

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA

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

Programa de Doctorado en Nutrición y Ciencias de los Alimentos



TESIS DOCTORAL INTERNACIONAL

***VALORACIÓN DEL ESTADO NUTRICIONAL E INMUNOLÓGICO
EN LA RECUPERACIÓN DE LA ANEMIA FERROPÉNICA CON
FERMENTADOS LÁCTEOS DE CABRA O VACA***

María García Burgos

Directores

Dra. M^a Inmaculada López Aliaga

Dr. Jorge Moreno Fernández

UNIVERSITY OF GRANADA

FACULTY OF PHARMACY

DEPARTMENT OF PHYSIOLOGY

NUTRITION AND FOOD TECHNOLOGY INSTITUTE "JOSÉ MATAIX"

PhD Program in Nutrition and Food Technology



INTERNATIONAL PhD THESIS

**EVALUATION OF NUTRITIONAL AND IMMUNOLOGICAL STATE
DURING IRON DEFICIENCY RECOVERY WITH FERMENTED
GOAT OR COW MILK**

María García Burgos

Directors

Dra. M^a Inmaculada López Aliaga

Dr. Jorge Moreno Fernández

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: María García Burgos
ISBN: 978-84-1117-298-1
URI: <http://hdl.handle.net/10481/74591>

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

*Proyecto de Investigación de Excelencia.
Modalidad Proyectos Motrices.*



UNIVERSIDAD
DE GRANADA

Universidad de Granada
Facultad de Farmacia
Departamento de Fisiología

**D^a M^a INMACULADA LÓPEZ ALIAGA. CATEDRÁTICA DE UNIVERSIDAD
ADSCRITA AL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA DE LA UNIVERSIDAD
DE GRANADA.**

INFORMA:

Que los trabajos de investigación que se exponen en la Memoria de Tesis Doctoral titulada: **“VALORACIÓN DEL ESTADO NUTRICIONAL E INMUNOLÓGICO EN LA RECUPERACIÓN DE LA ANEMIA FERROPÉNICA CON FERMENTADOS LÁCTEOS DE CABRA O VACA”**, que presenta la Graduada D^a María García Burgos al superior juicio del Tribunal que designe la Universidad de Granada, han sido realizados bajo mi dirección durante los años 2017-2022, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autor en condiciones tan aventajadas que la hacen merecedora al Título de Doctora, siempre y cuando así lo considere el citado Tribunal.

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

En Granada, a 25 de febrero de 2022



UNIVERSIDAD
DE GRANADA

Universidad de Granada
Facultad de Farmacia
Departamento de Fisiología

**D. JORGE MORENO FERNÁNDEZ. CONTRATADO POSTDOCTORAL
ADSCRITO AL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA DE LA UNIVERSIDAD
DE GRANADA.**

INFORMA:

Que los trabajos de investigación que se exponen en la Memoria de Tesis Doctoral titulada: **“VALORACIÓN DEL ESTADO NUTRICIONAL E INMUNOLÓGICO EN LA RECUPERACIÓN DE LA ANEMIA FERROPÉNICA CON FERMENTADOS LÁCTEOS DE CABRA O VACA”**, que presenta la Graduada D^a María García Burgos al superior juicio del Tribunal que designe la Universidad de Granada, han sido realizados bajo mi dirección durante los años 2017-2022, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autor en condiciones tan aventajadas que la hacen merecedora al Título de Doctora, siempre y cuando así lo considere el citado Tribunal.

Fdo. Prof. Dr. D. Jorge Moreno Fernández

En Granada, a 25 de febrero de 2022



UNIVERSIDAD
DE GRANADA

*Universidad de Granada
Facultad de Farmacia
Departamento de Fisiología*

La doctoranda D^a. MARÍA GARCÍA BURGOS y los directores de la Tesis D^a M^a INMACULADA LÓPEZ ALIAGA y D. JORGE MORENO FERNÁNDEZ, garantizamos, al firmar esta Tesis Doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la Tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizados sus resultados o publicaciones.

En Granada, a 25 de febrero de 2022

Directores de la Tesis Doctoral

Prof. Dra.

D^a M^a Inmaculada López Aliaga

Prof. Dr.

D. Jorge Moreno Fernández

Doctoranda

D^a María García Burgos



TESIS DOCTORAL INTERNACIONAL

La presente memoria de Tesis Doctoral se ha llevado a cabo bajo la concesión de un Contrato de Formación de Profesorado Universitario (FPU16/05954) por parte del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte. El trabajo experimental se ha realizado en el Departamento de Fisiología y en el Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos “José Mataix” de la Universidad de Granada, así como en la Universidad de Roehampton. Department of Life Sciences. The Health Science Research Centre de Londres, gracias a la obtención de una ayuda de movilidad internacional de doctorado en el marco de la Convocatoria de Movilidad de Estudiantes de Doctorado 2018/2019 del Vicerrectorado de Internacionalización de la Universidad de Granada para llevar a cabo una estancia de movilidad en el periodo comprendido entre el 01/09/2019 y el 30/11/2019, con el objetivo de obtener la Mención de Doctorado Internacional por la Universidad de Granada.



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

*Universidad de Granada
Facultad de Farmacia
Departamento de Fisiología*

INTERNATIONAL PhD THESIS

This current PhD Thesis has been carried out under the concession of a Contrato de Formación de Profesorado Universitario (FPU16/05954) by the Ministry of Education, Culture and Sport. The experimental work has been carried out in the Department of Physiology and in the Institute of Nutrition and Food Technology "José Mataix" of the University of Granada, as well as in the University of Roehampton. Department of Life Sciences. The Health Science Research Centre of London, thanks to the obtaining thanks to obtaining an international doctoral mobility grant supported by Convocatoria de Movilidad de Estudiantes de Doctorado 2018/2019 del Vicerrectorado de Internacionalización of the University of Granada to carry out a mobility stay in the period between 09/01/2019 and 11/30/2019, with the aim of obtaining the International Doctorate Mention from the University of Granada.

“El ascensor hacia el éxito esta fuera de servicio, tienes que subir las escaleras poco a poco”

Mireia Belmonte

“La verdadera ciencia enseña, por encima de todo, a dudar y a ser ignorante”

Miguel de Unamuno

Agradecimientos

Hace casi 11 años inicié el Grado en Farmacia sin saber que aquel paseo por Granada se convertiría en un largo y apasionado viaje hacia la obtención del doctorado.

En primer lugar, quiero dirigirme a mi familia. Esta Tesis Doctoral, así como toda mi carrera académica, no hubiera sido posible sin el apoyo incondicional de mi padre, mi madre y mi hermana. Ellos han sido y serán los pilares fundamentales de mi vida.

A mis padres, gracias por educarme, enseñarme a superarme y animarme a conseguir mis objetivos. Vuestro concepto de disciplina ha logrado que sea inconformista, perfeccionista y que haya llegado hasta aquí. Siendo vosotros el mejor ejemplo de trabajo y responsabilidad, solo debía seguir vuestros pasos para iniciar este viaje.

Mi padre, Juan, con tu punto de vista optimista característico, me has ayudado cuando ni tú mismo sabías que lo hacías, siempre a la retaguardia, siendo el soporte de todos. Mi madre, María, con tu objetividad y voz tranquilizadora cuando más lo he necesitado, me has escuchado de noche y de día y me has dado calma y paz. A los dos, gracias, nunca os han faltado fuerzas para ayudarme por más difícil que el camino resultara. Estoy profundamente agradecida por vuestro cariño y amor. Por último, gracias por el mayor legado que me habéis dado, mi hermana. Nos habéis enseñado a respetarnos, cuidarnos y querernos la una a la otra por encima de todo.

Ana, gracias por darme alas y controlarme de vez en cuando el vuelo. No tendré vida suficiente para agradecerte todo lo que haces por mí. Compañera de vida, gracias por tu tesón, tu diplomacia y tu saber estar ante cualquier problema; por animarme a luchar, por ser todo oídos y por estabilizarme. Me has hecho fuerte, me has apoyado y me has levantado. Gracias, hermana de mi alma, por hacerme feliz día a día.

Me gustaría dirigirme a mi cuñado, Luis, por formar parte de la vida de mi hermana y de la mía propia, convirtiéndote en familia y amigo a partes iguales.

A mis amigos, en especial a Diego, por animarme, darme energía y no permitir que me rinda. Gracias por hacerme reír. A Bea, por escucharme, por tener siempre un buen consejo para darme. Gracias por permanecer a mi lado desde el principio.

A mis directores de tesis, M^a Inmaculada López Aliaga, gracias por tu infinita paciencia, ayuda incondicional, cercanía, humanidad y apoyo. A Jorge Moreno, gracias

por enseñarme a desenvolverme en un laboratorio e iniciarme en el mundo de la investigación.

Me gustaría agradecer a todos los miembros de mi grupo de investigación que me permitieran realizar la Tesis Doctoral. A María José, por tus palabras de ánimo en momentos difíciles y por mantener viva en mí la esperanza. A Javier Díaz, por animarme a solicitar el contrato FPU, así como las demás becas de investigación. Gracias a tu primer empujón he llegado hasta aquí.

Por último, me gustaría dar las gracias a mis actuales compañeros de laboratorio. Habéis sido un soplo de aire fresco y me habéis hecho sentir como en casa al tratarme como una más.

Gracias a todas aquellas personas que de un modo u otro han sido pasajeras de este viaje. Me siento muy afortunada de tener en mi vida a personas extraordinarias.

ÍNDICE

ÍNDICE DE CONTENIDOS	1
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	7
ÍNDICE DE TABLAS	10
ÍNDICE DE FIGURAS	15

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. RESUMEN	21
1. SUMMARY	33
2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	43
2.1 SISTEMA INMUNE	43
2.1.1 <i>Inmunidad innata</i>	44
2.1.2 <i>Inmunidad adaptativa</i>	49
2.1.2.1 Desarrollo de la inmunidad adaptativa	55
2.1.2.2 Inmunidad humoral (activación de linfocitos B)	56
2.1.2.3 Inmunidad mediada por células (activación de linfocitos T).....	57
2.1.3 <i>El sistema complemento</i>	59
2.1.3.1 Activación de la vía clásica.....	60
2.1.3.2 Activación de la vía alternativa.....	61
2.1.3.3 Activación de la vía de las lectinas	61
2.1.3.4 Secuencia común o fase lítica del complemento	62
2.1.3.5 Consecuencias biológicas de la activación del complemento.....	62
2.1.4 <i>El hierro y la inmunidad</i>	63
2.1.4.1 El hierro y los neutrófilos	65
2.1.4.2 El hierro y los macrófagos	65
2.1.4.3 El hierro y las células T	66
2.2 EL HIERRO EN LA NUTRICIÓN.....	68
2.2.1 <i>Regulación de la homeostasis del hierro</i>	69
2.2.1.1 Absorción	69
2.2.1.2 Distribución.....	72
2.2.1.3 Metabolismo	74

2.2.1.4 Almacenamiento	76
2.2.1.5 Excreción	77
2.2.2 <i>Déficit de hierro. Anemia ferropénica nutricional</i>	78
2.2.2.1 Causas	80
2.2.2.2 Diagnóstico	83
2.2.2.3 Tratamiento	83
2.2.3 <i>Sobrecarga de hierro</i>	86
2.3 LECHES FERMENTADAS	88
2.3.1 <i>Tipos de leches fermentadas</i>	90
2.3.2 <i>Composición nutricional / características nutricionales</i>	91
2.3.2.1 Proteínas	92
2.3.2.2 Hidratos de carbono	94
2.3.2.3 Lípidos	94
2.3.2.4 Vitaminas y minerales	94
2.3.2.5 Prebióticos	96
2.3.2.6. Probióticos	96
2.3.2.7. Levaduras	97
2.3.3 <i>Efectos beneficiosos sobre la salud</i>	98
2.3.3.1 Efectos inmunológicos	98
2.3.3.1.1 Efectos sobre el intestino y el microbioma del huésped	98
2.3.3.1.2 Efectos anticancerígenos	99
2.3.3.1.2.1 Cáncer de colon	99
2.3.3.1.2.2 Cáncer de mama	100
2.3.3.1.3 Efectos inmunomoduladores	100
2.3.3.1.4 Efectos antialérgicos	101

2.3.3.2 Efectos hipocolesterolemiantes.....	101
2.3.3.3 Efectos antioxidantes	102
2.3.3.4 Efectos óseos.....	102
2.3.3.5 Efectos hipotensores	103
2.3.4 <i>Leche fermentada de cabra</i>	104
2.3.4.1 Efectos beneficiosos sobre la salud.....	106
3. OBJETIVOS	113
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	117
4.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	117
4.2 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	117
4.3 ELABORACIÓN Y DESHIDRATACIÓN DE LAS LECHES FERMENTADAS	120
4.3.1 <i>Obtención de la leche fermentada de cabra o vaca</i>	120
4.3.2 <i>Tratamiento previo a la fermentación</i>	120
4.3.3 <i>Inoculación del cultivo iniciador de la fermentación (starter)</i>	121
4.3.4 <i>Deshidratación del producto lácteo fermentado</i>	121
4.4 DIETAS EXPERIMENTALES.....	122
4.5 MÉTODOS ANALÍTICOS	123
4.5.1 <i>Contenido proteico, materia grasa, lactosa, materia seca y cenizas</i>	123
4.5.2 <i>Determinación y composición de aminoácidos</i>	124
4.5.3 <i>Determinación y composición de ácidos grasos</i>	125
4.5.4 <i>Determinación y composición mineral</i>	126
4.5.5 <i>Determinación y composición vitamínica</i>	127
4.6 PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS.....	129
4.6.1 <i>Serie eritrocitaria</i>	129
4.6.2 <i>Serie leucocitaria</i>	129
4.6.3 <i>Serie plaquetaria</i>	129

4.7 PARÁMETROS BIOQUÍMICOS.....	130
4.7.1 Estatus nutricional.....	130
4.7.2 Función hepática	130
4.7.3 Función renal.....	130
4.7.4 Estatus de hierro.....	130
4.8 ESTUDIO DE LA FUNCIÓN INMUNITARIA.....	131
4.8.1 Biomarcadores de la función inmune	131
4.8.2 Evaluación funcional de la actividad de las vías del complemento	132
4.8.3 Lactoferrina	133
4.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	133
5. RESULTADOS	137
5.1 PERIODO PRE-EXPERIMENTAL	137
5.1.1 Peso corporal e incremento de peso.....	137
5.1.2 Índices somáticos: hígado, bazo y timo	137
5.1.3 Composición corporal	137
5.1.4 Parámetros hematológicos	137
5.1.4.1 Serie eritrocitaria.....	137
5.1.4.2 Serie leucocitaria.....	138
5.1.4.3 Serie plaquetaria.....	138
5.1.5 Parámetros bioquímicos	138
5.2 PERIODO EXPERIMENTAL	138
5.2.1 Peso corporal e incremento de peso.....	138
5.2.2 Índices somáticos: hígado, bazo y timo	139
5.2.3 Composición corporal	140
5.2.4 Parámetros hematológicos	141
5.2.4.1 Serie eritrocitaria.....	141

5.2.4.2 Serie leucocitaria.....	142
5.2.4.3 Serie plaquetaria.....	144
5.2.5 Parámetros bioquímicos.....	145
5.2.6 Parámetros inmunológicos.....	147
6. TABLAS Y FIGURAS	155
7. DISCUSIÓN.....	179
7.1 PERIODO PRE EXPERIMENTAL.....	179
7.2 PERIODO EXPERIMENTAL	180
8. CONCLUSIONES	189
8. CONCLUSIONS.....	195
9. BIBLIOGRAFÍA	200

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
A/G	Ratio albumina/globulina
ADE	Amplitud de distribución eritrocitaria
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Amplitud de distribución plaquetaria
ALT	Alanina aminotransferasa
APC	Células presentadoras de antígenos
ARN	Ácido ribonucleico
AST	Aspartato aminotransferasa
ATP	Adenosín trifosfato
BCR	Receptor del linfocito B para el antígeno
BMP-6	Proteína morfogenética ósea 6
CHCM	Concentración de hemoglobina corpuscular media
CTL	Linfocitos T citotóxicos
Dcytb	Citocromo duodenal B
DMT1	Transportador de metales divalentes 1
EROs	Especies reactivas de oxígeno
FPN1	Ferroportina 1
G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos
HCM	Hemoglobina corpuscular media
HCP1	Proteína transportadora de hierro tipo hemo
HFE	Hemocromatosis hereditaria

HJV	Hemojuvelina
HLA	Antígeno leucocitario humano
INF- γ	Interferón gamma
IFNGR2	Receptor 2 de IFN- γ
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
IRE	Elementos reguladores de hierro
IRP	Proteínas reguladoras de hierro
LAB	Bacterias ácido lácticas
LPS	Lipopolisacáridos
MAC	Complejo de ataque a la membrana
MASP	Serina proteasa asociada a manosa
MBL	Lectina de unión a manosa
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MPO	Mieloperoxidasa
NCOA4	Coactivador del receptor nuclear 4
NEFA	Ácidos grasos no esterificados
NK	Células natural killer
NLR	Ratio neutrófilos/linfocitos
NOD	<i>Dominio de oligomerización y unión a nucleótido</i>
NTBI	Hierro no unido a la transferrina circulante
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PE	Período experimental

PepT1	Transportador de péptidos 1
PLR	Ratio plaquetas/linfocitos
PPE	Período pre-experimental
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
SPF	Condiciones libres de gérmenes patógenos
sTfRC	Receptor de transferrina soluble en suero
TBI	Hierro unido a transferrina
Tf	Transferrina
TfR1	Receptor de la transferrina 1
TfR2	Receptor de la transferrina 2
Th1	Linfocitos T colaboradores tipo 1
Th2	Linfocitos T colaboradores tipo 2
TIBC	Capacidad total de fijación al hierro
TIMP-1	Metalopeptidasa 1
TLR	Receptores tipo Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
Tsat	Saturación de transferrina
UCP1	Proteína de desacoplamiento 1
VCM	Volumen corpuscular medio
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VPM	Volumen plaquetario medio

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.

Tipos de leches fermentadas según el cultivo específico91

Tabla 2.

Composición de las leches fermentadas92

Tabla 3.

Principales proteínas en la leche de vaca y cabra.....93

Tabla 4.

Composición básica de la leche en función de la especie105

Tabla 5.

Composición de las dietas experimentales del período pre experimental (PPE)122

Tabla 6.

Composición de las dietas experimentales del período experimental (PE).....123

Tabla 7.

Composición química de las leches fermentadas de vaca y cabra124

Tabla 8.

Composición de aminoácidos de las leches fermentadas de vaca y cabra125

Tabla 9.

Composición de ácidos grasos de las leches fermentadas vaca y cabra126

Tabla 10.

Composición mineral de las leches fermentadas vaca y cabra127

Tabla 11.

Composición vitamínica de las leches fermentadas vaca y cabra129

Tabla I.

Peso corporal inicial, peso corporal final e incremento de peso en ratas controles y anémicas155

Tabla II.

Pesos de hígado, bazo y timo (absolutos y relativos al peso corporal) en ratas controles y anémicas155

Tabla III.

Composición corporal en ratas controles y anémicas.....155

Tabla IV.

Parámetros eritrocitarios en ratas controles y anémicas156

Tabla V.

Recuento total y diferencial de leucocitos en ratas controles y anémicas156

Tabla VI.

Parámetros plaquetarios en ratas controles y anémicas156

Tabla VII.

Parámetros bioquímicos en ratas controles y anémicas.....157

Tabla VIII.

Peso corporal inicial, peso corporal final e incremento de peso en ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro158

Tabla IX.

Pesos de hígado, bazo y timo (absolutos y relativos al peso corporal) en ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro158

Tabla X.

Composición corporal en ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro159

Tabla XI.

Parámetros eritrocitarios en ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro.....159

Tabla XII.

Recuento total y diferencial de leucocitos en ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro.....160

Tabla XIII.

Parámetros plaquetarios en ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro.....160

Tabla XIV.

Parámetros bioquímicos en ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro.....161

Tabla XV.

Biomarcadores de la función inmune en ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro.....162

Tabla XVI.

Evaluación funcional de la actividad de las vías del complemento en ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro162

Tabla XVII.

Concentración sérica de lactoferrina en ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro.....163

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.

Inmunidad innata y adaptativa.....44

Figura 2.

Inmunidad adaptativa52

Figura 3.

Tres vías de activación del sistema del complemento.....60

Figura 4.

Absorción de hierro hemo y no hemo71

Figura 5.

Homeostasis sistémica del hierro73

Figura 6.

Diseño experimental del estudio118

Figura I.

Concentración sérica de eotaxina en ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro.....164

Figura II.

Concentración sérica de fractalquina en ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro.....165

Figura III.

Concentración sérica de INF- γ en ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro.....166

Figura IV.

Concentración sérica de TNF- α en ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro.....167

Figura V.

Concentración sérica de MCP-1 en ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro.....168

Figura VI.

Concentración sérica de IL-4 en ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro.....169

Figura VII.

Concentración sérica de IL-6 en ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro.....170

Figura VIII.

Concentración sérica de IL-10 en ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro.....171

Figura IX.

Evaluación funcional de la actividad de la vía clásica del complemento en ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro172

Figura X.

Evaluación funcional de la actividad de la vía de las lectinas del complemento en ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro173

Figura XI.

Evaluación funcional de la actividad de la vía alternativa del complemento en ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro174

Figura XII.

Concentración sérica de lactoferrina en ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro175

Resumen

1. RESUMEN

Antecedentes

El sistema inmunológico es una organización de células y moléculas con funciones especializadas en la defensa contra infecciones. Protegen la piel, las vías respiratorias, el tracto intestinal y otras áreas de microorganismos susceptibles de producir una infección. Más allá de las barreras estructurales y químicas que protegen de las infecciones, la defensa contra los microbios está mediada por las reacciones tempranas de la inmunidad innata y las respuestas posteriores de la inmunidad adaptativa. Ambos tipos de inmunidad trabajan en conjunto para proteger al cuerpo humano de infecciones.

La inmunidad innata representa la primera barrera de defensa frente a infecciones utilizada por el huésped inmediatamente o pocas horas después de encontrar un antígeno. Los componentes de la inmunidad innata se encuentran presentes antes de la infección, no requiere de un encuentro o exposición previa al agente y no reconocen de manera selectiva a un antígeno concreto. La respuesta inmune innata no tiene memoria inmunológica y, por lo tanto, es incapaz de reconocer al mismo patógeno y será identificado como nuevo si el cuerpo humano se expone a él en el futuro. La variabilidad de las estructuras antigénicas, así como la capacidad de los patógenos de mutar para evitar la detección del huésped, ha impulsado la evolución del sistema inmunológico adaptativo.

La inmunidad adaptativa reconoce de manera específica pequeñas partes de moléculas (determinantes antigénicos o epítomos) para eliminarlas de manera selectiva y utiliza tres estrategias principales para combatir la mayoría de los microbios: los anticuerpos secretados que se unen a microbios extracelulares y promueven su ingestión y posterior destrucción por fagocitos, los fagocitos que ingieren microbios y los destruyen, y los linfocitos T citotóxicos que destruyen las células infectadas por microbios que son inaccesibles a los anticuerpos y la destrucción fagocítica. Hay dos tipos de respuestas inmunitarias adaptativas, la inmunidad humoral y la inmunidad mediada por células, que están moderadas por diferentes componentes del sistema inmunológico y funcionan para eliminar diferentes tipos de microbios.

El sistema de complemento es el mecanismo efector humoral más importante de la respuesta inmunológica y, junto con los fagocitos, es el principal responsable de la inmunidad innata. Está formado por una serie de proteínas plasmáticas, que se activan en cascada por un potente mecanismo de amplificación. El sistema del complemento está sujeto a una fuerte regulación mediante proteínas reguladoras que inhiben su activación, presentes en las células del anfitrión y las cuales no están presentes en los microbios. El sistema del complemento tiene tres vías de activación: vía clásica, vía alternativa y vía de las lectinas.

El hierro es un elemento fundamental para el desarrollo normal del sistema inmunológico, tanto para la respuesta inmune innata como para la adaptativa. Los niveles bajos de hierro ejercen un impacto negativo en la inmunidad del huésped que es reversible con terapia con hierro.

Tiene varios efectos sobre el sistema inmunológico ya sea modulando la proliferación y diferenciación de las células inmunitarias, controlando diversos mecanismos efectores de las células inmunitarias e interfiriendo directamente con las vías efectoras inmunitarias antimicrobianas. Su déficit produce una reducción de la actividad de los neutrófilos, actividad bactericida intracelular alterada, disminución del número de linfocitos T, producción de linfocitos T defectuosos, actividad alterada de las células NK, alteración en la producción de IL-2 por los linfocitos, producción reducida del factor inhibidor de la migración de macrófagos, de IgG e IL-6, deterioro de la hipersensibilidad cutánea retardada y respuestas ineficaces de anticuerpos después de la vacunación.

El hierro es un nutriente esencial para la mayor parte de los tejidos, un factor importante en la actividad vital de cada célula del organismo y cumple varias funciones biológicas fundamentales, como transporte y almacenamiento de oxígeno, crecimiento y proliferación celular, metabolismo oxidativo y resistencia a enfermedades.

La OMS establece que la deficiencia de hierro es la deficiencia de micronutrientes más prevalente en todo el mundo y se considera uno de los principales trastornos por deficiencia nutricional. Más de dos mil millones de personas en todo el mundo están afectadas por esta deficiencia y la anemia por deficiencia de hierro sigue siendo la principal causa de anemia.

Se ha puesto de manifiesto los efectos beneficiosos del consumo de leche fermentada de cabra en la recuperación de la anemia ferropénica, ya que mejora la utilización nutritiva de proteína, grasa y minerales, aumenta la biodisponibilidad de minerales minimizando sus interacciones, protege la estabilidad del material genético y mejora la señalización inflamatoria.

La leche fermentada es un producto lácteo obtenido por medio de la fermentación de la leche, que puede haber sido elaborado a partir de productos obtenidos de la leche, por medio de la acción de microorganismos adecuados e inocuos y teniendo como resultado la reducción del pH. Estos cultivos de microorganismos serán viables, activos y abundantes en el producto hasta la fecha de duración mínima.

Los procesos de fermentación generalmente mejoran el interés nutricional de muchos alimentos y aumentan la biodisponibilidad de nutrientes. La acción de la fermentación de cepas específicas de bacterias del ácido láctico puede conducir a la eliminación de factores tóxicos o antinutricionales, como la transformación de lactosa en ácido láctico, así como la formación de otros componentes bioactivos. El proceso de fermentación también conduce a una actividad proteolítica de caseína y produce liberación de aminoácidos y péptidos. Además, las enzimas bacterianas transforman los carbohidratos de la leche en oligosacáridos, algunos de los cuales tienen propiedades prebióticas.

Más allá del valor nutricional de la leche, los derivados fermentados presentan otros componentes tales como probióticos, prebióticos, glicoproteínas, anticuerpos y oligosacáridos, que favorecen el desarrollo del epitelio intestinal y la captación de nutrientes.

La microbiota intestinal es fundamental para el desarrollo y mantenimiento del sistema inmunológico. Los productos lácteos fermentados y probióticos contienen microorganismos vivos beneficiosos que pueden interactuar con la microbiota durante el tránsito intestinal y las células de la pared intestinal y mejorar la microbiota intestinal. La evidencia científica sugiere que el consumo de productos lácteos fermentados puede tener un impacto positivo en la salud, potenciando las funciones inmunológicas.

La leche y los productos lácteos contienen péptidos bioactivos que aumentan la actividad de las células del sistema inmunológico y están involucrados en la

proliferación de linfocitos, la función de las células NK, la síntesis de anticuerpos y la producción de citocinas.

El consumo de leche fermentada de cabra es más beneficioso en comparación con la leche fermentada de vaca para mejorar los efectos de la anemia por deficiencia de hierro. Los resultados también sugieren que la leche fermentada de cabra promueve los mecanismos de expresión de genes relacionados con el hierro, aumentando la biodisponibilidad de hierro y su repleción, después de la anemia inducida, un hecho que puede tener implicaciones significativas en poblaciones que sufren deficiencias nutricionales para recuperar la anemia por deficiencia de hierro.

Además, la leche de cabra mejora el perfil lipídico plasmático, disminuyendo los niveles de colesterol, debido a su elevado contenido en triglicéridos de cadena media, que reducen la síntesis de colesterol endógeno y su absorción intestinal, favoreciendo la captación de estos triglicéridos a nivel intestinal y su utilización como fuente de energía no acumulable, lo que supone un efecto trófico para el enterocito. La leche de cabra también presenta unas propiedades nutricionales altamente beneficiosas debido a su influencia positiva en el metabolismo del hierro en situación de ferropenia, turnover óseo y defensa enzimática antioxidante. La leche de cabra fermentada reduce los niveles séricos de cortisol, disminuyendo el efecto perjudicial que esta hormona ejerce sobre la función inmunitaria y la apoptosis celular inducida por el estrés.

Además, la leche de cabra fermentada eleva los niveles de melatonina, una hormona que regula diversas funciones con múltiples funciones inmunomoduladoras y antiinflamatorias, hallazgos que junto con los beneficios inducidos en el metabolismo del hierro se podrían traducir en una mejora del metabolismo general que influya de manera positiva en el estado inmunitario.

Objetivos

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es evaluar el efecto del consumo de una dieta basada en fermentados lácteos de cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro y sus repercusiones sobre el estado nutricional y el funcionamiento del sistema inmunológico durante la recuperación de la anemia ferropénica nutricional.

Material y métodos

El diseño experimental de este estudio comprende dos periodos:

- **Período pre-experimental (PPE)**

Las ratas recién destetadas (n=80) fueron divididas aleatoriamente en dos grupos experimentales (40 animales por grupo) alimentados *ad libitum* durante 40 días con dieta AIN-93G, con contenido normal de hierro (grupo control, 45 mg/kg de dieta) (Reeves et al., 1993) o bajo contenido de hierro (grupo anémico, 5 mg/kg de dieta), para la inducción experimental de anemia (Pallarés et al., 1993). Para la elaboración de la dieta con bajo contenido en hierro se omitió el hierro del suplemento mineral y se les administró agua desionizada destilada.

- **Período experimental (PE)**

A continuación, se inició el PE, en el que ambos grupos pre-experimentales (control y anémico) fueron alimentados *pair feed* durante 30 días con las dietas objeto de estudio: dieta elaborada con un producto fermentado de leche de cabra (n =40) y dieta elaborada con un producto fermentado de leche de vaca (n = 40), ambas con contenido normal (45 mg/kg dieta) o sobrecarga de hierro (450 mg/kg dieta) (Raja et al., 1994) para proceder a la recuperación de la anemia ferropénica nutricional inducida. El patrón de ingesta dietética fue *pair feed*, asegurando que los animales ingirieran el 80% de la ingesta media de cada periodo al día para evitar diferencias debidas a la cantidad de dieta ingerida, y el agua desionizada estaba disponible *ad libitum*.

