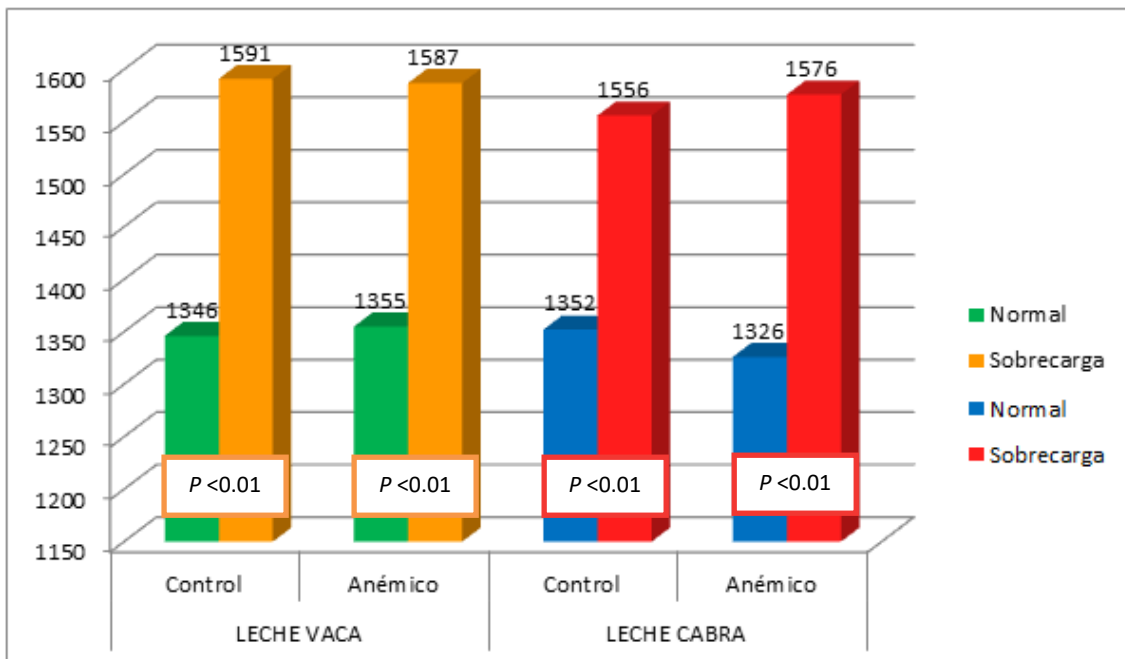


Figura VII. Capacidad total de fijación de hierro ($\mu\text{g/L}$) en ratas controles y anémicas alimentadas durante 30 días con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro ($n=10$ animales por grupo).

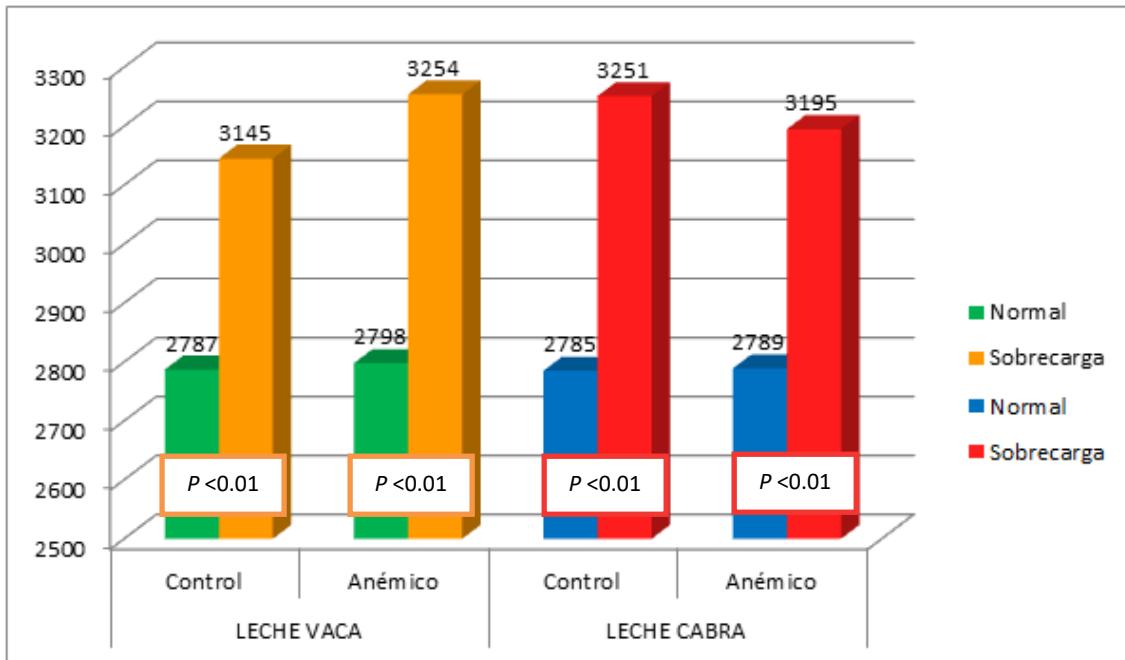


Figura VIII. Saturación de transferrina (%) en ratas controles y anémicas alimentadas durante 30 días con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro ($n=10$ animales por grupo).

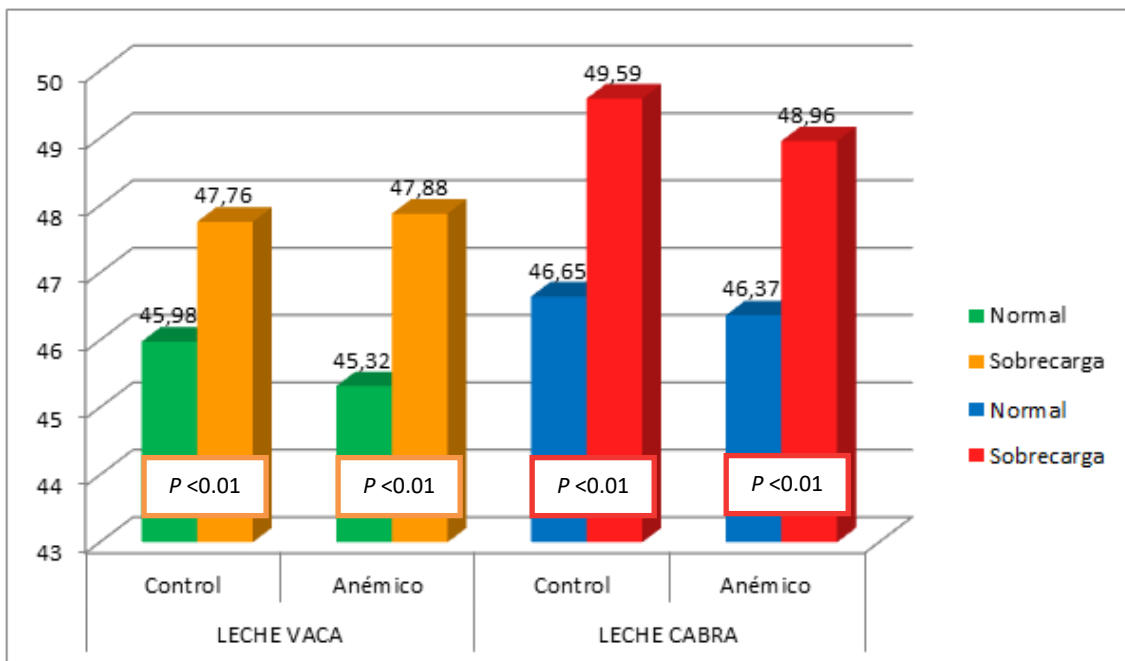


Figura IX. Contenido de ferritina ($\mu\text{g/L}$) en ratas controles y anémicas alimentadas durante 30 días con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro ($n=10$ animales por grupo).

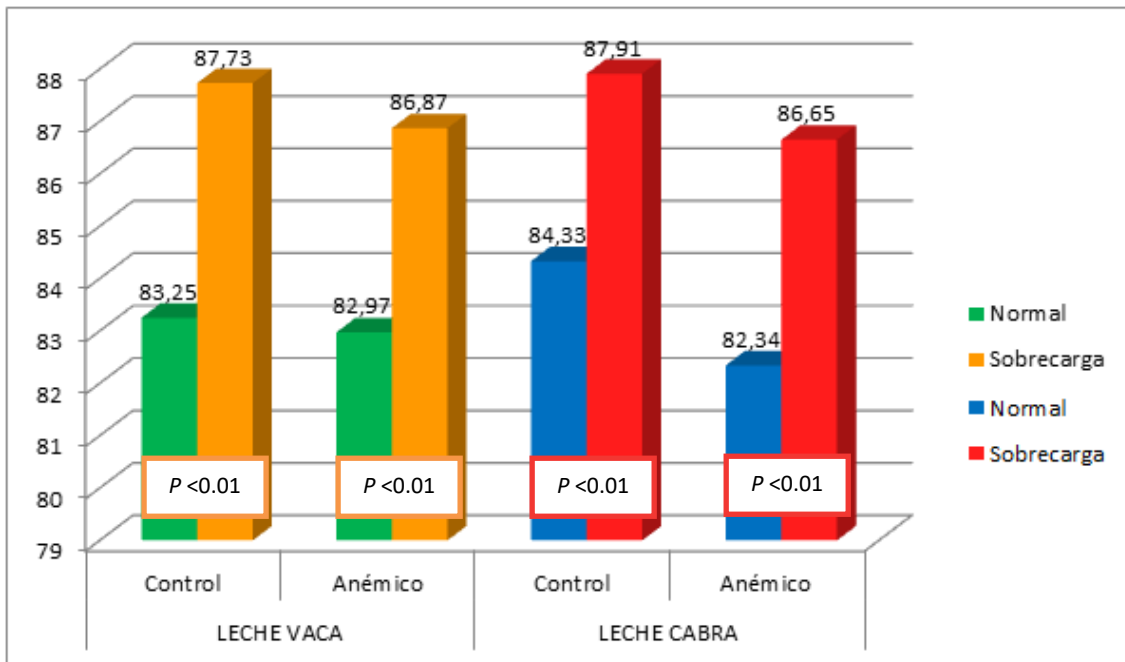


Figura X. Contenido de hepcidina ($\mu\text{g/L}$) en ratas controles y anémicas alimentadas durante 30 días con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro ($n=10$ animales por grupo).

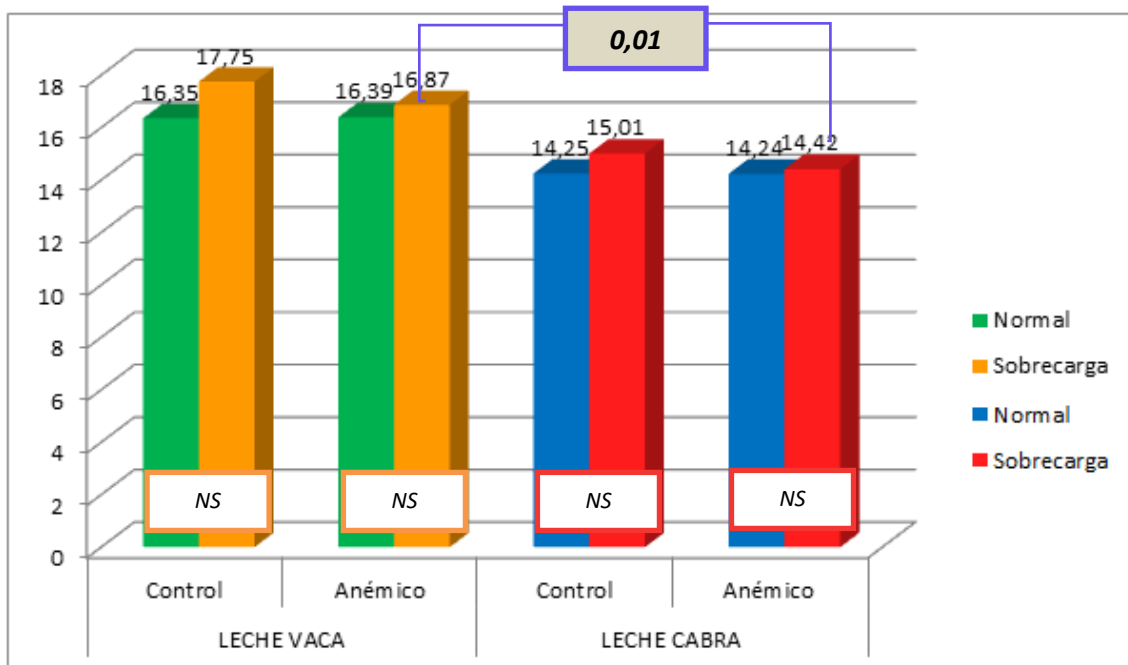


Figura XI. Concentración de IL-1 β (pg/ml) en plasma de ratas controles y anémicas alimentadas durante 30 días con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro.

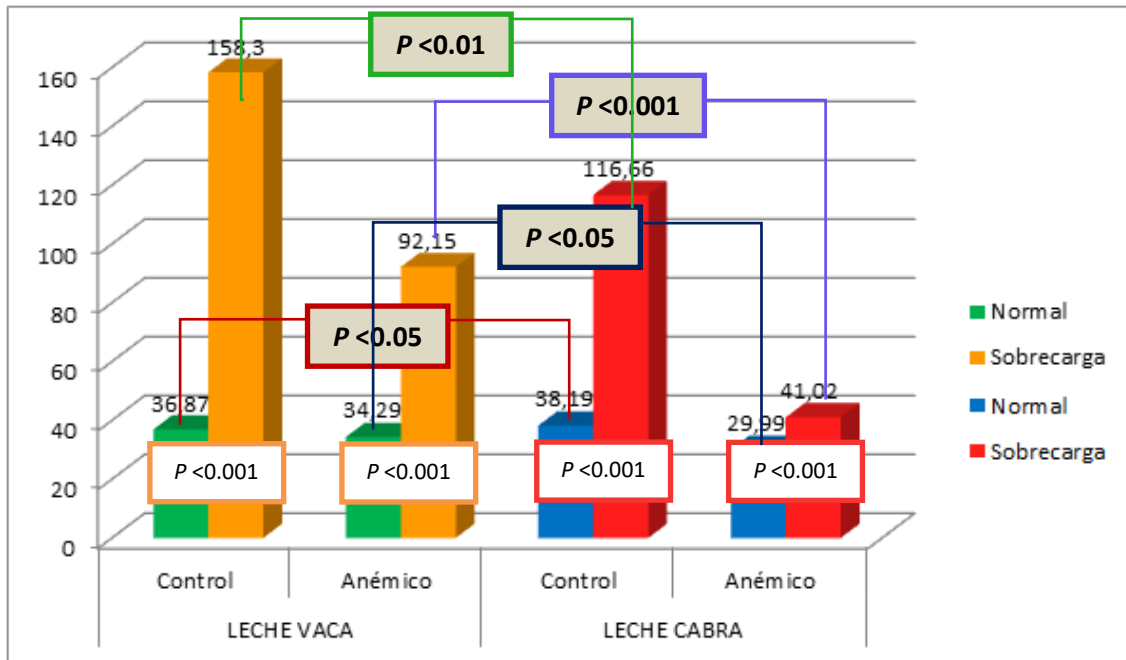


Figura XII. Concentración de IL-2 (pg/ml) en plasma de ratas controles y anémicas alimentadas durante 30 días con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro.

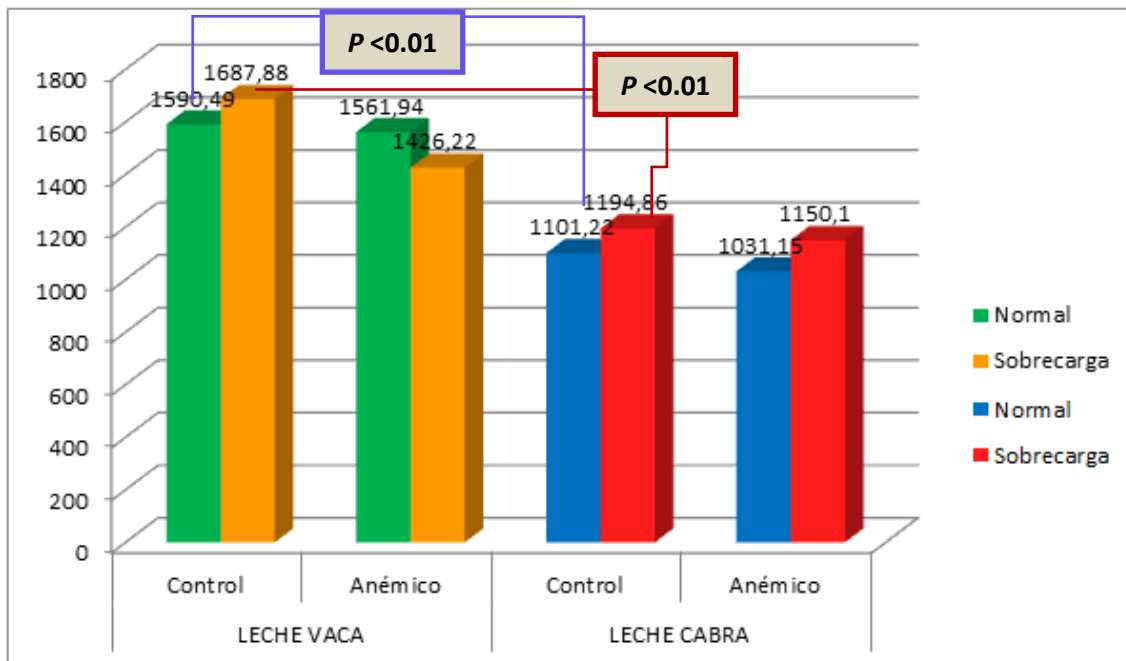


Figura XIII. Concentración de IL-12p70 (pg/ml) en plasma de ratas controles y anémicas alimentadas durante 30 días con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro.