Al finalizar el PPE y PE, tras 24 horas de ayuno, se procedió a la obtención de sangre periférica de la vena caudal para el control hematológico y bioquímico de la anemia, y se determinó la composición corporal con un dispositivo de resonancia magnética Echo MRI Analyzer System (Echo Medical Systems, Houston, TX).

Seguidamente, las ratas fueron desangradas completamente por canulación de la arteria aorta abdominal y sacrificadas, previa anestesia con pentobarbital sódico (Sigma Diagnostic, St Louis, MO), a una dosis de 5 mg/kg de peso por vía intraperitoneal siguiendo las directrices del Comité de Ética de la Universidad de Granada. Tras el sacrificio de los animales de experimentación se procedió, de la forma más rápida posible, a la extracción, procesado y conservación de los órganos (hígado, timo y bazo), para inducir las menores alteraciones posibles. Las muestras de suero se almacenaron a -

80°C hasta el posterior análisis de los biomarcadores de la función inmunitaria, la lactoferrina y la evaluación funcional de la actividad de las vías del complemento.

Resultados y discusión

Después de la ingesta de una dieta con bajo contenido en hierro durante 40 días, todos los parámetros hematológicos fueron menores en el grupo anémico con respecto al grupo control, excepto el valor de ADE que fue mayor en el grupo anémico.

El recuento de monocitos y el recuento de plaquetas fueron mayores durante la inducción de la anemia ferropénica nutricional, por lo tanto, la proporción de PLR también aumentó.

Además, durante la deficiencia de hierro se observó un aumento en los niveles séricos de hepcidina sérica, lo que da lugar a una reducción de los niveles plasmáticos de hierro, limitando la proliferación de los microorganismos patógenos

Una vez finalizó la administración de las dietas basadas en leches fermentadas de cabra o vaca, se observó que el peso corporal fue estadísticamente mayor en los animales alimentados con dieta a base de leche fermentada de cabra.

Uno de los principales activadores inmunitarios de la infiltración tisular de eosinófilos es la quimioquina eotaxina, que induce la liberación de especies reactivas de oxígeno, y es quimioatrayente e, indirectamente, es un agente dañino tisular en los lugares de inflamación. Asimismo, la fractalquina aumenta la transferencia de células inflamatorias y la destrucción de tejidos a través del aumento de la secreción de TNF- α , metaloproteinasas de matriz e IFN- γ . La dieta basada en fermentados lácteos de cabra suprimió la expresión de eotaxina y fractalcina.

El consumo de dieta basada en fermentados lácteos de cabra disminuye los niveles séricos citocinas proinflamatorias (IL-6 y TNF- α) y aumenta los de las citocinas antiinflamatorias (IL-4 e IL-10) debido a las propiedades antiinflamatorias de sus lípidos y al mayor contenido en ácido linoleico, en comparación con la dieta basada en fermentados lácteos de vaca.

La dieta basada en fermentados lácteos de cabra también indujo una disminución de la proteína MCP-1 que puede atribuirse al alto valor nutricional de la grasa y disminuye la generación de radicales libres y la migración y adhesión de monocitos

En el presente estudio, se han registrado niveles más altos de IFN- γ en animales alimentados con dieta basada en fermentados lácteos de cabra, los cuales se pueden atribuir a sus factores bioactivos, como proteínas, ácidos grasos poliinsaturados, oligosacáridos y micronutrientes presentes en la leche de cabra que confieren colonización inmunológica de la microbiota intestinal mejorando el desarrollo intestinal y disminuyendo la inflamación.

La lactoferrina influye en sistema inmunitario, regulando negativamente la activación, la migración y el crecimiento de las células inmunitarias. La lactoferrina es una proteína quelante de hierro y tiene una alta afinidad por el hierro férrico, lo que priva a los microbios del hierro libre necesario para su crecimiento, lo que explica los bajos niveles de esta proteína durante la anemia por deficiencia de hierro. Se han observado niveles más bajos de lactoferrina al consumir la dieta basada en fermentados lácteos de cabra.

La sobrecarga de hierro se asocia con funciones suprimidas del sistema del complemento (vía clásica y vía alternativa). En general, la dieta basada en fermentados lácteos de cabra aumenta la actividad de la vía clásica, vía alternativa y vía de las lectinas en animales controles y anémicos, ya sea con sobrecarga o contenido normal de hierro, mientras que la anemia disminuyó la actividad de las vías alternativa y de las lectinas, ya que la dieta basada en fermentados lácteos de cabra mejora la homeostasis del hierro, de importancia crítica en el funcionamiento normal del sistema inmunológico. Además, la dieta basada en fermentados lácteos de cabra aumenta la producción y la expresión de marcadores celulares relacionados con las respuestas innatas y adaptativas, lo que conduce a una mayor actividad del sistema del complemento.

Conclusiones

Primera conclusión

La dieta basada en fermentados lácteos de cabra durante la recuperación de la deficiencia de hierro influye positivamente en el estado nutricional y la composición corporal, disminuyendo la masa grasa y aumentando la masa magra, agua libre y agua total.

Segunda conclusión

El consumo de la dieta basada en fermentados lácteos de cabra disminuye los niveles séricos de citocinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-2, IL-12p70, IP-10 y TNF- α) y aumenta los de citocinas antiinflamatorias (IL-4, IL-13 e IL-10) gracias a las propiedades antiinflamatorias de sus lípidos y al mayor contenido en ácido linoleico, en comparación con la dieta basada en fermentados lácteos de vaca.

Tercera conclusión

La dieta basada en fermentados lácteos de cabra disminuye la expresión de las citocinas eotaxina y fractalquina debido a la reducción en la producción de especies reactivas de oxígeno y citocinas proinflamatorias como el TNF- α , que junto al incremento de los niveles séricos de IFN- γ , contribuyen a mejorar la respuesta inmune sistémica.

Cuarta conclusión

El consumo de dieta basada en fermentados lácteos de cabra indujo una disminución de la expresión de la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), que puede atribuirse al alto valor nutricional de su grasa, que proporciona un menor sustrato para la peroxidación de lípidos y generación de radicales libres y, en consecuencia, disminuye la adhesión y la migración de los monocitos. Además, la capacidad de los péptidos presentes en leche fermentada de cabra para inhibir los cambios deletéreos causados por la oxidación de los lípidos parece estar relacionada con ciertos residuos de aminoácidos, como la tirosina, la metionina, la histidina, la lisina y el triptófano, que inhiben la oxidación de los lípidos y reducen los hidroperóxidos.

Quinta conclusión

La dieta basada en fermentados lácteos de cabra aumenta la actividad de la vía clásica, la vía alternativa y la vía de las lectinas del sistema del complemento, junto con una disminución de los niveles séricos de lactoferrina, modificando la homeostasis del hierro, debido a su gran afinidad por este elemento, lo que priva a los microbios del hierro libre necesario para su crecimiento y de su propensión a interactuar con las superficies de las células microbianas y del huésped, influyendo así en la compleja maquinaria inmunitaria y regulando a la baja la activación, migración y crecimiento de las células inmunitarias.

Conclusión general

El consumo de una dieta basada en leche fermentada de cabra, en comparación con la de vaca, mejora el estado nutricional y la composición corporal, propiciando un entorno más favorable para el correcto funcionamiento del sistema inmune. Además, condiciona positivamente la función inmunológica durante la recuperación de la anemia ferropénica, ya que disminuye la producción de quimiocinas inducidas por agentes oxidantes debido a la reducción simultánea de la producción de radicales libres y citoquinas proinflamatorias, y aumenta la producción y la expresión de biomarcadores relacionados con la respuestas innata y adaptativa, de vital importancia en el funcionamiento normal del sistema inmunitario.

Summary

1. SUMMARY

Introduction

The immune system is an organization of cells and molecules with specialized functions in defense against infection. They protect the skin, respiratory tract, intestinal tract, and other areas from microorganisms that can cause infection. Beyond the structural and chemical barriers that protect against infection, defense against microbes is mediated by early reactions of innate immunity and later responses of adaptive immunity. Both types of immunity work together to protect the human body from infection.

Innate immunity represents the first barrier of defense against infection used by the host immediately or a few hours after encountering an antigen. The components of innate immunity are present before infection, do not require a previous encounter or exposure to the agent, and do not selectively recognize a specific antigen. The innate immune response has no immunological memory and is therefore unable to recognize the same pathogen and will be identified as new if the human body is exposed to it in the future. The variability of antigenic structures, as well as the ability of pathogens to mutate to avoid host detection, has driven the evolution of the adaptive immune system.

Adaptive immunity specifically recognizes small parts of molecules (antigenic determinants or epitopes) for selective removal and uses three main strategies to combat most microbes: secreted antibodies that bind to extracellular microbes and promote their ingestion and subsequent destruction by phagocytes, phagocytes that ingest and destroy microbes, and cytotoxic T lymphocytes that destroy cells infected by microbes that are inaccessible to antibodies and phagocytic destruction. There are two types of adaptive immune responses, humoral immunity and cell-mediated immunity, which are moderated by different components of the immune system and function to eliminate different types of microbes.

The complement system is the most important humoral effector mechanism of the immune response and, added to the phagocytes, is the main responsible for innate immunity. It is made up of a series of plasma proteins, which are activated in a cascade by a powerful amplification mechanism. The complement system is determined by strong regulation by regulatory proteins that inhibit its activation, present in host cells

and not present in microbes. The complement system has three activation pathways: the classical, the alternative and the lectin pathway.

Iron is a fundamental element for the normal development of the immune system, for both the innate and adaptive immune response. Low iron levels exert a negative impact on host immunity that is reversible with iron therapy.

Iron has various effects on the immune system by modulating immune cell proliferation and differentiation, controlling various immune cell effector mechanisms and directly interfering with antimicrobial immune effector pathways. Its deficiency produces a reduction in the activity of neutrophils, altered intracellular bactericidal activity, decreased number of T lymphocytes, production of defective T lymphocytes, altered activity of NK cells, alteration in the production of IL-2 by lymphocytes, production reduced macrophage migration inhibitory factor, IgG, and IL-6, impaired delayed skin hypersensitivity, and ineffective antibody responses after vaccination

Iron is an essential nutrient for most tissues, an important factor in the vital activity of every cell in the body, and it has several fundamental biological functions, such as oxygen transport and storage, cell growth and proliferation, oxidative metabolism and resistance to diseases.

The WHO states that iron deficiency is the most prevalent micronutrient deficiency worldwide and is considered one of the main nutritional deficiency disorders. More than two billion people worldwide are affected by this deficiency and iron deficiency anemia remains the leading cause of anemia.

The beneficial effects of consuming fermented goat's milk in the recovery from iron deficiency anemia have been revealed, since it improves the nutritional utilization of protein, fat and minerals, increases the bioavailability of minerals minimizing their interactions, protects the stability of the material gene and enhances inflammatory signaling.

Fermented milk is a dairy product obtained through the fermentation of milk, which may have been made from products obtained from milk, through the action of suitable and harmless microorganisms and resulting in a reduction in pH. These cultures of microorganisms will be viable, active and abundant in the product until the date of minimum durability.

Fermentation processes generally improve the nutritional value of many foods and increase the bioavailability of nutrients. The fermentation action of specific strains of lactic acid bacteria can lead to the elimination of toxic or antinutritional factors, such as the transformation of lactose into lactic acid, as well as the formation of other bioactive components. The fermentation process also leads to proteolytic activity of casein and results in release of amino acids and peptides. In addition, bacterial enzymes transform milk carbohydrates into oligosaccharides, some of which have prebiotic properties.

Beyond the nutritional value of milk, fermented derivatives have other components such as probiotics, prebiotics, glycoproteins, antibodies and oligosaccharides, which promote the development of the intestinal epithelium and the uptake of nutrients.

The intestinal microbiota is essential for the development and maintenance of the immune system. Fermented dairy products and probiotics contain live beneficial microorganisms that can interact with the microbiota during intestinal transit and the cells of the intestinal wall and improve the intestinal microbiota. Scientific evidence suggests that the consumption of fermented dairy products can have a positive impact on health, boosting immune functions.

Milk and dairy products contain bioactive peptides that increase the activity of cells of the immune system and are involved in lymphocyte proliferation, NK cell function, antibody synthesis and cytokine production.

Fermented goat milk consumption is more beneficial compared to fermented cow milk in improving the effects of iron deficiency anemia. The results also suggest that fermented goat milk promotes iron-related gene expression mechanisms, increasing iron bioavailability and repletion after induced anemia, a fact that may have significant implications in populations suffering from nutritional deficiencies to recover iron deficiency anemia.

In addition, goat milk improves the plasma lipid profile, lowering cholesterol levels, due to its high content of medium-chain triglycerides, which reduce the synthesis of endogenous cholesterol and its intestinal absorption, favoring the uptake of these triglycerides at the intestinal level. and its use as a non-accumulative energy source, which implies a trophic effect for the enterocyte. Goat milk also has highly beneficial

nutritional properties due to its positive influence on iron metabolism in situations of iron deficiency, bone turnover and antioxidant enzyme defense. Fermented goat's milk lowers serum cortisol levels, reducing the detrimental effect this hormone has on immune function and stress-induced cell apoptosis.

In addition, fermented goat's milk raises melatonin levels, a hormone that regulates various functions with multiple immunomodulatory and anti-inflammatory functions, findings that, together with the benefits induced in iron metabolism, could translate into an improvement in general metabolism that influences positively on the immune status.

Aims

The general objective of this Doctoral Thesis is to evaluate the effect of fermented goat milk-based diet consumption with normal content or iron overload and its repercussions on the nutritional status and the immune system function during the recovery of nutritional iron deficiency anemia.

Material and methods

Pre-experimental period (PEP)

Eighty rats were randomly assigned to two experimental groups fed ad libitum for 40 days with AIN-93G diet, with normal iron content (control group, 45 mg/kg diet), or low iron content (anemic group, 5 mg/kg diet), for experimental induction of anemia.

Experimental period (EP)

Both pre-experimental groups were fed ad libitum for 30 days with diets based on a fermented goat's or cow's milk product, with normal iron content (45 mg/kg diet) or iron overload (450 mg/kg diet) (Raja et al., 1994) to proceed with the recovery of induced nutritional iron deficiency anemia.

At the end of the PPE and PE, after 24 hours of fasting, peripheral blood was obtained from the caudal vein for hematological and biochemical control of anemia, and body composition was determined with an Echo MRI Analyzer magnetic resonance device. System (Echo Medical Systems, Houston, TX).

Subsequently, the rats were completely bled by cannulation of the abdominal aortic artery and sacrificed, after anesthesia with sodium pentobarbital (Sigma

Diagnostic, St Louis, MO), at a dose of 5 mg/kg of weight intraperitoneally, following the guidelines of the Committee of Ethics of the University of Granada. After the sacrifice of the experimental animals, the organs (liver, thymus and spleen) were extracted, processed and preserved as quickly as possible, in order to induce the least possible alterations. Serum samples were stored at -80°C until further analysis of biomarkers of immune function, lactoferrin, and functional assessment of complement pathway activity.

Results and discussion

After induction of iron deficiency anemia during 40 days, all the hematological parameters in the anemic group were lower than control group, except RDW, which was higher in the anemic group.

Monocyte count and platelet count were higher during induction of nutritional iron deficiency anemia, therefore, the proportion of PLR was also increased.

In addition, during iron deficiency, an increase in serum hepcidin levels was observed, which leads to a reduction in plasma iron levels, limiting the proliferation of pathogenic microorganisms.

After supplying the fermented milk-based diets, it was observed that the body weight was statistically higher in the animals fed with fermented goat milk-based diet.

One of the main immune activators of eosinophil tissue infiltration is the chemokine eotaxin, which induces the release of reactive oxygen species, and is a chemoattractant and, indirectly, a tissue-damaging agent at sites of inflammation. In addition, fractalkine increases inflammatory cell transfer and tissue destruction through increased secretion of $\text{TNF-}\alpha$, matrix metalloproteinases and $\text{IFN-}\gamma$. Fermented goat milk-based diet suppressed the expression of eotaxin and fractalcin.

Fermented goat milk-based diet consumption decreases serum levels of proinflammatory cytokines (IL-6 and $\text{TNF-}\alpha$) and increases those of anti-inflammatory cytokines (IL-4 and IL-10) due to the anti-inflammatory properties of their lipids and higher content of linoleic acid, compared to fermented cow milk-based diet.

Fermented goat milk-based diet also induced a decrease in MCP-1 protein that can be attributed to the high nutritional value of fat and decreases the generation of free radicals and the migration and adhesion of monocytes.

In the current study, higher levels of IFN- γ have been recorded in animals fed fermented goat milk-based diet, which can be attributed to their bioactive factors, such as proteins, polyunsaturated fatty acids, oligosaccharides and micronutrients present in goat's milk which confer immunological colonization of gut microbiota, improving intestinal development and downregulating inflammation.

Lactoferrin influences the complex immune machinery, downregulating immune cell activation, migration and growth. Lactoferrin has a high affinity for ferric iron, which deprives microbes of the free iron necessary for their growth and of its propensity to interact with microbial and target host cell surfaces, explaining the low levels of this protein during iron deficiency anemia. Lower levels of lactoferrin have been observed with fermented goat milk-based diet consumption.

Iron overload is associated with suppressed functions of the complement system (classical and alternative pathway). In general, fermented goat milk-based diet increases classical, alternative and lectin complement pathway activity in control and anemic animals either with normal or iron overload, while anemia decreased the lectin and alternative activity because fermented goat milk-based diet improves iron homeostasis, which is critically important in the normal function of the immune system. In addition, fermented goat milk-based diet increases the production and expression of cellular markers related to innate and adaptive responses, leading to increased complement system activity.

Conclusions

First conclusion

Fermented goat milk-based diet during nutritional iron deficiency recovery positively influences nutritional status and body composition, decreasing fat mass and increasing lean mass, free water and total water.

Second conclusion

Fermented goat milk-based diet consumption decreases the serum levels of proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-2, IL-12p70, IP-10 and TNF- α) and increases those of anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-13 and IL-10) thanks to the anti-inflammatory properties of their lipids and the higher content of linoleic acid, compared to cow milk-based diet.

Third conclusion

Fermented goat milk-based diet decreases the expression of eotaxin and fractalkine due to the reduction in the production of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines such as TNF- α , added to the increase in serum levels of IFN- γ , contribute to improving the systemic immune response.

Fourth conclusion

Fermented goat milk-based diet consumption decreases the expression of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), which can be attributed to the high nutritional fat value, which provides a lower substrate for lipid peroxidation and generation of free radicals and, consequently, decreases the adhesion and migration of monocytes. Furthermore, the ability of fermented goat milk peptides to inhibit deleterious changes caused by lipid oxidation can be related to certain amino acid residues, such as tyrosine, methionine, histidine, lysine, and tryptophan that inhibit lipid oxidation and reduce hydroperoxides.

Fifth conclusion

Fermented goat milk-based diet increases the classical, lectin and alternative complement pathway activity, added to a decrease in serum levels of lactoferrin, modifying iron homeostasis, due to its high affinity for this element, depriving microbes of the free iron necessary for their growth and their propensity to interact with microbial and host cell surfaces, influencing the complex immune machinery and downregulating activation, migration and growth of immune cells.

Overall conclusion

Fermented goat milk-based diet consumption, compared to cow milk-based diet, improves nutritional status and body composition, providing a more favorable environment for the correct functioning of the immune system. In addition, it positively conditions immune function during nutritional iron deficiency anemia recovery, since it decreases the production of chemokines induced by oxidizing agents due to the simultaneous reduction in the production of free radicals and proinflammatory cytokines, and increases the production and expression of biomarkers related to innate and adaptive responses, of vital importance in the normal functioning of the immune system.

Antecedentes bibliográficos

2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2.1 SISTEMA INMUNE

El sistema inmunológico es una organización de células y moléculas con funciones especializadas en la defensa contra infecciones. Protegen la piel, las vías respiratorias, el tracto intestinal y otras áreas de microorganismos susceptibles de producir una infección (Marshall et al., 2018). Estos microorganismos se clasifican en:

- Bacterias: dependiendo de si infectan al interior o al exterior celular estas bacterias se denominan:
 - Extracelulares, que pueden producir:
 - Endotoxinas: generalmente componentes de la pared celular bacteriana como lipopolisacáridos (LPS) y péptidoglicanos.
 - Exotoxinas: sintetizadas por la bacteria al medio exterior.
 - Intracelulares: crecen en el interior de las células y son inaccesibles a los anticuerpos.
- Virus: infectan el interior de la célula.
- Hogos: infectan el exterior de la célula.
- Parásitos, que se clasifican en:
 - Protozoos: extracelulares o intracelulares.
 - Helmintos: extracelulares.
- Priones: No se ha detectado inmunidad contra priones, el sistema inmune no los considera extraños. Desarrollan su actividad patógena en el cerebro (Murphy et al., 2011).

Más allá de las barreras estructurales y químicas que protegen de las infecciones, la defensa contra los microbios está mediada por las reacciones tempranas de la inmunidad innata y las respuestas posteriores de la inmunidad adaptativa (Abbas et al., 2011). Ambos tipos de inmunidad trabajan en conjunto para proteger al cuerpo humano de infecciones. La falta o defecto de uno o más componentes de la respuesta inmune conducen a una susceptibilidad a enfermedades infecciosas cuya severidad dependerá de la célula afectada y del tipo de defecto (Ochoa Ramírez, 2011).

Muchos microbios patógenos han evolucionado para resistir la inmunidad innata, también llamada inespecífica o natural y su eliminación requiere los mecanismos de la inmunidad adaptativa, la cual también es conocida como específica o adquirida. Hay muchas conexiones entre el sistema inmunológico innato y adaptativo. La respuesta inmune innata estimula e influye en la naturaleza de las respuestas inmunes adaptativas (Figura 1) (Abbas et al., 2011).

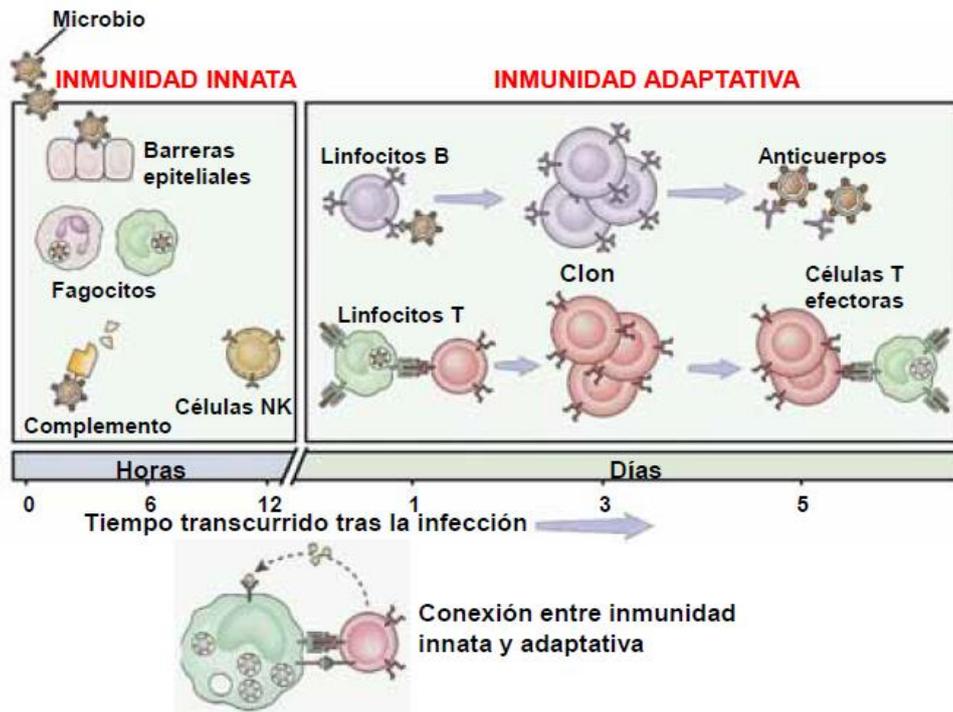


Figura 1. Inmunidad innata y adaptativa. (Modificada de Abbas et al., 2011).

2.1.1 Inmunidad innata

La inmunidad innata representa la primera barrera de defensa frente a infecciones utilizada por el huésped inmediatamente o pocas horas después de encontrar un antígeno (Abbas et al., 2011). Se considera antígeno cualquier tipo de sustancia que pueda ser específicamente reconocida por un anticuerpo o por un receptor de las células T (Murphy et al., 2011).

Los componentes de la inmunidad innata se encuentran presentes antes de la infección, no requiere de un encuentro o exposición previa al agente y no reconocen de manera selectiva a un antígeno concreto (Mazariegos Lanseros, 2009). El

reconocimiento del patógeno se realiza mediante la participación de receptores que identifican grupos de patrones moleculares o estructuras altamente conservadas comunes a un grupo o familia de patógenos. Son receptores no específicos frente a estructuras compartidas por diferentes patógenos, es decir, patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, pathogen-associated molecular patterns). Los PAMP son secuencias conservadas en células procariotas y no están presentes en eucariotas superiores. Estos patrones tienen funciones esenciales en procariotas donde poseen baja tasa de mutación e interactúan con los receptores de reconocimiento de patrones (PRR, pattern-recognition receptors) de las células superiores (Owen et al., 2013). Los componentes de la pared celular bacteriana tales como el lipopolisacárido (LPS) y el ácido ribonucleico bicatenario (ARN) producido durante una infección viral son ejemplos de PAMP (Marshall et al., 2018).

La respuesta inmune innata no tiene memoria inmunológica y, por lo tanto, es incapaz de reconocer al mismo patógeno y será identificado como nuevo si el cuerpo humano se expone a él en el futuro (Marshall et al., 2018). Es capaz de combatir la infección desde el mismo momento de su inicio con gran eficacia. Además, si no consigue eliminar la infección la mantiene bajo control mientras se desarrollan los mecanismos adaptativos (Murphy et al., 2011).

La inmunidad innata consiste en mecanismos de defensa celulares y bioquímicos, que reaccionan a los microbios y a los productos de las células lesionadas. Los componentes principales de la inmunidad innata son (Murphy et al., 2011):

- Barreras físicas y químicas, como epitelios y sustancias químicas antimicrobianas producidas en las superficies epiteliales.
- Células:
 - Granulocitos polimorfonucleares:
 - Neutrófilos
 - Eosinófilos
 - Basófilos
 - Monocitos y macrófagos: Los primeros existen en la circulación y cuando entran en el tejido y maduran, se convierten en los segundos. Realizan la fagocitosis y eliminación del microbio (Ochoa Ramírez, 2011).

- Mastocitos
- Células natural killer (NK): se consideran unas células puente entre la inmunidad innata y la adaptativa. Producen la lisis de células infectadas y de los microbios fagocitados. Secretan citoquinas que activan otras células, favoreciendo la fagocitosis. Además, producen citotoxicidad mediada por anticuerpo que consiste en que las células NK dirigen a las células efectoras inespecíficas hacia una diana concreta a través de la unión a los anticuerpos (Murphy et al., 2011).
- Moléculas
 - Proteínas de la sangre, incluidas las proteínas del sistema del complemento y las glucoproteínas como el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF).
 - Receptores PRR
 - Tipo Toll o TLR (Toll Like Receptor)
 - LPS
 - De detritos, depurador o scavenger
 - N-formilmetionina
 - Receptor de manosa
 - Proteínas llamadas citocinas inflamatorias y quimioquinas que regulan y coordinan muchas de las actividades de las células de la inmunidad innata como la activación de macrófagos y el rápido reclutamiento de células inmunes a los sitios de infección e inflamación. Las citocinas inflamatorias clave son: factor de necrosis tumoral (TNF), interferón gamma (INF- γ), interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), (Marshall et al., 2018) interleucina-4 (IL-4), que promueve la diferenciación a Th2; IL-10, que inhibe el desarrollo de células Th1 (Gallastegui et al., 2002); la eotaxina, que es altamente selectiva para los eosinófilos y actúa sobre la quimiotaxis de estas células; y proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1).
 - Otras moléculas solubles:
 - Colectinas (lectina de unión a manosa)
 - Proteínas de fase aguda
 - Anticuerpos naturales

- Proteínas con dominio de oligomerización y unión a nucleótido (NOD, nucleotide binding oligomerization domain)
 - Proteínas del sistema de las quininas
 - Proteínas del sistema de la coagulación

Cuando el patógeno ha atravesado las barreras físicas, la primera línea de defensa celular son los macrófagos que se localizan en los tejidos. Las funciones de los macrófagos son fagocitosis, eliminación de patógenos e inducción de la inflamación. Estos mecanismos se consideran parte de la respuesta innata. Además, en colaboración con la respuesta adaptativa, funcionan como células presentadoras de antígenos (APC) a los linfocitos T colaboradores Th1, éstos producen citoquinas que potencian a su vez la activación de los macrófagos, lo que produce más poder bactericida (Van de Veerdonk et al., 2009). Durante el proceso conocido como fagocitosis el microbio se adhiere a las invaginaciones de la membrana del fagocito o macrófago llamadas pseudópodos. El microbio es ingerido y se forma el fagosoma. Posteriormente, el lisosoma que se encuentra dentro del fagocito se fusiona con el fagosoma. En este momento las enzimas lisosomales digieren el material capturado. Por último, los productos de la digestión son liberados al medio por la célula a través de vesículas exocíticas (Regueiro et al., 2010; Owen et al., 2013). Durante la fagocitosis se producen efectos citotóxicos y microbicidas como son la respuesta enzimática lisosomal, la cual es oxígeno independiente y donde intervienen defensinas, lactoferrina, lisozima, proteasas, enzimas hidrolíticas y TNF; y también se produce el estallido respiratorio el cual es oxígeno dependiente y produce la formación de especies reactivas de oxígeno y productos tóxicos que ayudan a eliminar a los agentes patógenos (Murphy et al., 2011).

Para facilitar la fagocitosis intervienen los granulocitos polimorfonucleares, concretamente los neutrófilos que presentan receptores de superficie que reconocen los PAMP, para el sistema del complemento y los anticuerpos (Owen et al., 2013). Las funciones de los neutrófilos son la fagocitosis, eliminación de patógenos, inducción de la inflamación y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Estos mecanismos se consideran parte de la respuesta innata. Los mecanismos bactericidas de los neutrófilos son la acidificación, formación de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, péptidos antimicrobianos, lisozima, enzimas hidrolíticas y lactoferrina (Parham, 2009).