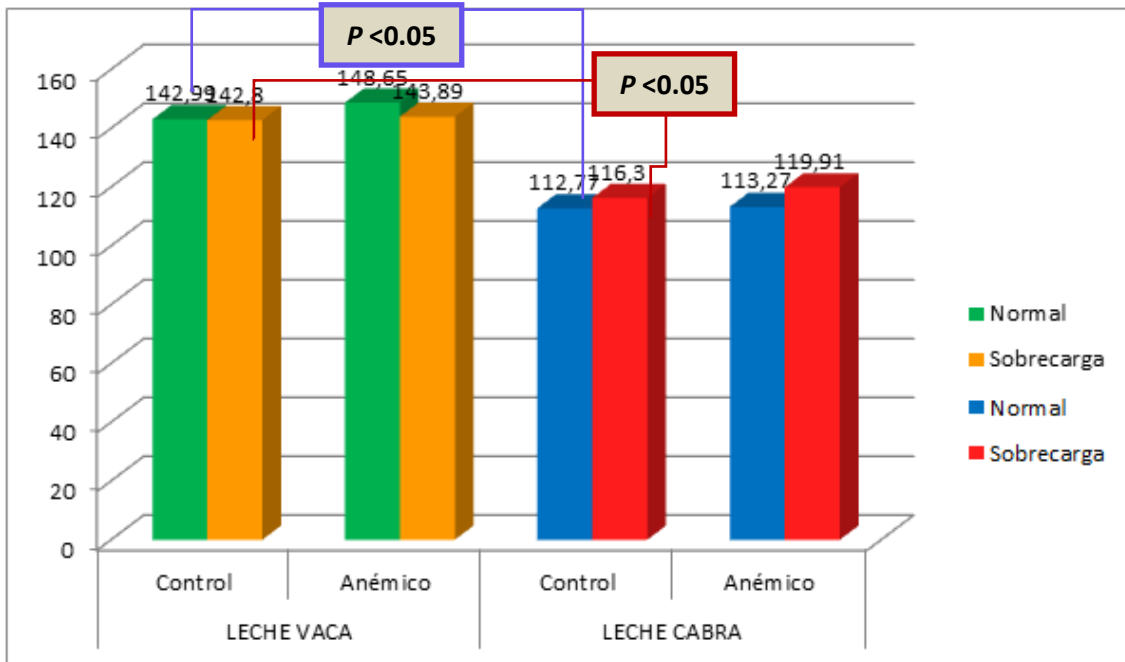


Figura XIV. Concentración de IP-10 (pg/ml) en plasma de ratas controles y anémicas alimentadas durante 30 días con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro.

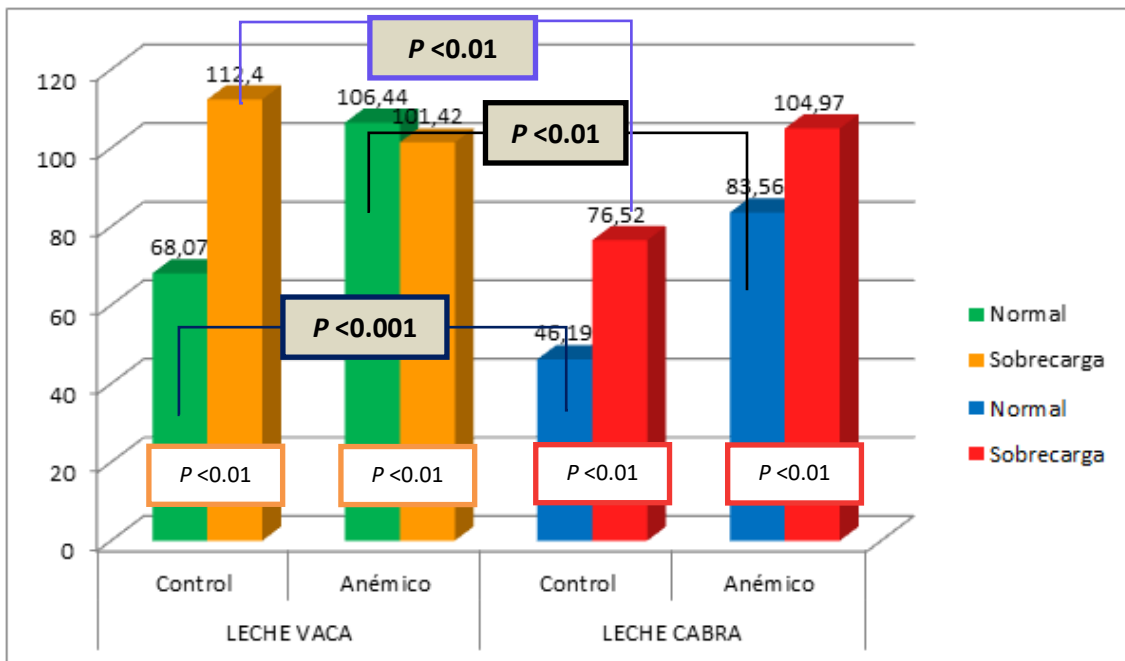


Figura XV. Concentración de TNF- α (pg/ml) en plasma de ratas controles y anémicas alimentadas durante 30 días con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro.

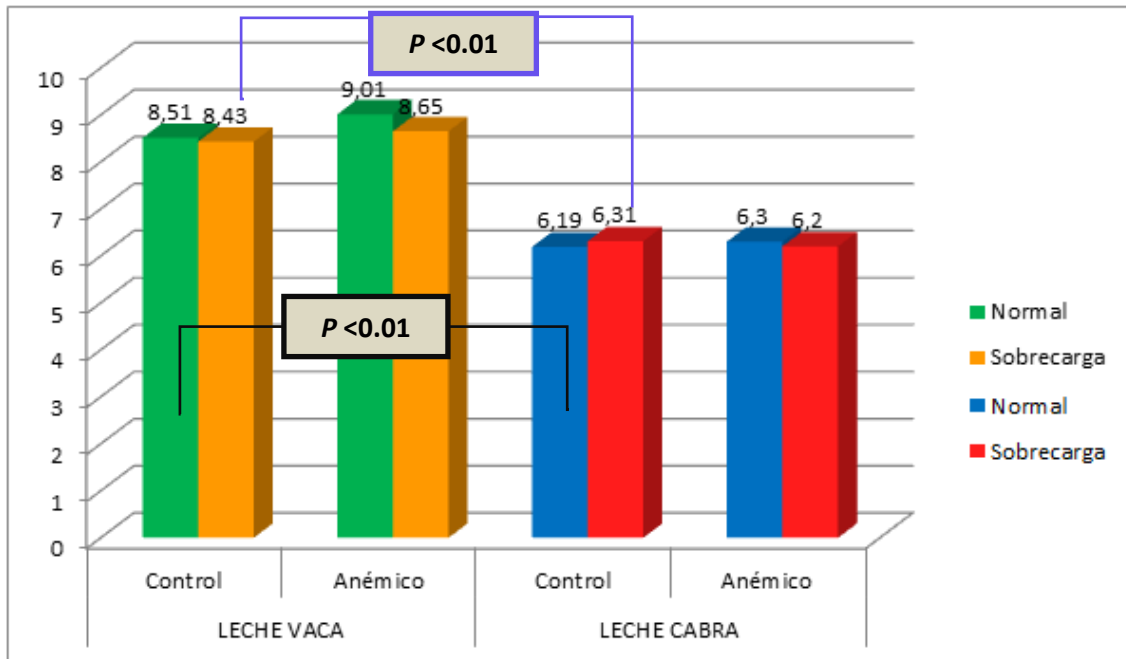


Figura XVI. Concentración de IL-4 (pg/ml) en plasma de ratas controles y anémicas alimentadas durante 30 días con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro.

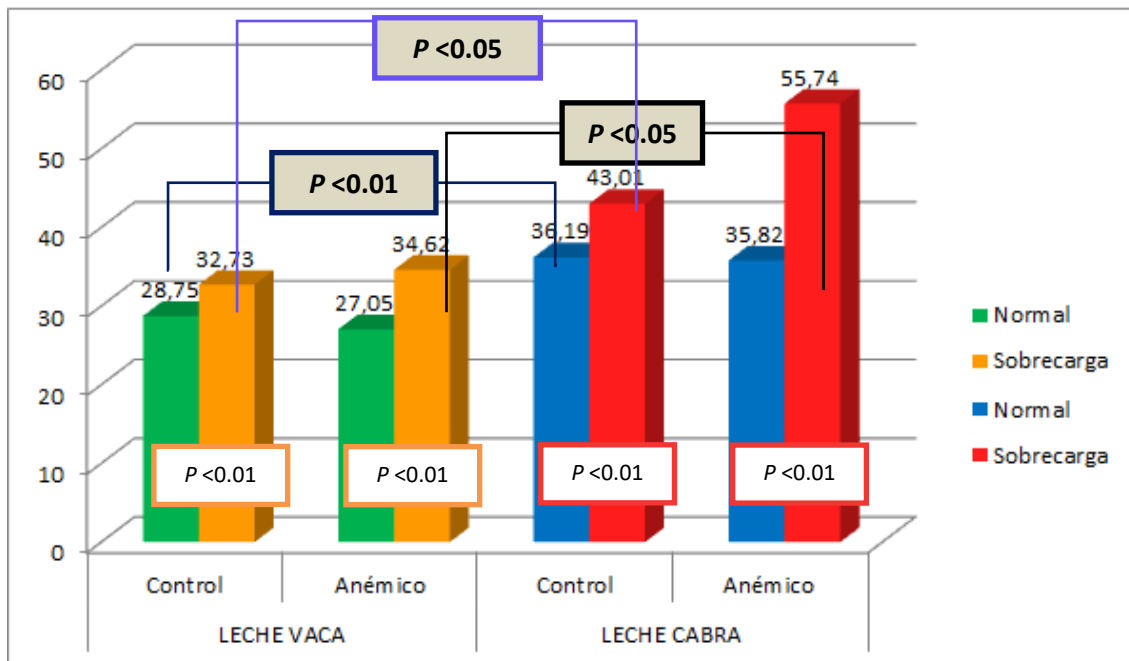


Figura XVII. Concentración de IL-13 (pg/ml) en plasma de ratas controles y anémicas alimentadas durante 30 días con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro.

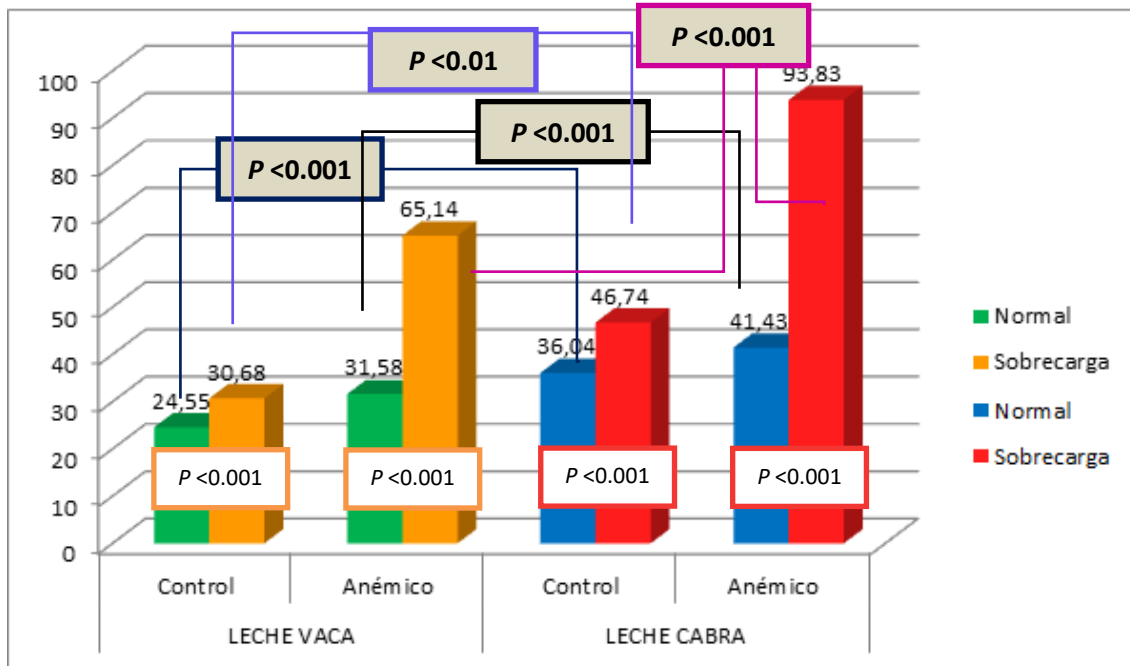
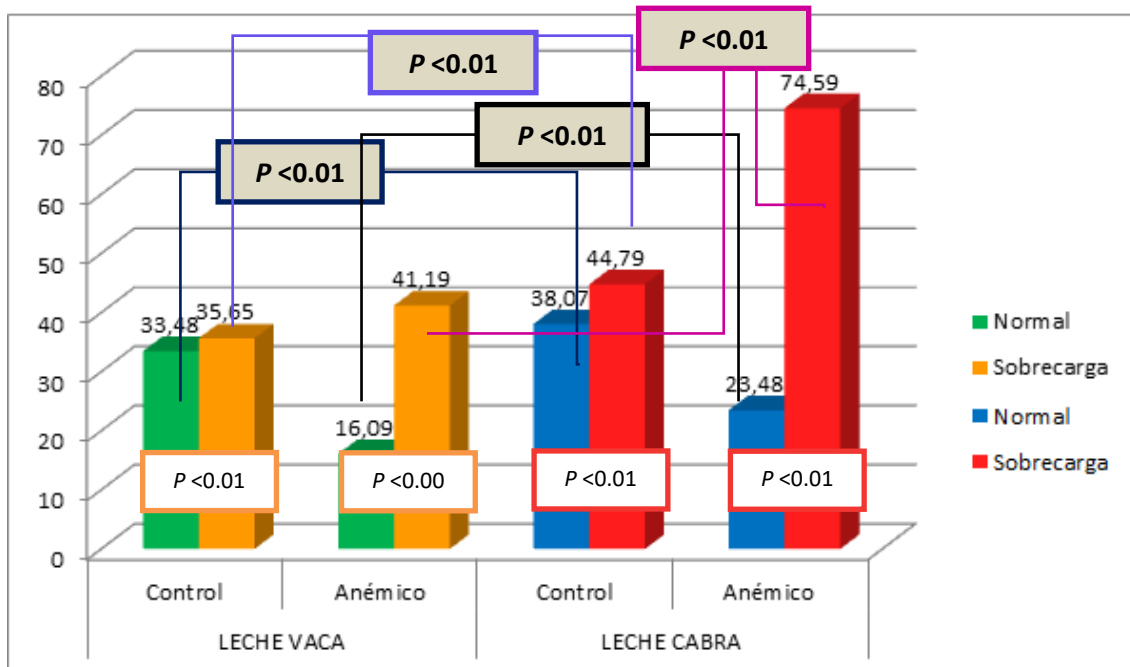


Figura XVIII. Concentración de IL-13 (pg/ml) en plasma de ratas controles y anémicas alimentadas durante 30 días con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro.



VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. PERÍODO PREEXPERIMENTAL

En el grupo control, todos los parámetros hematológicos estudiados están dentro del rango de valores normales para esta especie (Charles Rives, 1998).

Después de suministrar la dieta con bajo contenido en hierro (5 mg/kg dieta) durante 40 días (PPE), todos los parámetros hematológicos en el grupo anémico fueron menores que en el grupo control ($P < 0.001$), excepto la amplitud de distribución eritrocitaria (ADE) y el recuento de plaquetas ($P < 0.001$), mientras que el recuento de glóbulos blancos permaneció sin cambios, consecuencia de la depleción progresiva de las reservas corporales de hierro (TABLAS I y II).

En situación de anemia la ADE se encuentra incrementada significativamente debido a que el hierro circulante no llega a alcanzar la médula ósea de modo que el depósito de células rojas y su tamaño está aumentado.

Todos los parámetros séricos relacionados con el metabolismo de hierro fueron menores en el grupo anémico con respecto al grupo control ($P < 0.001$), excepto la capacidad total de fijación de hierro (CTFH) que fue mayor ($P < 0.001$) (TABLA II).

Estos resultados indican que el modelo de anemia ferropénica nutricional desarrollado confirma la inducción experimental de esta patología tras el suministro de una dieta baja en hierro durante 40 días a ratas recién destetadas.

6.2. PERÍODO EXPERIMENTAL

6.2.1. Parámetros hematológicos

Después de 30 días de suministro de las dietas a ensayar basadas en leche fermentada de vaca o cabra (PE), los parámetros hematológicos se recuperaron totalmente con ambas dietas ensayadas, especialmente con la dieta basada en leche fermentada de cabra, ya sea con contenido normal o sobrecarga de hierro.

Estos resultados pueden explicarse por las características nutricionales beneficiosas y los componentes bioactivos de la leche fermentada de cabra (Moreno-Fernandez et al., 2016) y sus lácteos que favorecen la absorción de hierro y potencian la actividad y expresión de la proteína DMT1 en el duodeno, mejorando el metabolismo y almacenamiento del hierro en comparación con la leche de vaca (Díaz-Castro et al., 2014).