Este proceso de fagocitosis se puede llevar a cabo mediante un reconocimiento directo o indirecto.

- Reconocimiento directo mediante receptores de péptidos formilados que producen quimiotaxis y mediante receptores de PAMP:
 - Receptores tipo Toll (TLR): Los receptores TLR son receptores que se expresan principalmente en las células inmunitarias innatas, pero también están presentes en las células inmunitarias adaptativas y no inmunitarias. Detectan patrones moleculares conservados en microbios. Los TLR también detectan el daño tisular al unir moléculas endógenas liberadas por células muertas o estresadas. La participación de TLR desencadena inflamación y la maduración de las células dendríticas, lo que conduce a una mejora de la respuesta inmune adaptativa (Yatim & Lakkis, 2015).
 - Tipo lectina: receptores de manosa que producen fagocitosis.
 - Receptores basureros o scavenger: De lipoproteínas bacterianas que producen fagocitosis.
- Reconocimiento indirecto o mediante opsoninas:
 - Receptores de anticuerpos que producen fagocitosis.
 - Receptores de complemento que producen fagocitosis y quimiotaxis.

La acción fagocítica de la respuesta inmune innata promueve la eliminación de células muertas o complejos de anticuerpos y elimina las sustancias extrañas presentes en órganos, tejidos, sangre y linfa (Regueiro et al., 2010).

Para que sea posible la comunicación de las células del sistema inmunitario entre sí y con otras células son necesarias las citoquinas, que son un conjunto de proteínas de bajo peso molecular que sintetizan las células del sistema inmunitario en respuesta a los patógenos o sus productos, o a otras señales relacionadas. Sus funciones son regular la duración y la amplitud de la respuesta inmunitaria, tanto innata como adaptativa; reclutar células a la zona de conflicto; inducir la generación de nuevas células a partir de los precursores hematopoyéticos y también, pueden ejercer directamente funciones efectoras normalmente de naturaleza citotóxica o antiviral. A menudo tienen efecto local, actuando allí donde se produce el reconocimiento del antígeno, aunque también pueden actuar sobre dianas más alejadas. Los macrófagos y los linfocitos T activados

son la principal fuente productora de estas citoquinas, aunque también pueden ser producidas por otras células no pertenecientes al sistema inmunológico, como células endoteliales y fibroblastos (Parham, 2009).

Las citoquinas están estrechamente relacionadas con la respuesta inflamatoria la cual es una etapa esencial de la respuesta inmunitaria. En primer lugar, el daño tisular causa liberación de factores vasoactivos y quimiotácticos que desencadenan un aumento local del flujo sanguíneo y la permeabilidad de los capilares permite la salida de fluido y de células. Esto permite que los fagocitos migren al sitio de la inflamación, proceso que se denomina quimiotaxis. Por último, la fagocitosis y el exudado antibacteriano (complemento, anticuerpo y proteína C reactiva) destruye la bacteria (Ochoa Ramírez, 2011).

2.1.2 Inmunidad adaptativa

Aunque el sistema inmunológico innato ha evolucionado para detectar rápidamente y efectuar la eliminación de una amplia gama de patógenos, la gama de patrones moleculares de los patógenos comunes que puede reconocer es limitada. La variabilidad de las estructuras antigénicas, así como la capacidad de los patógenos de mutar para evitar la detección del huésped, ha impulsado la evolución del sistema inmunológico adaptativo (Bonilla & Oettgen, 2010). A diferencia de los receptores de reconocimiento del sistema inmunológico innato, que están todos codificados en el genoma de la línea germinal, las respuestas inmunitarias adaptativas dependen de receptores que se adaptan y seleccionan a través de un proceso de recombinación somática de una gran variedad de segmentos de genes (Yatim & Lakkis, 2015).

La inmunidad adaptativa reconoce de manera específica pequeñas partes de moléculas (determinantes antigénicos o epítopos) para eliminarlas de manera selectiva. Este tipo de inmunidad posee receptores muy específicos y es mucho más eficaz que la inmunidad innata (Bonilla & Oettgen, 2010). Los componentes principales de la inmunidad adaptativa son (Regueiro et al., 2010):

- Células: Linfocitos B, linfocitos T, linfocitos T colaboradores (CD4): Th1 y Th2, linfocitos T citotóxicos (CD8).
- Moléculas: En la superficie de la célula, llamados receptores de superficie: receptor del linfocito B para el antígeno (BCR): Inmunoglobulina o anticuerpo (Ac), receptor del linfocito T para el antígeno (TCR). Secretoras: inmunoglobulinas o Ac, citoquinas inflamatorias y quimioquinas.

El receptor de superficie específico del linfocito B para el antígeno se denomina inmunoglobulina, anticuerpo o BCR. Se secreta por los linfocitos B que se diferencian en células plasmáticas. Estos receptores o anticuerpos pueden reconocer prácticamente cualquier tipo de molécula biológica. Los anticuerpos forman parte del BCR y reconocen solo un epítipo (Marshall et al., 2018).

El receptor de superficie específico del linfocito T para el antígeno se denomina TCR. No se secreta, solo reconoce el antígeno desde la superficie de la célula T. El TCR necesitan siempre que el antígeno sea procesado ya que sólo reconoce los antígenos en forma de pequeños péptidos presentados por las moléculas del antígeno leucocitario humano (HLA), que se definirán posteriormente, presentes en la superficie de la célula presentadora de antígeno. Por lo tanto, solo reconocen antígenos proteicos y no solubles (Abbas et al., 2011).

La inmunidad adaptativa se desarrolla como respuesta a la infección y se adapta a ella. Este tipo de inmunidad depende y es específica del antígeno y, por lo tanto, implica un lapso de tiempo entre la exposición al antígeno y la respuesta máxima. Esta respuesta aumenta en magnitud y capacidad defensiva con cada exposición sucesiva a una macromolécula en particular (Gallastegui et al., 2002).

La mayor particularidad de la inmunidad adaptativa es la capacidad de memoria que permite al huésped crear una respuesta inmune más rápida y eficiente tras la exposición posterior al antígeno (Marshall et al., 2018). La respuesta inmunitaria adaptativa tiene las siguientes características (Murphy et al., 2011):

- Clonalidad: Este término se refiere a un aumento en el número de células que expresan receptores idénticos para el antígeno y, por tanto, pertenecen a un clon. Este aumento de células específicas de antígeno permite que la respuesta inmune adaptativa siga el ritmo de los patógenos infecciosos que se dividen rápidamente. Hay muchos clones diferentes

de linfocitos que se diferencian en las estructuras de sus receptores de antígenos y, por tanto, en su especificidad por los antígenos, contribuyendo a un repertorio total y extremadamente diverso. La variación de los receptores de antígenos entre diferentes clones de células T y B es la razón por la que se dice que estos receptores están "distribuidos clonalmente" (Abbas et al., 2011).

- Especificidad: Asegura que distintos antígenos desencadenen respuestas específicas para moléculas distintas.
- Diversidad: Capacita al sistema inmunológico para responder a una gran variedad de antígenos. El sistema inmunitario necesita tener un número de clones de linfocitos diversos muy elevado porque el número potencial de patógenos es igualmente muy numeroso.
- Reconocimiento propio/extraño: Las anomalías en la inducción o el mantenimiento de la auto-tolerancia conducen a respuestas inmunes contra los propios antígenos (autólogos), que pueden resultar en trastornos llamados enfermedades autoinmunes.
- Memoria inmunológica: Produce un incremento de la respuesta a exposiciones repetidas del mismo antígeno
- Auto-limitación: Permite que el sistema inmunológico pueda responder a los antígenos nuevos que se encuentre
- Especialización: Genera respuestas que son óptimas para defenderse contra distintos tipos de microbios.

El sistema inmunológico adaptativo es capaz de reconocer y reaccionar con numerosas sustancias microbianas y no microbianas. Además, tiene una capacidad extraordinaria para distinguir entre microbios y moléculas diferentes, incluso estrechamente relacionados, y por esta razón también se le llama inmunidad específica o inmunidad adquirida, ya que las respuestas protectoras potentes son "adquiridas" por la experiencia. Los componentes principales de la inmunidad adaptativa son los linfocitos y sus productos secretados, como los anticuerpos (Regueiro et al., 2010; Abbas et al., 2011). Como se ha definido anteriormente, las sustancias extrañas que inducen respuestas inmunitarias específicas o son reconocidas por linfocitos o anticuerpos se denominan antígenos. Los mecanismos de defensa más especializados que constituyen la inmunidad adaptativa se encuentran únicamente en los vertebrados (Owen et al., 2013).

Las principales células del sistema inmunológico son los linfocitos, las células presentadoras de antígenos y las células efectoras. Estas células se organizan en tejidos especializados o en agrupaciones por todo el organismo. Los órganos encargados de la producción de estas células son la médula ósea, que da origen a las células madre pluripotenciales que dan lugar a células progenitoras mieloides o linfoides, y el timo, progenitor linfoide que da lugar a través de un proceso de maduración y selección, a los linfocitos T. Existen también órganos secundarios o periféricos como el bazo y los ganglios cuya estructura optimiza el contacto íntimo y las interacciones entre las poblaciones celulares que cooperan en la producción de las respuestas inmunitarias. El sistema linfático es el encargado de conectar entre sí todos estos núcleos además de mantener la volemia y capturar los antígenos presentes en líquido intersticial de los tejidos llevándolos a los ganglios donde quedan retenidos e interaccionan con las células del sistema inmunológico (Gallastegui et al., 2002).

Hay dos tipos de respuestas inmunitarias adaptativas, la inmunidad humoral y la inmunidad mediada por células (Figura 2).

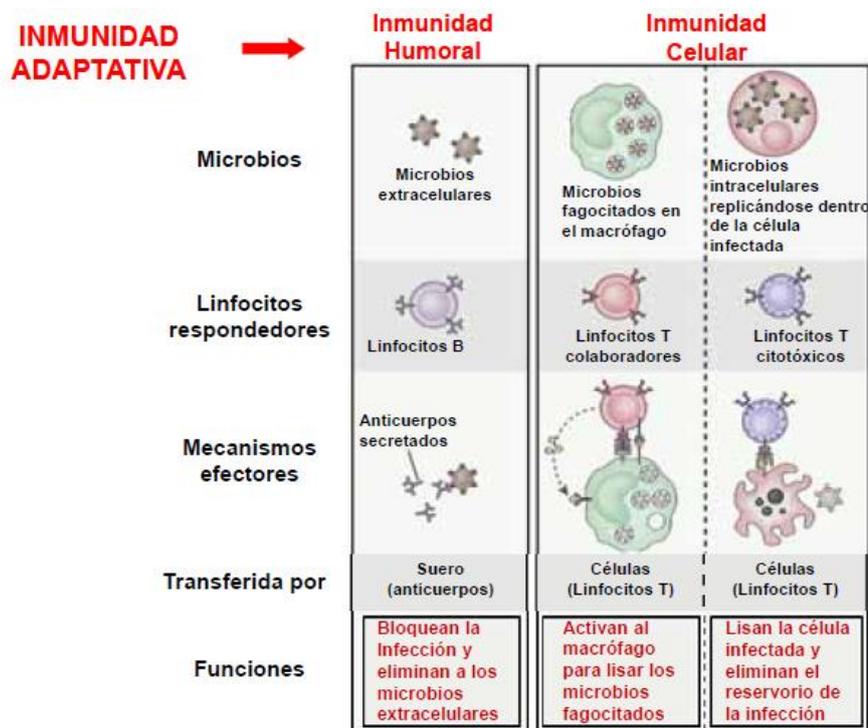


Figura 2. Inmunidad adaptativa. (Modificada de Abbas et al., 2011).

Los linfocitos son las células que reconocen específicamente y responden a antígenos extraños y, por lo tanto, son los mediadores de la inmunidad celular y humoral. Hay distintas subpoblaciones de linfocitos que difieren en la forma en que reconocen los antígenos y en sus funciones. Los linfocitos B son las únicas células capaces de producir anticuerpos. Reconocen antígenos extracelulares (incluida la superficie celular) y se diferencian en células plasmáticas secretoras de anticuerpos, por lo que funcionan como mediadores de la inmunidad humoral. Los linfocitos T, las células de la inmunidad mediada por células, reconocen los antígenos de los microbios intracelulares y ayudan a los fagocitos a destruir estos microbios o bien a matar directamente las células infectadas. Las células T no producen anticuerpos. Sus receptores de antígenos son moléculas de membrana distintas de los anticuerpos, pero relacionadas estructuralmente con ellos. Los linfocitos T tienen una especificidad limitada por los antígenos; reconocen péptidos que se unen a proteínas del huésped llamadas moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (Goldsby et al., 2003). El MHC es un elemento clave asociado a las células, imprescindible para el desarrollo de la respuesta inmunitaria. En el ser humano se identifica como HLA (antígeno leucocitario humano), y su presencia es imprescindible para la presentación del antígeno. Sólo los antígenos presentados por el HLA, pueden ser reconocidos por los linfocitos T (Gallastegui et al., 2002). El antígeno puede asociarse a moléculas del MHC de clase I o II, el primero para antígenos citosólicos y el segundo para antígenos fagocitados; y su presentación en membrana a linfocitos T, ya sean CD4 o CD8 (Ochoa Ramírez, 2011). Las moléculas HLA de clase I se expresan en la mayoría de las células del organismo y, en general, presentan péptidos intracelulares a los linfocitos T CD8. Mientras que las moléculas HLA de clase II, se expresan predominantemente en las APC (macrófagos y monocitos, células B, células dendríticas y linfocitos T activados) y presentan péptidos extracelulares a los linfocitos T CD4 (Abbas et al., 2011).

Como resultado, estas células T reconocen y responden a antígenos asociados a la superficie celular pero no solubles. Los linfocitos T consisten en poblaciones funcionalmente distintas, que incluyen las células T colaboradoras y los linfocitos T citotóxicos o citolíticos (CTL). En respuesta a la estimulación antigénica, las células T colaboradoras secretan proteínas llamadas citocinas, que son responsables de muchas de las respuestas celulares de la inmunidad innata y adaptativa y, por tanto, funcionan como "moléculas mensajeras" del sistema inmunológico. Las citocinas secretadas por

los linfocitos T colaboradores estimulan la proliferación y diferenciación de las propias células T y activan otras células, incluidas las células B, los macrófagos y otros leucocitos. Los CTL destruyen las células que producen antígenos extraños, como las células infectadas por virus y otros microbios intracelulares. Una tercera clase de linfocitos, las células NK, están involucradas en la inmunidad innata contra virus y otros microbios intracelulares. Las diferentes clases de linfocitos se pueden distinguir por la expresión de proteínas de superficie, que se denominan moléculas CD (Marshall et al., 2018). Así se pueden distinguir las siguientes poblaciones:

- Población CD4 o linfocitos T colaboradores (Th): Expresa en la membrana la molécula CD4. Sólo reconocen al antígeno cuando es presentado en conjunción con una molécula de histocompatibilidad de clase II. Existen dos tipos, las células Th1 y las Th2 (Gallastegui et al., 2002).

Th1: Su función es la activación de macrófagos para la eliminación de microbios fagocitados. Además, secretan IFN- γ , el cual promueve mayor diferenciación a Th1, a la vez que inhibe la proliferación de células Th2. Los Th1 también pueden activar a neutrófilos por medio de la secreción de citocinas como linfotoxina (LT) y factor de necrosis tumoral (TNF) (Van de Veerdonk et al., 2009; Ochoa Ramírez, 2011).

Th2: Su función es la erradicación de patógenos extracelulares. Además, producen la activación de células B para la producción de anticuerpos principalmente IgE, que promueven la desgranulación de mastocitos y de eosinófilos, importantes en el desarrollo de respuestas alérgicas y en defensa contra helmintos, respectivamente. También produce la activación de macrófagos para reparar tejidos y produce la supresión de la inflamación secretando interleucina-4 (IL-4), que promueve la diferenciación a Th2; e IL-10, que inhibe el desarrollo de células Th1 (Gallastegui et al., 2002).

- Población CD8 o linfocitos T citotóxicos (CTL): Expresan en la membrana la molécula CD8. Sólo reconocen al antígeno cuando es presentado en conjunción con una molécula de histocompatibilidad de clase I. La activación de los CTL está estrechamente relacionada con la de los Th1, ya que requieren de los mismos factores, incluidas las citocinas IL-2 e IL-12. Sus principales funciones son la citotoxicidad y la inmunosupresión (Goldsby et al., 2003; Ochoa Ramírez, 2011).

2.1.2.1 Desarrollo de la inmunidad adaptativa

La iniciación y el desarrollo de respuestas inmunes adaptativas requieren que los antígenos sean capturados y mostrados a linfocitos específicos. Las células que realizan esta función se denominan células presentadoras de antígeno (APC). Las APC más especializadas son las células dendríticas, que capturan antígenos que ingresan desde el ambiente externo, transportan estos antígenos a los órganos linfoides y presentan los antígenos a los linfocitos T vírgenes para iniciar respuestas inmunes. Otros tipos de células también funcionan como APC en diferentes etapas de la respuesta inmunitaria humoral y mediada por células (Yatim & Lakkis, 2015).

La activación de los linfocitos por el antígeno conduce a la generación de numerosos mecanismos que funcionan para eliminar el antígeno. La eliminación de antígenos a menudo requiere de la participación de células que se denominan células efectoras porque median el efecto final de la respuesta inmune, que es la eliminación de los microbios. Los linfocitos T activados, los fagocitos mononucleares y otros leucocitos funcionan como células efectoras en diferentes respuestas inmunes. Los linfocitos y las APC se concentran en órganos linfoides anatómicamente independientes, donde interactúan entre sí para iniciar respuestas inmunitarias. Los linfocitos también están presentes en la sangre donde pueden recircular hacia los tejidos linfoides y hacia los tejidos periféricos de exposición al antígeno para eliminarlos (Abbas et al., 2011).

El sistema inmunológico adaptativo utiliza tres estrategias principales para combatir la mayoría de los microbios (Murphy et al., 2011):

- Los anticuerpos secretados se unen a microbios extracelulares, bloquean su capacidad para infectar las células del huésped y promueven su ingestión y posterior destrucción por fagocitos.
- Los fagocitos ingieren microbios y los destruyen, y las células T colaboradoras mejoran las capacidades microbicidas de los fagocitos.
- Los CTL destruyen las células infectadas por microbios que son inaccesibles a los anticuerpos y la destrucción fagocítica.

El objetivo de la respuesta adaptativa es activar uno o más de estos mecanismos de defensa contra diversos microbios que pueden estar en diferentes ubicaciones anatómicas, como la luz intestinal, la circulación o el interior de las células.

Por lo tanto, la respuesta inmunitaria adaptativa tiene tres fases: fase de reconocimiento, de activación y efectora. Además, como se ha mencionado anteriormente, hay dos tipos de respuestas inmunitarias adaptativas, la inmunidad humoral y la inmunidad mediada por células, que están moderadas por diferentes componentes del sistema inmunológico y funcionan para eliminar diferentes tipos de microbios (Abbas et al., 2011).

2.1.2.2 Inmunidad humoral (activación de linfocitos B)

La inmunidad humoral está mediada por moléculas en la sangre y secreciones mucosas, llamadas anticuerpos, que son producidas por los linfocitos B y se encuentran asociados a su membrana. Los anticuerpos reconocen los antígenos microbianos, neutralizan la infectividad de los microbios y atacan a los microbios para su eliminación mediante diversos mecanismos efectores. La inmunidad humoral es el principal mecanismo de defensa contra los microbios extracelulares y sus toxinas porque los anticuerpos secretados pueden unirse a estos microbios y toxinas y ayudar a su eliminación. Los anticuerpos en sí mismos están especializados y pueden activar diferentes mecanismos efectores (Ochoa Ramírez, 2011).

Al activarse, los linfocitos B proliferan y se diferencian en células que secretan diferentes clases de anticuerpos con distintas funciones. La respuesta de los linfocitos B a los antígenos requiere la activación a través de señales de “ayuda” procedentes los linfocitos T colaboradores CD4 (esta es la razón por la que se llama a estas células colaboradoras o helper) (Owen et al., 2013).

Parte de los clones de linfocitos B se diferencian en células plasmáticas secretoras de anticuerpos. Cada célula plasmática secreta anticuerpos que tienen el mismo sitio de unión al antígeno que la superficie celular de los anticuerpos que reconocieron por primera vez el antígeno. Los polisacáridos y los lípidos estimulan la secreción principalmente de la clase de anticuerpos denominada IgM. Los antígenos proteicos inducen la producción de anticuerpos de clases funcionalmente diferentes

(IgG, IgA, IgE) a partir de un solo clon de linfocitos B. La producción de estos diferentes anticuerpos, todos con la misma especificidad, se denomina cambio de clase de cadena pesada y requiere la acción de los linfocitos T colaboradores y proporciona plasticidad en la respuesta del anticuerpo, lo que le permite cumplir muchas funciones. Los linfocitos T colaboradores también estimulan la producción de anticuerpos con mayor afinidad por el antígeno. Este proceso, denominado maduración por afinidad, mejora la calidad de la respuesta inmunológica humoral (Marshall et al., 2018).

La respuesta inmunitaria humoral combate los microbios de muchas formas. Los anticuerpos se unen a los microbios y evitan que estos infecten las células, neutralizando así los microbios y bloqueando su capacidad para infectar células huésped o colonizar tejidos. De hecho, los anticuerpos son los únicos mecanismos de inmunidad adaptativa que evitan que se establezca una infección. Ésta es la razón por la que inducir la producción de anticuerpos potentes es un objetivo clave de la vacunación. Los anticuerpos IgG recubren los microorganismos y así facilitan su fagocitosis porque los fagocitos (neutrófilos y macrófagos) expresan receptores para las IgG. Tanto la IgG como la IgM activan el sistema del complemento por la vía clásica, y estos productos del complemento promueven la fagocitosis y la destrucción de microbios. Algunos anticuerpos cumplen funciones especiales en lugares anatómicos particulares. La IgA se secreta desde el epitelio de las mucosas y neutraliza los microbios de la luz de los tractos respiratorio y gastrointestinal, así como de otros tejidos de las mucosas. La IgG materna se transporta activamente a través de la placenta y protege al recién nacido hasta que el sistema inmunológico del bebé madura. La mayoría de los anticuerpos tienen una vida media de unos pocos días, pero algunos anticuerpos IgG tienen una vida media de aproximadamente 3 semanas. Algunas células plasmáticas secretoras de anticuerpos migran a la médula ósea y viven durante años, sin dejar de producir niveles bajos de anticuerpos. Los anticuerpos secretados por estas células plasmáticas de larga duración brindan protección inmediata si el microbio vuelve a infectar al individuo (Owen et al., 2013).

2.1.2.3 Inmunidad mediada por células (activación de linfocitos T)

La inmunidad mediada por células, también llamada inmunidad celular, está mediada por los linfocitos T. Los microbios intracelulares, como los virus y algunas

bacterias, sobreviven y proliferan dentro de los fagocitos y otras células huésped, donde no son accesibles a los anticuerpos circulantes. La defensa contra tales infecciones es una función de la inmunidad mediada por células, que promueve la destrucción de los microbios que residen en las células infectadas para eliminar los reservorios de la infección (Abbas et al., 2011).

Los linfocitos T colaboradores CD4 activados proliferan y se diferencian en células efectoras cuyas funciones están mediadas en gran medida por las citocinas secretadas. Una de las respuestas más tempranas de los linfocitos T colaboradores CD4 es la secreción de la interleucina-2 (IL-2). La IL-2 es un factor de crecimiento que actúa sobre los linfocitos activados por antígenos y estimula su proliferación, es decir, su expansión clonal. Parte de esta proliferación se diferencia en células efectoras que pueden secretar diferentes conjuntos de citocinas y, por lo tanto, realizar diferentes funciones (Regueiro et al., 2010). Las citocinas inflamatorias clave son: TNF, INF- γ , IL-1, IL-6, (Marshall et al., 2018) IL-4, que promueve la diferenciación a Th2; IL-10, que inhibe el desarrollo de células Th1 (Gallastegui et al., 2002); la eotaxina, que es altamente selectiva para los eosinófilos y actúa sobre la quimiotaxis de estas células; y MCP-1.

Muchas de estas células efectoras abandonan los órganos linfoides donde se generaron y migran a los sitios de infección y la inflamación que la acompaña. Cuando estos efectores diferenciados vuelven a encontrarse con microbios asociados a las células, se activan para realizar las funciones responsables de la eliminación de los microbios. Algunos linfocitos T efectoras del linaje de los linfocitos T colaboradores CD4 secretan citocinas que reclutan leucocitos y estimulan la producción de sustancias microbicidas en los fagocitos. Una de estas citocinas es el IFN- γ . Por lo tanto, estos linfocitos T colaboradores ayudan a los fagocitos a destruir a los patógenos infecciosos, ya que reconocen los antígenos microbianos presentes en los macrófagos que han fagocitado microorganismos. Otros linfocitos T efectoras CD4 secretan citocinas que estimulan la producción de una clase especial de anticuerpo llamado IgE y activan a los eosinófilos, que son capaces de eliminar parásitos que pueden ser demasiado grandes para ser fagocitados. Además, algunos linfocitos T colaboradores CD4 permanecen en los órganos linfoides y estimulan las respuestas de los linfocitos B (Owen et al., 2013).

Los linfocitos T colaboradores CD8 activados proliferan y se diferencian en CTL que tienen capacidades líticas y destruyen a las células que albergan microbios en el citoplasma. Estos microbios pueden ser virus que infectan muchos tipos de células o bacterias que son ingeridas por macrófagos, pero escapan de las vesículas fagocíticas al citoplasma (donde son inaccesibles a la destrucción de los fagocitos, que en gran parte es realizada por las vesículas). Al destruir las células infectadas, los CTL eliminan los reservorios de infección. Además, los linfocitos TC también refuerzan la inmunidad innata al secretar citocinas como el TNF- α , la linfotóxina y el IFN- γ (Ochoa Ramírez, 2011).

2.1.3 El sistema del complemento

Es el mecanismo efector humoral más importante de la respuesta inmunológica y, junto con los fagocitos, es el principal responsable de la inmunidad innata. Está formado por una serie de proteínas plasmáticas, que se activan en cascada por un potente mecanismo de amplificación. Estas proteínas se sintetizan como proenzimas o zimógenos (inactivos), por hepatocitos, macrófagos, monocitos y células epiteliales del tracto urogenital y gastrointestinal. Se unen de forma covalente a los microbios y facilitan la eliminación directa o indirecta de los mismos, o la eliminación de los anticuerpos unidos a sus antígenos. El sistema del complemento está sujeto a una fuerte regulación mediante proteínas reguladoras que inhiben su activación, presentes en las células del anfitrión y las cuales no están presentes en los microbios. Solo se activa en la superficie de los microbios o en los lugares de unión de los anticuerpos a sus antígenos (Owen et al., 2013).

La activación del complemento depende de la generación de dos complejos proteolíticos: la convertasa C3, que escinde C3 en dos fragmentos proteolíticos llamados C3a y C3b; y la convertasa C5, que escinde C5 en C5a y C5b. Por convención, los productos proteolíticos de cada proteína del complemento se identifican mediante sufijos en minúsculas, “a” se refiere al producto más pequeño y “b” al más grande. C3b se une covalentemente a la superficie de la célula microbiana o a las moléculas de anticuerpo en el sitio de activación del complemento. Todas las funciones biológicas del complemento dependen de la escisión proteolítica de C3. La convertasa C5 se ensambla después de la generación previa de C3b, y esta convertasa contribuye tanto a la

inflamación (por la generación del fragmento C5a) como a la formación de poros en las membranas de los agentes patógenos. Las vías de activación del complemento difieren en la forma en que se produce C3b, pero siguen una secuencia común de reacciones después de la escisión de C5. El sistema del complemento tiene tres vías de activación (Figura 3):

- **Vía clásica:** Se activa sólo en respuesta a complejos antígeno - anticuerpo
- **Vía alternativa:** Se activan espontáneamente en la superficie de las células microbianas en ausencia de anticuerpos;
- **Vía de las lectinas:** Se activan espontáneamente en respuesta a carbohidratos en la superficie de las células microbianas

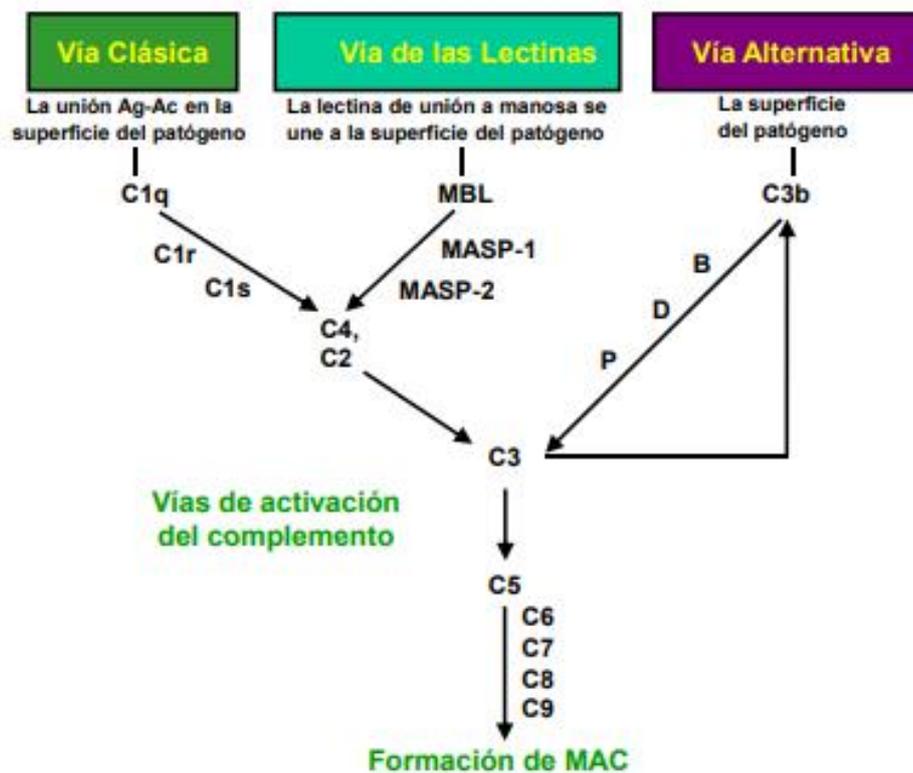


Figura 3. Tres vías de activación del sistema del complemento. (Elaboración propia).