Los niveles séricos de hepcidina fueron menores en ratas controles y anémicas alimentadas con leche fermentada de cabra con contenido normal o con sobrecarga de hierro, en comparación con los animales alimentados con leche fermentada de vaca ($P < 0.01$) (TABLAS III y IV; FIGURAS I-X).

Resultados previos de nuestro grupo de investigación (Díaz Castro e al., 2014) han puesto de manifiesto que en ratas alimentadas con dieta basada en leche fermentada de cabra, la expresión de hepcidina era menor en comparación con las que consumían dieta basada en leche de vaca. Esta menor expresión de hepcidina aumentó el flujo de salida de hierro de las células duodenales, dada la correlación inversa entre la actividad de la

ferroportina y el transporte basolateral de hierro, contribuyendo a una mejora de los parámetros hematológicos y promoviendo la recuperación de la anemia.

Como era de esperar, los niveles séricos de hierro fueron mayores en los grupos experimentales con sobrecarga de hierro ($P < 0.01$) alimentados con ambas dietas basadas en leche fermentada (vaca o cabra). La sobrecarga de hierro también incrementó la concentración de hemoglobina ($P < 0.001$), los niveles séricos de ferritina ($P < 0.01$), la saturación de transferrina ($P < 0.01$) y la capacidad total de fijación de hierro (CTFH) ($P < 0.01$) (TABLAS III y IV; FIGURAS I-X).

6.2.2. Señalización pro y antiinflamatoria

Después de 30 días de alimentar a los animales con dieta a base de leche fermentada de vaca o cabra (PE), los niveles plasmáticos de citocinas antiinflamatorias (IL-4, IL-10 e IL-13) fueron mayores en ambos grupos de animales (controles y anémicos) alimentados con leche fermentada de cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro, con respecto a la leche fermentada de vaca ($P < 0.001$ para IL-13; $P < 0.01$ para IL-10; $P < 0.01$ para IL-4 con contenido normal de hierro y $P < 0.05$ para los grupos con sobrecarga de hierro) (TABLAS V y VI; FIGURAS XI-XV).

La anemia incrementó la concentración plasmática de IL-13 durante la repleción de hierro con ambos tipos de leche fermentada, tanto con nivel normal ($P < 0.01$) como con sobrecarga de hierro ($P < 0.001$), mientras que disminuyó los niveles plasmáticos de IL-10 en animales alimentados con ambos tipos de leche fermentada con contenido normal de hierro ($P < 0.01$) y



aumentó los niveles de esta citocina en los animales alimentados con ambos tipos de leche con sobrecarga de hierro ($P < 0.01$).

La sobrecarga de hierro incrementó las concentraciones plasmáticas de citocinas antiinflamatorias (TABLA VI; FIGURAS XVI-XVIII) en animales alimentados con ambos tipos de leche fermentada ($P < 0.01$ para IL-4 e IL-10; $P < 0.001$ para IL-13). Respecto a la señalización pro-inflamatoria (TABLA V; FIGURAS XI-XV), el consumo de leche fermentada de cabra disminuyó los niveles séricos de citocinas pro-inflamatorias en comparación con la leche fermentada de vaca ($P < 0.01$ para IL-2 y TNF- α con contenido normal o sobrecarga de hierro; $P < 0.05$ para IL-1 β con contenido normal de hierro y $P < 0.01$ para sobrecarga de hierro; $P < 0.05$ para IL-12p70 con contenido normal o sobrecarga de hierro; $P < 0.001$ para IP-10 con contenido normal de hierro y $P < 0.01$ con sobrecarga de hierro).

La anemia incrementó los niveles séricos de IL-1 β en animales que consumía ambos tipos de leche fermentada ($P < 0.05$ para contenido normal de hierro y $P < 0.001$ para sobrecarga de hierro) e incrementó los niveles séricos de IP-10 ($P < 0.01$ para los animales alimentados con dietas basadas en leche fermentada con contenido normal de hierro). Por último, la sobrecarga de hierro incrementó los niveles séricos de IL-1 β ($P < 0.001$) e IP-10 ($P < 0.01$). (TABLA VI; FIGURAS XVI-XVIII).

Una mejor comprensión de la fisiopatología de la anemia ferropénica y la señalización inflamatoria generada durante la repleción crónica con hierro, puede facilitar nuevas estrategias nutricionales para mejorar el estado hematológico y la recuperación de la anemia.

El papel de los productos lácteos en la inflamación es controvertido, con evidencia de efectos positivos y negativos descritos en una revisión reciente que incluye 52 ensayos clínicos. En general, se ha sugerido un efecto protector de los productos lácteos en la inflamación, aunque se observó que las características de los productos lácteos y el estado general de salud influye en esta relación (Bordoni et al., 2017).

En la presente memoria de Tesis, se ha evaluado la inflamación producida, utilizando un modelo experimental de deficiencia de hierro severa y se ha observado que el consumo de leche fermentada de cabra modula esta respuesta sistémica. El punto de partida de este estudio se completó después de un periodo pre-experimental, período durante el cual se logró la deficiencia de hierro, y después se procedió a la repleción en condiciones de sobrecarga de hierro y por tanto, los beneficios que se observan con la leche fermentada de cabra no se limitan a una reducción de la señalización inflamatoria debido a la recuperación de los parámetros hematológicos y del estatus corporal de hierro, sino también a una disminución patente en los niveles de citocinas pro-inflamatorias producidas durante la sobrecarga de hierro, indicando beneficios adicionales de la leche fermentada de cabra durante el curso de la recuperación de la anemia.

El modelo experimental utilizado simula la deficiencia fisiológica de hierro y la reposición de este mineral y, por tanto, tiene como objetivo acercarse a la realidad de cómo la respuesta a la señalización inflamatoria puede ser modulada por componentes de la dieta. Utilizando una selección biomarcadores sensibles y representativos de la señalización pro y anti inflamatoria, se han detectado cambios que afectan a la recuperación de la



ferrodeficiencia. En el presente estudio, la anemia y la sobrecarga de hierro tuvieron una relación estadísticamente significativa con las citocinas pro y antiinflamatorias. Esta observación está en consonancia con el efecto de secuestro de hierro que se produce durante la inflamación (Turnham et al., 2010), por lo tanto consideramos que los biomarcadores de inflamación deben incorporarse a los estudios que evalúan la anemia y el estatus corporal de hierro como indicadores adicionales de la evaluación de esta patología.

La inflamación desempeña un papel crítico en el control del metabolismo del hierro, ya que las citocinas pro-inflamatorias liberadas tras la activación de las células inmunes alteran la homeostasis de las proteínas que regulan el metabolismo del hierro (Ganz and Nemeth, 2005). La capacidad del hierro para alterar el perfil de citocinas hace que los sujetos con sobrecarga de hierro sean más susceptibles a infecciones sistémicas que aquellos con deficiencia de hierro, por lo tanto, la sobrecarga favorece la competencia de los agentes patógenos por el hierro y aumenta la morbilidad y la mortalidad (Drakesmith and Prentice, 2012). Los macrófagos y los linfocitos T captan y acumulan hierro, actuando como un compartimento circulante de almacenamiento de este mineral para proteger diferentes tejidos de la citotoxicidad dependiente de este mineral (Pinto et al., 2014).

Por otro lado, la hepcidina es actualmente uno de los indicadores más precisos del estado del hierro, ya que regula los niveles de hierro y la localización de este elemento en respuesta al estado nutricional (Labadarios et al., 1995). Esta proteína producida por el hígado es la hormona que actúa como principal regulador circulante de la absorción de hierro y distribución tisular (Ganz, 2011). Actúa uniéndose a la ferroportina, único exportador de

hierro celular conocido, lo que lleva a la ubiquitinación, endocitosis y degradación de ferroportina en los lisosomas (Nemeth et al., 2004; Quiao et al., 2012). Bajo la influencia de altas concentraciones de hepcidina, la síntesis y expresión de ferroportina disminuye en las membranas celulares, el hierro se retiene en las células que exportan este mineral al plasma, y el flujo de hierro hacia el plasma disminuye considerablemente, lo que causa o contribuye a la restricción de hierro en una situación de anemia ferropénica. Cuando se reduce la producción de hepcidina, la estabilización de la ferroportina en la membrana celular promueve la absorción de hierro procedente de la dieta en el duodeno, aumenta la liberación de hierro de los macrófagos que reciclan eritrocitos senescentes y otras células, permitiendo la movilización del hierro almacenado de los hepatocitos. Cuando se establece un estado pro-inflamatorio, la síntesis de hepcidina es estimulada por las citocinas pro-inflamatorias, y esta situación es considerada una de las principales estrategias de defensa del hospedador contra infecciones, efecto desencadenado por la limitación de disponibilidad de hierro por parte de los patógenos (Nemeth et al., 2004; Pietrangelo et al., 2007; Nairz et al., 2014).

En el presente estudio, se ha observado una disminución de los niveles séricos de hepcidina en animales que consumen leche de cabra fermentada. En este sentido, nuestro grupo de investigación también ha revelado previamente (Moreno-Fernandez et al., 2016a) una disminución de la expresión duodenal de hepcidina en ratas alimentadas con dieta basada en leche de cabra fermentada, en comparación con los animales alimentados con dieta con leche de vaca fermentada. Esta regulación negativa de la hepcidina enterocítica aumentaría el flujo de salida de hierro de las células duodenales,



ya que la expresión de hepcidina anclada en la membrana del enterocito se correlaciona inversamente con la actividad de la ferroportina y la absorción de hierro. Estos datos indican un menor estado pro-inflamatorio debido a la mejor recuperación hematológica y del estatus de hierro debido al consumo de leche de cabra fermentada, que involucra una adaptación fisiológica específica que maximiza la absorción de hierro de la dieta cuando aumenta la demanda (Moreno-Fernandez et al., 2016a) y mejora el perfil plasmático de biomarcadores inflamatorios durante la recuperación de la anemia.

Es de destacar que la sobrecarga de hierro induce un incremento de las citocinas antiinflamatorias, probablemente a modo de mecanismo compensatorio para hacer frente a las condiciones pro-inflamatorias evocadas por el aumento de IL-1 β y IP-10. Sin embargo, el aumento de las citocinas antiinflamatorias es más significativo y las citocinas pro-inflamatorias aumentan en menor medida con la leche de cabra fermentada. En este sentido, el consumo de leche de cabra fermentada conduce a una reducción en la cantidad de hierro contenido en las células del epitelio intestinal inflamado, lo que lleva a incrementar su biodisponibilidad por los órganos diana mediante el incremento de la expresión de genes y proteínas involucradas en la homeostasis del hierro (Moreno-Fernandez et al., 2016a), reduciendo el efecto pro-inflamatorio causado por la sobrecarga de hierro. Además, el secuestro intracelular de hierro, especialmente durante la sobrecarga, está también estrechamente relacionado con la señalización inflamatoria.

La vitamina A atenúa la señalización inflamatoria e induce una recuperación de las proteínas intracelulares relacionadas con la homeostasis férrica, además de prevenir el secuestro intracelular de hierro por las células

duodenales, aumentando la expresión proteica del transportador de metales divalentes 1 mediante regulación post-transcripcional, incrementando su traducción y disminuyendo la degradación, de manera que afecta positivamente el metabolismo del hierro (Katz et al., 2015). Teniendo en cuenta que la leche fermentada de cabra contiene más vitamina A que la leche de vaca fermentada (Moreno-Fernandez et al., 2016b), podemos afirmar que este mecanismo también contribuye al aumento de la expresión de genes relacionados con el estado del hierro (citocromo duodenal b, ferritina, ferroportina 1 y receptor de transferrina 1), (Moreno-Fernandez et al., 2016a), mejorando la homeostasis del hierro durante la recuperación de la anemia y reduciendo la señalización pro-inflamatoria provocada por sobrecarga de hierro.

Cabe destacar que de la dieta elaborada con leche de cabra fermentada disminuye los niveles de citocinas pro-inflamatorias (IL-1 β , IL-2, IL-12p70, IP-10 y TNF- α) e induce un aumento de los niveles de citocinas antiinflamatorias (IL-4, IL-13 e IL-10) en ratas controles y anémicas. Las mejores características nutricionales de la leche de cabra fermentada, en comparación con la leche de vaca fermentada (Moreno-Fernandez et al., 2016b) juegan un papel crucial en este producto lácteo como alimento de alto valor nutricional, con propiedades antiinflamatorias. Las actividades antiinflamatorias de los lípidos en los productos de leche cabra han sido ampliamente estudiados en derivados lácteos griegos tradicionales (Tsorotioti et al., 2014), y sus fracciones lipídicas mostraron una clara actividad inhibitoria de la agregación plaquetaria inducida por el factor activador de plaquetas. Las fracciones lipídicas más biológicamente activas contenían esfingomiélin, fosfatidilcolina y derivados lipídicos de fosfatidiletanolamina. Sin embargo, estas fracciones lipídicas no



siempre presentan una estructura típica de fosfolípidos, sino que a veces comparten una estructura similar a los derivados de fosfatidilcolina de acuerdo al estudio de Nasopoulou et al. (2014) La fosfatidilcolina tiene varios efectos antiinflamatorios (Erős et al., 2009) Poutzalis et al. (2016) compararon las propiedades inhibitoras de la activación plaquetaria de los derivados lácteos de leche de cabra (leche, yogur y queso), y todas las muestras presentaban factores inhibidores de la agregación plaquetaria. Los datos resultantes indicaron un aumento en la inhibición del factor activador de plaquetas durante la lipólisis (es decir, durante la incubación de leche a yogur y queso). Esta tendencia ha sido atribuida a la fermentación de microorganismos tales como *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophiles*, los microorganismos iniciadores de fermentación tradicionales utilizados en el presente estudio. La leche caprina tiene un mayor valor nutricional que la leche bovina y lípidos bioactivos con propiedades antiinflamatorias (Tsorotioti et al., 2014; Nasopoulou et al., 2014). Finalmente, la leche de cabra fermentada es más rica en ácido linoleico que la leche de vaca fermentada (Moreno-Fernandez et al., 2016b) y este ácido graso tiene efectos moduladores sobre las respuestas pro- y antiinflamatorias.

VI. CONCLUSIONES

CONCLUSIÓN PRIMERA

Tanto la ferropénica como la sobrecarga de hierro influyen en la señalización inflamatoria, aumentando los niveles plasmáticos de las principales citoquinas pro-inflamatorias y reduciendo las anti-inflamatorias, debido al efecto de secuestro de hierro que se produce durante esta señalización. Además, la capacidad del hierro para alterar la secreción de citocinas es más acusada en situación de sobrecarga de hierro, favoreciendo la competencia de los agentes patógenos por este mineral y aumentando la susceptibilidad a infecciones.

CONCLUSIÓN SEGUNDA

La dieta basada en leche fermentada de cabra disminuye los niveles séricos de hepcidina, indicando un menor estado pro-inflamatorio debido a la mejor recuperación hematológica de la anemia y del estatus de hierro, que involucra una adaptación fisiológica específica encaminada a maximizar la absorción de hierro de la dieta cuando aumenta la demanda y mejorar el perfil plasmático de biomarcadores inflamatorios durante la recuperación de la anemia ferropénica.

CONCLUSIÓN TERCERA

La sobrecarga de hierro induce un incremento de la señalización inflamatoria, a modo de mecanismo compensatorio para hacer frente a las condiciones pro-inflamatorias evocadas por el aumento de IL-1 β y IP-10. Sin



embargo, el aumento de las citocinas antiinflamatorias es más significativo y las citocinas pro-inflamatorias aumentan en menor medida con la leche fermentada de cabra, ya que su consumo conduce a una reducción en la cantidad de hierro contenido en las células del epitelio intestinal inflamado, incrementando su biodisponibilidad por los órganos diana y reduciendo el efecto pro-inflamatorio causado por la sobrecarga de hierro.

CONCLUSIÓN CUARTA

La dieta basada en leche fermentada de cabra en ratas controles y anémicas disminuye los niveles plasmáticos de citocinas 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. El perfil lipídico 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 fermentada 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. Además la dieta basada en leche fermentada de cabra previene el 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 provocada por sobrecarga de hierro.