2.1.3.1 Activación de la vía clásica

La vía clásica se inicia mediante la unión de la proteína del complemento C1 a la IgG o a la IgM que se han unido al antígeno. C1 es un gran complejo proteico

multimérico compuesto por subunidades. La subunidad C1q es la encargada de unirse al anticuerpo. Los C1 activados escinden la siguiente proteína en la cascada, C4, para generar C4b que puede interactuar y unirse con la siguiente proteína del complemento C2. C2 se une al fragmento C4b y se escinde C2, formando el complejo C4bC2a que escinde el siguiente componente de la vía, el C3 y genera el fragmento C3b. Así se forman el complejo C4b2a3b. Este complejo funciona como convertasa de C5 de la vía clásica e inicia los últimos pasos de la activación del complemento (Abbas et al., 2011) (Figura 3).

2.1.3.2 Activación de la vía alternativa

La vía alternativa de activación del complemento da como resultado la proteólisis de C3 y la unión estable de su producto de degradación C3b a las superficies microbianas. Cuando se produce el fragmento C3b, también queda expuesto un sitio de unión para una proteína plasmática llamada factor B. Después, el factor B se une a la proteína C3b que ahora está unida covalentemente a la superficie de una célula microbiana. El factor B unido es a su vez escindido por el factor D, liberando un pequeño fragmento llamado Ba y generando un fragmento más grande llamado Bb que permanece unido a C3b. El complejo C3bBb funciona para escindir más moléculas C3, estableciendo así una secuencia de amplificación. El resultado es la formación del complejo C3bBbC3b, que funciona como convertasa de C5 de la vía alternativa e inicia los últimos pasos de la activación del complemento. La activación de la vía alternativa se produce fácilmente en las superficies de las células microbianas y no en las células de los mamíferos (Owen et al., 2013) (Figura 3).

2.1.3.3 Activación de la vía de las lectinas

La vía de la lectina se desencadena en ausencia de anticuerpos por la unión de polisacáridos microbianos a lectinas circulantes como la lectina de unión a manosa (MBL). MBL es una proteína homologa a C1q. Una vez fijada a una superficie, la MBL puede activar dos serinas proteasas asociadas a manosa relacionadas con ella: MASP-1 y MASP-2. Estas producen la escisión de C4 y C2 para activar la vía del complemento.

Los pasos posteriores en esta vía son idénticos a los que ocurren en la vía clásica (Owen et al., 2013) (Figura 3).

2.1.3.4 Secuencia común o fase lítica del complemento

Las convertasas C5 generadas por la vía clásica, alternativa o de las lectinas inician la activación de los últimos pasos del sistema del complemento, que culmina en la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC). Las convertasas C5 escinden C5 en un pequeño fragmento C5a que se libera y un fragmento C5b que proporciona un sitio de unión para los componentes posteriores del MAC. El fragmento C5b se une a C6 y C7, el complejo resultante sufre un cambio conformacional que expone regiones hidrófobas en la superficie del componente C7 capaz de insertarse en el interior de la membrana microbiana, donde se convierte en un receptor de alta afinidad para la molécula C8. La proteína C8 se une al complejo C5b67. La unión de C8 a C5b67 induce un cambio conformacional en el dímero C8 de tal manera que C8 puede insertarse en el interior de la membrana fosfolipídica. El complejo C5b678 puede crear un poro pequeño, de 10 Å de diámetro, y la formación de este poro puede conducir a la lisis de los glóbulos rojos, pero no de las células nucleadas. El paso final en la formación del MAC es la unión de C9 al complejo C5b678. Las moléculas de C9 experimentan una transición, de modo que también pueden insertarse en la membrana. El MAC completo, que tiene una forma tubular y un diámetro de poro funcional de 70 Å a 100 Å, consta de un complejo C5b678 rodeado de 10 a 17 moléculas de C9 para formar poros en las membranas plasmáticas. Los poros formados son similares a los poros de la membrana formados por la perforina, la proteína granular citolítica que se encuentra en los linfocitos T citotóxicos y las células NK. La pérdida de la integridad de la membrana plasmática conduce irreversiblemente a la muerte celular (Abbas et al., 2011) (Figura 3).

2.1.3.5 Consecuencias biológicas de la activación del complemento

La respuesta biológica del sistema del complemento comprende cuatro acciones. En primer lugar, la eliminación directa o indirecta de patógenos. La eliminación directa

consiste en originar lisis de células, bacterias y virus por el complejo de ataque y la eliminación indirecta consiste en hacer a los patógenos susceptibles a la fagocitosis mediante la opsonización por recubrimiento con fragmentos de C3, proceso mediante el cual las células inmunitarias engullen a los microbios y eliminan los restos celulares (Gallastegui et al., 2002). Este proceso incluye recubrir la partícula extraña con fragmentos específicos del complemento que pueden ser reconocidos por receptores situados en las células fagocíticas. La segunda función es la generación de fragmentos e inflamación mediante atracción de células y moléculas gracias al proceso de quimiotaxis (Mazariegos Lanseros, 2009) de mastocitos y neutrófilos (a través de anafilotoxinas y quimioquinas como C5a, C4a y C3a), En tercer lugar, ocasiona la eliminación de inmunocomplejos circulantes y, por último, produce la regulación de la respuesta humoral (Marshall et al., 2018).

2.1.4 El hierro y la inmunidad

El hierro es un elemento fundamental para el desarrollo normal del sistema inmunológico, tanto para la respuesta inmune innata como para la adaptativa. Los niveles bajos de hierro ejercen un impacto negativo en la inmunidad del huésped que es reversible con terapia con hierro. Tiene varios efectos sobre el sistema inmunológico ya sea modulando la proliferación y diferenciación de las células inmunitarias, controlando diversos mecanismos efectores de las células inmunitarias e interfiriendo directamente con las vías efectoras inmunitarias antimicrobianas (Hassan et al., 2016; Haschka et al., 2021) Su déficit produce una reducción de la actividad de los neutrófilos, actividad bactericida intracelular alterada, disminución del número de linfocitos T, producción de linfocitos T defectuosos, actividad alterada de las células NK, alteración en la producción de IL-2 por los linfocitos, producción reducida del factor inhibidor de la migración de macrófagos, de IgG e IL-6, deterioro de la hipersensibilidad cutánea retardada y respuestas ineficaces de anticuerpos después de la vacunación (Oppenheimer, 2001; Hassan et al., 2016; Haschka et al., 2021) Además, distintas cantidades de hierro son un requisito previo para la traducción de TNF y otros ARN mensajeros de citocinas y promoción de respuestas antimicrobianas al estrés oxidativo (Nairz & Weiss, 2020).

La regulación de los niveles de hierro sistémico representa una importante defensa de primera línea contra las infecciones. Los patógenos invasores prosperan con el hierro libre en el torrente sanguíneo para proliferar y hacer avanzar su ataque. Ciertos microbios intracelulares han desarrollado técnicas especializadas para secuestrar el hierro de las células inmunes y mejorar su propia supervivencia. En este sentido, *Mycobacterium tuberculosis* y *Salmonella enterica* reducen la expresión de ferroportina y la exportación de hierro, lo que permite que haya más hierro intracelular para las bacterias. Por lo tanto, la infección conduce a cambios en la homeostasis del hierro y, por lo general, a hipoferrremia e hiperferritinemia (Haschka et al., 2021).

La identificación de la hepcidina ha permitido una mejor comprensión de la relación entre el sistema inmunológico y la homeostasis del hierro. El aumento de hepcidina pocas horas después de una infección o un ataque inflamatorio, da como resultado una reducción de los niveles de hierro en plasma. Sin embargo, la activación prolongada de este mecanismo de defensa puede eventualmente restringir la disponibilidad de hierro no solo para los patógenos invasores, sino también para el desarrollo de eritrocitos en la médula ósea, lo que lleva al desarrollo de anemia. Por lo tanto, la disponibilidad y restricción de hierro sistémico durante tiempos de infección e inflamación representa un mecanismo de defensa esencial contra patógenos, pero en condiciones fisiopatológicas puede provocar anemia y otras patologías graves como resultado de la reducción del desarrollo de glóbulos rojos (Hassan et al., 2016). Además de controlar la disponibilidad de hierro para los patógenos, la regulación de la hepcidina tiene el potencial de permitir la manipulación de la respuesta del hospedador y, por tanto, podría aprovecharse para aumentar la resistencia a infecciones (Drakesmith & Prentice, 2012).

El hierro tiene numerosos efectos sobre el sistema inmunológico. Éstos dependen de la cantidad y forma de hierro presente y del tipo de célula inmunitaria involucrada. El hierro tiene un papel esencial, y a menudo específico, en varios subtipos de células inmunes. Los neutrófilos, los macrófagos y las células T usan el hierro para diferentes funciones inmunitarias (Nairz & Weiss, 2020).

2.1.4.1 El hierro y los neutrófilos

Los radicales superóxido (O^{2-}) responsables del estallido de oxígeno producido por los neutrófilos pueden liberar hierro Fe^{2+} y este puede reaccionar con el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) para dar lugar a los radicales hidroxilo ($OH\cdot$). Todos estos componentes (H_2O_2 , O^{2-} y $OH\cdot$) destruyen a los microorganismos. Además, los neutrófilos tienen una metaloproteína dependiente de hierro; una enzima llamada mieloperoxidasa (MPO) contenida en los gránulos intracelulares, que representa aproximadamente el 5% de la proteína total dentro de un neutrófilo. La MPO es una hemoproteína y sus estados redox Fe^{3+} / Fe^{2+} son críticos para su papel en la producción de efectos antimicrobianos. Además, los neutrófilos producen grandes cantidades de calprotectina y lactoferrina, las cuales eliminan el hierro, inhibiendo así la proliferación bacteriana (Cronin et al., 2019).

2.1.4.2 El hierro y los macrófagos

Los macrófagos también tienen un papel esencial en la homeostasis ya que promueven la maduración de los glóbulos rojos, así como la liberación del hemo libre tóxico y la hemoglobina de los glóbulos rojos envejecidos. La producción de glóbulos rojos que contienen hemoglobina en la médula ósea requiere grandes cantidades de hierro. Los macrófagos eliminan el hierro hemo de los glóbulos rojos dañados o envejecidos en la médula ósea, el hígado y el bazo, y extraen el hierro Fe^{2+} y lo exportan de nuevo a la circulación a través de la ferroportina o lo almacenan intracelularmente en forma de ferritina (Cronin et al., 2019).

Además, el grupo hemo promueve la diferenciación de monocitos en macrófagos. Este proceso está bloqueado por la acción de la hepcidina durante los momentos de infección para evitar la liberación de hierro en la circulación, que de otro modo facilitaría el crecimiento de patógenos extracelulares (Sukhbaatar & Weichhart, 2018; Cronin et al., 2019).

Los macrófagos están implicados en las distintas etapas del reciclaje y metabolismo del hierro, excepto en la captación de hierro duodenal. El metabolismo del hierro mediado por macrófagos es particularmente importante durante las condiciones de estrés. En estas condiciones existen mecanismos compensatorios que mantienen el

metabolismo sistémico del hierro, siendo los macrófagos los principales reguladores (Sukhbaatar & Weichhart, 2018).

2.1.4.3 El hierro y las células T

La proliferación y las funciones efectoras de las células T son procesos que requieren hierro para las muchas reacciones metabólicas y redox involucradas, así como enzimas que contienen hemo y Fe-S que son indispensables para la división celular y la producción de citocinas (Cronin et al., 2019).

Además, hay una correlación significativamente positiva entre el hierro sérico y la IL-6, por lo que la disfunción de las células T puede ser el resultado de una baja actividad de las citocinas. Se ha demostrado que la eliminación de las reservas de hierro del organismo provoca una disminución en la proliferación y diferenciación de las células T con la posterior secreción de citocinas. Algunos autores han sugerido que los niveles alterados de algunas IL y citocinas (IL2, IL1, IL6, TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-12p40 e IL-10) podrían conducir a deficiencias del sistema inmunológico en pacientes con deficiencia de hierro (Hassan et al., 2016). Si bien todas las poblaciones de linfocitos parecen depender de la adquisición de hierro unido a transferrina (TBI), las células Th1 son muy sensibles a la homeostasis del hierro. Por un lado, la captación de TBI antagoniza la señalización de IFN- γ en el subconjunto Th1. Este efecto se basa en la internalización del receptor 2 de IFN- γ (IFNGR2). Por otro lado, la quelación del hierro provoca una regulación positiva de IFNGR2 mientras que inhibe la proliferación de células Th1 y, por lo tanto, la producción de IFN- γ . En particular, las mutaciones en cualquiera de las subunidades del IFNGR dan como resultado un mayor riesgo de infecciones por micobacterias. Esto proporciona otro vínculo entre el metabolismo del hierro y la tuberculosis (Nairz & Weiss, 2020).

Otro sistema de defensa que se asocia con el metabolismo del hierro son las proteínas de unión al hierro celulares y extracelulares (transferrinas y lactoferrina).

La lactoferrina es una glicoproteína con afinidad de ligarse con el hierro (de la familia transferrina) que es sintetizada por los neutrófilos y el epitelio de las mucosas. Los estudios convergen hacia la hipótesis de que la lactoferrina funciona como antimicrobiano (Ostan et al., 2021). También tiene acciones antivirales de amplio

espectro, así como inmunomoduladoras y antiinflamatorias. Se cree que la lactoferrina ejerce sus actividades biológicas tras la interacción con receptores específicos que se han identificado en múltiples tejidos y tipos de células, incluidos los linfocitos intestinales, placentarios, hepatocelulares, mamarios, respiratorios y epiteliales. Además, la lactoferrina produce la disminución de la expresión de IL-1 β e IL-6, que son citocinas proinflamatorias (Salaris et al., 2021).

Otra consecuencia de la deficiencia de hierro en el sistema inmune está relacionada con la producción de radicales libres. La ferropenia se ha asociado a un aumento de estas moléculas inestables y dañinas para el organismo, por lo que podría contribuir al incremento de diferentes patologías (Haschka et al., 2021).

Tanto la sobrecarga como la deficiencia de hierro tienen efectos sobre la función inmunitaria y el control de infecciones. La suplementación con hierro participa directamente en las respuestas inflamatorias al promover la producción de citocinas proinflamatorias en las células T auxiliares y reducción de las actividades quimiotácticas, fagocíticas y destructoras de los neutrófilos (Haschka et al., 2021). Además, la sobrecarga de hierro tiene un impacto en las funciones de los macrófagos. Varias líneas de evidencia apoyan el concepto de que el hierro altera muchas funciones efectoras de las células mieloides. Por ejemplo, el hierro inhibe la transcripción de MHC-II, lo que puede alterar la interacción entre las células Th1 y los macrófagos infectados. En consecuencia, se reduce la presentación de antígenos a las células Th1 a través de MHC-II. Por otro lado, la señalización coestimuladora por contacto directo célula-célula puede reducirse durante la sobrecarga de hierro. Además, los niveles altos de hierro intracelular inhiben la transcripción de TNF u otras vías inducibles por IFN- γ como la inducción de NOS2, la degradación de triptófano o la formación de neopterina en monocitos humanos. Las células Th2 se diferencian en presencia de IL-4 y se caracterizan por la secreción de IL-4, IL5, IL-10 e IL-13. El exceso de hierro desplaza el equilibrio entre las células Th1 y Th2 hacia las últimas, lo que da como resultado una mayor producción de IL-4. Tras la infección sistémica con *Candida albicans*, este desequilibrio entre Th1 / Th2 altera la formación de NO mediada por IFN- γ , lo que produce un resultado adverso de la infección. Algunos patógenos fúngicos crecen sustancialmente mejor en presencia de hierro no unido a transferrina (NTBI) en el plasma o en un microambiente rico en hierro en el pulmón, lo que respalda el concepto

de que la disponibilidad de hierro y la absorción de hierro por los hongos determinan la virulencia de estos (Nairz & Weiss, 2020).

Por otro lado, la sobrecarga de hierro reduce la producción de granzima B y perforina y cambia el equilibrio entre factores proapoptóticos y antiapoptóticos a favor de los primeros. Estos efectos están mediados por la producción de EROs inducida por hierro y reducen aún más el número de CTL. Por lo tanto, el hierro tiene amplios efectos sobre diversos subconjuntos de células T que implican su capacidad de respuesta a señales extracelulares, señales intracelulares, funciones efectoras, proliferación y muerte celular programada (Nairz & Weiss, 2020)

Por lo tanto, los niveles elevados de hierro, presentan efectos negativos para la función inmune, aumentando la susceptibilidad a infecciones. El nivel elevado de hierro también se asocia con una mayor mortalidad en la infección por virus. El hierro es necesario para la replicación del virus y, por lo tanto, favorece su propio crecimiento. Además, el aumento de las concentraciones de hierro en el organismo puede causar daño e inflamación de los tejidos y afectar la función de los órganos (Drakesmith & Prentice, 2008).

2.2 EL HIERRO EN LA NUTRICIÓN

El hierro es un componente biológico esencial en el metabolismo de todos los organismos vivos, se trata de un mineral necesario en el crecimiento, desarrollo y participación de diferentes funciones biológicas. Es por ello que existen mecanismos para obtener, transportar o almacenar hierro en el organismo. Químicamente, el hierro es un elemento altamente reactivo que puede interactuar con el oxígeno, dando lugar a especies intermedias con una capacidad potencial de dañar las membranas celulares o degradar el ADN. Presenta tres estados de oxidación: hierro metálico (Fe^0), ferroso (Fe^{2+}) y férrico (Fe^{3+}) los cuales condicionan su participación en la transferencia de electrones y en reacciones de oxidación-reducción. Gracias a estos estados redox el hierro actúa como cofactor de distintas enzimas (Beard, 2001). El hierro debe encontrarse en forma de complejos unido a proteínas (hemoproteínas), compuestos hemo (hemoglobina o mioglobina), enzimas hemo, o compuestos no hemo (enzimas hierro-flavina, transferrina, ferritina) para evitar estos potenciales efectos perjudiciales sobre las células (McDowell, 2003).

El contenido total de este mineral es de 3,8 g en el hombre y de 2,3 g en la mujer, que se distribuyen entre los eritrocitos como hemoglobina, en mioglobina, en forma química hemo y en forma no hemo formando parte de las enzimas, unido a transferrina o hemosiderina como forma de hierro circulante, así como en hígado, bazo y médula ósea. El mantenimiento del estatus férrico es fundamental para conservar función es específicas entre las que destacan el almacenamiento y transporte de oxígeno, el crecimiento tisular, la síntesis de ADN y el mantenimiento de las capacidades de trabajo, memoria y concentración. Dicho estatus se regula homeostáticamente a través de los cambios en la cantidad absorbida por la mucosa intestinal (Gómez-Álvarez Salinas, 2004).

El hierro también desempeña un papel en el proceso de división celular. Contribuye al funcionamiento normal del sistema inmunitario, al metabolismo energético y a una función cognitiva normal. Además, el hierro actúa como cofactor de numerosas proteínas y enzimas e interviene en el transporte de energía en todas las células y en la producción de ATP mitocondrial. Además, los citocromos que tienen al grupo hemo en su composición, ejercen su función en la cadena de transporte electrónico mitocondrial, transfiriendo electrones y almacenando energía gracias a las reacciones de oxidación y reducción del hierro (Beard, 2001).

Las ingestas recomendadas de este metal varían en función de la edad y las distintas situaciones fisiológicas en las que se puede encontrar una persona, dada la gran variabilidad en las necesidades (Gómez-Álvarez Salinas, 2004).

2.2.1 Regulación de la homeostasis del hierro

2.2.1.1 Absorción

El hierro dietético se presenta en muchas formas, pero generalmente se clasifica como hierro hemo o no hemo. El hierro hemo se encuentra en mayor abundancia en los alimentos de origen animal como parte de las hemoproteínas hemoglobina y mioglobina. El bajo pH del estómago, junto con las enzimas proteolíticas de este y del intestino delgado, ayudan a liberar el hemo de las hemoproteínas. El hierro tipo hemo en sí tiene una solubilidad muy limitada, pero forma complejos solubles con otros

componentes dietéticos en el lumen intestinal. El hierro se libera del grupo hemo después de ingresar en los enterocitos (Fuqua et al., 2012). El hierro no hemo es abundante en fuentes tanto de origen animal como vegetal. El hierro no hemo se encuentra en una amplia variedad de formas e incluye hierro soluble, hierro en complejos de bajo peso molecular, hierro en una gran variedad de proteínas, incluida la proteína de almacenamiento de hierro llamada ferritina, y también se encuentra en las vacuolas de las células vegetales (Anderson & Frazer, 2017). Si bien el bajo pH del estómago puede estabilizar el hierro en la forma ferrosa o Fe^{2+} , el hierro dietético se encuentra con mayor frecuencia en la forma férrica o Fe^{3+} , que tiene baja solubilidad y biodisponibilidad. Durante el proceso de digestión, sin embargo, es probable que el hierro no hemo se encuentre en muchos complejos diferentes con otros productos de digestión en el tracto intestinal, lo que puede mejorar o perjudicar la absorción. Los fitatos, los taninos y los polifenoles de origen vegetal pueden secuestrar algunas formas de hierro no hemo y las hace precipitar. Por lo que disminuyen en gran medida su absorción ya sea porque se unen con este mineral y se elimina, o porque al acelerar el tránsito intestinal, reducen el tiempo disponible para ser captado por el organismo. Por el contrario, el ácido ascórbico y el ácido cítrico pueden aumentarla (Baró et al., 2010). La absorción de ferritina no se ve tan afectada como algunas formas de hierro no hemo por los componentes de la dieta. El hierro hemo tiende a absorberse de manera más eficiente ya que su absorción se ve poco afectada por los quelantes o potenciadores del hierro en la dieta. Esto sugiere que la ferritina y el hierro hemo son absorbidos por diferentes mecanismos que las formas de hierro no hemo (Fuqua et al., 2012).

El hierro es absorbido por los enterocitos maduros de la vellosidad media, principalmente en el intestino delgado. Aunque pequeñas cantidades de hierro pueden ser absorbidas en las partes más distales del tracto gastrointestinal, las partes proximales del intestino delgado (duodeno y yeyuno) están particularmente adaptadas para esta función. Para pasar de la luz del intestino al torrente sanguíneo, el hierro debe atravesar tanto la membrana apical del borde en cepillo como la membrana basolateral de los enterocitos. El hierro no hemo atraviesa la membrana del borde en cepillo a través del transportador de metales divalentes 1 (DMT1). Este transportador requiere hierro ferroso (Fe^{2+}) como sustrato, pero la mayor parte del hierro dietético se encuentra en forma férrica (Fe^{3+}). Por lo tanto, es necesario reducir el hierro antes de que pueda ser absorbido. El citocromo duodenal B (Dcytb) es una reductasa del borde en cepillo que

se encarga de reducir el hierro. Si el organismo no requiere inmediatamente hierro, en el enterocito, se almacena en la célula dentro de la proteína ferritina y se elimina una vez que el enterocito se desprende al final de su período de vida de varios días. Si se requiere hierro, se puede exportar rápidamente a través de la membrana basolateral de los enterocitos a través de la ferroportina 1 (FPN1). La eficiencia de la exportación basolateral de hierro aumenta en gran medida por la oxidasa dependiente de cobre llamada hefestina, que convierte el Fe^{2+} en la forma Fe^{3+} (Anderson & Frazer, 2017). Diversos estudios han indicado que la hefestina y la FPN1 pueden interactuar (Figura 4) (Fuqua et al., 2012).

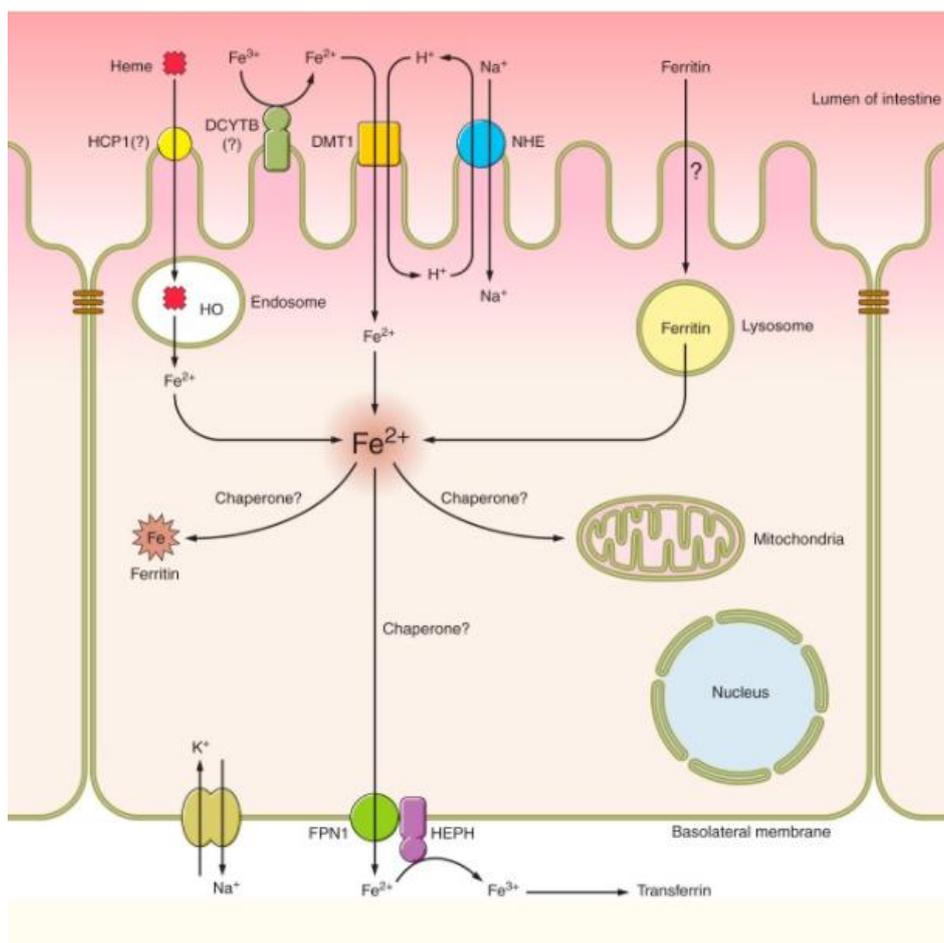


Figura 4. Absorción de hierro hemo y no hemo. (Gulec et al., 2014).

El mecanismo de internalización del hemo sigue estando poco definido y puede implicar el transporte directo de hemo o endocitosis mediada por receptores. Los macrófagos y los enterocitos catabolizan el hemo en una reacción catalizada por las hemo oxigenasas 1 y 2, que liberan hierro inorgánico que es expulsado de las células a través de FPN1 (es decir, la misma vía que el hierro no hemo). Además, en la

membrana apical del enterocito se ha identificado una proteína transportadora de hierro tipo hemo (HCP1), como posible responsable de su absorción (Anderson & Frazer, 2017).

2.2.1.2 Distribución

La transferrina es el transportador fisiológico de hierro en plasma. Normalmente, sólo el 20% -40% de los sitios de unión disponibles en las moléculas de transferrina están ocupados por hierro férrico. El contenido de hierro del plasma es sólo de 2 a 3 mg, por lo que este compartimento debe renovarse cada pocas horas. Los precursores de eritrocitos absorben hierro casi exclusivamente a través de los receptores de transferrina 1 (TfR1), por lo que el suministro de hierro a los precursores de eritrocitos depende completamente de la transferrina plasmática. Por el contrario, los hepatocitos y otras células no eritroides también pueden absorber NTBI, un proceso que es importante durante la sobrecarga de hierro cuando la saturación de transferrina en plasma alcanza el 100% (Ganz & Nemeth, 2012).

A nivel de todo el organismo, la absorción de hierro de la dieta y la exportación de hierro de los tejidos al plasma están reguladas por el péptido hepcidina (Anderson & Frazer, 2017). La unión de hepcidina a FPN1 expresada en macrófagos, hepatocitos y otros tipos de células induce la internalización y degradación lisosomal del exportador de hierro. Por lo tanto, la exportación de hierro se bloquea en las células que expresan FPN1, lo que conduce a la retención celular de hierro (Vogt et al., 2021).

Después de la absorción por parte del enterocito, el hierro debe suministrarse a las células para funciones generales o específicas. La estabilidad del hierro unido a la transferrina depende de varios factores, como el estado de oxidación del hierro, la conformación de la proteína y el pH ambiental. La transferrina se encuentra en el plasma en tres estados: apo-transferrina (apo-Tf), cuando no se une hierro; transferrina monoférrica (unida a un solo átomo de hierro); y transferrina diférrica, también conocida como holotransferrina (holo-Tf; unida a dos átomos de hierro). La existencia concomitante de estos tres estados de transferrina en un individuo sano permite la respuesta a incrementos agudos de la absorción de hierro, evitando los efectos tóxicos del exceso de hierro en el organismo. La captación celular de hierro está mediada

principalmente por el TfR1, ubicado en la membrana. Tras la unión a la superficie celular, el complejo transferrina-TfR1 sufre una endocitosis dependiente de clatrina. El pH del endosoma disminuye por la entrada de H⁺ mediada por una bomba de protones dependiente de ATP, y se libera Fe³⁺, mientras que la apo-Tf permanece unida a TfR1. En el endosoma, el hierro libre es reducido y transportado al citoplasma por DMT1. Mientras tanto, el complejo Tf-TfR1 es conducido a la superficie celular donde se libera apo-Tf al plasma. El hierro libre no unido a transferrina (NTBI) también se encuentra con frecuencia en el plasma (Silva & Faustino, 2015). El NTBI se genera en estados de sobrecarga de hierro, como en la hemocromatosis hereditaria, donde la transferrina se satura gradualmente por completo con hierro y pierde su capacidad amortiguadora (Pantopoulos et al., 2012) (Figura 5).

Se ha sugerido que la forma principal del NTBI es el Fe³⁺ unido al citrato. Sin embargo, se han detectado otros transportadores de hierro, como el acetato. El origen y los mecanismos implicados en la captación celular del NTBI plasmático todavía no se conocen. El transporte de NTBI más probable que se ha identificado hasta ahora es el transportador de zinc ZIP14 (Silva & Faustino, 2015). Posteriormente se observó que en este proceso estaba involucrada también el transportador ZIP 8 (Recalcati et al., 2017).