CONCLUSIÓN GENERAL

Tanto la ferropdeficiencia como la sobrecarga de hierro inducen un estado inflamatorio generalizado. La dieta basada en leche fermentada de cabra mejora el estado hematológico y promueve respuestas metabólicas beneficiosas, que atenúan la inflamación sistémica durante la recuperación de la anemia y la sobrecarga hierro. Considerando el papel supresor de la hepcidina y la implicación en la recuperación de la anemia, la leche fermentada de cabra puede ser considerada como un alimento funcional con beneficios en la respuesta inflamatoria sistémica. Estos beneficios no se limitan a una recuperación de los parámetros hematológicos y del estatus corporal de hierro, sino también un ajuste homeostático en la señalización inflamatoria, que representa beneficios adicionales durante el curso de la recuperación de la anemia. La inclusión en la dieta de la leche fermentada de cabra podría ser una estrategia dietética para disminuir la respuesta inflamatoria asociada a los suplementos tradicionales de hierro.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A

- Abubakar A, Saito T, Kitazawa H, Kawai Y, Itoh T. Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion. *J Dairy Sci* 1998;81:3131–8.
- Achón M, Alonso-Apperte E, Reyes L, Úbeda N, Varela-Moreiras G. High-dose folic acid supplementation in rats: effects on gestation and the methionine cycle. *Brit J Nutr* 2000;83:177–83.
- Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 2003;3:745–56.
- Amigo L, Fontecha J. Goat milk. In: J.W. Fuquay, P.F. Fox, & P.L.H. Mcsweney (Eds.). *ENCYCLOPEDIA of DAIRY sciences* (2nd ed.). London, UK: Elsevier 2011; Ltd 3:484-3:493.
- Aisen P. Transferrin, the transferrin receptor, and the uptake of iron by cells. *Met Ions Biol Syst.* 1998; 35:585–631. [PubMed: 9444770].
- Aisen P. Transferrin receptor 1. *Int J Biochem & Cell Biol* 2004;36:2137–43.
- Aisen P, Enns C, Wessling-Resnick M. Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *Int J Biochem Cell B* 2001;33:940–59.
- Alférez MJ, Barrionuevo M, López-Aliaga I, Sanz-Sampelayo MR, Lisbona F, Robles JC, et al. Digestive utilization of goat and cow milk fat in malabsorption syndrome. *J Dairy Res* 2001;68:451–61.
- Amores R, Calvo A, Maestre JR, Martínez-Hernández D. Probióticos. *Rev Esp Quimioter* 2004;17 (2):131-39.
- Anand-Apte B, Bao L, Smith R, Iwata K, Olsen BR, Zetter B, et al. A review of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) and experimental analysis of its effect on primary tumour growth. *Biochem Cell Biol* 1996;74:853–62.
- Anderson P. Clinical Immunology: Principles and Practice. *JAMA* 1996;275(15):1208-9.
- Andrews NC. Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med* 1999;341:1986-95.
- Andrews NC. Iron homeostasis: insights from genetics and animal models. *Nat Rev Genetics* 2000;1:208–17.
- Anker SD, Comin Colet J, Filippatos G, Willenheimer R, Dickstein K, Drexler H, et al. Ferric carboxymaltose in patients with heart failure and iron deficiency. *New Engl J Med* 2009;361:2436-48.



- Ansar W, Ghosh S. C-reactive protein and the biology of disease. *Immunol Res* 2013;56(1):131-42.
- AOAC, Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th ed. Arlington, VA: Association of Official Analytical Chemists; 2005.
- Aranceta J, Serra L, Leche, lácteos y salud. Editorial Panamericana. 2004.
- Arend W. Biological role of interleukin 1 receptor antagonist isoforms. *Ann Rheum Dis*. 2000;59(90001):60i-4.
- Arend W, Palmer G, Gabay C. IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. *Immunol Rev* 2008;223(1):20-38.
- Arosio P, Ingrassia R, Cavadini P. Ferritins: A family of molecules for iron storage, antioxidation and more. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1790:589–99.
- Arosio P, Levi S. Cytosolic and mitochondrial ferritins in the regulation of cellular iron homeostasis and oxidative damage. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1800:783–92.
- Aronow WS, Ahn C. Three-year follow-up shows no association of serum ferritin levels with incidence of new coronary events in 577 persons aged > or = 62 years. *Am J Cardiol* 1996;78:678-9.
- Aslan M, Horoz M, Kocyigit A, Ozgonü I S, Celik H, Celik M, et al. Lymphocyte DNA damage and oxidative stress in patients with iron deficiency anemia. *Mutat Res* 2006;601:144-9.
- Atilla E, Toprak SK, Demirer T. Current Review of Iron Overload and Related Complications in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Turk J Hematol* 2017;34:1-9.

B

- Baggiolini M. Chemokines in pathology and medicine. *J Intern Med* 2001;250(2):91-104.
- Bali PK, Zak O, Aisen P. A new role for the transferrin receptor in the release of iron from transferrin. *Biochem* 1991; 30:324–8.
- Barath P, Fishbein MC, Cao J, Berenson J, Helfant RH, Forrester JS. Detection and localization of TNF in human atheroma. *Am J Cardiol* 1990;65:297–302.

- Baró Rodríguez L, Lara Villoslada F, Corral Román E. Leche y derivados lácteos. In: Gil A, editor. *Tratado de Nutrición*. Tomo II: Composición y calidad nutritiva de los alimentos. 2nd ed. Madrid: Panamericana;2010. p. 17-18.
- Barrionuevo M, Alférez MJM, López Aliaga I, Sanz-Sampelayo MR, Campos MS. Beneficial effect of goat milk on nutritive utilization of iron and copper in malabsorption syndrome. *J Dairy Sci* 2002;85:657-64.
- Barrionuevo M, López Aliaga I, Alférez MJM, Mesa E, Nestares T, Campos MS. Beneficial effect of goat milk on bioavailability of copper, zinc and selenium in rats. *J Physiol Biochem* 2003;59:111-8.
- Barros RK, Cotrim HP, Daltro CH, Oliveira YA. Hyperferritinemia in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Rev Assoc Med Bras* 2017;63:284-9.
- Bartzokis G, Lu PH, Tishler TA, Fong SM, Oluwadara B, Finn JP, et al. Myelin breakdown and iron changes in Huntington's disease: pathogenesis and treatment implications. *Neurochem Res* 2007;32:1655-64.
- Batida S, Vaquero MP, Veldhuizen M, Sánchez-Muniz FJ. Selected trace elements and minerals in cord blood: association with lipid and lipoproteins at birth. *Acta Paediatr* 2000;89:1201-6.
- Bazan J, Bacon K, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, et al. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 1997;385(6617):640-4.
- Bemelman MHA, Van Tits LJH, Buurman WA. Tumor necrosis factor: function, release and clearance. *Crit Rev Immunol* 1996;16:1-11.
- Berger HM, Mimby S, Gutteridge JMC. Ferrous ions detected in iron-overloaded cord blood plasma from preterm and term babies: implications for oxidative stress. *Free Rad Res* 1995;22:555-9.
- Black R, Rauch C, Kozlosky C, Peschon J, Slack J, Wolfson M, et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature* 1997;385(6618):729-33.
- Bogdan A, Miyazawa M, Hashimoto K, Tsuji Y. Regulators of Iron Homeostasis: New Players in Metabolism, Cell Death, and Disease. *Trends Biochem Sci* 2016;41(3):274-86.
- Boraschi D, Lucchesi D, Hainzl S, Leitner M, Maier E, Mangelberger D, et al. IL-37: a new anti-inflammatory cytokine of the IL-1 family. *Eur Cytokine Netw* 2011;22(3):127-47.



- Bordoni A, Danesi F, Dardevet D, Dupont D, Fernandez A, Gille D, et al. Dairy products and inflammation: A review of the clinical evidence. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2015;57(12):2497-525.
- Boraschi D, Lucchesi D, Hainzl S, Leitner M, Maier E, Mangelberger D, et al. IL-37: a new anti-inflammatory cytokine of the IL-1 family. *Eur Cytokine Netw* 2011; 22:127–47.
- Borroni E, Bonecchi R. Shaping the gradient by nonchemotactic chemokine receptors. *Cell Adh Mig* 2009;3(2):146-7.
- Bosch X, Montori E, Guerra-García M, Costa-Rodríguez J, Quintanilla MH, Tolosa- Chapasian PE, et al. Haemoglobin responses to transfusion in severe iron deficiency anaemia: potential impact of gastrointestinal disorders. *Vox Sang* 2017;112:257-67.
- Bosch X, Montori E, Guerra-García M, Costa-Rodríguez J, Quintanilla MH, Tolosa- Chapasian PE, et al. A comprehensive evaluation of the gastrointestinal tract in iron- deficiency anemia with predefined hemoglobin below 9mg/dL: A prospective cohort study. *Digest Liver Dis* 2017;49:417-26.
- Bou-Fakhredin R, Halawi R, Roumi J, Taher A. Insights into the diagnosis and management of iron deficiency in inflammatory bowel disease. *Expert Rev Hematol* 2017;10:801-8.
- Bradley J. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* 2008;214(2):149-60.
- Brasse-Lagnel C, Karim Z, Letteron P, Bekri S, Bado A, Beaumont C. Intestinal DMT1 cotransporter is down-regulated by hepcidin via proteasome internalization and degradation. *Gastroenterol* 2011; 140:1261–71.
- Bridle KR, Frazer DM, Wilkins SJ, Dixon JL, Purdie DM, Crawford DH, et al. Disrupted hepcidin regulation in HFE-associated haemochromatosis and the liver as a regulator of body iron homeostasis. *Lancet*. 2003; 361:669–73.
- Brissot P, Ropert M, Le Lan C, Loréal O. Non-transferrin bound iron: A key role in iron overload and iron toxicity. *Biochim Biophys Acta* 2012;1820(3):403-10.
- Buttarello M. Laboratory diagnosis of anemia: are the old and new red cell parameters useful in classification and treatment, how? *Int J Lab Hematol* 2016;38:123-32.

C

- Camaschella C, Roetto A, Cali A, De Gobbi M, Garozzo G, Carella M, et al. The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. *Nat Genet.* 2000; 25:14–5.
- Campell JR, Marshall RT. The science of providing milk for man: *McGraw-Hill Book Co*, 1975.
- Canales A, Sánchez-Muniz FJ. Paraoxonasa ¿Algo más que un enzima? *Med Clin (Barc)* 2003;12:537-48.
- Cao C, Fleming MD. The placenta: the forgotten essential organ of iron transport. *Nutr Rev* 2016;74:421-31.
- Cappellini MD, Comin-Colet J, de Francisco A, Dignass A, Doehner W, S P Lam C, et al. Iron deficiency across chronic inflammatory conditions: International expert opinion on definition, diagnosis, and management. *Am J Hematol* 2017;92:1068-78.
- Carswell E, Old L, Kassel R, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci* 1975;72(9):3666-70.
- Casanova J, Abel L, Quintana-Murci L. Human TLRs and IL-1Rs in host defense: Natural insights from evolutionary, epidemiological, and clinical genetics. *Annu Rev Immunol* 2011;29(1):447-91.
- Çavuşoğlu Y, Altay H, Çetiner M, Güvenç TS, Temizhan A, Ural D, et al. Iron deficiency and anemia in heart failure. *Turk Kardiyol Dern Ars* 2017;45(Suppl 2):1- 38.
- Ceballos L, Morales E, de la Torre Adarve G, Castro J, Martínez L, Sampelayo M. Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology. *J Food Compos Anal* 2009;22(4):322-9.
- Chan F. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* 2000;288(5475):2351-4.
- Charles River Laboratories. Baseline Hematology and Clinical Chemistry Values for Charles River Wistar Rats (CRL: (WI) BR) as a Function of Sex and Age. Technical Bulletin. 1998.
- Chaston TB, Patak P, Pourvali K, Srail SK, McKie AT, Sharp PA. Hypoxia inhibits hepcidin expression in HuH7 hepatoma cells via decreased SMAD4 signaling. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2011; 300:C888–895.



- Claeys WL, Verraes C, Cardoen S, De Block J, Huyghebaert A, Raes K, et al. Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits. *Food Control* 2014;42:188-201.
- Clark S, García MB. A 100-year review: Advances in goat milk research. *Science* 2017;100(12),10026–44.
- Cleland JG, Zhang J, Pellicori P, Dicken B, Dierckx R, Shoaib A, et al. Prevalence and outcomes of anemia and hematinic deficiencies in patients with chronic heart failure. *J Am Med Assoc Cardiol* 2016;1:539–47.
- Codex Stan. Norma de Codex para leches fermentadas. 243. 2003.
- Coffey R, Ganz T. Iron homeostasis: An anthropocentric perspective. *J Biol Chem* 2017;292:12727-34.
- Collen D, Lijnen HR. The fibrinolytic system in man. *Cri Rev Oncol Hemat* 1986;4:249-301.
- Conde Diez S, de las Cuevas Allende R, Conde García E. Estado actual del metabolismo del hierro: implicaciones clínicas y terapéuticas. *Med Clín* 2017;148(5):218-24.
- Condon R, Mariné A, Rafecas M, Yogur: Elaboración y valor nutritivo. Fundación Española de la Nutrición 1998.
- Conrad M, Umbreit J. Iron absorption and transport- An update. *Am J Hematol* 2000;64:287-98.
- Conrad M, Umbreit J. Pathways of iron absorption. *Blood Cells Mol Dis* 2002;29:336-55.
- Constantin G, Majeed M, Giagulli C, Piccio L, Kim J, Butcher E, Laudanna C. Chemokines trigger immediate β 2 integrin affinity and mobility changes. *Immunity* 2000;13(6):759-69.
- Corradini E, Rozier M, Meynard D, Odhiambo A, Lin HY, Feng Q, et al. Iron regulation of hepcidin despite attenuated Smad1,5,8 signaling in mice without transferrin receptor 2 or Hfe. *Gastroenterol* 2011; 141:1907–14.
- Courselaud B, Pigeon C, Inoue Y, Inoue J, Gonzalez FJ, Leroyer P, et al. C/EBPalpha regulates hepatic transcription of hepcidin, an antimicrobial peptide and regulator of iron metabolism. Cross-talk between C/EBP pathway and iron metabolism. *J Biol Chem* 2002; 277:41163–70.
- Cozzi A, Corsi B, Levi S, Santambrogio P, Biasiotto G, Arosio P. Analysis of the biologic functions of H-and L-ferritins in HeLa cells by transfection with siRNAs and cDNAs: evidence of proliferative role of L-ferritin. *Blood* 2004; 103:2377–83.

- Crichton R. Iron metabolism and oxygen toxicity. *Bioelectrochem Bioenerg* 1987;18(1-3):105-16.
- Crichton RR, Wilmet S, Legssyer R, Ward RJ. Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. *J Inorg Biochem* 2002;91:9-18.

D

- Daddaoua A, Puerta V, Requena P, Martinez-Ferez A, Guadix E, Sanchez De Medina F, et al. Goat milk oligosaccharides are anti-inflammatory in rats with hapten-induced colitis. *J Nutr* 2006;136:672-76.
- Darshan D, Anderson GJ. Liver-gut axis in the regulation of iron homeostasis. *World J Gastroentero* 2007;13:4737-45.
- Das S, Rajagopalan L, Guerrero-Plata A, Sai J, Richmond A, Garofalo R, Rajagopalan K. Monomeric and dimeric CXCL8 are both essential for in vivo neutrophil recruitment. *PLoS ONE*. 2010;5(7):e11754.
- Dautry-Varsat A, Ciechanover A, Lodish HF. pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1983; 80:2258–62.
- Davies MJ, Gordon JL, Gearing AJ, Pigott R, Woolf N, Katz D, et al. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J Pathol* 1993;171:223-9.
- De Domenico I, Nemeth E, Nelson JM, Phillips JD, Ajioka RS, Kay MS, et al. The hepcidin-binding site on ferroportin is evolutionarily conserved. *Cell Metab* 2008;8:146-56.
- De Domenico I, Vaughn MB, Li L, Bagley D, Musci G, Ward DM, et al. Ferroportin-mediated mobilization of ferritin iron precedes ferritin degradation by the proteasome. *EMBO J* 2006; 25:5396–404.
- De Domenico I, Ward DM, Kaplan J. Regulation of iron acquisition and storage. Consequences for iron-linked disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008; 9:72–81.
- De Domenico I, Ward DM, Langelier C, Vaughn MB, Nemeth E, Sundquist WI, et al. The molecular mechanism of hepcidin-mediated ferroportin down-regulation. *Mol Biol Cell* 2007; 18:2569–78.
- De Domenico I, Ward DM, Kaplan J. Specific iron chelators determine the route of ferritin degradation. *Blood* 2009; 114:4546–51.



- De Domenico I, Ward DM, Nemeth E, Vaughn MB, Musci G, Ganz T, et al. The molecular basis of ferroportin-linked hemochromatosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102:8955–60.
- Dev S, Babitt JL. Overview of iron metabolism in health and disease. *Hemodial Int* 2017;21:6-20.
- Devireddy LR, Gazin C, Zhu X, Green MR. A cell surface receptor for lipocalin 24p3 selectively mediates apoptosis and iron uptake. *Cell* 2005;123:1293–1305.
- Díaz-Castro J, Alférez MJ, López-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* 2008;24:1167-73.
- Díaz-Castro J, Alférez MJM, López-Aliaga I, Nestares T, Sánchez-Alcover A, Campos MS. Bile composition, plasma lipids and oxidative hepatic damage induced by calcium supplementation; effects of goat or cow milk consumption. *J Dairy Res* 2013;80:246-54.
- Diaz-Castro J, Moreno-Fernandez J, Pulido-Moran M, Alférez MJM, Robles-Rebollo M, Ochoa JJ, et al. Changes in adiposity and body composition during anemia recovery with goat or cow fermented milks. *J Agr Food Chem* 2017;65:4057-65.
- Díaz-Castro J, Pulido M, Alférez MJ, Ochoa JJ, Rivas E, Hijano S, et al. 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;97:147-54.
- Dinarello C. Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. *Ann Rev Immunol* 2009;27(1):519-50.
- Domagala J, Wszolek M, Dudzinska A. The influence of the fortification method and starter culture type on the texture and microstructure of probiotic yoghurts prepared from goat's milk. *Milchwissenschaft* 2012;67:172-6.
- Domagala J, Wszolek M. Effect of concentration method and starter culture type on the texture and susceptibility to syneresis of yoghurt and bio-yoghurts made of goat's milk. *Zywnosc. Nauka. Technologia. Jakosc/Food. Science Technology. Quality* 2008;15:118-28.
- Donath M, Böni-Schnetzler M, Ellingsgaard H, Halban P, Ehses J. Cytokine production by islets in health and diabetes: cellular origin, regulation and function. *Trends Endocrin Met* 2010;21(5):261-67.