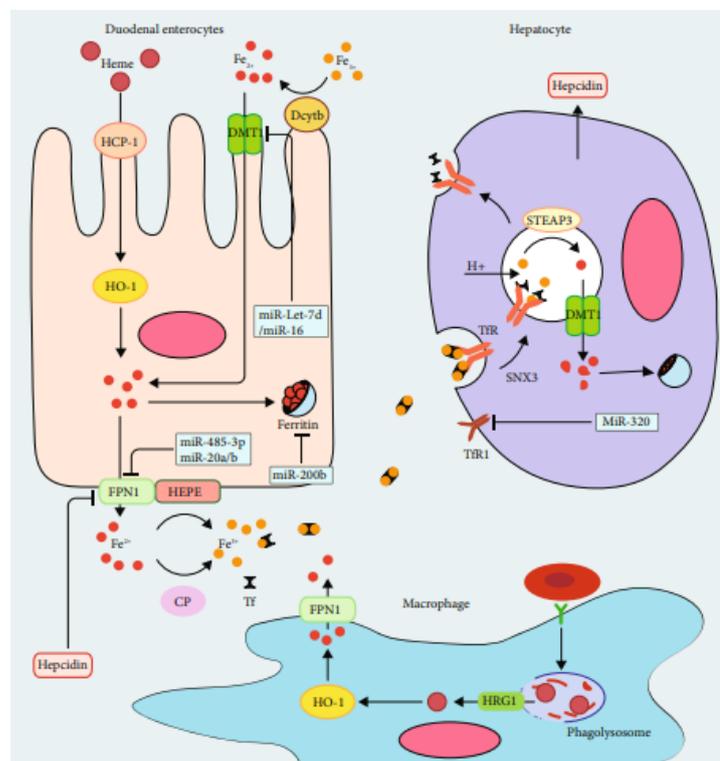


Figura 5. Homeostasis sistémica del hierro. (Li et al., 2020).

2.2.1.3 Metabolismo

Las concentraciones de hierro celular están moduladas por las proteínas reguladoras del hierro (IRP1 e IRP2). A nivel de todo el organismo, la absorción de hierro de la dieta y la exportación de hierro de los tejidos al plasma están reguladas por el péptido hepcidina (Anderson & Frazer, 2017).

La hepcidina es el principal regulador de la homeostasis del hierro. Es una hormona peptídica de 25 aminoácidos expresada principalmente por el hígado. Su expresión está regulada por varias condiciones fisiológicas, tales como niveles de hierro sistémico, hipoxia, anemia, eritropoyesis, infección e inflamación (Waldvogel-Abramowsk et al., 2014; Silva & Faustino, 2015). A nivel sistémico, la homeostasis del hierro se regula a través del eje hepcidina / FPN1. La desregulación de la expresión de hepcidina da como resultado trastornos del hierro. La deficiencia de hepcidina induce una sobrecarga de hierro en los hepatocitos, como ocurre en la hemocromatosis hereditaria. Por el contrario, una sobreproducción de hepcidina se asocia con anemia por restricción de hierro. La hepcidina solo se regula a nivel transcripcional, expresada principalmente en los hepatocitos del hígado. El péptido se somete a un procesamiento proteolítico, lo que lleva a una molécula bioactiva liberada en el torrente sanguíneo y puede unirse y bloquear la actividad de la FPN1 (Vogt et al., 2021). La hepcidina actúa desencadenando la internalización de la FPN1 y la consiguiente degradación. Por lo tanto, la hepcidina regula el metabolismo sistémico del hierro al reducir los niveles de FPN1, en consecuencia, la absorción y liberación de hierro de la dieta por los macrófagos, hepatocitos y otros tipos de células. La hepcidina se expresa principalmente en el hígado, aunque su expresión también se ha detectado en macrófagos, células β -pancreáticas, riñón, adipocitos y pulmón. Mientras que la sobrecarga de hierro, la infección y la inflamación producen mayor expresión de hepcidina; la deficiencia de hierro, la hipoxia, la anemia y la eritropoyesis actúan de forma opuesta. Es decir, cuando las demandas de hierro en los tejidos son altas, las concentraciones de hepcidina son bajas y viceversa (Waldvogel-Abramowsk et al., 2014; Silva & Faustino, 2015).

La expresión de la hepcidina está principalmente regulada transcripcionalmente por los niveles de hierro en un circuito de retroalimentación que involucra múltiples vías por las cuales los hepatocitos reconocen el estado del hierro circulante. La

regulación de la síntesis de hepcidina es compleja e involucra varias proteínas presentes en la membrana plasmática de los hepatocitos, es decir, proteínas de hemocromatosis hereditaria (HFE) y receptor de transferrina 2 (TfR2), así como hemojuvulina (HJV), que regulan estrechamente el nivel de expresión de hepcidina por la proteína morfogenética ósea 6 (BMP-6) (Vogt et al., 2021).

La homeostasis del hierro celular, a diferencia de la sistémica, asegura que cada célula absorba cantidades suficientes, pero no excesivas, de hierro para satisfacer sus necesidades individuales de síntesis de ferroproteínas. El sistema se basa en la regulación postranscripcional a través de la interacción de proteínas reguladoras de hierro (IRP1 e IRP2) con elementos reguladores de hierro (IRE) en ARN mensajeros (ARNm) que codifican transportadores de hierro clave, ferroproteínas y enzimas involucradas en el metabolismo del hierro. El sistema IRE/IRP regula eficazmente la absorción de hierro, proporciona el almacenamiento del exceso de hierro en la ferritina y regula la síntesis del grupo hemo, grupos de hierro-azufre y ferroproteínas en función del hierro disponible (Ganz & Nemeth, 2012).

En efecto, el sistema actúa para disminuir el gasto de energía sintética y de sustratos, y para prevenir la acumulación de formas tóxicas de hierro. Los ARNm diana contienen IRE que forman estructuras características, ya sea en la región 5' o en la región 3'. Las IRP1 e IRP2 están relacionadas estructuralmente, pero interactúan con el hierro de distintas formas. Ambas proteínas se unen a los IRE cuando los niveles de hierro celular son bajos. En presencia de hierro, la IRP1 incorpora un grupo hierro-azufre y no se une a los IRE. Por el contrario, la IRP2 es ubiquitinada mediante un proceso complejo dependiente del hierro y luego se degrada en los proteasomas. Muchos ARNm están regulados por el sistema IRP/IRE y se dividen en tres clases:

(1) Adquisición de hierro, generalmente con IRE en la región 3', donde la unión de las IRP evita que las endonucleasas escindan regiones sensibles del ARNm, estabilizando así el ARNm y aumentando la síntesis de proteínas.

(2) Utilización y almacenamiento de hierro, con IRE en la región 5', donde la unión de las IRP reprime la traducción y disminuye la síntesis de proteínas.

(3) Exportación de hierro, con IRE también en la región 5' y disminución de la síntesis de proteínas.

Las proteínas sujetas a regulación IRE/IRP incluyen TfR1 y DMT1 involucrados en la absorción, proteínas que participan en el transporte y almacenamiento celular de hierro, síntesis del grupo hemo en las células eritroides y ferroportina. El efecto neto de la respuesta IRE/IRP durante la deficiencia celular de hierro es aumentar la absorción celular de hierro, movilizar el hierro del almacenamiento celular, disminuir la utilización de hierro y, cuando el hierro se vuelve suficiente o excesivo, revertir estas respuestas y dirigir más hierro hacia el almacenamiento celular y la exportación. El ajuste de la entrada y salida de hierro celular se logra mediante la traducción de ARNm en diferentes tejidos para incluir o excluir IRE (Ganz & Nemeth, 2012).

2.2.1.4 Almacenamiento

El almacenamiento de hierro evita la presencia de hierro libre cuando aumentan los niveles de hierro corporal. También asegura su disponibilidad inmediata durante la deficiencia de hierro. La principal proteína responsable del almacenamiento de hierro es la ferritina (Silva & Faustino, 2015). La ferritina almacena hierro en una forma no tóxica y contribuye a la biodisponibilidad intracelular del hierro. La retención de hierro en la ferritina puede inhibir el paso del hierro a través de los enterocitos. El hierro secuestrado en la ferritina constituye un depósito que puede movilizarse mediante la degradación de la ferritina (Muckenthaler et al., 2017).

La ferritina citosólica es un multímero de 24 subunidades de cadenas polipeptídicas pesadas (Ft-H) y ligeras (Ft-L). Cuando se sintetizan, estas cadenas se auto ensamblan, formando una estructura capsular esférica que es capaz de almacenar hasta 4500 átomos de hierro en su núcleo. El Fe^{2+} citosólico es oxidado por las subunidades Ft-H, mientras que la subunidad Ft-L promueve su captación en el núcleo. La ferritina se localiza en el citosol celular, el núcleo y las mitocondrias, pero también está presente en el suero. Las mitocondrias expresan sus propias cadenas de tipo Ft-H, y parece que la ferritina mitocondrial es capaz de almacenar hierro de forma más eficaz que la citosólica. Se cree que los mecanismos utilizados para la liberación de hierro de la ferritina están impulsados tanto por mecanismos de degradación mediados por lisosomas como por proteasomas. Se ha demostrado que el coactivador del receptor nuclear 4 (NCOA4) se une y entrega la ferritina a los lisosomas, regulando así la biodisponibilidad del hierro. La expresión del receptor NCOA4 se regula al alza durante

la eritropoyesis, un proceso con altas demandas de hierro (Silva & Faustino, 2015). En situaciones de sobrecarga de hierro, éste es ingerido por las células de Kupffer del sistema reticuloendotelial y depositado en el sistema en forma de hemosiderina cuya cubierta proteica está parcialmente degradada, permitiendo la unión del hierro. Así forma grupos insolubles y grandes en el interior celular, los cuales son visibles con microscopía óptica (Li et al., 2020).

La expresión de ferritina aumenta en gran medida cuando aumentan las concentraciones de hierro celular y proporciona a la célula una enorme capacidad para encontrar hierro. Cuando se acumulan altas concentraciones de ferritina cargada de hierro dentro de la célula, las moléculas de ferritina se agregan y, finalmente, estos agregados se fusionan con los lisosomas. Este proceso conduce a la degradación de la ferritina, y la combinación resultante de núcleos y péptidos de Fe^{3+} se conoce como hemosiderina. Esta forma de almacenamiento de hierro es particularmente prominente en las células de pacientes con enfermedades por sobrecarga de hierro. El hierro se puede movilizar de manera eficiente tanto de la ferritina como de la hemosiderina cuando se requiere en otras partes del cuerpo humano. Otra característica importante de la ferritina es que la célula secreta cantidades pequeñas y la cantidad que se secreta se correlaciona fuertemente con la concentración de hierro intracelular. Esta asociación hace que las concentraciones séricas de ferritina sean un indicador preciso y de fácil medición de las reservas de hierro en el organismo (Anderson & Frazer, 2017).

También están presentes pequeñas cantidades de ferritina en el suero humano y están elevadas en condiciones de sobrecarga de hierro e inflamación. La ferritina sérica es pobre en hierro y puede contener una nueva subunidad "G" (glicosilada). Se ha demostrado que la secreción de ferritina ocurre cuando se produce la síntesis de ferritina celular en ausencia relativa de hierro citosólico libre. También se ha demostrado que la ferritina en los macrófagos no es una fuente significativa de hierro para las funciones metabólicas de la propia célula (Waldvogel-Abramowski et al., 2014).

2.2.1.5 Excreción

Los humanos, a diferencia de otros mamíferos, carecen de un mecanismo de excreción de hierro y las pérdidas de hierro solo ocurren en la exfoliación de la piel y

células gastrointestinales, y en pequeñas cantidades a través de la orina y la bilis (Nespolo, 2017).

El organismo humano tiene varios mecanismos a través de los cuales los niveles de hierro se mantienen en homeostasis que, por falta de excreción de hierro hepática o renal regulada, están controlados únicamente por la absorción intestinal de hierro (Muckenthaler et al., 2017). La absorción, el reciclaje y el almacenamiento controlados del hierro forman parte de estos mecanismos. Dado que no existen formas activas de excretar hierro, el cuerpo humano necesita absorber aproximadamente 1 mg de hierro dietético todos los días (Silva & Faustino, 2015).

Se cree que la excreción de hierro ocurre a una tasa basal independientemente de los niveles de hierro y está asociada con procesos como el recambio del epitelio intestinal, la pérdida de sangre y la exfoliación de las células muertas de la epidermis, aunque la mayor parte del hierro se excreta a través del tracto gastrointestinal. La excreción renal de hierro se considera un factor insignificante en la homeostasis del hierro. También se cree que el hígado contribuye mínimamente a la eliminación de hierro del organismo, a pesar de que la excreción hepatobiliar es un medio importante de excreción de otros metales como el manganeso y el cobre. También se ha sugerido, que las vías de excreción no gastrointestinales, como la exfoliación de la piel, juegan un papel mínimo en la homeostasis del hierro (Mercadante, et al 2019).

2.2.2 Déficit de hierro. Anemia ferropénica nutricional

El término déficit de hierro define la condición en la que las reservas de hierro se reducen o incluso se agotan, pero puede que el suministro de hierro a la eritropoyesis aún se mantenga, por lo que no se produciría anemia. La anemia por deficiencia de hierro se refiere a la condición en la que falta de hierro produce una menor síntesis de la hemoglobina implicada en la producción de los eritrocitos. Por lo tanto, la anemia ferropénica es el signo más evidente de deficiencia de hierro, y es la deficiencia nutricional más común en todo el mundo (Fuqua et al., 2012).

La deficiencia de hierro es el trastorno de hierro más común a nivel mundial. Aunque se piensa que es un problema predominantemente adquirido causado por la

pérdida de sangre y la ingesta inadecuada de hierro, la predisposición genética puede modular la susceptibilidad a esta condición como muestran los estudios de asociación del genoma completo (Ganz & Nemeth, 2012).

La deficiencia de hierro es la causa más común de anemia y representa un problema de salud mundial afectando en promedio al 30% de la población en general. Su incidencia en los países desarrollados es de aproximadamente del 10% cifra que aumenta al 40% en los países que están en vías de desarrollo. La OMS calcula que, en todo el mundo, un 42% de los niños menores de 5 años y un 40% de las embarazadas son anémicos. En términos generales, las personas más vulnerables, más pobres y de menor nivel educativo son las más afectadas por la ferropenia (Boccio & Bressan, 2004). Clínicamente, este trastorno se manifiesta con mayor frecuencia como una anemia normocítica normocrómica con hipoferremia, pero la anemia puede ser microcítica, especialmente en niños o trastornos inflamatorios muy crónicos. La restricción del hierro limita la síntesis de hemoglobina y contribuye a la anemia (Ganz & Nemeth, 2012). Además de la eritropoyesis, el hierro es esencial para la función mitocondrial, la síntesis y reparación del ADN y numerosas reacciones enzimáticas necesarias para la supervivencia celular. La deficiencia de hierro puede contribuir a defectos del desarrollo cognitivo en los niños, bajo rendimiento físico y resultados desfavorables en el embarazo (Muckenthaler et al., 2017).

Por otro lado, la deficiencia de hierro también altera varias funciones del sistema nervioso central, lo que sugiere que el hierro juega un papel importante en condiciones fisiológicas. De acuerdo con esta idea, el hierro es fundamental durante la diferenciación y proliferación neuronal; su deficiencia afecta a procesos neuronales como la mielinización, la diferenciación de las células dendríticas y la plasticidad neuronal. A nivel sináptico, las alteraciones inducidas por la deficiencia de hierro en el hipocampo incluyen cambios en las propiedades electrofisiológicas de los circuitos neurales y los sistemas de neurotransmisores (Muñoz & Humeres, 2012).

Se pueden producir varios tipos de anemia por deficiencia de hierro, que cursan en etapas de severidad creciente. Primero ocurre un agotamiento de los depósitos de hierro que se caracteriza por una reducción de la ferritina sérica, denominada ferropenia latente. Al progresar el déficit se compromete el aporte de hierro a los tejidos que se caracteriza en forma precoz por un aumento de la concentración sérica del receptor de

transferrina y más tarde se añaden una reducción de la saturación de la transferrina y un aumento de la protoporfirina libre eritrocitaria. En esta etapa, denominada ferropenia sin anemia, se aprecia una reducción de la síntesis de hemoglobina, sin embargo, su concentración aún no cae por debajo del límite normal (Pérez-Surribas et al, 2019).

Finalmente se llega a la etapa más severa de la deficiencia, denominada anemia ferropénica nutricional, que es un desequilibrio entre los requerimientos del organismo y la cantidad de hierro suministrada a través de la dieta. Ocurre con mayor frecuencia en determinados grupos poblacionales, como las mujeres jóvenes y los niños, en los países en desarrollo, con una prevalencia que alcanza el 40% en niños en edad preescolar, alrededor del 30% en mujeres jóvenes y hasta el 38% en mujeres embarazadas, respectivamente. También en los países de ingresos altos, los niños y las mujeres, especialmente las mujeres embarazadas, siguen siendo los principales grupos de riesgo (Fuqua et al., 2012; Camaschella, 2017). Está caracterizada principalmente por la ausencia o reducción de los depósitos de hierro, como se ha mencionado anteriormente, así como un nivel bajo de hierro sérico y de hemoglobina, reducción del hematocrito y mayor nivel de plaquetas. Además, el porcentaje de saturación de transferrina se verá disminuido junto con la concentración de ferritina sérica. Por el contrario, la capacidad total de fijación al hierro (TIBC), se verá drásticamente aumentada.

2.2.2.1 Causas

La absorción inadecuada de hierro, su pérdida excesiva, el aumento de los requerimientos, o la ingesta disminuida causan anemia ferropénica, el tipo de anemia más común. Las mujeres presentan mayor riesgo de anemia ferropénica como consecuencia de la pérdida de sangre menstrual y el incremento en la demanda de hierro del feto en crecimiento durante el embarazo. Las pérdidas gastrointestinales, como las que suceden por ulceraciones o cáncer, también contribuyen al surgimiento de este tipo de anemia (Tortora & Derrickson, 2010).

Las condiciones que predisponen a la anemia por deficiencia de hierro son:

- Incremento en los requerimientos de hierro, como ocurre en niños durante el crecimiento; en mujeres jóvenes durante la edad fértil, debido a la menstruación; y

en el segundo y tercer trimestre de embarazo. También aumentan los requerimientos de hierro en los pacientes con tratamiento estimulante de la eritropoyesis.

- Ingesta reducida de hierro, por malnutrición, hierro poco biodisponible por formación de complejos quelantes o por seguimiento de una dieta vegetariana o vegana. La cantidad de hierro absorbida y utilizada por el organismo depende no sólo del contenido de éste en los alimentos, también del estatus en que se encuentre este mineral. Y además influye fundamentalmente su biodisponibilidad en los alimentos. Así, la absorción varía desde una cantidad que oscila entre el 1 y el 5% en los vegetales, hasta un 10-25% en las carnes y el pescado. Y aunque están calculados los coeficientes de absorción para cada alimento (1% para el arroz, 1-2% para espinacas, 3-4% en legumbres secas, 10-15% para pescados, 15-20% para hígado, 50-70% para leche materna, etc.), la absorción se ve fundamentalmente influida por las múltiples interacciones entre los propios alimentos. En concreto, el hierro no hemo (presente tanto en alimentos animales como vegetales) duplica o triplica su absorción cuando a la vez que los alimentos que lo contienen se ingieren proteínas, porque los aminoácidos lisina, cisteína, histidina y metionina aumentan dicha capacidad de absorción (Gómez-Álvarez Salinas, 2004).
- La absorción de hierro se incrementa con la presencia de vitamina C por la formación de un quelato soluble al pH intestinal. Otros ácidos como el cítrico o el tartárico ocasionan el mismo efecto. Los taninos reducen su absorción. Así es que el hecho de tomar una taza de café con la comida puede reducir la absorción de hierro en un 60%. Los oxalatos (presentes en gran cantidad en las espinacas) dificultan la absorción del hierro. El calcio y el fósforo disminuyen su absorción debido a que forman fosfato férrico, que es insoluble en el medio digestivo, o bien un complejo calcio-fosfato, también insoluble. Algunos compuestos catalogados como fibra, como puede ser el salvado de los cereales, disminuyen la absorción de hierro. Otros, como las pectinas, no tienen ninguna influencia. En general, cabe describir una serie de patrones alimentarios con distinta disponibilidad:

Disponibilidad alta: se absorbe entre el 15 y el 20% del hierro contenido en los alimentos cuando la dieta es variada y en ella se incluyen alimentos de origen animal y vitamina C.

Disponibilidad media: se absorbe una media del 10% del hierro cuando la dieta, además de lo anterior, incluye cereales y/o raíces, así como tubérculos.

Disponibilidad baja: se absorbe solamente el 5% en dietas a base de cereales o raíces

y tubérculos, pero pobres en alimentos de origen animal y en vitamina C (Gómez-Álvarez Salinas, 2004).

- Pérdida crónica de sangre por trastornos gastrointestinales como infestación por anquilostomas, lesiones gastrointestinales benignas y malignas, salicilatos, corticosteroides y antiinflamatorios no esteroideos que producen sangrado del tracto gastrointestinal. También se puede producir pérdida de sangre por menstruaciones abundantes y hematuria. Si la pérdida menstrual de sangre es abundante (>80ml al mes), el riesgo de anemia por deficiencia de hierro aumenta drásticamente. Durante el parto se pierden con el sangrado unos 250mg de hierro, siendo mayor en los partos por cesárea, donde el sangrado prácticamente es el doble que en un parto normal (Zimmermann & Hurrell, 2007; Miller, 2013). Algunas patologías como la hemólisis intravascular, defectos de la hemostasia y la pérdida urinaria de hemoglobina pueden producir anemia ferropénica, así como los fármacos anticoagulantes y compuestos antiplaquetarios. La anemia ferropénica es común en donantes habituales de sangre, especialmente mujeres, y limita la frecuencia de las donaciones (Miller, 2013).
- Malabsorción de hierro, absorción defectuosa por trastornos gastrointestinales como pueden ser infección por *Helicobacter pylori*, enfermedad celíaca, gastritis autoinmune e incluso enfermedades inflamatorias del intestino. En los pacientes celíacos el diagnóstico correcto es importante ya que la introducción de la dieta sin gluten puede restaurar la absorción de hierro. Varios fármacos interfieren con la absorción de hierro (inhibidores de la bomba de protones, bloqueadores H₂) o favorecen las pérdidas de sangre (aspirina, anticoagulantes, fármacos antiinflamatorios no esteroideos). La anemia por deficiencia de hierro en sujetos obesos cursa con alto nivel de hepcidina sérica y reducción de la absorción de hierro por la inflamación relacionada con la adiposidad. Además, si aparecen desórdenes en la síntesis de las proteínas implicadas en el metabolismo del hierro, (hepcidina, FPN1, DMT1...) pueden indicar algún problema de malabsorción (Anderson et al., 2009). Las cirugías como la gastrectomía, derivación duodenal o cirugía bariátrica también producen una disminución de la superficie de absorción del hierro.
- Otras causas: La anemia ferropénica también se produce en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica, probablemente secundaria a una reducción de la absorción de hierro o una disminución de la ingesta. A menudo se diagnostica en atletas de resistencia jóvenes, especialmente mujeres, debido a hemólisis, pérdida de

sangre e inflamación leve y puede afectar el rendimiento deportivo (Camaschella, 2017; Camaschella, 2019).

2.2.2.2 Diagnóstico

El diagnóstico de la anemia ferropénica requiere pruebas de laboratorio, ya que los síntomas pueden estar presentes, pero son inespecíficos y a menudo se pasan por alto. El enfoque diagnóstico de los trastornos del hierro se basa en la determinación de hierro sérico, transferrina (o capacidad total de unión al hierro) y ferritina. La saturación de transferrina (Tsat), es decir, la relación entre la capacidad de unión de hierro sérico/hierro total, la ferritina sérica junto con pruebas genéticas y mediciones de imágenes por resonancia magnética no invasiva del contenido de hierro en el hígado, definen la naturaleza y la gravedad de la carga de hierro. Otros marcadores útiles son el nivel del receptor de transferrina soluble en suero (sTFRC), relacionado con el grado de eritropoyesis o la deficiencia de hierro, la relación sTFRC/log ferritina para el diagnóstico de la deficiencia de hierro en la inflamación y la relación Tsat/log hepcidina para diagnosticar la anemia ferropénica refractaria. Medir los niveles de hepcidina en suero no aporta ninguna información adicional a la ferritina sérica, ya que las dos variables están estrechamente relacionadas. Algunos investigadores proponen determinar los niveles de hepcidina para elegir la mejor vía terapéutica de administración de la suplementación de hierro (oral o intravenoso), así como su correcta administración. Sin embargo, además de estar sujetos a oscilaciones circadianas, los niveles de hepcidina cambian rápidamente en respuesta a las señales activadoras e inhibitoras, lo que hace que su medición sea útil sólo en un número limitado de condiciones (Camaschella et al., 2020).

2.2.2.3 Tratamiento

La suplementación oral de hierro es el tratamiento de elección que suele utilizarse para la anemia ferropénica. El sulfato ferroso, sulfato ferroso desecado, gluconato ferroso y fumarato ferroso son las formulaciones de hierro por vía oral más asequibles, y los pacientes que toleran estas preparaciones corrigen su anemia y los

síntomas relacionados. Sin embargo, hasta el 70% de los pacientes a los que se les prescribe hierro oral tiene efectos secundarios gastrointestinales importantes, que deterioran notablemente la adherencia al tratamiento. El hierro oral causa estreñimiento y, a veces, diarrea, sabor metálico y calambres gástricos. En las mujeres embarazadas, que ya sufren estreñimiento debido a niveles elevados de progesterona que ralentizan el tránsito intestinal y la presión del útero, el hierro oral puede empeorar los síntomas (Auerbach & Adamson, 2016). Otros efectos adversos del hierro no absorbido incluyen alteraciones en la composición del microbioma intestinal, con reducción de bacterias beneficiosas *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, aumento de patógenos potenciales (Enterobacteriaceae) y aumento de inflamación y diarrea (Camaschella, 2019).

Hay varias preparaciones de hierro que muestran tener una tolerabilidad superior. Estas preparaciones a menudo tienen la propiedad de liberación lenta y aunque quizás se toleren mejor, pueden no absorberse con tanta eficacia (Camaschella et al., 2020). Además, cambiar la administración diaria a días alternos y de dosis divididas a dosis únicas puede aumentar la eficacia del tratamiento en individuos no anémicos con deficiencia de hierro y puede mejorar la tolerabilidad.

Otro problema relacionado con el hierro suplementado es la disbiosis intestinal. Para evitar tanto la disbiosis como los efectos comentados anteriormente, una solución futura es el desarrollo de compuestos de hierro biodisponibles solo para humanos y no para patógenos. Existe un gran interés en el desarrollo de compuestos que se toleren mejor que las sales de hierro. Se han propuesto numerosos compuestos (hierro sucrosomial, polipéptido de hierro hemo, nanopartículas que contienen hierro), pero los estudios son limitados. El citrato férrico quelante de fosfato corrige simultáneamente tanto la hiperfosfatemia como la deficiencia de hierro. Un ensayo con maltol férrico proporcionó resultados positivos sobre la anemia ferropénica en las enfermedades inflamatorias del intestino. El compuesto natural extraído de la corteza del árbol taiwanés hinokitiol restaura el transporte de hierro en células que carecen de transportadores, como DMT1 o FPN1. Aprovechando el gradiente de hierro que, en ausencia del transportador, se forma a través de las membranas, el hinokitiol restaura la dirección de transporte *in vitro* (Camaschella, 2019).

El hierro oral debe tomarse con el estómago vacío, lo que permite que el ácido gástrico promueva la unión del hierro a los aminoácidos, azúcares y vitamina C. Esto

protege al hierro de la conversión a óxido de hierro en el duodeno proximal, permitiendo el tránsito al duodeno distal y yeyuno proximal. Como la absorción es incompleta, se evitan las formulaciones orales después de la cirugía bariátrica donde la absorción es marginal, en la enfermedad inflamatoria intestinal donde el hierro oral puede empeorar los síntomas y en pacientes con condiciones asociadas con una tasa de pérdida de sangre elevada. Un patrón de prescripción típico es recomendar tomar 50-65 mg de hierro elemental tres veces al día, entre comidas y a la hora de acostarse. Si hay malestar gástrico, el hierro se puede tomar con las comidas, pero esto reducirá la absorción (Auerbach & Adamson, 2016).

Una forma de reemplazo de hierro oral es el suplemento disponible comercialmente, el polipéptido de hierro hemo. El hierro hemo es la forma del hierro que se encuentra predominantemente en la carne roja y se absorbe mucho mejor que otras formulaciones. Si bien las formas comerciales del polipéptido de hierro hemo son más caras que las sales de hierro comunes, representan una alternativa eficaz para aquellos pacientes que no pueden tolerar las sales de hierro y que han reaccionado o rechazado el reemplazo de hierro parenteral. El objetivo del reemplazo de hierro no es solo corregir el déficit de hemoglobina, sino proporcionar suficiente hierro para las reservas de hierro (Camaschella et al, 2020).

En situación de intolerancia o cuando no hay respuesta al hierro oral, el hierro intravenoso es una alternativa. Las formulaciones de hierro intravenoso disponibles actualmente son igualmente seguras y efectivas. Consisten en complejos de hierro-carbohidrato o coloides basados en pequeñas partículas esféricas de hierro-carbohidrato. Las partículas consisten en un núcleo de gel de hidróxido de hierro rodeado por una capa de carbohidratos que estabiliza el núcleo y permite la liberación lenta del hierro mientras que las partículas restantes permanecen en una suspensión coloidal. Aunque no se ha comprobado, los efectos tóxicos del hierro intravenoso son aparentemente debidos a la liberación de hierro libre que es directamente proporcional a la velocidad de liberación de hierro elemental del núcleo de carbohidratos. Los primeros hierros parenterales, que carecían de la cubierta de carbohidratos, se asociaron con reacciones agudas severas y no eran adecuados para su uso (Auerbach & Adamson, 2016).

Además de los tratamientos comentados anteriormente, otra estrategia adecuada sería la fortificación con hierro de los alimentos para combatir la deficiencia de hierro. Los productos lácteos al igual que los cereales y las harinas son considerados como unos de los principales vehículos para ser fortificados con hierro y en menor proporción la sal, el azúcar y los condimentos (Boccio & Bressan, 2004). Los alimentos fortificados son productos que la industria alimentaria obtiene suplementando en forma significativa el contenido natural de los alimentos en determinados nutrientes esenciales. Para ser considerados como tales, han de aportar entre el 20 y el 100% de los requerimientos diarios recomendados para adultos y niños de más de cuatro años de edad. Las empresas utilizan la fortificación como una estrategia de diferenciación para elaborar alimentos que puedan ser percibidos como productos de mayor valor. Los alimentos enriquecidos son aquellos a los que se han adicionado nutrientes esenciales con el fin de compensar deficiencias de la alimentación. Un ejemplo claro es el de los cereales, que se enriquecen con hierro para asegurar un aporte suficiente en los casos de personas con necesidades elevadas (niños, mujeres hasta la menopausia, embarazadas y lactantes). Los problemas tecnológicos que se presentan en su elaboración se deben a un aumento de la oxidación en los cereales, en general, y a un empeoramiento de las propiedades panificables de las harinas. En el caso de los cereales para desayuno, se agrega en forma de FePO_4 (Gómez-Álvarez Salinas, 2004).