- Donato H, Crisp RL, Rapetti MC, García E, Attie M. Esferosis hereditaria. Revisión. Parte II. Manifestaciones clínicas, evolución, complicaciones y tratamiento. *Arch Argent Pediatr* 2015;113:168-76.
- Drakesmith H., Prentice A. M. Heparin and the iron-infection axis. *Science*, 2012; 338:768-72.
- Dunn LL, Suryo Rahmanto Y, Richardson DR. Iron uptake and metabolism in the new millennium. *Trends Cell Biol* 2007;17:93-100.

E

- Edison ES, Bajel A, Chandy M. Iron homeostasis: new players, newer insights. *Eur J Haematol* 2008;81:411-24.
- Edwards DR, Beaudry PP, Laing TD, Kowal V, Leco KJ, Leco PA, et al. The roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in tissue remodelling and cell growth. *Int J Obesity* 1996;20:9–15.
- EFSA Panel on dietetic products, nutrition and allergies. Scientific opinion on dietary reference values for iron. *EFSA J* 2015;13:4254.
- Efthymakis K, Milano A, Laterza F, Serio M, Neri M. Iron deficiency anemia despite effective gluten-free diet in celiac disease: Diagnostic role of small bowel capsule endoscopy. *Digest Liver Dis* 2017;49:412-6.
- Eguchi K, Manabe I. Macrophages and islet inflammation in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 2013;15(s3):152-8.
- Elzinga B, Twomey C, Powell J, Harte F, McCarthy J. Interleukin-1 receptor type 1 is a substrate for γ -secretase-dependent regulated intramembrane proteolysis. *J Biol Chem* 2008;284(3):1394-409.
- Enjuanes C, Bruguera J, Grau M, Cladellas M, Gonzalez G, Meroño O, et al. Iron status in chronic heart failure: impact on symptoms, functional class and submaximal exercise capacity. *Rev Esp Cardiol* 2016;69:247-55.
- Epsztein S, Glickstein H, Picard V, Slotki IN, Breuer W, Beaumont C, et al. H-ferritin subunit overexpression in erythroid cells reduces the oxidative stress response and induces multidrug resistance properties. *Blood* 1999; 94:3593–603.
- Erős G, Ibrahim S, Siebert N, Boros M, Vollmar B. Oral phosphatidylcholine pretreatment alleviates the signs of experimental rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2009; 11:R43.



- Eros G, Varga G, Váradi R, Czóbel M, Kaszaki J, Ghyczy M, et al. Anti-inflammatory action of a phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and N-acylphosphatidylethanolamine-enriched diet in carrageenan-induced pleurisy. *Eur Surg Res* 2009;42:40-8.
- Espejo-Carpio FJ, De Gobba C, Guadix A, Guadix EM, Jeanette Otte. Angiotensin I- converting enzyme inhibitory activity of enzymatic hydrolysates of goat milk protein fractions. *Int Dairy J* 2013;32:175-83.
- Evstatiev R. Iron deficiency, thrombocytosis and thromboembolism. *Wien Med Wochenschr* 2016;166:437-46.

F

- Fairbanks V, Beutler E. Iron deficiency. In: Beutler E, editores. Williams hematology. *New York: McGrawHill*;2001. p. 295–304, 447–50.
- Fanchini M, Targher G, Montagnana M, Lippi G. Iron and thrombosis. *Ann Hematol* 2008;87:167-73.
- Farran A, Zamora R, Cervera P. Tablas de composición de los alimentos del CESNID (Centro d'Ensenyament Superior de Nutritió i Dietètica). 2 ed. Madrid: McGraw Hill Interamericana; 2004.
- Faruqi A, Ahmad SI, Ahmed ST. Evaluation of QT parameters in patients of thalassaemia major with iron overload. *J Pak Med Assoc* 2016;66:799-802.
- Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect* 2003;5(14):1317-27.
- Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, et al. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet* 1996; 13:399–408.
- Feldmann M, Maini R. Anti-TNF therapy, from rationale to standard of care: what lessons has it taught us?. *J Immunol* 2010;185(2):791-4.
- Fiel MI, Schiano T. A woman with chronic anemia and cholestatic liver disease. *Hepatology* 2009;49:1390-1.
- Filippatos G, Farmakis D, Colet JC, Dickstein K, Lüscher TF, Willenheimer R, et al. Intravenous ferric carboxymaltose in iron-deficient chronic heart failure patients with and without anaemia: a subanalysis of the FAIR-HF trial. *Eur J Heart Fail* 2013;15:1267-76.

- Finberg KE, Heeney MM, Campagna DR, Aydinok Y, Pearson HA, Hartman KR, et al. Mutations in Tmprss6 cause iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA). *Nat Genet* 2008; 40:569–71.
- Finkelstein JL, Haas JD, Mehta S. Iron-biofortified staple food crops for improving iron status: a review of the current evidence. *Curr Opin Biotech* 2017;44:138-45.
- Fiske, CH, Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* 1925; 66:375–400.
- FitzGerald RJ, Meisel H. Milk protein hydrolysates and bioactive peptides. In: Fox PF, McSweeney PLH, editores. *Advanced Dairy Chemistry*. 3rd ed, Part B. New York/Boston/Dordrecht/London/Moscow: Kluwer Academic/Plenum;2003. p. 675– 98.
- FitzGerald RJ, Meisel H. Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I- converting enzyme. *Brit J Nutr* 2000;84:33–7.
- FitzGerald RJ, Murray BA, Walsh DJ. Hypotensive peptides from milk proteins. *J Nutr* 2004;134:980-8.
- Fleming MD, Tremor CC, Su MA, Foernzler D, Beier DR, Dietrich WF, Andrews NC. Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. *Nat Genet* 1997; 16:383–6.
- Flier J, Boorsma D, van Beek P, Nieboer C, Stoof T, Willemze R, et al. Differential expression of CXCR3 targeting chemokines CXCL10, CXCL9, and CXCL11 in different types of skin inflammation. *J Pathol* 2001;194(4):398-405.
- Friedman A, Galazka-Friedman J, Bauminger ER, Kozirowski D. Iron and ferritin in hippocampal cortex and substantia nigra in human brain—implications for the possible role of iron in dementia. *J Neurol Sci* 2006;248:31-4.
- Friedmann E, Hauben E, Maylandt K, Schlegler S, Vreugde S, Lichtenthaler S, et al. SPPL2a and SPPL2b promote intramembrane proteolysis of TNF α in activated dendritic cells to trigger IL-12 production. *Nature Cell Biology* 2006;8(8):843-8.

G

- Gabay C, Lamacchia C, Palmer G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nat Rev Rheumatol* 2010;6(4):232-41.
- Ganz T. Cellular iron: ferroportin is the only way out. *Cell Metab* 2005;1:155–7.



- Ganz T. Heparin and iron regulation, 10 years later. *Blood* 2011; 117:4425–33.
- Ganz T. Molecular control of iron transport. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:394-400.
- Ganz T, Nemeth E. Heparin and disorders of iron metabolism. *Annu Rev Med* 2011; 62:347–60.
- Ganz T, Nemeth E. Heparin and iron homeostasis. *Biochim Biophys Acta* 2012;1823:1434–43.
- Ganzand T, Nemeth E. Iron homeostasis in host defence and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2015; 5:500–10.
- Garrido Durán C, Iyo Miyashiro E, Páez Cumpa C, Khorrami Minaei S, Erimeiku Barahona A, Llompert Rigo A. Diagnostic yield of video capsule endoscopy in premenopausal women with iron-deficiency anemia. *Gastroenterol Hepatol* 2015;38:373-8.
- Gaudie J, Richards C, Northemann W, Fey G, Baumann H. IFN β 2/BSF2/IL-6 is the monocyte-derived HSF that regulates receptor-specific acute phase gene regulation in hepatocytes. *Ann N Y Acad Sci* 2008;557(1):46-59.
- Gehrke SG, Kulaksiz H, Herrmann T, Riedel HD, Bents K, Veltkamp C, et al. Expression of heparin in hereditary hemochromatosis: evidence for a regulation in response to serum transferrin saturation and non-transferrin-bound iron. *Blood* 2003; 102:371–6.
- Giorgio D, Di Trana A, Claps S. Oligosaccharides, polyamines and sphingolipids in ruminant milk. *Small Rumin Res* 2018; 160, 23–30.
- Girelli D, Nemeth E, Swinkels DW. Heparin in the diagnosis of iron disorders. *Blood* 2016;127:2809-13.
- Girelli D, Trombini P, Busti F, Campostrini N, Sandri M, Pelucchi S, et al. A time course of heparin response to iron challenge in patients with HFE and TFR2 hemochromatosis. *Haematologica* 2011; 96:500–6.
- Givens I. Animal nutrition and lipids in animal products and their contribution to human intake and health. *Nutrients* 2009;1:71–82.
- Gkamprela E, Deutsch M, Pectasides D. Iron deficiency anemia in chronic liver disease: etiopathogenesis, diagnosis and treatment. *Ann Gastroenterol* 2017;30:405- 13.
- Gkouvatsos K, Papanikolaou G, Pantopoulos K. Regulation of iron transport and the role of transferrin. *Biochim Biophys Acta* 2012;1820(3):188-202.

- Glickstein H, Ben El R, Shvartsman M, Cabantchik ZI. Intracellular labile iron pool as direct targets of iron chelators: a fluorescence study of chelator action in living cells. *Blood* 2005; 106:3242–50.
- Goddard AF, James MW, McIntyre AS, Scott BB. British Society of Gastroenterology. Guidelines for the management of iron deficiency anaemia. *Gut* 2011;60:1309–16.
- Goette N, Lev P, Heller P, Glembotsky A, Chazarreta C, Salim J, et al. Abnormal regulation of soluble and anchored IL-6 receptor in monocytes from patients with essential thrombocythemia. *Exp Hematol* 2010;38(10):868-876.e1.
- González-Martínez BE, Gómez–Trevino M. Probióticos. *Respyn Revista Salud Pública y Nutrición* 2001; **2(3)**:
- González de Villambrosia S, Núñez J, González Mesones B, Insunza A. Trastornos del metabolismo del hierro y anemia ferropénica. *Medicine* 2012;11:1202–11.
- Graf D, Haselow K, Münks I, Bode J, Häussinger D. Caspase-mediated cleavage of the signal-transducing IL-6 receptor subunit gp130. *Arch Biochem Biophys* 2008;477(2):330-8.
- Grell M, Douni E, Wajant H, Löhden M, Clauss M, Maxeiner B, et al. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 1995;83(5):793-802.
- Groom J, Richmond J, Murooka T, Sorensen E, Sung J, Bankert K, et al. CXCR3 chemokine receptor-ligand interactions in the lymph node optimize CD4+ T helper 1 cell differentiation. *Immunity* 2012;37(6):1091-103.
- Guedez L, Lim MS, Stetler-Stevenson WG. The role of metalloproteinases and their inhibitors in hematological disorders. *Crit Rev Oncogenesis* 1996;7:205–25.
- Gunshin H, Fujiwara Y, Custodio AO, Drenzo C, Robine S, Andrews NC. Slx11a2 is required for intestinal iron absorption and erythropoiesis but dispensable in placenta and liver. *J Clin Invest* 2005; 115:1258–66.
- Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, et al. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 1997;388:482–88.
- Gupta S. Tumor necrosis factor- α -induced apoptosis in T cells from aged humans: a role of TNFR-I and downstream signaling molecules. *Exper Gerontol* 2002;37(2-3):293-9.



- Guo XK, Zhao WO, Kondo C, Shimojo N, Yamashita K, Aoki T, et al. Tissue inhibitors of metalloproteinases-1 (TIMP-1) and -2(TIMP-2) are major serum factors that stimulate the TIMP-1 gene in human gingival fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 2006;1763:296-304.
- Guyton AC, Hall JE. Textbook of Medical Physiology. 11^a edición: Saunders, 2006.

H

- Haenlein G. Goat milk in human nutrition. *Small Rumin Res* 2004;51(2):155-63.
- Haenlein GFW. Role of goat meat and milk in human nutrition. In: Proceedings of the Fifth International Conference on Goats, 2–8 March 1992. Vol. II, Pt. II. New Delhi: Indian Council of Agricultural Research Publishers; 1992. p. 575–80.
- Hale KK, Smith CG, Baker SL. Multifunctional regulation of the biological effects of TNF- α by the soluble type I and type II TNF receptors. *Cytokine* 1995;7:26–38.
- Hall D, Beresford I, Browning C, Giles H. Signalling by CXC-chemokine receptors 1 and 2 expressed in CHO cells: a comparison of calcium mobilization, inhibition of adenylyl cyclase and stimulation of GTP γ S binding induced by IL-8 and GRO α . *Br J Pharmacol* 1999;126(3):810-8.
- Hashimoto G, Aoki T, Nakamura H, Tanzawa K, Okada Y. Inhibition of ADAMTS4 (aggrecanase-1) by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1, 2, 3, and 4). *FEBS Lett* 2001;494:192–5.
- Hassan GS, Williams TM, Frank PG, Lisanti MP. Caveolin-1-deficient aortic smooth muscle cells show cell autonomous abnormalities in proliferation, migration, and endothelin-based signal transduction. *Am J Physiol-Heart C* 2006;290:2393-401.
- Hata Y, Yamamoto M, Ohni M, Nakajima K, Nakamura Y, Takano T. A placebo- controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects. *Am J Clin Nutr* 1996;64:767–71.
- Hayakawa T. Multiple functions of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): a new aspect involving osteoclastic bone resorption. *J Bone Miner Metab* 2002;20:1–13.
- Hehlgans T, Männel D. The TNFTNF receptor system. *Biol Chem* 2002;383(10):1581-5.

- Heidemann J, Ogawa H, Dwinell M, Rafiee P, Maaser C, Gockel H, et al. Angiogenic effects of interleukin 8 (CXCL8) in human intestinal microvascular endothelial cells are mediated by CXCR2. *J Biol Chem* 2002;278(10):8508-15.
- Henriksen LF, Petri AS, Hasselbalch HC, Kanters JK, Ellervik C. Increased iron stores prolong the QT interval - a general population study including 20 261 individuals and meta-analysis of thalassaemia major. *Brit J Haematol* 2016;174:776- 85.
- Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell* 2010;142:24-38.
- Hernández LB, Recio I, Ramos M, Amigo L. Preparation of ovine and caprine β - lactoglobulin hydrolysates with ACE-inhibitory activity. Identification of active peptides from caprine β -lactoglobulin hydrolysed with thermolysin. *Int Dairy J* 2002;12:805–12.
- Hernández-Galán L, Cardador-Martínez A, López-del-Castillo M, Picque D, Spinnler H, Martín del Campo S. Antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in fresh goat cheese prepared without starter culture: a preliminary study. *CyTA Journal of Food* 2017;15(1):49-57.
- Hernández-Monzón A, Torres-Herrera A, Duarte-Garcia C, Rodríguez Villacis D. Desarrollo de una leche fermentada de cabra con cultivos probióticos. *Tecnología Química* 2016;36:267-80.
- Hider RC, Kong X. Chemistry and biology of siderophores. *Nat Prod Rep* 2010;27:637-57.
- Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T, et al. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 1986;324(6092):73-6.
- Hua NW, Stoohs RA, Facchini FS. Low iron status and enhanced insulin sensitivity in lacto-ovo vegetarians. *Br J Nutr* 2001;86:515-9.
- Huang FW, Pinkus JL, Pinkus GS, Fleming MD, Andrews NC. A mouse model of juvenile hemochromatosis. *J Clin Invest* 2005; 115:2187–91.
- Huang W, Davidge S, Wu J. Bioactive natural constituents from food sources—potential use in hypertension prevention and treatment. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2013;53(6):615-30.
- Huang YH, Kuo HC, Huang FC, Yu HR, Hsieh KS, Yang YL, et al. Hepcidin-induced iron deficiency is related to transient anemia and hypoferremia in kawasaki disease patients. *Int J Mol Sci* 2016;17(5):715.



- Huang YH, Kuo HC. Anemia in Kawasaki disease: Hepcidin as a potential biomarker. *Int J Mol Sci* 2017;18:820.
- Hug BL, Tichelli A, Benkert P, Stirnimann G, Schifferli JA. Diagnosis and treatment of iron deficiency in medical inpatients at a Swiss tertiary university referral hospital: a retrospective observational cohort study of clinical practice. *Swiss Med Wkly* 2013;143:13847.
- Huppertz T, Kelly A. Properties and constituents of cow's milk. In: Tamime AY Editor. Milk processing and quality management. New York: Blackwell Publishing Ltd; 2009, p 23-47.

I

- Illing AC, Shawki A, Cunningham CL, Mackenzie B. Substrate profile and metal-ion selectivity of human divalent metal-ion transporter-1. *J Biol Chem* 2012;287:30485- 96.
- Immenschuh S, Vijayan V, Janciauskiene S, Gueler F. Heme as a target for therapeutic interventions. *Front Pharmacol* 2017;8:146.
- Ischiropoulos H, Beckman JS. Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association? *J Clin Invest* 2003;111:163-9.
- Isik N, Hereld D, Jin T. Fluorescence resonance energy transfer imaging reveals that chemokine-binding modulates heterodimers of CXCR4 and CCR5 receptors. *PLoS ONE*. 2008;3(10):e3424.
- Isler M, Delibas N, Guclu M, Gultekin F, Sutcu R, Bahceci M, et al. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase in erythrocytes of patients with iron deficiency anemia: effects of different treatment modalities. *Croat Med J* 2002;43:16-9.
- ISO-IDF. 2002. Milk fat-preparation of fatty acid methyl esters. International Standard ISO 15884-IDF 182, 2002.

J

- Jacobs, DeMott. Laboratory Handbook (5th ed.). Cleveland: Lexi-Comp, 2001. p. 435.
- Jandal JM, Comparative aspects of goat and sheep milk. *Small Rumin Res* 1996;22:177-85.

- Jankowska EA, Kasztura M, Sokolski M, Bronisz M, Nawrocka S, Oleśkowska-Florek W, et al. Iron deficiency defined as depleted iron stores accompanied by unmet cellular iron requirements identifies patients at the highest risk of death after an episode of acute heart failure. *Eur Heart J* 2014;35:2468–76.
- Jankowska EA, Ponikowski P. Molecular changes in myocardium in the course of anemia or iron deficiency. *Heart Fail Clin* 2010;6:295-304.
- Jankowska EA, Rozentryt P, Witkowska A, Nowak J, Hartmann O, Ponikowska B, et al. Iron deficiency predicts impaired exercise capacity in patients with systolic chronic heart failure. *J Card Fail* 2011;17:899-906.
- Jauhainen T, Rönback M, Vapaatalo H, Wuolle K, Kautiainen H, Groop PH, et al. Long-term intervention with *Lactobacillus helveticus* fermented milk reduces augmentation index in hypertensive subjects. *Eur J Clin Nutr* 2010;64:424-31.
- Jay J, Loessner M, Golden D, Ordóñez Pereda J, Asensio Pérez M, García de Fernando Minguillón G. Microbiología moderna de los alimentos. Zaragoza: Acribia; 2009.
- Jiang R, Manson JE, Meigs JB, Ma J, Rifai N, Hu FB. Body iron stores in relation to risk of type 2 diabetes in apparently healthy women. *J Am Med Assoc* 2004;291:711–7.
- Jiang Y. Prevention of Constitutive TNF Receptor Signaling by Silencer of Death Domains. *Science* 1999;283(5401):543-46.
- Johnson MB, Enns CA. Differic transferrin regulates transferrin receptor 2 protein stability. *Blood* 2004; 104:4287–93.
- Jostock T, Müllberg J, Özbek S, Atreya R, Blinn G, Voltz N, et al. Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses. *Eur J Biochem* 2001;268(1):160-7.
- Juárez M. Leche y derivados lácteos. Tratado de nutrición. Madrid: Díaz de Santos; 1999. p 377- 387.
- Jucker M, Abts H, Li W, Schindler R, Merz H, Gunther A, et al. Expression of interleukin-6 and interleukin-6 receptor in Hodgkin's disease. *Blood* 1991;77(11):2413-8.

K

- Kadla SA, Shah NA, Bindroo MA, Khan BA, Farooq A, Yousf W, et al. Evaluation of iron deficiency anaemia for gastrointestinal causes in patients



without GI symptoms in high prevalent GI malignancy zones. *Arab J Gastroenterol* 2016;17:67- 72.

- Kaminsky BM, Pogue KT, Hanigan S, Koelling TM, Dorsch MP. Effects of total dose infusion of iron intravenously in patients with acute heart failure and anemia (Hemoglobin < 13 g/dl). *Am J Cardiol* 2016;117:1942-6.
- Kaptoge S, Di Angelantonio E, Pennells L. C-reactive protein, fibrinogen, and cardiovascular disease prediction. *N Engl J Med* 2012; 367:1310-20.
- Kasner M, Aleksandrov AS, Westermann D, Lassner D, Gross M, von Haehling S, et al. Functional iron deficiency and diastolic function in heart failure with preserved ejection fraction. *Int J Cardiol* 2013;168:4652-7.
- Kattamis A, Papassotiriou I, Palaiologou D, Apostolakou F, Galani A, Ladis V, et al. The effects of erythropoietic activity and iron burden on hepcidin expression in patients with thalassemia major. *Haematologica* 2006; 91:809–12.
- Katz O, Reifen R, Lerner A. β -Carotene can reverse dysregulation of iron protein in an in vitro model of inflammation. *Immunol Res* 2015; 61:70–8.
- Kawabata H, Fleming RE, Gui D, Moon SY, Saitoh T, O’Kelly J, et al. Expression of hepcidin is down regulated in TfR2 mutant mice manifesting a phenotype of hereditary hemochromatosis. *Blood* 2005; 105:376–81.
- Kawabata H, Yang R, Hiramata T, Vuong PT, Kawano S, Gombart AF, et al. Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family. *J Biol Chem* 1999; 274:20826–32.
- Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 2011;34(5):637-50.
- Kautz-Neu K, Kostka S, Dinges S, Iwakura Y, Udey M, von Stebut E. A role for leukocyte-derived IL-1RA in DC homeostasis revealed by increased susceptibility of IL-1RA-deficient mice to cutaneous leishmaniasis. *J Invest Dermatol* 2011;131(8):1650-9.
- Kehagias C, Csapo J, Konteles S, Kolokitha E, Koulouris S, Csapo-Kiss ZS. Support of growth and formation of D-amino acids by *Bifidobacterium longum* in cow’s, ewe’s, goat’s milk and modified whey powder products. *Int Dairy J* 2008;18:396-402.
- Kelner G, Kennedy J, Bacon K, Kleyensteuber S, Largaespada D, Jenkins N, et al. Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* 1994;266(5189):1395-9.

- Khamseekaew J, Kumfu S, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. Effects of iron overload on cardiac calcium regulation: translational insights into mechanisms and management of a global epidemic. *Can J Cardiol* 2016;32:1009-16.
- Kiechl S, Aichner F, Gerstenbrand F, Egger G, Mair A, Rungger G, et al. Body iron stores and presence of carotid atherosclerosis: results from the Bruneck Study. *Arterioscler Thromb* 1994;14:1625-30.
- Kim KO. Management of anemia in patients with inflammatory bowel disease. *Korean J Gastroenterol* 2015;65:145-50.
- Kishimoto T. IL-6: from its discovery to clinical applications. *Int Immunol* 2010;22(5):347-352.
- Klip IT, Comin-Colet J, Voors AA, Ponikowski P, Enjuanes C, Banasiak W, et al. Iron deficiency in chronic heart failure: an international pooled analysis. *Am Heart J* 2013;165:575-82.
- Knutson M, Wessling-Resnick M. Iron metabolism in the reticuloendothelial system. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2003;38:61-88.
- Koj A. Initiation of acute phase response and synthesis of cytokines. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1317:84-94.
- Kongo JM, Gomes AM, Malcata FX. Manufacturing of fermented goat milk with a mixed starter culture of *Bifidobacterium animalis* and *Lactobacillus acidophilus* in a controlled bioreactor. *Lett Appl Microbiol* 2006;42:595-9.
- Kovac S, Anderson GJ, Baldwin GS. Gastrins, iron homeostasis and colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1813:889–95.
- Kozirowski D, Friedman A, Arosio P, Santambrogio P, Dziewulska D. ELISA reveals a difference in the structure of substantia nigra ferritin in Parkinson's disease and incidental Lewy body compared to control. *Parkinsonism Relat D* 2007;13:214- 8.
- Kraml P. The role of iron in the pathogenesis of atherosclerosis. *Physiol Res* 2017;66(1):55-67.
- Krause A, Neitz S, Magert HJ, Schulz A, Forssmann WG, Schulz-Knappe P, et al. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett* 2000;480:147–50.
- Kryczek I, Wei S, Keller E, Liu R, Zou W. Stroma-derived factor (SDF-1/CXCL12) and human tumor pathogenesis. *Am J Physiol-Cell Physiol* 2007;292(3):C987-C95.



- Kruszewski M. Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. *Mutat Res* 2003;531:81-92.
- Kunz C, Rudloff S, Baier W, Klein N, Strobel S. Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. *Annu Rev Nutr* 2000;20:699-722.

L

- Labadarios D, VanMiddelkoop A, Coutosoudis A, Eggers T, Hussey G, Ijsselmuiden C, et al. in The South African Vitamin A Consultative Group (SAVACG), ed. D. Labadarios and A. V. Middelkoop, 1995.
- Lambe T, Simpson RJ, Dawson S, Bouriez-Jones T, Crockford TL, Lepherd M, et al. Identification of Steap3 endosomal targeting motif essential for normal iron metabolism. *Blood* 2009; 113:1805–8.
- Lara-Villoslada F, Debras E, Nieto A, Concha A, Galvez J, Lopez-Huertas E, et al. Oligosaccharides isolated from goat milk reduce intestinal inflammation in a rat model of dextran sodium sulfate-induced colitis. *Clin Nutr* 2006;25:477-88.
- Larrick J, Hyman E. Acquired iron-deficiency anemia caused by an antibody against the transferrin receptor. *N Engl J Med* 1984; 311:214–8.
- Laveti D, Kumar M, Hemalatha R, Sistla R, Naidu V, Talla V, et al. Anti-Inflammatory treatments for chronic diseases: A review. *Inflammation & Allergy-Drug Targets* 2013;12(5):349-61.
- Lee M. Cytokine synergism in apoptosis: Its role in diabetes and cancer. *BMB Reports* 2002;35(1):54-60.
- Lee W, Wang C, Lin T, Hsiao C, Luo C. CXCL17, an orphan chemokine, acts as a novel angiogenic and anti-inflammatory factor. *Am J Physiol Endocrinol Metabol* 2013;304(1):E32-E40.
- Lehninger A, Nelson D, Cox M. Principios de Bioquímica. 3ª Edición. Omega, 2001.
- Levy JE, Jin O, Fujiwara Y, Kuo F, Andrews NC. Transferrin receptor is essential for development of erythrocytes and the nervous system. *Nat Genet* 1999; 21:396–9.
- Li SJ, Hwang YY, Ha SY, Chan GC, Mok AS, Wong SJ, et al. Role of three-dimensional speckle tracking echocardiography in the quantification of myocardial iron overload in patients with beta-thalassemia major. *Echocardiography* 2016;33:1361-7.

- Liu Q, Sun L, Tan Y, Wang G, Lin X, Cai L. Role of iron deficiency and overload in the pathogenesis of diabetes and diabetic complications. *Curr Med Chem* 2009;16:113-29.
- Liu T, Young PR, McDonnell PC, White RF, Barone FC, Feuerstein GZ. Cytokine- induced neutrophil chemoattractant mRNA expressed in cerebral ischemia. *Neurosci Lett* 1993;164:125-8.
- Lobito A, Gabriel T, Medema J, Kimberley F. Disease causing mutations in the TNF and TNFR superfamilies: Focus on molecular mechanisms driving disease. *Trends Mol Med* 2011;17(9):494-505.
- Locksley R, Killeen N, Lenardo M. The TNF and TNF receptor superfamilies. *Cell* 2001;104(4):487-501.
- Loeffler RB, McCarville MB, Wagstaff AW, Smeltzer MP, Krafft AJ, Song R, et al. Can multi-slice or navigator-gated R2* MRI replace single-slice breath-hold acquisition for hepatic iron quantification? *Pediatr Radiol* 2017;47:46-54.
- Loetscher P, Seitz M, Lewis I, Baggiolini M, Moser B. Monocyte chemotactic proteins MCP-1, MCP-2, and MCP-3 are major attractants for human CD4 + and CD8 + T lymphocytes. *FASEB J* 1994;8(13):1055-60.
- López Aliaga I, Alférez MJM, Nestares MT, Ros PB, Barrionuevo M, Campos MS. Goat milk feeding causes an increase in biliary secretion of cholesterol and a decrease in plasma cholesterol levels in rats. *J Dairy Sci* 2005;88:1024-30.
- López-Aliaga I, Díaz-Castro J, Alférez M, Barrionuevo M, Campos M. A review of the nutritional and health aspects of goat milk in cases of intestinal resection. *Dairy Sci Technol* 2010;90(6):611-22.
- Lynch SR. Iron. In: Sadler MJ, Strain JJ, Caballero B, eds. *Encyclopedia of Human Nutrition*. Londres: Academic Press, 1998. vol. 2, p. 1153-9.

M

- Macdougall IC, Bircher AJ, Eckardt KU, Obrador GT, Pollock CA, Stenvinkel P, et al. Iron management in chronic kidney disease: conclusions from a "Kidney Disease: Improving Global Outcomes" (KDIGO) Controversies Conference. *Kidney Int* 2016;89:28-39.
- MacEwan D. TNF receptor subtype signalling: Differences and cellular consequences. *Cell Signal* 2002;14(6):477-92.



- Madu AJ, Ughasoro MD. Anaemia of chronic disease: An in-depth review. *Med Prin Pract* 2017;26:1-9.
- Maedler K, Sergeev P, Ris F, Oberholzer J, Joller-Jemelka H, Spinas G, et al. Glucose-induced β cell production of IL-1 β contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J Clin Invest* 2002;110(6):851-60.
- Mahaut M. Productos lácteos industriales. Zaragoza: *Acribia*; 2011.
- Mahida Y, Ceska M, Effenberger F, Kurlak L, Lindley I, Hawkey C. Enhanced synthesis of neutrophil-activating peptide-I/interleukin-8 in active ulcerative colitis. *Clin Sci* 1992;82(3):273-5.
- Makubi A, Roberts DJ. Investigation and treatment for iron deficiency in heart failure: the unmet need in Lower and Middle Income Countries. *Brit J Haematol* 2017;177:896-904.
- Martínez-Ferez A, Bode L, Rudloff S, Kunz C. Goat's milk oligosaccharides inhibit monocyte adhesion to human umbilical vein endothelial cells under flow conditions. *Angiogenesis* 2004;7:182
- Martínez C, Ros G, Periago MJ, López G. Biodisponibilidad del hierro de los alimentos. *Arch Latinoam Nutr* 1999;49 (2):106-113.
- Mastrogiannaki M, Matak P, Mathieu JR, Delga S, Mayeux P, Vaulont S, et al. Hepatic HIF-2 down-regulates hepcidin expression in mice through epo-mediated increase in erythropoiesis. *Haematologica* 2012; 827-34.
- Mayr R, Griffiths WJ, Hermann M, McFarlane I, Halsall DJ, Finkenstedt A, et al. Identification of mutations in SLC40A1 that affect ferroportin function and phenotype of human ferroportin iron overload. *Gastroenterol* 2011;140:2056–63.
- McClelland DBL, editor. Handbook of transfusion medicine. 4 ed. London: *TSO (The Stationery Office)*; 2007.
- McFarlane S, Pashmi G, Connell M, Littlejohn A, Tucker S, Vandenabeele P., et al. Differential activation of nuclear factor- κ B by tumour necrosis factor receptor subtypes. TNFR1 predominates whereas TNFR2 activates transcription poorly. *FEBS Letters* 2002;515(1-3):119-26.
- Mckie AT. The role of Dcytb in iron metabolism: an update. *Biochem Soc T* 2008;36:1239-41.
- Medeiros DM. Copper, iron, and selenium dietary deficiencies negatively impact skeletal integrity: A review. *Exp Biol Med* 2016;241:1316-22.
- Meisel H. Bioactive peptides from milk proteins: a perspective for consumers and producers. *Aust J Dairy Technol* 2001;56:83-91.

- Meisel, H. Casokinins as inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme. In: Sawatski G, Renner B, editores. *New Perspectives in Infant Nutrition*. New York: Thieme Publishers Stuttgart; 1993. p. 153–159.
- Melenovsky V, Petrak J, Mracek T, Benes J, Bourlaug BA, Nuskova H, et al. Myocardial iron content and mitochondrial function in human heart failure. *Eur J Heart Fail* 2016;19:522-30.
- Meliș LE, Mărginean CO, Mocanu S, Mărginean MO. A rare case of iron-pill induced gastritis in a female teenager: A case report and a review of the literature. *Medicine* 2017;96:e7550.
- Meneghini R. Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. *Free Radical Biol & Med* 1997; 23:783-92.
- Meyers DG. The iron hypothesis: does iron play a role in atherosclerosis? *Transfusion* 2000;40:1023-9.
- Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 2003;114(2):181-90.
- Milic S, Mikolasevic I, Orlic L, Devcic E, Starcevic-Cizmarevic N, Stimac D, et al. The Role of Iron and Iron Overload in Chronic Liver Disease. *Med Sci Monitor* 2016;22:2144-51.
- Miller E, Cohen A, Nagao S, Griffith D, Maunder R, Martin T, et al. Elevated levels of NAP-1/Interleukin-8 are present in the airspaces of patients with the adult respiratory distress syndrome and are associated with increased mortality. *Am Rev Resp Dis* 1992;146(2):427-32.
- Miller JL. Iron deficiency anemia: a common and curable disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013;3:a011866
- Mims MP, Guan Y, Pospisilova D, Priwitzerova M, Indra K, Ponka P, et al. Identification of a human mutation of DMT1 in a patient with microcytic anemia and iron overload. *Blood* 2005; 105:1337–42.
- Mitchell CJ, Shawki A, Ganz T, Nemeth E, Mackenzie B. Functional properties of human ferroportin, a cellular iron exporter reactive also with cobalt and zinc. *Am J Physiol-Cell Ph* 2014;306:450–9.
- Moreiras O, Carvajal A, Cabrera L, Cuadrado C. Ingestas Recomendadas de Energía y Nutrientes Para la Población Española (Revisadas 2015). In: *Tablas de Composición de los Alimentos; Pirámide*: Madrid, Spain, 2015; p. 258–9.
- Moreno Aznar LA, Cervera Ral PI, Ortega AR, Díaz Martín JJ, Baladía E, Basulto J, et al. Evidencia científica sobre el papel del yogur y otras leches



fermentadas en la alimentación saludable de la población española. *Nutr Hosp* 2013; 28(6):2039-89.