Los antagonistas de la hepcidina que bloquean la síntesis génica tienen aplicación en el tratamiento de la anemia (Anderson & Frazer, 2017) ya que inhibiendo la expresión de hepcidina se produce una mayor exportación celular de hierro y mayor circulación sistémica de este metal en el espacio extracelular (Vogt et al., 2021).

2.2.3 Sobrecarga de hierro

Dado que los iones hierro libres (Fe^{2+} y Fe^{3+}) se unen a ciertas moléculas de las células de la sangre y las dañan, la transferrina y la ferritina actúan como “proteínas acompañantes” protectoras para el transporte y depósito de los iones de hierro. Como consecuencia, el plasma prácticamente no contiene hierro libre. Además, las células sólo tienen pequeñas cantidades de hierro disponible para la síntesis de moléculas que lo

requieran, como los citocromos necesarios para la producción de ATP en las mitocondrias (Ganz & Nemeth, 2012).

En casos de sobrecarga de hierro, la cantidad de hierro presente en el organismo aumenta. Dado que el hierro excedente no se elimina, cualquier trastorno que incremente la absorción a través de la dieta del ion puede causar una sobrecarga. En algunos casos, las proteínas transferrina y ferritina se saturan con otros iones y la cantidad de hierro libre aumenta (Tortora & Derrickson, 2010). Las concentraciones crónicamente altas de hierro conducen a una saturación intermitente o en estado estacionario de transferrina con hierro y la generación de NTBI, con el consiguiente depósito de exceso de hierro en el hígado, las glándulas endocrinas, los miocitos cardíacos y otros tejidos (Ganz & Nemeth, 2012). Por lo tanto, la sobrecarga de hierro generalmente da lugar a trastornos hepáticos, cardíacos, de los islotes pancreáticos y de las gónadas (Tortora & Derrickson, 2010). Además, el exceso de hierro celular puede causar daño tisular al catalizar diferentes reacciones redox que conducen a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden causar daño al ADN, peroxidación de lípidos y oxidación de proteínas (Ganz & Nemeth, 2012) y todas estas perturbaciones tienen un impacto deletéreo en el sistema nervioso central (Muñoz & Humeres, 2012). La formación de ROS se ha asociado con el estrés oxidativo y la patogenia de varias enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y el Parkinson.

Entre las causas comunes de sobrecarga de hierro se encuentra el aumento patológico de la absorción intestinal de hierro, que explica el exceso de este en la hemocromatosis hereditaria y en la sobrecarga de hierro asociada con eritropoyesis ineficaz como la β -talasemia. Las transfusiones de sangre y la administración parenteral de compuestos de hierro constituyen la otra causa principal de sobrecarga de hierro que se usan para tratar ciertos trastornos hereditarios como las anemias (Ganz & Nemeth, 2012).

La mayor parte de la sobrecarga de hierro primaria tiene una base genética. Los síndromes de sobrecarga de hierro primario, a menudo denominados hemocromatosis, son el resultado de mutaciones en genes que participan en el transporte de hierro o su regulación. Se reconocen cinco tipos principales de hemocromatosis que son el resultado de mutaciones en los genes que codifican la proteína de la hemocromatosis (tipo 1), hemojuvelina (tipo 2A), hepcidina (tipo 2B), TFR2 (tipo 3) y FPN1 (tipo 4). La

mayoría de estas son afecciones poco frecuentes o raras, pero la hemocromatosis tipo 1 es común en poblaciones del norte de Europa. La característica común de estos trastornos es la expresión hepática de hepcidina reducida o insignificante, lo que resulta en una incapacidad para limitar la absorción de hierro en la dieta a medida que aumenta la carga de hierro corporal. El hierro se acumula en muchos órganos, sobre todo en el hígado, el corazón y el páncreas. Las consecuencias clínicas de esta acumulación incluyen fibrosis hepática y cirrosis, mayor riesgo de carcinoma hepatocelular, miocardiopatía, artritis y diabetes. Además, el exceso de hierro puede influir en la gravedad de otras enfermedades, como la enfermedad del hígado graso, la fibrosis quística y una amplia gama de trastornos neurológicos. El tratamiento de la sobrecarga de hierro depende de la enfermedad subyacente. Los miméticos de la hepcidina o los agentes que aumentan la expresión del gen de la hepcidina son prometedores en el tratamiento de la hemocromatosis y la β -talasemia (Anderson & Frazer, 2017).

La eritropoyesis ineficaz es una afección en la que un gran número de precursores de eritrocitos de la médula ósea sufren apoptosis y, por lo tanto, no logran completar la maduración en eritrocitos. Las lesiones genéticas que causan eritropoyesis ineficaz incluyen las talasemias y anemia diseritropoyética congénita. En estos trastornos, la expresión de hepcidina se suprime causando hiperabsorción de hierro en la dieta y sobrecarga de este (Ganz & Nemeth, 2012).

La sobrecarga de hierro también permite que ciertos microbios que dependen de él se desarrollen. Por lo general, estos microbios no son patógenos, pero pueden multiplicarse rápidamente y causar efectos graves en poco tiempo en presencia de hierro libre (Tortora & Derrickson, 2010).

2.3 LECHES FERMENTADAS

La leche fermentada es un producto lácteo producido por medio de la fermentación de la leche, que puede haber sido elaborado a partir de productos obtenidos de la leche con o sin modificaciones en la composición, por medio de la acción de microorganismos adecuados y teniendo como resultado la reducción del pH con o sin coagulación (precipitación isoelectrica). Los cultivos de microorganismos serán viables, activos y abundantes en la leche fermentada. Si el producto es tratado

térmicamente después de la fermentación, no se aplica el requisito de microorganismos viables (FAO/WHO, 2010).

Las leches fermentadas son alimentos que se consumen ampliamente en todo el mundo con un aumento sustancial del consumo en los últimos años. Existe un creciente interés de los consumidores de estos alimentos debido a los beneficios nutricionales y para la salud que ofrecen, ya que su efecto sobre la microbiota bacteriana del intestino contribuye a una vida saludable y a aumentar la esperanza de vida (Bourrie et al., 2016).

Los procesos de fermentación generalmente mejoran el interés nutricional de muchos alimentos y aumentan la biodisponibilidad de nutrientes. Además, la fermentación de la leche mejora la digestibilidad y el sabor de esta. La acción de la fermentación de cepas específicas de bacterias del ácido láctico (LAB) puede conducir a la eliminación de factores tóxicos o antinutrientes, como la lactosa y la galactosa, de las leches fermentadas para prevenir la intolerancia a la lactosa y la acumulación de galactosa. La fermentación láctea aporta a sus productos propiedades funcionales beneficiosas para el alimento y para la salud: mejora el sabor, la textura, la conservación, disminuye el contenido calórico, favorece la emulsión y formación de espumas y aporta beneficios nutricionales (Shiby y Mishra, 2013).

La transformación de lactosa en ácido láctico es el hecho más importante que se produce durante la fermentación, además de la formación de otros componentes bioactivos. La lipólisis de triglicéridos no es una actividad significativa debido a que las LAB no tiene lipasa, pero tiene una actividad proteolítica de caseína y produce liberación de aminoácidos y péptidos. Además, las enzimas bacterianas transforman los carbohidratos de la leche en oligosacáridos, algunos de los cuales tienen propiedades prebióticas (Granier et al., 2013).

Además de la producción de ácido láctico, la producción de otros compuestos producidos por las LAB depende de las cepas bacterianas, las condiciones del proceso de fermentación y el medio de fermentación. Las cepas más comunes de las LAB utilizadas para la fermentación de la leche son *Streptococcus thermophilus*, generalmente en asociación con Bifidobacteria, como *Bifidobacterium breve* C50, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum* y *Bifidobacterium animalis*, o con Lactobacilli como *Lactobacillus rickardii*, *Lactobacillus joophilus*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* (Granier et al., 2013).

Diferentes LAB producen diferentes productos de fermentación, aunque tienen en común que están vivos en el producto y pueden interactuar con la microbiota durante el tránsito intestinal y con las células de la pared intestinal (Granier et al., 2013). En este sentido, las leches fermentadas son una excelente matriz para desarrollar una gran variedad de productos innovadores que promueven la salud, como los alimentos funcionales (Bourrie et al., 2016).

Las tendencias actuales en la industria alimentaria y la creciente demanda de alimentos saludables han llevado al desarrollo de productos que aportan componentes funcionales, como sustancias prebióticas o bacterias probióticas. Los alimentos funcionales que contienen prebióticos y probióticos han despertado el interés de la industria láctea debido a la evidencia científica relacionada con sus beneficios positivos para la salud. De hecho, muchos de los alimentos que contienen probióticos y prebióticos son productos lácteos fermentados, como el yogur, que es el producto lácteo fermentado más estudiado, kumys, skyr, yakult y kéfir. Por lo tanto, los productos lácteos fermentados podrían usarse debido a su efecto nutracéutico y porque contribuye a los beneficios para la salud (Bourrie et al., 2016; Chen et al., 2019).

2.3.1 Tipos de leches fermentadas

Según la Norma del Codex Alimentarius las leches fermentadas pueden clasificarse en (FAO & OMS, 2010):

1. La leche fermentada propiamente dicha, cuya definición se ha mencionado anteriormente. Cada leche fermentada tiene un cultivo específico (o cultivos específicos) que se utilizan para la fermentación (Tabla 1). Además de los que constituyen el o los cultivos específicos se podrán agregar otros microorganismos (FAO & OMS, 2010).

Tabla 1. Tipos de leches fermentadas según el cultivo específico. (Modificada de FAO & OMS, 2010).

Leche fermentada	Cultivo específico
Yogur	Cultivos simbióticos de <i>Streptococcus thermophilus</i> y <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
Yogur en base a cultivos alternativos	Cultivos de <i>Streptococcus thermophilus</i> y todas las especies de <i>Lactobacillus</i>
Leche acidófila	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Kefir	Cultivo elaborado a partir de los gránulos del kéfir, <i>Lactobacillus kefir</i> , especies del género <i>Leuconostoc</i> , <i>Lactococcus</i> y <i>Acetobacter</i> que crecen en una estrecha relación específica. Los gránulos del kéfir constituyen tanto levaduras fermentadoras de lactosa (<i>Kluyveromyces marxianus</i>) como levaduras fermentadoras sin lactosa (<i>Saccharomyces unisporus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Saccharomyces exiguus</i>)
Kumys	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i> y <i>Kluyveromyces marxianus</i>

2. La leche fermentada concentrada es una leche fermentada cuya proteína ha sido aumentada antes o después de la fermentación a un mínimo del 5,6%. Las leches fermentadas concentradas incluyen productos tradicionales tales como Stragisto (yogur colado), Labneh, Ymer e Ylette (FAO & OMS, 2010).
3. Las leches fermentadas aromatizadas son productos lácteos compuestos, que contienen un máximo del 50 % (w/w) de ingredientes no lácteos (tales como carbohidratos nutricionales y no nutricionales, frutas y verduras, así como jugos, purés, pastas, preparados y conservadores derivados de los mismos, cereales, miel, chocolate, frutos secos, café, especias y otros alimentos aromatizantes naturales e inoocuos) y/o sabores. Los ingredientes no lácteos pueden ser añadidos antes o después de la fermentación (FAO & OMS, 2010).
4. Las bebidas a base de leche fermentada son productos lácteos compuestos, obtenidas mediante la mezcla de leche fermentada con agua potable, con o sin el agregado de otros ingredientes tales como suero, otros ingredientes no lácteos, y aromatizantes. Las bebidas a base de leche fermentada tienen un contenido mínimo de leche fermentada del 40% (m/m) (FAO & OMS, 2010).

2.3.2 Composición nutricional/características nutricionales

En las leches fermentadas el contenido de energía y macronutrientes es similar al de las leches de partida, si bien se debe tener presente las diferentes raciones de

consumo habitual para el cálculo de la aportación (Tabla 2). Actualmente, los iniciadores microbianos del proceso de fermentación están muy bien definidos. Los principales grupos bacterianos utilizados en la fabricación de productos lácteos fermentados son los lactobacilos, estreptococos y lactococos, debido a sus excelentes características nutricionales y organolépticas, siendo las LAB el grupo más importante (Panesar, 2011). La composición de la leche fermentada puede variar en función de la especie. Por esta razón, aunque la leche fermentada de cabra y la de vaca son similares, presentan diferencias de composición que pueden reflejarse en el efecto en la salud.

Tabla 2. Composición de las leches fermentadas. (Modificada de Oliveira, 2014).

Componentes	Leche fermentada	Yogur, yogur en base a cultivos alternativos y leche acidófila	Kefir	Kumys
Proteína láctea (% w/w)	mín. 2,7%	mín. 2,7%	mín. 2,7%	-
Grasa láctea (% w/w)	menos del 10%	menos del 15%	menos del 10%	menos del 10%
Acidez valorable, expresada como % de ácido láctico (% w/w)	mín. 0,3%	mín. 0,6%	mín. 0,6%	mín. 0,7%
Etanol (% vol./w)	-	-	-	mín. 0,5%
Suma de microorganismos que comprenden el cultivo (ufc/g, en total)	mín. 10 ⁷	mín. 10 ⁷	mín. 10 ⁷	mín. 10 ⁷
Microorganismos etiquetados (ufc/g)	mín. 10 ⁶	mín. 10 ⁶	-	-
Levaduras (ufc/g)	-	-	mín. 10 ⁴	mín. 10 ⁴

2.3.2.1 Proteínas

Los productos lácteos fermentados están compuestos de proteínas de alta calidad, como caseína (α -s1, α -s2, β -caseína, κ -caseína) y proteínas del suero (β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina, lactoferrina, inmunoglobulinas, glicomacropéptido, enzimas y factores de crecimiento) (Tabla 3). Los péptidos específicos se liberan durante la proteólisis de las LAB. Estos péptidos son bioactivos y tienen actividades inmunomoduladoras, antifúngicas, antimicrobianas, antioxidantes y anticancerígenas. Además, debido a este efecto proteolítico de algunas LAB, el proceso digestivo aumenta la digestibilidad y el valor biológico de la proteína (Tojo Sierra et al., 2006). Las proteasas producidas por las LAB de la leche, como las de *Lactococcus lactis*, liberan

oligopéptidos biológicamente activos a partir de α y β -caseínas, las cuales tienen secuencias de aminoácidos que están presentes en casomorfina, lactofina, casoquinina e inmunopéptidos que son péptidos que presentan gran variedad de actividades biológicas, algunas con efecto similar a la morfina. Los oligopéptidos tienen características similares a los analgésicos, estimulan la excreción de insulina y somatostatina, prolongan la reabsorción gastrointestinal de nutrientes, modulan el transporte de aminoácidos en el intestino y también actúan como agentes antidiarreicos. Estos péptidos opioides atípicos difieren de los opioides endógenos, como las encefalinas y las endorfinas, solo en sus secuencias N-terminales (Ebringer et al., 2008).

Además, las bacteriocinas actúan contra otras bacterias con actividad bactericida o bacteriostática. Esta capacidad puede resultar muy útil y representar una oportunidad para buscar nuevas bacteriocinas en microbiotas complejas, como las de un producto fermentado tradicional (Hill et al., 2017).

En relación a la digestibilidad de las proteínas y grasas, se ve mejorada debido a la acción de las bacterias lácticas, que llevan a cabo una predigestión de estos nutrientes. Este hecho supone una ventaja funcional para pacientes que presentan problemas digestivos o intestinales. En el estómago la proteína de las leches fermentadas coagula dando lugar a partículas más pequeñas y que presentan una mayor superficie para ser digeridas, por lo que se mejora su digestibilidad (Tojo Sierra et al., 2006).

Tabla 3. Principales proteínas en la leche de vaca y cabra. (Modificada de Moreno-Fernández et al., 2016).

Proteínas (g/100mL)	Leche de vaca	Leche de cabra
Caseínas		
α 1-Caseína	42.86-53.57	0*-28.0
α 2-Caseína	10.71-14.28	10.0-25.0
β -Caseína	32.14-39.28	0*-64.0
κ -Caseína	10.71-14.28	15.0-29.0
Proteínas del suero		
α -Lactoalbúmina	14.28-21.42	17.8-33.3
β -Lactoglobulina	28.57-57.14	39.2-72.1
Albumina sérica	1.43-5.71	5.1-21.5
Inmunoglobulina	8.57-14.28	4.6-21.4

2.3.2.2 Hidratos de carbono

La lactosa es el principal carbohidrato disponible en los productos lácteos que da lugar al ácido láctico después de la fermentación. Dependiendo del tipo de producto y aditivos industriales, este disacárido puede llegar hasta el 98% del total de carbohidratos en el yogur natural. Su hidrólisis en glucosa y galactosa ocurre principalmente en el tracto digestivo por la β -galactosidasa del borde en cepillo intestinal. Además, contiene oligosacáridos, polisacáridos y dependiendo de las cepas, algunos tipos de exopolisacáridos (homo y heteropolisacáridos) producidos por LAB (Fernandez et al., 2015). Una estrategia terapéutica para el consumo de productos lácteos fermentados en personas que presentan intolerancia a la lactosa es su mayor contenido de lactasa que ayuda a digerir la lactosa, disminuyendo los síntomas típicos (diarrea, hinchazón, dolor abdominal y flatulencia) (Levri et al., 2005).

2.3.2.3 Lípidos

El producto lácteo fermentado tiene un contenido de grasa menor que la leche, debido a los ingredientes lácteos que se utilizan en su elaboración (Tojo Sierra et al., 2006). Dependiendo del origen de la leche y del proceso de fabricación, el contenido de lípidos en el producto lácteo fermentado puede variar en cantidad, pero la calidad no cambia significativamente en comparación con la leche de partida.

Los triglicéridos representan más del 95% de los lípidos del producto lácteo fermentado. A pesar del contenido de grasas saturadas (72%), muchos de los beneficios para la salud parecen atribuirse a los lípidos, que también contienen un 25% de ácidos grasos monoinsaturados y 3% poliinsaturados y son vectores de las vitaminas liposolubles A, D, E y K. Además, los productos lácteos contienen altos niveles de ácido linoleico conjugado (Fernández et al., 2016).

2.3.2.4 Vitaminas y minerales

Los productos lácteos fermentados son ricos en muchas vitaminas y minerales altamente biodisponibles.

Al igual que la leche de vaca la de cabra es una excelente fuente de niacina (vitamina B₃), tiamina (vitamina B₁), riboflavina (vitamina B₂), ácido pantoténico (vitamina B₅) y vitamina A. Contiene aproximadamente el doble de vitamina A que la leche de vaca, el alto contenido de esta vitamina explica la ausencia de carotenoides en la leche de cabra, pues todos estos se encuentran ya convertidos a vitamina A. Además, la leche de cabra es muy rica en riboflavina, un importante factor del crecimiento (Richardson, 2004).

La leche de cabra contiene niveles superiores de minerales en comparación con la leche de vaca. Se distingue de otras leches por su alto contenido en calcio, cloro, potasio, fósforo y magnesio, y menores de hierro, cinc, cobre y azufre. Comparativamente, la leche de cabra contiene 134 mg/100g de calcio, mientras que la leche de vaca contiene 119 mg/100 g. Aunque la leche de cabra tiene una baja concentración de hierro, tiene una mayor biodisponibilidad que en la leche de vaca debido a la presencia de mayores cantidades de nucleótidos (Raynal-Ljutovac et al., 2008).

El bajo pH de las leches fermentadas hace que algunos minerales sean más solubles que en la leche normal y, por ello, tienen una mayor biodisponibilidad en los productos lácteos fermentados que en la leche cruda. No obstante, la absorción de algunos elementos, especialmente del magnesio y del cinc, está favorecida por la presencia de lactosa, la cual disminuye durante la fermentación, por lo que la absorción neta a partir de leche acidificada es menor. Estos efectos se han comprobado en ensayos realizados con animales alimentados con yogur y la absorción del fósforo, que está menos afectada por la lactosa, aumenta en algunos casos (Tojo Sierra et al., 2006).

Además, el aporte de ácido láctico parece jugar un papel importante en la absorción de calcio, inhibición de la microbiota patógena y en la estimulación de la secreción intestinal (Tojo Sierra et al., 2006).

Asimismo, la lactosa favorece la absorción del calcio, aunque el mecanismo no está completamente establecido, parece ser que se debe a un aumento de la permeabilidad intestinal, lo que facilita la absorción mediante difusión pasiva. Este efecto positivo de la lactosa es especialmente importante cuando otros mecanismos de absorción del calcio están comprometidos, como ocurre en caso de déficit de vitamina D (Ortega et al., 2004).

2.3.2.5 Prebióticos

Un prebiótico es un componente con fermentación selectiva que produce cambios específicos en la composición de la microbiota gastrointestinal, así como en su actividad con efectos beneficiosos sobre la salud del huésped. La microbiota gastrointestinal produce una fermentación selectiva de prebióticos que modula la salud intestinal a través de la producción de metabolitos bioactivos, especialmente ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato, butirato, lactato) que se generan por fermentación de carbohidratos complejos; y ácidos grasos poliinsaturados que muestran un flujo desde el intestino hacia la circulación sistémica. Los ácidos grasos de cadena corta tienen un efecto trófico sobre las células intestinales y participan en el control de diversos procesos como la proliferación de la mucosa, la inflamación, la carcinogénesis colorrectal, la absorción de minerales y la eliminación de compuestos nitrogenados. Se proponen diferentes vías para aumentar la cantidad de ácidos grasos de cadena corta, incluyendo la administración de probióticos, prebióticos y simbióticos. Los metabolitos de origen bacteriano representan aproximadamente el 10% de los metabolitos circulantes y son metabolitos reguladores clave ya que estos componentes no son digeribles y estimulan selectivamente el crecimiento de microorganismos específicos (Chen et al., 2019).

La función del prebiótico es mejorar la supervivencia, el crecimiento y el rendimiento de los probióticos u otras bacterias beneficiosas en el colon que inducen beneficios para la salud. Tanto la lactosa como los exopolisacáridos son una fuente conocida de prebióticos. Otra fuente de prebióticos son los galactooligosacáridos, polidextrosa y sialilactosa que podrían mejorar significativamente la absorción y síntesis de las vitaminas B (Hill et al., 2017).

2.3.2.6. Probióticos

Los probióticos son microorganismos vivos que confieren un beneficio a la salud del huésped cuando se administran en cantidades adecuadas. En las pautas globales sobre probióticos y prebióticos publicados en 2013 por la Organización Mundial de Gastroenterología se confirmó que la efectividad de los probióticos es específica de la cepa y la dosis, disipando el mito de que cualquier yogur puede considerarse un

probiótico. En 2014 se definieron tres categorías amplias de probióticos (McFarland, 2015).

1. Aquellos que no tienen declaraciones de propiedades saludables (generalmente se consideran seguros, no requieren prueba de efectividad).
2. Como un suplemento dietético con una declaración de propiedades saludables (cepa utilizada definida, la eficacia basada en la evidencia de los ensayos clínicos o metaanálisis y su uso para fortalecer el sistema inmunológico).
3. Como fármaco probiótico (ensayo clínico por indicación o enfermedad específica, cepa utilizada definida, justificación riesgo-beneficio y cumplimiento de la normativa que legisle los fármacos).

Se encontró que los probióticos están especialmente indicados en la prevención de la diarrea asociada con antibióticos, el tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*, el tratamiento de la diarrea aguda pediátrica, la prevención de alergias, el tratamiento de la enfermedad crónica, el síndrome del intestino irritable, el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal, el tratamiento de la vaginitis y vaginosis bacteriana, prevención de la enterocolitis necrotizante en recién nacidos, prevención de la diarrea del viajero, tratamiento de la diarrea aguda en adultos, tratamiento del estreñimiento, tratamiento de la infección por *Clostridium difficile*, sepsis, infecciones dentales y obesidad (McFarland, 2015).

Se está investigando ampliamente el uso de probióticos, prebióticos y simbióticos (combinación de probióticos y prebióticos en el mismo producto lácteo) en el tratamiento o la prevención del cáncer. Existe evidencia de que estos actúan como agentes anticancerígenos o agentes antimutagénicos a través de la dieta (Hill et al., 2017).

2.3.2.7. Levaduras

Una característica única de la producción tradicional de productos lácteos fermentados es la presencia de una gran cantidad de levaduras en la leche fermentada. Aunque la mayoría de los microorganismos probióticos que se comercializan son bacterias como los lactobacilos y bifidobacterias, hay algunas especies de levadura y

cepas que se han reconocido que tienen propiedades probióticas, tales como *Saccharomyces boulardii*.

Se ha demostrado que *S. boulardii* mejora los síntomas de la diarrea asociada a *Clostridium difficile*, además, reduce la inflamación y estimula la respuesta inmune a nivel intestinal. Algunas levaduras del kéfir tienen características inmunomoduladoras, como *Kluyveromyces marxianus* que produce una reducción en la secreción de citocinas proinflamatorias TNF- α , IL-6 y MIP1 α (Bourrie et al., 2016).

2.3.3 Efectos beneficiosos sobre la salud

2.3.3.1 Efectos inmunológicos

2.3.3.1.1. Efectos sobre el intestino y el microbioma del huésped

Los mecanismos promotores de la salud se basan en el efecto beneficioso sobre la modulación de la función inmune, generalmente debido a la estimulación de respuestas inmunes innatas. En este caso, modulan principalmente la producción de citocinas y péptidos antimicrobianos (Ebringer et al., 2008).

Varios estudios han demostrado que las heces de los niños alimentados con fórmula a base de leches fermentadas en comparación con los que recibieron una fórmula estándar no fermentada tenían una colonización con mayor frecuencia por *Bifidobacterium longum infantis* y *B.breve*, especies que se encuentran principalmente durante la lactancia y se asocian con una función de barrera intestinal mejorada y una adecuada maduración del sistema inmunológico (Granier et al., 2013).

Una de las principales formas a través de las cuales los productos alimenticios que contienen probióticos pueden ejercer efectos beneficiosos es alterando la microbiota intestinal. Esto puede hacerse bien mediante la introducción de nuevas especies o cepas en el tracto gastrointestinal, o mediante la promoción del crecimiento de microorganismos beneficiosos que ya están presentes. El consumo de leche fermentada se ha asociado con un aumento de microorganismos beneficiosos, como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, mientras que simultáneamente disminuyen las especies microbianas dañinas como *Clostridium perfringens* (Bourrie et al., 2016). El consumo de LAB puede

disminuir el efecto de *Escherichia coli* gracias a las inmunoglobulinas anti-E que evitan la colonización por bacterias patógenas (Shiby & Mishra, 2013)

Los componentes producidos durante la fermentación tienen beneficios en la microbiota intestinal (Granier et al., 2013). Los péptidos bioactivos producidos durante la fermentación de la leche por *Lactobacillus helveticus* han sido propuestos como una alternativa para el control de la infección bacteriana por sus propiedades antimicrobianas e inmunoestimulantes. La leche fermentada aumentó la producción de IL-6, TNF- α , IL-1 β mediante la estimulación de macrófagos, acompañada de una mayor producción de óxido nítrico y actividad fagocítica (Matar et al., 2001).

Por otro lado, se ha demostrado que el kéfir tiene actividades antibacterianas y antifúngicas. Se ha encontrado que la leche fermentada con kéfir tiene una función similar a la ampicilina, amoxicilina, azitromicina, ceftriaxona y cetoconazol (Bourrie et al., 2016).

2.3.3.1.2 Efectos anticancerígenos

El efecto preventivo de los probióticos sobre la carcinogénesis puede estar asociado a la modulación de la respuesta inmunitaria y cambios en la microbiota intestinal, evitando el aumento de bacterias que se convierten de procarcinógenos en carcinógenos. Es importante resaltar que el consumo de productos lácteos fermentados puede estimular el sistema inmunológico y puede mantenerlo en un estado de vigilancia, lo que podría ser útil para hacer frente a diferentes tipos de cáncer (De Moreno de Leblanc & Perdígón, 2010).

2.3.3.1.2.1. Cáncer de colon

En un modelo de cáncer de colon murino, el consumo de productos lácteos fermentados inhibe el crecimiento tumoral a través de la reducción de la respuesta inflamatoria a través del aumento de células secretoras de IL-10, la apoptosis y el descenso de las enzimas procarcinogénicas. Las LAB pueden estar involucradas en el descenso de las actividades enzimáticas procarcinógenas y en los cambios en la flora

intestinal. El consumo de productos lácteos fermentados aumenta el número de células que codifican IgA y linfocitos T CD4 en la lámina propia del intestino grueso con una disminución de las células IgG y linfocitos T CD8, lo que podría limitar la respuesta inflamatoria, ya que la IgA se considera una barrera importante en la neoplasia de colon. Las leches fermentadas pueden modular el sistema inmunológico de la mucosa intestinal. La administración de productos fermentados puede tener un impacto en la microbiota intestinal, estimular las células inmunes asociadas al intestino y es útil contra la inflamación intestinal y el cáncer de colon (De Moreno de LeBlanc et al., 2007).

2.3.3.1.2.2. Cáncer de mama

Las leches fermentadas tienen fracciones de péptidos producidos durante la fermentación que pueden estimular el sistema inmunológico e inhibir el crecimiento de tumores (Matar et al., 2001). La leche fermentada disminuye la IL-6 y aumenta la IL-10 y la IL-4 en suero, glándulas mamarias y células inmunes (De Moreno De Leblanc & Perdígón 2010).

Los productos lácteos fermentados inducen apoptosis, detención del ciclo celular y reducen el crecimiento tumoral en las células del cáncer de mama; por lo tanto, pueden ser adecuados para la prevención o el tratamiento del cáncer de mama.

2.3.3.1.3 Efectos inmunomoduladores

Las LAB inducen la maduración y activación de las células dendríticas humanas después de la fermentación de un medio a base de suero de leche (Granier et al., 2013). La leche fermentada con probióticos estimula las células intestinales con liberación de IL-6, así como las células relacionadas con la barrera inespecífica y con las células inmunes intestinales, aumentando la producción de linfocitos T, linfocitos B, Ig A, y la expresión de marcadores celulares relacionados con las respuestas innatas y adaptativas mediadas por macrófagos (De Moreno de Leblanc & Perdígón, 2010).

Por otro lado, los metabolitos producidos por las bacterias de la leche fermentada por *Lactobacillus helveticus*, que contienen péptidos y oligosacáridos específicos, modulan la inmunidad de las mucosas.

Estos productos podrían promover la inducción de linfocitos Th1 o linfocitos T reguladores y, por tanto, podrían participar activamente en el mantenimiento de la homeostasis del sistema inmunológico (Granier et al., 2013).