- Moreno-Fernández J, Diaz-Castro J, Alférez MJ, Boesch C, Nestares T, López-Aliaga I. Fermented goat milk improves antioxidant status and protects from oxidative damage to biomolecules during anemia recovery. *J Sci Food Agr* 2017;97:1433-42.
- Moreno-Fernández J, Díaz-Castro J, Alférez MJM, 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* 2016b; 83:81-8.
- Moreno-Fernandez J, Diaz-Castro J, Pulido-Moran M, Alferez MJ, Boesch C, Sanchez-Alcover A, et al. Fermented goat's milk consumption improves duodenal expression of iron homeostasis genes during anemia recovery. *J. Agric Food Chem* 2016a; 64:2560–8.
- Moreno-Fernandez J, Diaz-Castro J, Pulido-Moran M, Alferez MJM, Nestares T, Lopez-Aliaga I. Fermented goat milk consumption during anaemia recovery: ergogenic effect and improvement of skeletal muscle homeostasis. *Eur J Nutr* 2016d;56:2277-87.
- Moser B, Wolf M, Walz A, Loetscher P. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol* 2004;25(2):75-84.
- Muckenthaler M, Rivella S, Hentze M, Galy B. A red carpet for iron metabolism. *Cell* 2017;168(3):344-61.
- Muñoz Alférez MJ, Muñoz-García A, Moreno-Fernández J, López-Aliaga I, Díaz- Castro J. Fermented goat milk consumption improves cardiovascular health during anemia recovery. *JSci Food Agric* 2019; 99(1):473-81.

N

- Nadadur SS, Srirama K, Mudipalli A. Iron transport & homeostasis mechanisms: their role in health & disease. *Indian J Med Res* 2008;128:533-44.
- Nairz M, Haschka D, Demetz E, Weiss G. Iron at the interface of immunity and infection. *Front Pharmacol* 2014; 5:152.
- Nairz M, Theurl I, Wolf D, Weiss G. Iron deficiency or anemia of inflammation? : Differential diagnosis and mechanisms of anemia of inflammation. *Wien Med Wochenschr* 2016;166:411-23.

Naito Y, Tsujino T, Matsumoto M, Sakoda T, Ohyanagi M, Masuyama T. Adaptive response of the heart to long-term anemia induced by iron deficiency. *Am J Physiol- Heart C* 2009;296:585-93.

- Namaste SM, Rohner F, Huang J, Bhushan NL, Flores-Ayala R, Kupka R, et al. Adjusting ferritin concentrations for inflammation: Biomarkers reflecting inflammation and nutritional determinants of anemia (BRINDA) project. *Am J Clin Nutr* 2017;106:359-71.

- Nanki T, Takada K, Komano Y, Morio T, Kanegane H, Nakajima A, et al. Chemokine receptor expression and functional effects of chemokines on B cells: implication in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2009;11(5):R149.

- Nasopoulou C, Smith T, Detopoulou M, Tsikrika C, Papaharisis L, Barkas D. et al. Structural elucidation of olive pomace fed sea bass (*Dicentrarchus labrax*) polar lipids with cardioprotective activities. *Food Chem.* 2014;145:1097–105.

- Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature* 2002; 420:846-52.

- Nead KG, Halterman JS, Kaczorowski JM, Auinger P, Weitzman M. Overweight children and adolescents: a risk group for iron deficiency. *Pediatrics* 2004;114:104-8.

- Neilands JB. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J Biol Chem* 1995;270:26723-6.

- Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, et al. IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest* 2004;113:1271-6.

- Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 2004;306:2090–3.

- Nomiya H, Osada N, Yoshie O. Systematic classification of vertebrate chemokines based on conserved synteny and evolutionary history. *Genes to Cells* 2012;18(1):1-16.

- Núñez J, Domínguez E, Ramón JM, Núñez E, Sanchis J, Santas E, et al. Iron deficiency and functional capacity in patients with advanced heart failure with preserved ejection fraction. *Int J Cardiol* 2016;207:365-7.

O



- O'Neill L. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. *Immunol Rev* 2008;226(1):10-8.
- Oakley AE, Collingwood JF, Dobson J, Love G, Perrott HR, Edwardson JA, et al. Individual dopaminergic neurons show raised iron levels in Parkinson disease. *Neurology* 2007;68:1820-5.
- Obregón L MC, Cruchet MS, Diaz BE, Salazar RG, Gotteland RM. El consumo regular de *Lactobacillus johnsonii* la1 interfiere con la colonización gástrica por *Helicobacter pylori*. *Rev Chil Nutr* 2003; 30(3):243-49.
- Ohgami RS, Campagna DR, Greer EL, Antiochos B, McDonald A, Chen J, et al. Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin dependent iron uptake in erythroid cells. *Nat Genet* 2005;37:1264 9.
- Ohgami RS, Campagna DR, McDonald A, Fleming MD. The Steap proteins are metalloreductases. *Blood* 2006;108:1388–94.
- Oikonomidou PR, Casu C, Rivella S. New strategies to target iron metabolism for the treatment of beta thalassemia. *Ann NY Acad Sci* 2016;1368:162-8.
- Olivares Grohnert M, Arredondo Olguín M, Pizarro Aguirre F. Hierro. In: Gil A, editor. *Tratado de Nutrición*. Tomo I. 2nd ed. Madrid: Panamericana; 2010. p. 671-86.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 20 de mayo de 2009.

P

- Paganini D, Uyoga MA, Zimmermann MB. Iron fortification of foods for infants and children in low-income countries: Effects on the gut microbiome, gut inflammation, and diarrhea. *Nutrients* 2016;8:494.
- Pak M, Lopez MA, Gabayan V, Ganz T, Rivera S. Suppression of hepcidin during anemia requires erythropoietic activity. *Blood* 2006;108:3730–5.
- Pallarés I, Lisbona F, López-Aliaga I, Barrionuevo M, Alférez MJM, Campos MS. Effects of iron deficiency on the digestive utilization of iron, phosphorus, calcium and magnesium in rats. *Br J Nutr* 1993;70:609-20.
- Palma Parodi, C. Calidad de leche y queso de cabra. Evaluación de rendimiento quesero. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Argentina 2015.

- Pan D, Guo Y. Optimization of sour milk fermentation for the production of ACE- inhibitory peptides and purification of a novel peptide from whey protein hydrolysate. *Int Dairy J* 2010;20:472–9.
- Panichi V, Maggiore U, Taccola D, Migliori M, Manca Rizza G, Consani C, et al. Interleukin-6 is a stronger predictor of total and cardiovascular mortality than C-reactive protein in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19:1154-60.
- Pantopoulos K, Porwal SK, Tartakoff A, Devireddy L. Mechanisms of mammalian iron homeostasis. *Biochemistry* 2012;51(29):5705-24.
- Papanikolaou G, Pantopoulos K. Iron metabolism and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;202:199-211.
- Papanikolaou G, Samuels ME, Ludwig EH, MacDonald ML, Franchini PL, Dube MP, et al. Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nat Genet* 2004;36:77–82.
- Papanikolaou G, Tzilianos M, Christakis JI, Bogdanos D, Tsimirika K, MacFarlane J, et al. Hepcidin in iron overload disorders. *Blood* 2005;105:4103–5.
- Parekh R, Dwek R, Rademacher T, Opdenakker G, Damme J. Glycosylation of interleukin-6 purified from normal human blood mononuclear cells. *Eur J Biochem* 1992;203(1-2):135-41.
- Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 2001; 276:7806–10.
- Park Y, Juárez M, Ramos M, Haenlein G. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Rum Res* 2007;68:88-113.
- Park SH, Stenvinkel P, Lindholm B. Cardiovascular biomarkers in chronic kidney disease. *J Ren Nutr* 2012; 22:120-7.
- Planck S, Woods A, Clowers J, Nicklin M, Rosenbaum J, Rosenzweig H. Impact of IL-1 signalling on experimental uveitis and arthritis. *Ann Rheum Dis* 2012;71(5):753-60.
- Parrot S, Degraeve P, Curia C, Martial-Gros A. In vitro study on digestion of peptides in Emmental cheese: analytical evaluation and influence on angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Nahrung* 2003;47:87–94.
- Pennica D, Nedwin G, Hayflick J, Seeburg P, Derynck R, Palladino M, et al. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 1984;312(5996):724-9.



- Pereira IAC, Teixeira M, Xavier AV. Hemeproteins in anaerobes. Williams, RJP, editor. Bioinorganic chemistry: Trace element evolution from anaerobes to aerobes. New York:Springer-Verlag; 2010. p. 91-190.
- Peslova G, Petrak J, Kuzelova K, Hardy I, Halada P, Kuchel PW, et al. Heparin, the hormone of iron metabolism, is bound specifically to alpha-2-macroglobulin in blood. *Blood* 2009;113:6225–36.
- Peters M, Müller A, Rose-John S. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor: Direct stimulation of gp130 and hematopoiesis. *Blood* 1998;92(10):3495-504.
- Petrat F, de Groot H, Sustmann R, Rauen U. The chelatable iron pool in living cells: a methodically defined quantity. *Biol Chem* 2002; 383:489–502.
- Petry N, Olofin I, Hurrell RF, Boy E, Wirth JP, Moursi M, et al. The proportion of anemia associated with iron deficiency in low, medium, and high human development index countries: A systematic analysis of national surveys. *Nutrients* 2016;8:693.
- Peyssonnaud C, Zinkernagel AS, Schuepbach RA, Rankin E, Vaulont S, Haase VH, et al. Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). *J Clin Invest* 2007;117:1926–32.
- Phelan M, Kerins D. The potential role of milk-derived peptides in cardiovascular disease. *Food Funct* 2011;2:153-67.
- Pietrangelo A, Dierssen U, Valli L, Garuti C, Rump A, Corradini E, et al. STAT3 is required for IL-6-gp130-dependent activation of hepcidin in vivo. *Gastroenterology* 2007;132:294–300.
- Pinilla-Tenas JJ, Sparkman BK, Shawki A, Illing AC, Mitchell CJ, Zhao N, et al. Zip14 is a complex broad-scope metal-ion transporter whose functional properties support roles in the cellular uptake of zinc and nontransferrin-bound iron. *Am J Physiol-Cell Ph* 2011;301:862–71.
- Pinto JP, Arezes J, Dias V, Oliveira S, Vieira I, Costa M, et al. Physiological implications of NTBI uptake by T lymphocytes. *Front Pharmacol* 2014;5:24.
- Piperno A, Girelli D, Nemeth E, Trombini P, Bozzini C, Poggiali E, et al. Blunted hepcidin response to oral iron challenge in HFE-related hemochromatosis. *Blood* 2007;110:4096–100.
- Piperno A, Mariani R, Trombini P, Girelli D. Hepcidin modulation in human diseases: from research to clinic. *World J Gastroenterol* 2009;15:538-51.

- Pobezinskaya Y, Kim Y, Choksi S, Morgan M, Li T, Liu C, et al. The function of TRADD in signaling through tumor necrosis factor receptor 1 and TRIF-dependent Toll-like receptors. *Nature Immunol* 2008;9(9):1047-54.
- Poli M, Asperti M, Ruzzenenti P, Naggi A, Arosio P. Non-Anticoagulant heparins are hepcidin antagonists for the treatment of anemia. *Molecules* 2017;22:598.
- Ponikowski P, van Veldhuisen DJ, Comin-Colet J, Ertl G, Komajda M, Mareev V, et al. Beneficial effects of long-term intravenous iron therapy with ferric carboxymaltose in patients with symptomatic heart failure and iron deficiency. *Eur Heart J* 2015;36:657-68.
- Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JG, Coats AJ, et al. Inhibiting the hepcidin inhibitor for treatment of iron overload. *Blood* 2013;121:1068–9.
- Porteu F, Nathan C. Shedding of tumor necrosis factor receptors by activated human neutrophils. *J Exp Med* 1990;172(2):599-607.
- Portugal-Cohen M, Horev L, Ruffer C, Schlippe G, Voss W, Ma'or Z, et al. Non-invasive skin biomarkers quantification of psoriasis and atopic dermatitis: Cytokines, antioxidants and psoriatic skin auto-fluorescence. *Biomed Pharmacother* 2012;66(4):293-9.
- Poutzalis S, Anastasiadou A, Nasopoulou C, Megalemou K, Sioriki E, Zabetakis I. Evaluation of the in vitro antiatherogenic activities of goat milk and goat dairy products. *Dairy Sci Technol* 2016;96:317-27.
- Poutzalis S, Anastasiadou A, Nasopoulou C, Megalemou K, Sioriki E, Zabetakis I. Evaluation of sensory and in vitro anti-thrombotic properties of traditional Greek yogurts derived from different types of milk. *Dairy Sci Technol* 2017;3(1):e00227.
- Pozzo J, Fournier P, Delmas C, Vervueren PL, Roncalli J, Elbaz M, et al. Absolute iron deficiency without anaemia in patients with chronic systolic heart failure is associated with poorer functional capacity. *Arch Cardiovasc Dis* 2017;110:99-105.
- Pruenster M, Mudde L, Bombosi P, Dimitrova S, Zsak M, Middleton J, et al. The Duffy antigen receptor for chemokines transports chemokines and supports their promigratory activity. *Nat Immunol* 2008;10(1):101-8.



Q

- Qiao B, Sugianto P, Fung E, Del-Castillo-Rueda A, Moran-Jimenez MJ, Ganz T, et al. Hepcidin-induced endocytosis of ferroportin is dependent on ferroportin ubiquitination. *Cell Metab* 2012;15:918–24.
- Quiles A, Hevia ML. Características organolépticas y nutricionales de la leche de cabra. *Agricultura: Revista agropecuaria y ganadera* 2000;818:600-3.

R

- Raja KB, Simpson RJ, Peters TJ. Intestinal iron absorption studies in mouse models of iron-overload. *Brit J Haematol* 1994;86:156-62.
- Ramos E, Kautz L, Rodriguez R, Hansen M, Gabayan V, Ginzburg Y, et al. Evidence for distinct pathways of hepcidin regulation by acute and chronic iron loading in mice. *Hepatology* 2011;53:1333–41.
- Rao M, Guo D, Perianayagam MC, Tighiouart H, Jaber BL, Pereira BJB, et al. Plasma interleukin-6 predicts cardiovascular mortality in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2005;45:324-33.
- Real Decreto 179/2003, de 14 de febrero, por el que se aprueba la Norma de Calidad para el yogur. BOE núm. 42, 18 Febrero 2003.
- Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993;123:1939–51.
- Requena T, Janer C, Peláez C. Leches fermentadas probióticas. Departamento de Ciencia y Tecnología de Productos Lácteos. Instituto del Frío (CSIC). 2005. Madrid. 2-5.
- Reynolds CM, Roche HN. Conjugated linoleic acid and inflammatory cell signaling. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2010;82:199–204.
- Ricci I, Artacho R, Olalla M. Milk protein peptides with angiotensin I-converting enzyme inhibitory (ACEI) activity. *Crit Rev Food Sci* 2010;50:390-402.
- Richardson DR. 24p3 and its receptor: Dawn of a new iron age? *Cell*. 2005; 123:1175–7.
- Roach D, Bean A, Demangel C, France M, Briscoe H, Britton W. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. *J Immunol* 2002;168(9):4620-7.

- Robb A, Wessling-Resnick M. Regulation of transferrin receptor 2 protein levels by transferrin. *Blood* 2004;104:4294–9.
- Robinson PH, Fredeen AH, Chalupa W, Julien WE, Sato H, Fujieda T, et al. Ruminally protected lysine and methionine for lactating dairy cows fed a diet designed to meet requirements for microbial and postruminal protein. *J Dairy Sci* 1995;78:582-94.
- Roetto A, Papanikolaou G, Politou M, Alberti F, Girelli D, Christakis J, et al. Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nat Genet.*2003; 33:21–2.
- Rohner F, Namaste SM, Larson LM, Addo OY, Mei Z, Suchdev PS, et al. Adjusting soluble transferrin receptor concentrations for inflammation: Biomarkers reflecting inflammation and nutritional determinants of anemia (BRINDA) project. *Am J Clin Nutr* 2017;106:372-82.
- Rojas-Castro WN, Chacón-Villalobos A, Pineda-Castro ML. Características del yogurt batido de fresa derivadas de diferentes proporciones de leche de vaca y cabra. *Agron Mesoam* 2007;18:221-37.
- Rollins, BJ. Chemokines. *Blood* 1997;90:909–28.
- Rosa J, Flores R, Oliver S, Pontello A, Zaldivar F, Galasseti P. Sustained IL-1 α , IL-4, and IL-6 elevations following correction of hyperglycemia in children with type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Diabetes* 2008;9(1):9-16.
- Rota, C, Herrera A. Nuevas leches fermentadas. *Alimentaria: Rev Tech High Alim* 2001;320:57-64.
- Rothe J, Gehr G, Loetscher H, Lesslauer W. Tumor necrosis factor receptors-structure and function. *Immunol Res* 1992;11(2):81-90.
- Rostoker G, Vaziri ND, Fishbane S. Iatrogenic iron overload in dialysis patients at the beginning of the 21st century. *Drugs* 2016;76:741-57.
- Ryter SW, Alam J, Choi AM. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev* 2006; 86:583–650.

S

- Sakimoto T, Yamada A, Sawa M. Release of soluble tumor necrosis factor receptor 1 from corneal epithelium by tnf- α -converting enzyme-dependent ectodomain shedding. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(10):4618.
- Saliba AN, Taher AT. Morbidities in non-transfusion-dependent thalassemia. *Ann NY Acad Sci* 2016;1368:82-94.



- Saloff-Coste C.J. Beneficios de las leches fermentadas y de los probióticos sobre la salud: una revisión. *World Newsletter Danone* 1997;15: 1-11.
- Salonen JT, Nyyssonen K, Korpela H, Toumiletto J, Seppanen R, Salonen R. High stored iron levels are associated with excess risk of myocardial infarction in Eastern Finnish men. *Circulation* 1992;86:803-11.
- Samaniego-Vaesken ML, Partearroyo T, Olza J, Aranceta-Bartrina J, Gil Á, González-Gross M, et al. Iron intake and dietary sources in the spanish population: findings from the ANIBES study. *Nutrients* 2017;9:203.
- Santarlaschi V, Cosmi L, Maggi L, Liotta F, Annunziato F. IL-1 and T helper immune responses. *Front Immunol* 2013;4.
- Santini V, Girelli D, Sanna A, Martinelli N, Duca L, Campostrini N, et al. Hepcidin levels and their determinants in different types of myelodysplastic syndromes. *PLoS ONE* 2011;6:e23109.
- Sanz Y, Collado MC, Dalmau J. Probióticos: criterios de calidad y orientaciones calidad y orientaciones para el consumo. 2003;61(9):476-82.
- Sarmiento J, Shumate C, Suetomi K, Ravindran A, Villegas L, Rajarathnam K, et al. Diverging mechanisms of activation of chemokine receptors revealed by novel chemokine agonists. *PLoS ONE* 2011;6(12):e27967.
- Sarriá B, Navas-Carretero S, Lopez-Parra AM, Perez-Granados AM, Arroyo-Pardo E, Roe MA, et al. The G277S transferrin mutation does not affect iron absorption in iron deficient women. *Eur J Nutr* 2007;46:57-60.
- Sawaya WN, Khalil JK, Al-Shalhat AF. Mineral and vitamin content of goat's milk. *J Am Diet Assoc* 1984;84:433-5.
- Schlorke D, Thomas L, Samsonov S, Huster D, Arnhold J, Pichert A. The influence of glycosaminoglycans on IL-8-mediated functions of neutrophils. *Carbohydr Res* 2012;356:196-203.
- Schroder K, Zhou R, Tschopp J. The NLRP3 inflammasome: A sensor for metabolic danger? *Science* 2010;327(5963):296-300.
- Sebastiani G, Pantopoulos K. Disorders associated with systemic or local iron overload: from pathophysiology to clinical practice. *Metallomics* 2011; 3:971–86.
- Seitz M, Dewald B, Ceska M, Gerber N, Baggolini M. Interleukin-8 in inflammatory rheumatic diseases: synovial fluid levels, relation to rheumatoid factors, production by mononuclear cells, and effects of gold sodium thiomalate and methotrexate. *Rheumatol Int* 1992;12(4):159-64.
- 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):1035-48.

- Sermini C, Acevedo M, Arredondo M. Biomarcadores del metabolismo y nutrición de hierro. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 2017;34(4):690.
- Shadidi K, Aarvak T, Henriksen J, Natvig J, Thompson K. The chemokines CCL5, CCL2 and CXCL12 play significant roles in the migration of th1 cells into rheumatoid synovial tissue. *Scand J Immunol* 2003;57(2):192-8.
- Sharma SK, Agarwal SK, Bhargava K, Sharma M, Chopra K, Arumugam G. Prevalence and spectrum of iron deficiency in heart failure patients in south Rajasthan. *Indian Heart J* 2016;68:493-7.
- Sharp P, Srai SK. Molecular mechanisms involved in intestinal iron absorption. *World J Gastroentero* 2007;13:4716-24.
- Shi H, Bencze KZ, Stemmler TL, Philpott CC. A cytosolic iron chaperone that delivers iron to ferritin. *Science* 2009;320:1207–10.
- Shi Z, Zhen S, Zhou Y, Taylor AW. Hb level, iron intake and mortality in Chinese adults: a 10-year follow-up study. *Brit J Nutr* 2017;117:572-81.
- Sikorska K, Bernat A, Wroblewska A. Molecular pathogenesis and clinical consequences of iron overload in liver cirrhosis. *Hepatob Pancreat Dis* 2016;15:461-79.
- Silanikove N, Leitner G, Merin U, Prosser C. Recent advances in exploiting goat's milk: Quality, safety and production aspects. *Small Rum Res* 2010; 89:110-24.
- Silva B, Faustino P. An overview of molecular basis of iron metabolism regulation and the associated pathologies. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2015;1852(7):1347-59.
- Silveira Rodríguez M, Monereo Megías S, Molina Baena B. Alimentos funcionales y nutrición óptima: ¿Cerca o lejos? *Rev Esp Salud Pública* 2003;77(3):317-31.
- Slacanac V, Bozanic R, Hardi J, Rezessy J, Lucan M, Krstanovic V. Nutritional and therapeutic value of fermented caprine milk. *Int J Dairy Technol* 2010;63:171-89.
- Smith C, Farrah T, Goodwin R. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: Activation, costimulation, and death. *Cell* 1994;76(6):959-62.
- Smith K, Maizels R. IL-6 controls susceptibility to helminth infection by impeding Th2 responsiveness and altering the Treg phenotype in vivo. *Eur J Immunol* 2013;44(1):150-61.
- Stein J, Connor S, Virgin G, Ong DE, Pereyra L. Anemia and iron deficiency in gastrointestinal and liver conditions. *World J Gastroentero* 2016;22:7908-25.



- Steinbicker AU, Bartnikas TB, Lohmeyer LK, Leyton P, Mayeur C, Kao SM, et al. Perturbation of hepcidin expression by BMP type I receptor deletion induces iron overload in mice. *Blood* 2011;118:4224–30.
- Stow J, Ching Low P, Offenhäuser C, Sangermani D. Cytokine secretion in macrophages and other cells: Pathways and mediators. *Immunobiology* 2009;214(7):601-12.
- Suárez H, Cimino F, Bonilla E. Hierro en el sistema nervioso central: metabolismo y consideraciones fisiopatológicas. *Invest Clín* 1985;26:247-322.
- Suk K, Kim S, Kim Y, Kim K, Chang I, Yagita H, et al. IFN- γ /TNF- α synergism as the final effector in autoimmune diabetes: A key role for STAT1/IFN regulatory factor-1 pathway in pancreatic β cell death. *J Immunol* 2001;166(7):4481-9.
- Sullivan JL. Iron and the sex difference in heart disease risk. *Lancet* 1981;1:1293-4.
- Sullivan JL. Iron in arterial plaque: A modifiable risk factor for atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta* 2009;1790:718-23.
- Sullivan JL. Macrophage iron, hepcidin, and atherosclerotic plaque stability. *Exp Biol Med (Maywood)* 2007;232:1014-20.
- Sumarmono J, Sulistyowati M, Soenarto. Fatty acids profiles of fresh milk, yogurt and concentrated yogurt from Peranakan Etawah goat milk. *Procedia Food Sci* 2015;3:216-22.

T

- Taga T, Kishimoto T. gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Ann Rev Immunol* 1997;15(1):797-819.
- Takami M, Terry V, Petruzzelli L. Signaling Pathways Involved in IL-8-Dependent Activation of Adhesion Through Mac-1. *J Immunol* 2002;168(9):4559-66.
- Takeda K, Kaisho T, Yoshida N, Takeda J, Kishimoto T, Akira S. Correction: Stat3 activation is responsible for il-6–dependent t cell proliferation through preventing apoptosis: Generation and characterization of t cell–specific stat3-deficient mice. *J Immunol* 2015;194(7):3526.
- Tanno T, Bhanu NV, Oneal PA, Goh SH, Staker P, Lee YT, et al. High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. *Nat Med* 2007;13:1096–101.

- Tanno T, Porayette P, Sripichai O, Noh SJ, Byrnes C, Bhupatiraju A, et al. Identification of TWSG1 as a second novel erythroid regulator of hepcidin expression in murine and human cells. *Blood* 2009;114:181–6.
- Tartaglia L, Goeddel D. Two TNF receptors. *Immunol Today* 1992;13(5):151-3.
- Tartaglia LA, Weber RF, Figari IS. The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses. *P Natl Acad Sci USA* 1991;88:9292–6.
- Tauchenová L, Křížová B, Kubánek M, Fraňková S, Melenovský V, Tintěra J, et al. Successful treatment of iron-overload cardiomyopathy in hereditary hemochromatosis with deferoxamine and deferiprone. *Can J Cardiol* 2016;32:1574.
- Taylor S, Rampton D. Treatment of iron deficiency anemia: practical considerations. *Pol Arch Med Wewn* 2015;125:452-60.
- Theil EC, Raymond KN. Transition-metal storage, transport, and biomineralization bioinorganic chemistry. In: Bertini I, Gray HB, Lippard SJ, Valentine JS, editors. *Bioinorganic Chemistry*. Mill Valley, CA: University Science Books; 994. p.1-36.
- Thelen M. Dancing to the tune of chemokines. *Nat Immunol* 2001;2(2):129-34.
- Thurnham DI, McCabe LD, Haldar S, Wieringa FT, Northrop-Clewes CA, McCabe G P. Adjusting plasma ferritin concentrations to remove the effects of subclinical inflammation in the assessment of iron deficiency: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 2010;92:546–55.
- Totino PR, Daniel-Ribeiro CT, Ferreira-da-Cruz MF. Evidencing the role of erythrocytic apoptosis in malarial anemia. *Front Cell Infect Mi* 2016;6:176.
- Toxqui L, De Piero A, Courtois V, Bastida S, Sánchez-Muniz FJ, Vaquero MP. Iron deficiency and overload. Implications in oxidative stress and cardiovascular health. *Nutr Hosp* 2010;25:350-65.
- Tracey D, Klareskog L, Sasso E, Salfeld J, Tak P. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review. *Clin. Pharmacol. Ther* 2008;117(2):244-79.
- Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature* 2002;420:853-9.
- Tran TN, Eubanks SK, Schaffer KJ, Zhou CY, Linder MC. Secretion of ferritin by rat hepatoma cells and its regulation by inflammatory cytokines and iron. *Blood* 1997;90:4979-86.



- Tripepi G, Mallamaci F, Zoccali C. Inflammation markers, adhesion molecules, and all-cause and cardiovascular mortality in patients with ESRD: searching for the best risk marker by multivariate modeling. *J Am Soc Nephrol* 2005;16(1):S83-8.
- Tzorotioti SE, Nasopoulou C, Detopoulou M, Sioriki E, Demopoulos CA, Zabetakis I. In vitro anti-atherogenic properties of traditional Greek cheese lipid fractions. *Dairy Sci Technol* 2014; 94:269–81.
- Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta* 2014;1843(11):2563-82.
- Tussing-Humphreys LM, Liang H, Nemeth E, Freels S, Braunschweig CA. Excess adiposity, inflammation, and iron-deficiency in female adolescents. *J Am Diet Assoc* 2009;109:297-302.

V

- Valore EV, Ganz T. Posttranslational processing of hepcidin in human hepatocytes is mediated by the prohormone convertase furin. *Blood Cells Mol Dis* 2008;40:132–8.
- Van Haehling S, Jankowska EA, van Veldhuisen DJ, Ponikowski P, Anker SD. Iron deficiency and cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol* 2015;12:659–69.
- Van Meijl LE, Vrolix R, Mensink RP. Dairy product consumption and the metabolic syndrome. *Nutr Res Rev* 2008;21:148–57.
- Vargas M, Chafer M, Albors A, Chiralt A, González-Martínez C. Physico-chemical and sensory characteristics of yoghurt produced from mixtures of cow's and goat's milk. *Int Dairy J* 2008;18:1146-52.
- Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003;92:827–39.
- Vokurka M, Krijt J, Sulc K, Necas E. Hepcidin mRNA levels in mouse liver respond to inhibition of erythropoiesis. *Physiol Res* 2006;55:667–74.
- Volke M, Gale DP, Maegdefrau U, Schley G, Klanke B, Bosserhoff AK, et al. Evidence for a lack of a direct transcriptional suppression of the iron regulatory peptide hepcidin by hypoxia-inducible factors. *PLoS ONE* 2009;4:e7875.
- Von Moos LM, Schneider M, Hilty FM, Hilbe M, Arnold M, Ziegler N, et al. Iron phosphate nanoparticles for food fortification: Biological effects in rats and human cell lines. *Nanotoxicology* 2017;11:496-506.

W

- Wallace DF, Summerville L, Lusby PE, Subramaniam VN. First phenotypic description of transferrin receptor 2 knockout mouse, and the role of hepcidin. *Gut* 2005; 54:980–6.
- Wallace DF, Summerville L, Subramaniam VN. Targeted disruption of the hepatic transferrin receptor 2 gene in mice leads to iron overload. *Gastroenterol* 2007;132:301–10.
- Waldvogel-Abramowski S, Waeber G, Gassner C, Buser A, Frey B, Favrat B et al. Physiology of Iron Metabolism. *Transfus Med Hemother* 2014;41(3):213-21.
- Walsh DJ, FitzGerald RJ. The functional value of dairy proteins. In: Yada R, editor. *Proteins in Food Processing*. Cambridge, UK: Woodhead;2004.
- Wang CY, Jenkitkasemwong S, Duarte S, Sparkman BK, Shawki A, Mackenzie B, et al. ZIP8 is an iron and zinc transporter whose cell-surface expression is up-regulated by cellular iron loading. *J Biol Chem* 2012;287:34032–43.
- Wang RH, Li C, Xu X, Zheng Y, Xiao C, Zervas P, et al. A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression. *Cell Metab* 2005;2:399–409.
- Wang J, Pantopoulos K. Regulation of cellular iron metabolism. *Biochem J* 2011;434:365-81.
- Wang Y, Huang L, Zhang L, Qu Y, Mu D. Iron status in attention-deficit/hyperactivity disorder: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2017;12:e0169145.
- Weinstein D, Roy CN, Fleming MD, Loda MF, Wolfsdorf JI, Andrews NC. Inappropriate expression of hepcidin is associated with iron refractory anemia: implication for the anemia chronic disease. *Blood* 2002;100:3776-81.
- Weiss G. Iron metabolism in the anemia of chronic disease. *Biochim Biophys Acta* 2009;1790:682–93.
- Wessling-Resnick M. Iron homeostasis and the inflammatory response. *Annu Rev Nutr* 2010;30:105–22.
- West AP Jr, Bennett MJ, Sellers VM, Andrews NC, Enns CA, Bjorkman PJ. Comparisons of the interactions of transferrin receptor with transferrin and hereditary hemochromatosis protein HFE. *J Biol Chem* 2000;275:38135–8.



- West AR, Oates PS. Mechanisms of heme iron absorption: current questions and controversies. *World J Gastroentero* 2008;14:4101-10.
- Wienbergen H, Pfister O, Hochadel M, Michel S, Bruder O, Remppis BA, et al. Usefulness of Iron Deficiency Correction in Management of Patients With Heart Failure [from the Registry Analysis of Iron Deficiency-Heart Failure (RAID-HF) Registry]. *Am J Cardiol* 2016;118:1875-80.
- Wieringa FT, Dahl M, Chamnan C, Poirot E, Kuong K, Sophonneary P, et al. The high prevalence of anemia in cambodian children and women cannot be satisfactorily explained by nutritional deficiencies or hemoglobin disorders. *Nutrients* 2016;8:348.
- Wigglesworth JM, Baum H. In: In Iron in Biochemistry and Medicine II. Jacobs A, Worwood M, editors. *New York, NY: Academic Press*; 1980. p. 29–86.
- Witthöft CM, Arkbåge K, Johansson M, Lundin E, Berglund G, Zhang JX, et al. Folate absorption from folate-fortified and processed foods using a human ileostomy model. *Br J Nutr* 2006;95:181-7.
- Woessner JF, Nagase H. Matrix metalloproteinases and TIMPs. *New York: Oxford Univ Press*; 2000.
- Wongjaikam S, Kumfu S, Khamseekaew J, Sripetchwandee J, Srichairatanakool S, Fucharoen S, et al. Combined iron chelator and antioxidant exerted greater efficacy on cardioprotection than monotherapy in iron-overloaded rats. *PLoS One* 2016;11:e0159414.
- Wunderlich AP, Cario H, Juchems MS, Beer M, Schmidt SA. Noninvasive MRI-based liver iron quantification: methodic approaches, practical applicability and significance. *Rofo-Fortschr Rontg* 2016;188:1031-6.

Y

- Yadav A, Singh J, Yadav S. Composition, nutritional and therapeutic values of goat milk: A review. *Asian J Dairy Food Res* 2016;35(2):96-102.
- Yamamoto N, Maeno M, Takano T. Purification and characterization of an antihypertensive peptide from a yogurt-like product fermented by *Lactobacillus helveticus* CPN4. *J Dairy Sci* 1999;82:1388–93.
- Yanoff LB, Menzie CM, Denkinger B, Sebring NG, McHugh T, Remaley AT, et al. Inflammation and iron deficiency in the hypoferrremia of obesity. *Int J Obes* 2007;31:1412-9.

Z

- Zalewska B, Kaevska M, Slana I. Sequence analysis of changes in microbial composition in different milk products during fermentation and storage. *Curr Microbiol* 2018;75(2):202-5.
- Žan M, Stibilj V, Rogelj I. Milk fatty acid composition of goats grazing on alpine pasture. *Small Ruminant Res* 2006;64:45-52.
- Zervas G, Tsiplakou E. Goat Milk. In: Park YW, Haenlein GFW, editors. *Milk and Dairy Products in Human Nutrition: Production, Composition and Health*. Oxford: John Wiley & Sons; 2013. p. 498–518.
- Zhang Y, Mikhael M, Xu D, Li Y, Soe-Lin B, Li W, et al. Lysosomal proteolysis is the primary degradation pathway for cytosolic ferritin and cytosolic ferritin degradation is necessary for iron exit. *Antioxid Redox Signal* 2010;13:999–1009.