2.3.3.1.4 Efectos antialérgicos

Algunos estudios han informado que la complejidad y heterogeneidad del microbioma humano es un factor importante para desarrollar una enfermedad alérgica. Los altos niveles de *Bifidobacterium* y lactobacilos del grupo 1 en el intestino de los niños muestran una menor incidencia de enfermedad alérgica posterior. La suplementación con *Bifidobacterium* influye en la microbiota intestinal de los bebés porque reduce los niveles de *Bacteroides* y se ha asociado con una menor incidencia de alergia alimentaria (Bourrie et al., 2016).

Uno de los principales mecanismos de la alergia alimentaria es el desequilibrio de los linfocitos Th1/Th2, que conduce a una mayor producción de IgE. Varios estudios muestran que la leche fermentada con lactobacilos puede ayudar a aliviar los síntomas de la alergia (Bourrie et al., 2016).

2.3.3.2 Efectos hipocolesterolemiantes

Los estudios clínicos han demostrado que la administración regular de ciertos probióticos puede tener efectos hipocolesterolémicos. Las bacterias probióticas pueden metabolizar el colesterol y, por tanto, reducen su reabsorción en el tracto gastrointestinal. Los estudios *in vitro* e *in vivo* indican que los lactobacilos, bifidobacterias y otras bacterias de la leche asimilan el colesterol, por incorporación a las membranas celulares, desconjugación y precipitación del colesterol con los ácidos biliares. Los ácidos biliares desconjugados son menos solubles y, por lo tanto, se absorben menos en la luz intestinal que sus formas conjugadas. Un consumo diario a

largo plazo de productos lácteos fermentados aumenta los niveles séricos de colesterol HDL y mejora la relación LDL/HDL. Los resultados muestran una disminución estadísticamente significativa en el nivel de colesterol total y colesterol LDL que disminuye de manera más significativa en personas con niveles iniciales de colesterol más altos. Además, se observó un descenso en el nivel de glucosa en sangre y creatinina sérica, proteína C reactiva y presión arterial (Ebringer et al., 2008).

2.3.3.3 Efectos antioxidantes

El consumo de leche fermentada inhibe la peroxidación de lípidos mediante la captación de especies reactivas de oxígeno y radicales libres, mejorando significativamente la actividad antioxidante total en comparación con la leche no fermentada, incluido el estado antioxidante, la resistencia oxidativa de la fracción de lipoproteínas, la reducción de los peróxidos de lipoproteínas y la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad. Los exopolisacáridos de la leche fermentada aumentan los niveles séricos de glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa, catalasa y capacidad antioxidante total y disminuye el nivel de malondialdehído (Zhang et al., 2017).

La leche fermentada de cabra aumenta los niveles séricos de melatonina y la capacidad antioxidante total y reduce la expresión génica de glutatión peroxidasa 1 en la mucosa duodenal, limitando el daño oxidativo a las principales biomoléculas del organismo (Moreno-Fernandez et al., 2016, 2017b).

El consumo de kéfir ha mostrado un efecto protector sobre el estrés oxidativo, al aumentar el nivel de glutatión peroxidasa y disminuir el nivel de malondialdehído, y también fue efectivo para reducir la peroxidación lipídica (Ebringer et al., 2008).

2.3.3.4 Efectos óseos

Los ensayos de intervención en niños y adolescentes han demostrado que los productos lácteos fermentados tienen un efecto positivo en la salud ósea, particularmente en el contenido mineral óseo y la densidad de masa ósea (Rizzoli & Biver, 2018).

En adultos, afecta al equilibrio del calcio y la reabsorción tubular de calcio. Los estudios respaldan una asociación positiva significativa entre la ingesta de productos lácteos fermentados y la mejora de la formación ósea, aumentando la densidad de masa ósea y previniendo su pérdida.

El consumo de productos lácteos enriquecidos con prebióticos fue más eficaz que la leche para disminuir la resorción ósea ya que se potencia la biodisponibilidad del calcio. Los productos del metabolismo de los ácidos grasos de cadena corta pueden modificar directamente el metabolismo intestinal, mejorar la función de la barrera intestinal y modificar el pH del intestino, lo que influye en la disponibilidad de calcio y aumenta su absorción (Rizzoli & Biver, 2018).

2.3.3.5 Efectos hipotensores

Las bacterias probióticas hidrolizan las proteínas de la leche a oligopéptidos que presentan diversas funciones biológicas, entre ellas péptidos pequeños con efecto hipotensor basado en la inhibición de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina, tales como Val-Pro-Pro e Ile-Pro-Pro. La actividad proteolítica de las LAB durante la fermentación de la leche genera péptidos hipotensores con un mayor número de unidades de aminoácidos, como son las casoquininas y lactoquininas (Ebringer et al., 2008).

En las últimas décadas, los posibles efectos de los productos lácteos fermentados en la prevención y el tratamiento de enfermedades han sido profundamente estudiados debido a la amplia gama de productos disponibles en la industria alimentaria. Numerosos estudios y ensayos clínicos con productos lácteos fermentados sugieren que presentan funciones como agentes inmunomoduladores, anticancerígenos, hipocolesterolémicos, antioxidantes e hipotensores. Según la evidencia científica, los productos lácteos fermentados son uno de los mejores ingredientes naturales para ser utilizados como un tratamiento eficaz y que a su vez tiene menos efectos secundarios adversos.

Para garantizar la reproducibilidad, los productos de fermentación deben tener un control preciso del proceso tecnológico. Debido a la variedad de cepas y la

complejidad del sustrato de fermentación, la composición exacta y la estructura molecular de los productos de fermentación no se conocen completamente. Estos enfoques están limitados por el hecho de que no todos los microorganismos se cultivan fácilmente en el laboratorio y no existe un medio de cultivo que permita el crecimiento simultáneo de todas las cepas presentes. La identificación molecular de los compuestos podría ser un objetivo de la investigación, necesaria para comprender los efectos. Así, los productos del futuro mejorarán y ajustarán sus características organolépticas o contenido de nutrientes según el gusto o las necesidades sanitarias de cada consumidor (García-Burgos et al., 2020)

Existe la necesidad de ensayos controlados aleatorios de alta calidad para distinguir los efectos inmunológicos de los productos de fermentación de los producidos por las paredes celulares bacterianas y para confirmar las propiedades inmunomoduladoras específicas.

Una sugerencia para estudios futuros es proporcionar descripciones detalladas del probiótico probado, incluido el género, la especie y la cepa, la dosis diaria y la duración utilizada, de modo que se puedan agrupar y analizar los datos apropiados.

Los productos lácteos fermentados son alimentos funcionales por lo que se requiere una investigación más profunda para obtener un mejor conocimiento de cómo estos productos podrían usarse como agente nutracéutico y como una alternativa terapéutica potente en un gran número de patologías.

2.3.4 Leche fermentada de cabra

La leche de cabra es un alimento importante para los seres humanos, especialmente para quienes tienen un problema de intolerancia a la lactosa y son sensibles a la leche de otros animales. Entre los nutrientes importantes de la leche de cabra se encuentran grasas, proteínas, lactosa, vitaminas, enzimas y sales minerales. La mayoría de los componentes de la leche de cabra son mayores que los de otros animales productores de leche. Por ejemplo, la leche de cabra contiene un 25% más de vitamina B6, un 47% más de vitamina A y un 13% más de calcio que la leche de vaca. Además, la leche de cabra también se utiliza como terapia frente a diferentes problemas que

incluyen trastornos gastrointestinales, vómitos, cólicos, diarreas, estreñimiento y problemas respiratorios (Getaneh et al., 2016).

Existen diferencias específicas en la composición entre las leches fermentadas deshidratadas de cabra y vaca (Tabla 4). Aunque la composición básica de ambas leches fermentadas es similar, la leche fermentada de cabra presenta un mayor contenido de proteínas y aminoácidos, así como un mayor contenido mineral. Minerales como el selenio, magnesio y zinc, con un papel antioxidante clave, y el calcio, de elevada importancia en la mineralización ósea y la señalización celular, se encontraron en mayor cantidad en la leche fermentada de cabra con respecto a la de vaca. En cuanto a las vitaminas, la leche fermentada de cabra presenta mayores niveles de vitamina A, B6, B12 y D3 y menores de vitamina E, ácido fólico y vitamina C, en comparación con la leche fermentada de vaca, además presenta un perfil de ácidos grasos saludable (Moreno-Fernández et al., 2016).

Tabla 4. Composición básica de la leche en función de la especie. (Modificada de Moreno-Fernández et al., 2016).

Componente	Leche de vaca	Leche de cabra
Energía (Kcal)	61	69
Sólidos totales (g/100g)	12.6	13.2
Proteína (g/100g)	3.4	3.6
Grasa (g/100g)	3.7	4.5
Lactosa (g/100g)	4.7	4.3
Cenizas (g/100g)	0.7	0.8

La leche de cabra es conocida por su menor potencial alergénico y mejor digestibilidad en comparación con la leche de vaca, así como la presencia de compuestos que promueven la salud. Por lo tanto, la leche de cabra se puede utilizar en la fabricación de una amplia variedad de productos y también se puede utilizar como portador de sustancias prebióticas o bacterias probióticas. Se han realizado algunos estudios *in vivo* para explorar su potencial terapéutico y han mostrado excelentes efectos biológicos.

Asimismo, se sabe que la viabilidad de los probióticos no es un requisito esencial para ejercer beneficios para la salud, lo que representa una oportunidad potencial en el área de productos lácteos funcionales de cabra (Verruck et al., 2019).

Recientemente, el consumo y la producción de leche de cabra ha aumentado a nivel mundial, especialmente en las naciones desarrolladas, debido al mayor conocimiento de la composición química de la leche de cabra, rica en proteínas de alto valor biológico, ácidos grasos esenciales, alta biodisponibilidad mineral y contenido vitamínico. Aunque se sabe que la cabra puede producir leche que tiene un alto valor y composición nutricional, varios factores que incluyen raza, estado nutricional, tamaño y forma de la ubre, peso corporal y tamaño de la camada afectan a la composición y al contenido de la leche. La leche de cabra carece de ácido fólico y no se recomienda para bebés menores de un año porque puede causar anemia (Getaneh et al., 2016).

2.3.4.1 Efectos beneficiosos sobre la salud

La leche fermentada de cabra aumenta la resistencia a las infecciones por *Salmonella typhimurium* y *Streptococcus pneumoniae* en huéspedes inmunodeprimidos. Algunos estudios en modelos animales y celulares, indican que los ácidos grasos caproico (C6:0), caprílico (C8:0) y cáprico (C10:0), especialmente abundantes en la leche de cabra, podrían tener actividad antimicrobiana (Moreno Aznar et al., 2013). Además de los beneficios nutricionales de los componentes de la leche, los componentes adicionales como los anticuerpos, las glicoproteínas y los oligosacáridos pueden proteger al prevenir infecciones por patógenos y apoyar el crecimiento del epitelio intestinal (Nayik et al., 2021). El aumento de los recuentos de lactobacilos intestinales puede proporcionar un sistema de defensa contra las infecciones entéricas (Verruck et al., 2019).

La inclusión de la leche fermentada de cabra en la dieta mejora los parámetros hematológicos. La normalización precoz de leucocitos, neutrófilos y linfocitos en sangre es importante para la recuperación de la inmunidad frente a infecciones intestinales y respiratorias (Verruck et al., 2019). Además, la leche de cabra es un agente antiviral eficaz. La infectividad viral reducida es causada por el bloqueo de la superficie del virus por los componentes activos de la leche de cabra y la caseína, lo que probablemente conduce a la inhibición de la replicación. Lo más probable es que esta fracción esté compuesta por uno o más componentes distintos que interactúan con los receptores de la cápside o la membrana de diferentes virus, lo que impide la entrada en las células y la replicación. Sería de interés estudiar la posibilidad del efecto de la caseína de la leche de

cabra sobre el COVID-19. Es probable que la estimulación de la inmunidad por la leche fermentada de cabra dependa de subproductos como los péptidos bioactivos (Rubin et al., 2021).

Su mayor contenido en vitamina A, induce una recuperación de las proteínas intracelulares relacionadas con la homeostasis del hierro y la inducción de las células T y B a nivel intestinal, mejorando la defensa inmunitaria. Como se ha comentado anteriormente, la leche fermentada de cabra disminuye los niveles plasmáticos de citoquinas pro-inflamatorias e induce un aumento de las citoquinas antiinflamatorias (Salva et al., 2011).

Los péptidos bioactivos de la leche fermentada de cabra se consideran responsables de las actividades inhibitorias de la enzima convertidora de angiotensina, actividades antioxidantes y antibacterianas. Estos hallazgos refuerzan los posibles beneficios del consumo de leche fermentada de cabra en la prevención de enfermedades cardiovasculares asociadas al estrés oxidativo y la hipertensión (Moreno-Montoro et al., 2018).

La leche fermentada de cabra tiene propiedades nutraceuticas con efectos positivos para la salud del sistema cardiovascular, ya que reduce la respuesta relacionada con la señalización inflamatoria, produce activación de los macrófagos y tiene un papel importante en la aterosclerosis (López-Aliaga et al., 2018). Además, se ha demostrado que el consumo diario de leche de cabra reduce la inflamación aguda, disminuye la secreción basal exagerada de IL-6, IL-8 y respuesta aguda, y genera una regulación a la baja de IL-1 β y la producción de TNF- α en pacientes ancianos inmunocomprometidos. Por esta razón, la leche y el yogur de cabra podrían utilizarse como alimentos funcionales en la enfermedad inflamatoria intestinal (Nayik et al., 2021).

El consumo de leche fermentada de cabra mejora el estado hematológico y promueve respuestas metabólicas beneficiosas, que pueden atenuar los factores de riesgo cardiovascular durante la recuperación de la anemia y la sobrecarga de hierro. El consumo de leche fermentada de cabra disminuye los niveles de TNF- α , IL6 y TIMP1, que están involucrados en todas las etapas del proceso de aterosclerosis, desde la disfunción endotelial hasta la rotura de la placa aterosclerótica y la trombosis. Por lo tanto, la leche fermentada de cabra es un candidato natural como agente nutraceutico

que puede tener un papel beneficioso sobre la salud cardiovascular durante la recuperación de la deficiencia de hierro (Muñoz-Alfárez et al., 2019) El consumo de leche de cabra reduce las concentraciones plasmáticas de colesterol y triglicéridos y por tanto tiene un efecto positivo sobre el metabolismo de los lípidos idéntico al del consumo de una dieta que incluya aceite de oliva virgen. La proporción de ácidos grasos omega-6 a omega-3 en la grasa de la leche de cabra es 5: 1, que es comparable a la proporción sugerida para la prevención de enfermedades cardiovasculares en humanos, ya que el consumo de ácido linoleico conjugado puede reducir la grasa corporal al bloquear la lipogénesis y aumentar la lipólisis.

Además de las funciones anteriormente mencionadas, la leche fermentada de cabra podría tener un efecto neuroprotector, que mejoraría las funciones moleculares del cerebro (Moreno-Fernández et al., 2019).

El consumo habitual de leche fermentada de cabra disminuye la adiposidad y el peso corporal en modelos animales al incrementar el gasto energético, la lipólisis y la sensación de saciedad (Muñoz-Alfárez et al., 2020). Además, acelera la recuperación de los parámetros nutricionales clínicos como el peso corporal y el perfil proteico, que podría ser resultado de una mayor biodisponibilidad de péptidos y aminoácidos, lo que facilitaría su absorción a nivel intestinal (Verruck et al., 2019).

Además, durante la recuperación de la anemia, el consumo de leche fermentada de cabra modula la homeostasis del depósito de tejido reduciendo la adiposidad, induciendo elevación de los niveles de leptina y reducción de grelina y, por lo tanto, disminuyendo el apetito y aumentando la saciedad, en comparación con la leche fermentada de vaca. Además, las concentraciones plasmáticas de adiponectina se redujeron en animales alimentados con leche fermentada de cabra, lo que muestra una correlación inversa con los ácidos grasos no esterificados (NEFA), un marcador importante de la movilización de lípidos, lo que indica un aumento de las tasas de lipólisis en el tejido adiposo. La regulación positiva de la irisina en animales alimentados con leche fermentada de cabra contribuye a un perfil metabólico favorable y al pardeamiento del tejido adiposo durante la recuperación de la anemia en comparación con la leche fermentada de vaca (Díaz-Castro et al., 2017).

El consumo de leche fermentada de cabra durante la recuperación de la anemia mejora la lipólisis y la termogénesis en el músculo esquelético, un importante regulador endocrino del metabolismo corporal. La expresión de la proteína UCP1 aumentó en los animales alimentados con leche fermentada de cabra, lo que indica un aumento del metabolismo muscular, aumento de la termogénesis, buen funcionamiento mitocondrial y una mejora en la degradación de los ácidos grasos, lo que representa un crecimiento de las células del músculo esquelético. La mayor expresión de PepT1 en el músculo esquelético de animales alimentados con leche fermentada de cabra podría favorecer la síntesis y regeneración de fibras musculares, lo que explica también la mayor cantidad de masa magra en estos animales (Moreno-Fernández et al., 2017a).

El estado antioxidante se asocia con biomarcadores de estrés oxidativo como hidroperóxidos, isoprostanos, 8-OHdG y roturas de cadenas de ADN durante la recuperación de la anemia ferropénica nutricional. Si bien el consumo de leche fermentada de cabra redujo la expresión de glutatión peroxidasa 1 en la mucosa duodenal, indujo un efecto protector en los tejidos estudiados, aumentando la capacidad antioxidante total y disminuyendo los biomarcadores de daño oxidativo, lo que se correlaciona directamente con la expresión y actividad de enzimas antioxidantes en el hígado, revelando que la leche protege los principales componentes biológicos de las células (lípidos, proteínas, prostaglandinas y ADN) del daño oxidativo provocado durante la recuperación de la anemia (Moreno-Fernández et al., 2017b). La leche fermentada de cabra induce mecanismos antioxidantes intrínsecos como la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión reductasa que pueden proporcionar protección contra enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo como cáncer, diabetes, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (Verruck et al., 2019).

Además, durante la instauración de la anemia, el aumento de la secreción de melatonina y de los niveles de corticosterona podría ser un mecanismo compensador para aliviar, al menos en parte, el estado inflamatorio inducido por la anemia, mejorando el metabolismo energético y la señalización inflamatoria alterada en el curso de esta patología. La leche fermentada de cabra tiene efectos positivos en la recuperación de la anemia, aumentando los niveles séricos de melatonina y el estado antioxidante total, incluso en situación de sobrecarga de hierro (Moreno-Fernández et al., 2016).

Las características de la leche de cabra mejoran la microestructura y la composición de la fórmula infantil, emulando los glóbulos de grasa complejos que se observan en la grasa de la leche humana, y se ha demostrado que ayudan a la digestión, así como al desarrollo cognitivo e inmunológico (Nayik et al., 2021).

Varias investigaciones han sugerido la leche de cabra como un alimento funcional por su perfil nutricional y beneficios para la salud, alteración beneficiosa de los procesos fisiológicos y disminución del riesgo de enfermedades crónicas (Nayik et al., 2021).

Objetivos

3. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto del consumo de una dieta basada en fermentados lácteos de cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro y sus repercusiones sobre el estado nutricional y el funcionamiento del sistema inmunológico durante la recuperación de la anemia ferropénica nutricional.

Objetivos específicos

Para alcanzar este objetivo general se han establecido los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar el estado nutricional, peso y composición corporal tras la recuperación de la anemia ferropénica con dietas basadas en fermentados lácteos (cabra o vaca) con contenido normal o sobrecarga de hierro.
2. Estudiar los cambios en los biomarcadores relacionados con la señalización pro y antiinflamatoria tras el consumo de dietas basada en fermentados lácteos (cabra o vaca) con contenido normal o sobrecarga de hierro.
3. Estudiar el efecto del consumo de una dieta basada en fermentados lácteos de cabra (en comparación con la de vaca) con contenido normal o sobrecarga de hierro sobre la función del sistema inmune, en especial sobre la producción de linfocitos, citoquinas y factores de crecimiento, durante la recuperación de la anemia ferropénica nutricional.
4. Evaluar la actividad funcional de las tres vías de activación del sistema del complemento y los niveles séricos de lactoferrina, como modulador de la respuesta inmunitaria tras la recuperación de la ferropénica con una dieta basada en fermentados lácteos de cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro.

Material y métodos

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Para el desarrollo de esta tesis doctoral se han empleado 80 ratas Wistar albina macho (*Rattus norvegicus albinus*) recién destetadas, con un peso de 36-42 g, procedentes de la Unidad de Experimentación Animal de la Universidad de Granada (Granada, España). Los protocolos de manejo, cuidado y sacrificio de los animales fueron aprobados por el Comité de Bienestar Animal de la Universidad de Granada (ref. 11022011) y se llevaron a cabo siguiendo la directiva 2010/63/EU del Parlamento Europeo y del Consejo y la Declaración de Helsinki, relativas a la protección y bienestar de los animales utilizados con fines de investigación. Los ensayos biológicos con animales se llevaron a cabo en la Unidad de Experimentación Animal del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Granada que cuenta con área de categoría certificada como libre de gérmenes patógenos (SPF). Los animales se mantuvieron en condiciones de alta seguridad biológica, con parámetros sanitarios y medioambientales rigurosamente controlados. Los animales fueron alojados en células individuales situadas en una habitación termorregulada (20-22° C), con una humedad relativa del 55-60% y un período de luz-oscuridad de 12 h.

4.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental de este estudio comprende dos periodos experimentales: un período pre-experimental para la inducción de anemia ferropénica nutricional, seguido de un período experimental de alimentación con las dietas semisintéticas a ensayar basadas en un producto fermentado de leche de cabra o vaca (Figura 6).

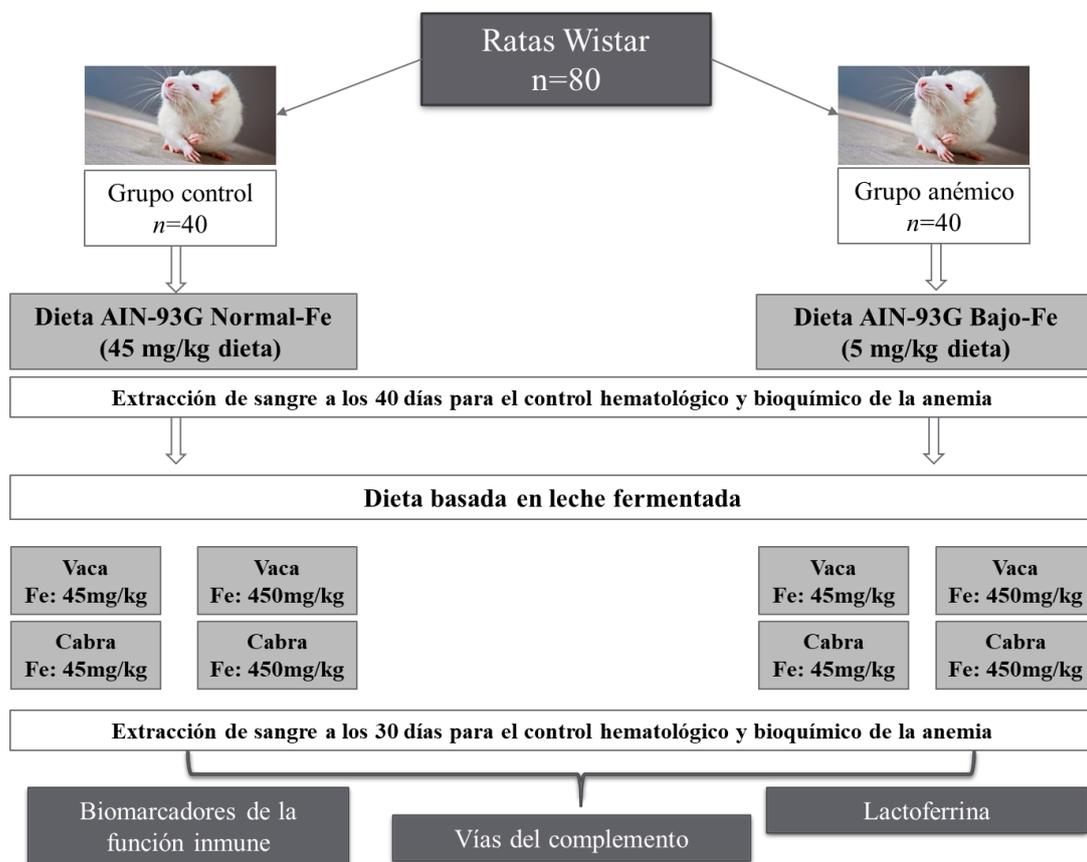


Figura 6. Diseño experimental del estudio.

- **Período pre-experimental (PPE)**

Las ratas recién destetadas (n=80) fueron divididas aleatoriamente en dos grupos experimentales (40 animales por grupo) alimentados *ad libitum* durante 40 días con dieta AIN-93G, con contenido normal de hierro (grupo control, 45 mg/kg de dieta) (Reeves et al., 1993) o bajo contenido de hierro (grupo anémico, 5 mg/kg de dieta), para la inducción experimental de anemia (Pallarés et al., 1993). Para la elaboración de la dieta con bajo contenido en hierro se omitió el hierro del suplemento mineral y se les administró agua desionizada destilada.

Al final del PPE, tras un periodo de ayuno nocturno, se tomaron muestras de sangre periférica de la vena caudal para el control hematológico y bioquímico de la anemia, y se determinó la composición corporal con un dispositivo de resonancia magnética Echo MRI Analyzer System (Echo Medical Systems, Houston, TX).

- **Período experimental (PE)**

A continuación, se inició el período experimental (PE), en el que ambos grupos pre-experimentales (control y anémico) fueron alimentados *pair feed* durante 30 días con las dietas objeto de estudio: dieta elaborada con un producto fermentado de leche de cabra (n =40) y dieta elaborada con un producto fermentado de leche de vaca (n = 40), ambas con contenido normal (45 mg/kg dieta) o sobrecarga de hierro (450 mg/kg dieta) (Raja et al., 1994) para proceder a la recuperación de la anemia ferropénica nutricional inducida. El patrón de ingesta dietética fue *pair feed*, asegurando que los animales ingirieran el 80% de la ingesta media de cada periodo al día para evitar diferencias debidas a la cantidad de dieta ingerida, y el agua desionizada estaba disponible *ad libitum*.

Al finalizar el PE, tras 24 horas de ayuno, se procedió a la obtención de sangre periférica de la vena caudal para el control hematológico y bioquímico de la anemia, y se determinó la composición corporal del mismo modo que en el PPE. Seguidamente, las ratas fueron desangradas completamente por canulación de la arteria aorta abdominal y sacrificadas, previa anestesia con pentobarbital sódico (Sigma Diagnostic, St Louis, MO), a una dosis de 5 mg/kg de peso por vía intraperitoneal siguiendo las directrices del Comité de Ética de la Universidad de Granada y se procedió a la obtención de sangre, mediante dicha canulación aórtica. Tras el sacrificio de los animales de experimentación se procedió, de la forma más rápida posible, a la extracción, procesado y conservación de los órganos (hígado, timo y bazo), para inducir las menores alteraciones posibles. Los órganos se lavaron con solución salina a 4°C para eliminar cualquier resto de sangre, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C.

Al finalizar el PPE y PE la sangre obtenida se dividió en dos alícuotas. Una fracción de sangre se trató con EDTA K3 como anticoagulante para realizar el control hematológico de la anemia y para la obtención del plasma, tras centrifugar durante 15 min a 1500g y 4°C. La fracción de sangre sin anticoagulante se dejó coagular en reposo durante 30 min y posteriormente se centrifugó bajo las mismas condiciones anteriormente descritas para la obtención de suero. Las muestras de suero se almacenaron a -80°C hasta el posterior análisis de los biomarcadores de la función

inmunitaria, la lactoferrina y la evaluación funcional de la actividad de las vías del complemento.

4.3 ELABORACIÓN Y DESHIDRATACIÓN DE LAS LECHES FERMENTADAS

4.3.1 Obtención de la leche fermentada de cabra o vaca

Para el proceso de fermentación se utilizó leche de cabra de la raza Murciano-Granadina y leche de vaca de la raza Holstein Friesian, procedentes de granjas situadas en el sureste peninsular, a 694 m de altitud, con un clima mediterráneo continental. Ambos tipos de leche se almacenaron a -80°C hasta el momento de la fermentación. La leche seleccionada presentó un contenido mínimo de sólidos no grasos de origen lácteo en torno al 8% (FAO/OMS) y se caracterizaba por no tener conservantes añadidos.

La lactosa se transforma en ácido láctico mediante microorganismos con los que se inocula la leche para llevar a cabo la fermentación. La elaboración del producto lácteo fermentado se desarrolló en condiciones controladas que conllevan la producción de dióxido de carbono, ácido acético, diacetilo, acetaldehído y otros compuestos que proporcionan las propiedades funcionales de los productos lácteos fermentados.

4.3.2 Tratamiento previo a la fermentación

Se analizó la presencia de antimicrobianos inhibidores del crecimiento, que podrían afectar al inóculo a emplear para la fermentación, a pesar de que las leches se almacenaron sin añadirles ningún aditivo. Después se realizó la homogenización de la muestra para evitar que exista una separación de la fase grasa.

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

4.3.3 Inoculación del cultivo iniciador de la fermentación (starter)

La leche fue inoculada con un cultivo de fermentos lácticos o starter utilizados en la producción del yogur, en una proporción que generalmente alcanza el 1-3 %. Estos cultivos tradicionales provocan un descenso del pH de la leche debido a la generación de ácido láctico. En la actualidad existen cultivos concentrados, congelados y liofilizados de estos microorganismos. La leche con estos cultivos se mantiene en depósitos o en los propios envases a una temperatura de 45 °C durante 3-4 horas. Los cultivos utilizados estaban formados por *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* con una concentración inicial de 1×10^{11} UFC/ml y se incubaron a 37°C durante 24h aproximadamente, estableciéndose entre ambas bacterias un fenómeno de asociación o simbiosis cooperativa. Al finalizar la fermentación, las leches fermentadas se enfriaron a 15°C en un baño de hielo, y el coágulo se rompió con un disco perforado de acero inoxidable con movimientos hacia arriba y hacia abajo durante aproximadamente 1 minuto. El pH de las muestras de leche fermentada se evaluó mediante un medidor de pH digital (Crison, Barcelona, España) y el proceso de fermentación finalizó cuando las leches alcanzaron un pH = 4.6.

4.3.4 Deshidratación del producto lácteo fermentado

Las muestras de leche fermentada se sometieron a un suave proceso de deshidratación industrial en un túnel de aire forzado con calentadores en el interior montado sobre una cámara de aire independiente que permite obtener una distribución uniforme de la temperatura y una estabilización rápida (Conterm Selecta, Barcelona, España). La leche fermentada se deshidrató a una temperatura de 50 ± 3 ° C durante 24 h, hasta que los rangos de humedad final estuvieron entre 2,5 y 4,5 %. Estas condiciones mejoran la conservación de la leche fermentada, así como también reducen los posibles cambios nutricionales y organolépticos negativos.

Para el control de calidad de los deshidratados se realizó un análisis organoléptico completo con la finalidad de comprobar el estado óptimo del producto lácteo fermentado. Se valoraron parámetros tales como olor, sabor, textura y color.

4.4 DIETAS EXPERIMENTALES

Las dietas fueron elaboradas semanalmente según las recomendaciones del AIN-93G (Reeves et al., 1993) y almacenadas al vacío y en oscuridad a -20° C para prevenir la oxidación (Tabla 5; Tabla 6).

La elaboración de las dietas con un producto fermentado de leche (cabra o vaca) se realizó a partir de los respectivos deshidratados. A la cantidad de minerales y vitaminas que aporta el deshidratado se le añadió un corrector mineral y vitamínico específicos que cubran las recomendaciones del AIN-93G. La sobrecarga de hierro (450 mg/kg dieta) fue inducida por la técnica descrita por Raja et al., 1994.

Tabla 5. Composición de las dietas experimentales del PPE.

PERÍODO PRE-EXPERIMENTAL	
Dieta AIN-93G	
Ingredientes	g/100 g dieta
Almidón de trigo	50
Sacarosa	10
Aceite de oliva virgen	10
Caseína	20
Celulosa micronizada	5
Corrector vitamínico	1
Corrector mineral	3.50
Bitartrato de colina	0.25
L-Cisteína	0.30
Tert butilhidroquinona	0.01

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

Grupo control (4.5mg Fe/100 g dieta) /Grupo anémico (0.5 mg Fe/100 g dieta)

Tabla 6. Composición de las dietas experimentales del PE.

PERÍODO EXPERIMENTAL		
Dietas basadas en leche fermentada		
Ingredientes	Leche de vaca	Leche de cabra
	g/100g dieta	
Almidón de trigo	20.10	20.50
Lactosa	29.50	29
Grasa láctea	10	10
Proteína láctea	20.40	20.50
Celulosa micronizada	5	5
Corrector vitamínico	1	1
Corrector mineral	3.50	3.50
Bitartrato de colina	0.25	0.25
L-Cisteína	0.30	0.30
Tert butilhidroquinona	0.01	0.01

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

Grupo control (4.5mg Fe/100 g dieta) /Grupo anémico (0.5 mg Fe/100 g dieta)

4.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

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

El contenido en nitrógeno se determinó por el método Kjeldahl (AOAC, 1990). Este método se fundamenta en la oxidación de la materia orgánica por acción del ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado, el cual digiere la materia dando lugar a dióxido de carbono (CO₂) y agua (H₂O). El contenido proteico se calculó como la diferencia entre el nitrógeno total y el nitrógeno no proteico. Los valores de nitrógeno de la proteína, caseína y proteína del suero, se convirtieron en valores proteicos multiplicando por un factor de conversión de 6.25 para la dieta AIN-93G y 6.38 para la proteína aportada por las leches y las dietas basadas en leche fermentada de cabra o vaca.

La materia grasa de las dietas fue determinada mediante hidrólisis y extracción con éter de petróleo (Sanderson, 1986).

El contenido de lactosa de la leche se calculó como la diferencia entre la cantidad de sólidos totales y la suma de proteínas, grasas y cenizas totales.

La determinación de la materia seca y 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 (Tabla 7).

Tabla 7. Composición química de las leches fermentadas de vaca y cabra. (Modificada de Moreno-Fernández et al., 2016).

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

4.5.2 Determinación y composición de aminoácidos

Las leches fermentadas deshidratadas se suspendieron en agua hasta alcanzar una concentración de 7g de contenido deshidratado/100 ml. Seguidamente 1.28 ml de leche fermentada de cabra y 1.21 ml de leche fermentada de vaca se dividieron en 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. 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 y posteriormente se sellaron los tubos. Después de la hidrólisis, los tubos se agitaron y se añadió norleucina como patrón interno. Una vez secos los tubos, 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)) para después analizarse usando un sistema de cromatografía líquida de alta resolución de intercambio iónico (Waters Corporation, Milford, MA, EE. UU.), utilizando detección de ninhidrina en la columna con una absorbancia a 570 nm (440 nm para la prolina).

Los tubos utilizados para determinar los aminoácidos azufrados se trataron con ácido per fórmico antes de la hidrólisis para oxidar cuantitativamente la cisteína y la metionina a los componentes más estables, ácido cisteico y metionina sulfona. Primero

se añadió 1 ml de ácido fórmico enfriado en hielo (proporción 9:1 de ácido fórmico al 88% y peróxido de hidrógeno al 30%). Los tubos se incubaron en hielo durante 16 h en un refrigerador. Tras la incubación se añadieron 0,15 ml de bromuro de hidrógeno y se sometieron a hidrólisis ácida como ha sido descrito anteriormente (Tabla 8).

Tabla 8. Composición de aminoácidos de las leches fermentadas de vaca y cabra. (Modificada de Moreno-Fernández et al., 2016).

Aminoácidos (g/Kg)	Leche fermentada de vaca	Leche fermentada de cabra
Aminoácidos esenciales		
Thr	15.1	18.5
Ileu	19.0	22.5
Leu	28.1	41.1
Lys	24.8	28.6
Met	8.1	13.6
Cys	0.5	0.8
Phe	12.1	19.8
Tyr	4.9	8.8
Val	19.2	27.6
Aminoácidos no esenciales		
Arg	7.5	13.9
His	7.7	14.2
Ala	15.2	14.8
Asp	27.1	34.0
Glu	54.1	94.6
Gly	5.3	8.6
Pro	29.1	41.2
Ser	17.7	23.3

4.5.3 Determinación y composición de ácidos grasos

El análisis de los ésteres metílicos de ácidos grasos se realizó mediante la técnica de cromatografía de gases con un detector de ionización de llama (GC-FID) y un cromatógrafo de gas-líquido (Agilent 6890 N Network System) en una columna capilar de sílice fundida (Varian, Middelburg, Netherlands) con un programa de gradiente de temperatura, partiendo de una temperatura inicial de 160°C. Tras 80 min, la temperatura del horno se elevó gradualmente a 210 ° C y a continuación se mantuvo constante durante 35 min. El gas portador utilizado fue el helio, y la temperatura del inyector y el detector fue 250°C Los ésteres metílicos de ácidos grasos se prepararon mediante

metanólisis básica catalizada por glicéridos (KOH en metanol) de acuerdo con el procedimiento ISO-IDF (ISO-IDF, 2002) (Tabla 9).

Tabla 9. Composición de ácidos grasos de las leches fermentadas vaca y cabra. (Modificada de Moreno-Fernández et al., 2016).

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

4.5.4 Determinación y composición mineral

Para llevar a cabo la determinación mineral, se realizó una mineralización previa de las muestras de leches fermentadas en un baño de arena (JR Selecta, Barcelona, España), por vía húmeda. Las muestras se disolvieron en ácido nítrico seguido de una mezcla de HNO₃: HClO₄ (69%:70%, v/v; en relación 1:4, v/v; Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) hasta proceder a la eliminación total de la materia orgánica.

Posteriormente se diluyeron en agua bidestilada Milli-Q ultrapura. Para disminuir el riesgo de contaminación, se utilizaron placas de polipropileno y puntas de pipeta de plástico, reduciéndose al mínimo el uso de material de vidrio.

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 determinar el contenido de Ca, P, Mg, Zn, K, Fe, Cu, Se, I. Todos los elementos no se midieron en el mismo análisis ya que los distintos elementos pueden reaccionar de manera diferente en ciertas soluciones ácidas o en ciertas condiciones de plasma de acoplamiento inductivo y, por lo tanto, los elementos compatibles fueron analizados juntos en condiciones optimizadas. Para la calibración del aparato, se usaron soluciones multielementales de calibración de Astasol (Analytika, Khodlova, Praga) (Tabla 10).

Tabla 10. Composición mineral de las leches fermentadas vaca y cabra. (Modificada de Moreno-Fernández et al., 2016).

Minerales (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

4.5.5 Determinación y composición vitamínica

La vitamina A, la vitamina E, la vitamina B6, la vitamina B12 y la vitamina C se determinaron mediante el sistema de HPLC (Hewlett-Packard, Waldbronn, Alemania), que consiste en un dispositivo de desgasificación de la serie HP 1050, un HP 1100 (para análisis hidrosoluble), o un automuestreador Waters 717 (para análisis liposoluble) (Waters, Milford, MA), ambos con 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). 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 y la vitamina C fueron suministradas por 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 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, se evaporó y se re disolvió 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. La vitamina A (trans- retinol) y la vitamina E (tocoferol) fueron suministradas por 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 disolvente B, seguido de un aumento lineal a 100% de disolvente B en 4.5 minutos. Después de una retención isocrática al 100% de disolvente B durante 5.9 minutos, el gradiente volvió al 10% de disolvente B en 0,1 min para el equilibrio de la columna durante 3 minutos. El espectrómetro de masas se hizo funcionar en modo negativo por electrospray y la adquisición de datos se realizó en modo de monitorización de reacción múltiple. El argón se usó como gas de colisión a 3.2×10^{-3} mbar y el multiplicador fue operado a 750 V (Tabla 11).

Tabla 11. Composición vitamínica de las leches fermentadas vaca y cabra. (Modificada de Moreno-Fernández et al., 2016).

Vitaminas (µg/100g)	Leche fermentada de vaca	Leche fermentada de cabra
Vitaminas liposolubles		
Vitamina A	207.25	498.33
Vitamina D₃	0.02	0.07
Vitamina E	0.09	0.03
Vitaminas hidrosolubles		
B₆ (piridoxina)	42.71	33.25
B₁₂ (cobalamina)	0.08	0.45
B₉ (ácido fólico)	2.21	0.73
C (ácido ascórbico)	931.12	759.65

4.6 PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS

Todos los parámetros hematológicos estudiados se determinaron en un analizador automático de hematología Mythic 22CT (C2 Diagnostics, Grabels, France).

4.6.1 Serie eritrocitaria

Recuento de hematíes, determinaciones de hemoglobina, hematocrito, índices eritrocitarios (VCM, HCM, CHCM), amplitud de distribución eritrocitaria (ADE).

4.6.2 Serie leucocitaria

Recuento total y diferencial de leucocitos. La ratio neutrófilos/linfocitos (NLR) y la ratio plaquetas/linfocitos (PLR) se calcularon como el cociente de los neutrófilos o plaquetas entre los linfocitos respectivamente.

4.6.3 Serie plaquetaria

Recuento total de plaquetas, plaquetocrito, volumen plaquetario medio (VPM) y amplitud de distribución plaquetaria (ADP).

4.7 PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

Todos los parámetros estudiados para evaluar el estatus nutricional, función hepática y función renal se determinaron en plasma en un analizador automático de química clínica BS-200 (Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co Ltd, Shenzhen, China).

4.7.1 Estatus nutricional

Proteínas totales, albumina, globulina, ratio albumina/globulina (A/G), glucosa, colesterol total, HDL-colesterol, LDL- colesterol, triglicéridos.

Los niveles de globulina se calcularon mediante la diferencia entre las proteínas totales y la albumina. La relación A/G se calculó a partir del cociente entre albumina y globulina.

4.7.2 Función hepática

Aspartato aminotransferasa (AST) alanina aminotransferasa (ALT) y bilirrubina.

4.7.3 Función renal

Ácido úrico, urea y creatinina.

4.7.4 Estatus de hierro

Hierro sérico, capacidad total de fijación al hierro, saturación de transferrina, ferritina y hepcidina.

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

Saturación de transferrina (%) = concentración sérica de hierro ($\mu\text{g/L}$)/TIBC ($\mu\text{g/L}$)x100

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

4.8 ESTUDIO DE LA FUNCIÓN INMUNITARIA

Los parámetros estudiados para evaluar la función inmunitaria se determinaron mediante diferentes técnicas y tecnologías detalladas a continuación.

4.8.1. Biomarcadores de la función inmune

Los niveles séricos de eoxatina, fractalquina, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), interferón gamma (INF- γ), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), LIX, proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) e interleucina (IL) -4, IL-6 e IL-10 se determinaron usando el kit para el panel de perlas magnéticas RCYTOMAG-80K Milliplex MAP para citoquinas/quimioquinas de rata (Millipore, Darmstadt, Germany). Este sistema se basa en tecnologías como 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.

Las muestras se prepararon de acuerdo con las instrucciones del fabricante las cuales se basan en inmunoensayos en la superficie de esferas fluorescentes codificadas (microesferas) (50 eventos por perla, 50 µl de muestra, configuración de compuerta: 8000-15000, tiempo de espera 60 segundos).

La lectura de la placa se llevó a cabo en el analizador LABScan 100 (Luminex Corporation, Austin, TX) con el software xPONENT para la adquisición de datos. Los valores promedio para cada conjunto de muestras duplicadas o estándares se encontraban dentro del 15% de la media. Las concentraciones de los parámetros de función inmunológica se determinaron comparando la media de las muestras de suero duplicadas con la curva estándar para cada ensayo. Los valores de la curva estándar de cada uno de los biomarcadores son los siguientes: eotaxina, G-CSF e IL-4: 4.9-20000.0 (pg/mL); fractalquina y TNF- α : 2.4-10000.0 (pg/ml); INF- γ : 14.6-60000.0 (pg/ml); LIX: 24.4-100000.0 (pg/ml); MCP-1: 29.3-120000.0 (pg/ml); IL-6: 73.2-300000.0 (pg/ml); IL-10: 7.3-30000.0 (pg/ml).

4.8.2 Evaluación funcional de la actividad de las vías del complemento

Las tres vías de activación del sistema del complemento (vía clásica, vía de las lectinas y vía alternativa) se determinaron en muestras de suero y se evaluaron con kits ELISA (HIT 410, HIT 411 y HIT 412 Hycult Biotech, Uden, The Netherlands). Los pocillos para la evaluación de la vía clásica se recubrieron previamente con IgM, para la vía de las lectinas se recubrieron con manano y para la vía alternativa se recubrieron con lipopolisacáridos (LPS). Las muestras, así como el suero estándar y el suero control negativo, se analizaron por duplicado a una dilución fijada. Las muestras se incubaron durante 60 min a 37 ° C. Después de lavar los pocillos, se añadió anticuerpo trazador biotinilado para adherirse al C5b-9 unido en las muestras y el control durante 60 min de incubación a 37 ° C. Después de períodos de lavado adicionales, y la adición de estreptavidina-peroxidasa reaccionará con el sustrato, tetrametilbencidina (TMB). La reacción enzimática se detiene mediante la adición de ácido oxálico. Después se leyeron los valores de absorbancia a 450 nm con un lector de microplacas multifuncional BioTek (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA). La actividad del complemento se calculó usando la siguiente fórmula: Actividad = [((media A450 (muestra) - media

$A450 \text{ (control negativo)} / ((\text{media } A450 \text{ (suero estándar)} - \text{media } A450 \text{ (control negativo)})] \times 100\%$.

4.8.3 Lactoferrina

La concentración de lactoferrina se determinó en muestras de suero utilizando el kit ELISA de lactoferrina de rata (LTF/LF) (MyBioSource, San Diego, California, USA). Este kit se basa en la tecnología de enzimoimmunoensayo. Las placas de 96 pocillos están recubiertas previamente con anticuerpo anti-LTF/LF. Y el anticuerpo anti-LTF/LF conjugado con biotina se utilizó como anticuerpos de detección. Los estándares, las muestras de prueba y el anticuerpo de detección conjugado con biotina se agregaron posteriormente a los pocillos y se lavaron con tampón de lavado. Se añadió estreptavidina-HRP y los conjugados no unidos se lavaron con tampón de lavado. Se utilizaron sustratos de TMB para visualizar la reacción enzimática de HRP. TMB fue catalizado por HRP para producir un producto de color azul que cambió a amarillo después de agregar una solución ácida de stop. La intensidad de color es proporcional a la cantidad de muestra LTF/LF en la placa. La absorbancia de la reacción se midió a 450 nm utilizando un lector de microplacas (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA) y a continuación se calculó la concentración de LTF / LF.

4.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos han sido presentados como media aritmética \pm error estándar de la media (EEM). Para el análisis estadístico se utilizó el programa informático SPSS versión 22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.). La significancia en la diferencia entre el grupo control y el grupo anémico durante el período pre-experimental (PPE) se evaluó mediante la prueba *t*-Student. Las diferencias debidas a la dieta, la anemia y el contenido de hierro en la dieta durante el período experimental (PE) se analizaron utilizando ANOVA de dos vías seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey cuando los efectos e interacciones principales fueron significativos. Para todos los análisis estadísticos, el valor $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

Resultados

5. RESULTADOS

5.1 PERIODO PRE-EXPERIMENTAL

5.1.1 Peso corporal e incremento de peso

Al final del PPE, el peso corporal fue menor en el grupo anémico en comparación con el grupo control, dando lugar a un menor incremento de peso estadísticamente significativo (Tabla I).

5.1.2 Índices somáticos: hígado, bazo y timo

Al final del PPE, el peso corporal fue menor en el grupo anémico en comparación con el grupo control, mientras que el peso del hígado no presentó diferencias significativas, como consecuencia el índice hepatosomático (relación peso del hígado/peso corporal) fue mayor en el grupo anémico. Por el contrario, el peso del timo y del bazo presentaron diferencias significativas con respecto al grupo control, siendo el peso del bazo mayor y el peso del timo menor en los animales anémicos. Las respectivas relaciones con el e corporal fueron mayores en el grupo anémico (Tabla II).

5.1.3 Composición corporal

Al final del PPE los parámetros de composición corporal mostraron diferencias entre ambos grupos experimentales (control y anémico) ($p < 0,05$). La masa grasa, la masa magra y el agua total fueron más bajas en el grupo anémico en comparación con el grupo control ($p < 0,05$). Por el contrario, el agua libre fue mayor en el grupo con deficiencia de hierro ($p < 0,05$) (Tabla III).

5.1.4 Parámetros hematológicos

5.1.4.1 Serie eritrocitaria

Después de la ingesta de una dieta con bajo contenido en hierro durante 40 días, todos los parámetros hematológicos estudiados fueron menores en el grupo anémico con respecto al grupo control ($p < 0,05$), excepto el ADE que fue mayor en el grupo anémico ($p < 0,05$) (Tabla IV).

5.1.4.2 Serie leucocitaria

Tras 40 días con una dieta con bajo contenido en hierro, los parámetros de la serie leucocitaria permanecieron sin cambios, excepto el porcentaje de monocitos y la relación plaquetas/linfocitos que fueron mayores en el grupo anémico con respecto al grupo control ($p < 0,05$) (Tabla V).

5.1.4.3 Serie plaquetaria

Al final del PPE todos los parámetros relacionados con la serie plaquetaria (recuento de plaquetas, plaquetocrito, VPM y ADP) fueron significativamente superiores en el grupo anémico respecto al grupo control ($p < 0,05$) (Tabla VI).

5.1.5 Parámetros bioquímicos

Tras 40 días del suministro de las dietas con contenido normal o bajo en hierro las concentraciones séricas de los parámetros bioquímicos estudiados, glucosa, colesterol total, colesterol-HDL, triglicéridos, transaminasas (AST y ALT), bilirrubina, urea y TIBC fueron significativamente superiores en el grupo anémico respecto al grupo control ($p < 0,05$), mientras que la concentración de colesterol-LDL, hierro sérico, saturación de transferrina, ferritina y hepcidina fueron menores ($p < 0,05$), permaneciendo sin cambios las concentraciones séricas de proteínas totales, albumina, globulina, ratio A/G, ácido úrico y creatinina (Tabla VII).

5.2 PERIODO EXPERIMENTAL

5.2.1 Peso corporal e incremento de peso

La dieta basada en fermentados lácteos de cabra aumentó el peso corporal inicial y final en los animales controles y anémicos, ya sea con un contenido de hierro normal o alto ($p < 0,001$), en comparación con los animales alimentados con dietas a base de leche fermentada de vaca.

El peso corporal inicial y final fue significativamente menor en los animales anémicos alimentados con ambas dietas con contenido normal de hierro y con sobrecarga ($p < 0,05$). La sobrecarga de hierro disminuyó el peso corporal final en

animales controles y anémicos alimentados con dietas a base de leche fermentada de vaca ($p < 0,05$).

El incremento de peso fue mayor en animales anémicos alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca con contenido de hierro normal ($p < 0,01$) o alto ($p < 0,001$) y en animales control alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca con alto contenido de hierro ($p < 0,01$). El incremento de peso fue significativamente mayor en los animales anémicos alimentados con ambas dietas con contenido normal de hierro ($p < 0,05$) y con sobrecarga ($p < 0,01$) (Tabla VIII).

5.2.2 Índice somático: hígado, bazo y timo

La dieta basada en fermentados lácteos de cabra aumentó el peso del hígado en los animales controles y anémicos, ya sea con un contenido de hierro normal o alto ($p < 0,05$), en comparación con los animales alimentados con dietas a base de leche fermentada de vaca.

El índice hepatosomático es mayor en animales anémicos alimentados con dietas basadas en leche fermentada de cabra ya sea con un contenido de hierro normal o alto ($p < 0,05$), en comparación con los animales controles y anémicos alimentados con dietas basadas en leche fermentada de vaca.

La dieta basada en fermentados lácteos de cabra aumentó el peso del bazo en los animales controles con alto contenido en hierro ($p < 0,001$) en comparación con los animales alimentados con dietas a base de leche fermentada de vaca.

La anemia disminuyó el peso del bazo en animales alimentados con dieta basada en fermentados lácteos de cabra con alto contenido en hierro ($p < 0,001$). La sobrecarga de hierro aumentó el peso del bazo en animales controles alimentados con dieta basada en fermentados lácteos de cabra ($p < 0,001$).

La dieta basada en fermentados lácteos de cabra, ya sea con un contenido de hierro normal o alto, disminuyó el índice somático del bazo en animales anémicos ($p < 0,001$).

La anemia disminuyó el índice somático del bazo en animales alimentados con dieta basada en fermentados lácteos de vaca con contenido normal de hierro ($p < 0,001$).

La dieta basada en fermentados lácteos de cabra aumentó el peso del timo en los animales controles con un contenido de hierro normal ($p < 0,001$), y en los animales controles y anémicos con un contenido de hierro alto ($p < 0,001$), en comparación con los animales alimentados con dietas a base de leche fermentada de vaca.

La anemia disminuyó el peso del timo en animales alimentados con dieta basada en fermentados lácteos de cabra con contenido normal de hierro ($p < 0,001$). La sobrecarga de hierro aumentó el peso del timo en animales controles alimentados con dieta basada en fermentados lácteos de cabra ($p < 0,001$).

La dieta basada en fermentados lácteos de cabra aumentó el índice somático del timo en animales controles con un contenido de hierro alto ($p < 0,01$).

La anemia disminuyó el índice somático del timo en animales alimentados con dieta basada en fermentados lácteos de cabra con contenido normal ($p < 0,01$) y alto de hierro ($p < 0,001$) (Tabla IX).

5.2.3 Composición corporal

La dieta basada en fermentados lácteos de cabra disminuyó la masa grasa y magra en los animales controles y anémicos, ya sea con un contenido de hierro normal o alto ($p < 0,001$), en comparación con los animales alimentados con dietas a base de leche fermentada de vaca.

La anemia disminuyó la masa grasa en animales alimentados con dieta basada en fermentados lácteos de cabra con contenido normal y alto de hierro ($p < 0,001$) y la masa magra en animales alimentados con dieta basada en fermentados lácteos de cabra y vaca con contenido normal y alto de hierro ($p < 0,001$).

La sobrecarga de hierro aumentó la masa grasa en los animales controles y anémicos alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca ($p < 0,05$) y en los animales controles alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de cabra ($p < 0,05$).

La sobrecarga de hierro disminuyó la masa magra en los animales anémicos alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de cabra ($p < 0,001$).

La dieta basada en fermentados lácteos de cabra aumentó el agua libre y el agua total en los animales controles y anémicos, ya sea con un contenido de hierro normal o alto ($p < 0,001$), en comparación con los animales alimentados con dietas a base de leche fermentada de vaca.

La anemia disminuyó el agua libre en animales alimentados con dieta basada en fermentados lácteos de vaca con contenido normal y alto de hierro ($p < 0,001$) y el agua total en animales alimentados con dieta basada en fermentados lácteos de cabra y vaca con contenido normal y alto de hierro ($p < 0,001$) (Tabla X).

5.2.4 Parámetros hematológicos

5.2.4.1 Serie eritrocitaria

Al final del PE, las dietas basadas en fermentados lácteos de cabra con alto contenido en hierro aumentaron el recuento de hematíes en animales controles ($p < 0,01$).

Las dietas mencionadas anteriormente aumentaron la concentración de hemoglobina en animales anémicos con alto contenido en hierro ($p < 0,05$). La sobrecarga de hierro aumentó la concentración de hemoglobina en animales anémicos alimentados con ambas dietas a base de leche fermentada ($p < 0,001$).

Las dietas basadas en fermentados lácteos de cabra aumentaron el hematocrito en animales control y anémicos con contenido normal de hierro ($p < 0,01$) y en animales control con alto contenido en hierro ($p < 0,05$). La sobrecarga de hierro aumentó el hematocrito en animales anémicos alimentados con ambas dietas ($p < 0,01$).

Las dietas basadas en fermentados lácteos de cabra aumentaron el VCM en animales anémicos con alto contenido en hierro ($p < 0,05$).

La anemia aumentó la HCM en animales alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de cabra y vaca con alto contenido en hierro ($p < 0,05$). La sobrecarga de hierro aumentó la HCM en animales anémicos alimentados con ambas dietas ($p < 0,001$).

Las dietas basadas en fermentados lácteos de cabra aumentaron la CHCM en animales anémicos con contenido normal de hierro ($p < 0,05$) y animales control y

anémicos con alto contenido en hierro ($p < 0,01$). La anemia aumentó la CHCM en animales alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca con alto contenido en hierro ($p < 0,05$) y en animales alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de cabra con contenido normal de hierro ($p < 0,05$).

Las dietas basadas en fermentados lácteos de cabra aumentaron el ADE en animales anémicos con contenido normal y alto de hierro ($p < 0,01$). La sobrecarga de hierro aumentó el ADE en animales controles alimentados con ambas dietas ($p < 0,01$) (Tabla XI).

5.2.4.2 Serie leucocitaria

Al final del PE, después de 30 días del consumo de las dietas basadas en fermentados lácteos de cabra ya sea con contenido normal ($p < 0,01$) o alto ($p < 0,001$) en hierro aumentó el recuento de glóbulos blancos en animales anémicos, y en animales controles con alto contenido de hierro ($p < 0,05$), en comparación con los animales alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca. La anemia aumentó el recuento de glóbulos blancos en animales alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de cabra con contenido de hierro normal o alto ($p < 0,05$) mientras que fue menor en animales alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca con contenido normal de hierro ($p < 0,05$). Con respecto a la sobrecarga de hierro, se redujo el recuento de glóbulos blancos en animales controles y anémicos alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca ($p < 0,01$).

El recuento de neutrófilos fue mayor en los animales controles alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de cabra, ya sea con contenido normal o alto contenido de hierro ($p < 0,05$). La anemia aumentó el nivel de neutrófilos en los animales alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca con contenido normal de hierro ($p < 0,05$) y alto contenido de hierro ($p < 0,01$), y los redujo en los animales alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de cabra con contenido normal de hierro ($p < 0,01$). Con respecto a la sobrecarga de hierro, se redujo el nivel de neutrófilos en los animales controles alimentados con ambas dietas a base de leche fermentada ($p < 0,01$).

La anemia redujo el recuento de linfocitos en los animales alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca con alto contenido de hierro ($p < 0,05$). La sobrecarga de hierro aumentó el recuento linfocitario en los animales controles alimentados con ambas dietas a base de leche fermentada ($p < 0,05$).

Las dietas basadas en fermentados lácteos de cabra redujeron el recuento de monocitos en animales controles y anémicos con contenido normal de hierro ($p < 0,05$) y en animales anémicos alimentados con alto contenido de hierro ($p < 0,01$), en comparación con los animales alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca. La anemia aumentó el número de monocitos en animales alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca con contenido normal y alto contenido de hierro ($p < 0,05$). La sobrecarga de hierro aumentó el número de monocitos en animales anémicos alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca ($p < 0,05$).

El porcentaje de eosinófilos fue menor en los animales controles alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de cabra con contenido de hierro normal ($p < 0,05$) y aumentó en animales anémicos con alto contenido de hierro ($p < 0,05$), en comparación con los animales alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca. La anemia aumentó los valores relativos de eosinófilos en animales alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca con alto contenido de hierro ($p < 0,05$). La sobrecarga de hierro redujo el porcentaje de eosinófilos en los animales controles alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca ($p < 0,05$).

Las dietas basadas en fermentados lácteos de cabra, disminuyeron el porcentaje de basófilos en animales controles ($p < 0,05$) y animales anémicos con alto contenido de hierro ($p < 0,01$). La anemia aumentó el recuento relativo de basófilos en animales alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca con alto contenido de hierro ($p < 0,01$). La sobrecarga de hierro aumentó el nivel de basófilos en animales anémicos alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca ($p < 0,01$) y redujo los niveles en animales de control alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de cabra ($p < 0,05$).

Los valores medios del ratio neutrófilos/linfocitos (NLR) y del ratio plaquetas/linfocitos (PLR) fueron significativamente más bajos en animales anémicos alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de cabra, ya sea con contenido

normal ($p < 0,05$) o alto contenido de hierro ($p < 0,05$; $p < 0,01$) y los valores de PLR fueron menores en animales controles alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de cabra con alto contenido de hierro ($p < 0,01$), en comparación con los animales alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca.

La anemia aumentó los valores de NLR y PLR en animales alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca con contenido normal ($p < 0,05$) y NLR en animales con alto contenido de hierro ($p < 0,05$). La sobrecarga de hierro aumentó los valores de PLR en los animales controles y anémicos alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca ($p < 0,01$) (Tabla XII).

5.2.4.3 Serie plaquetaria

La dieta basada en fermentados lácteos de cabra aumentó el plaquetocrito en los animales anémicos, ya sea con un contenido de hierro normal ($p < 0,05$) o alto ($p < 0,01$), en comparación con los animales alimentados con dietas a base de leche fermentada de vaca. La anemia aumentó el plaquetocrito en animales alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de cabra con contenido normal y alto de hierro ($p < 0,01$). La sobrecarga de hierro aumentó el plaquetocrito en animales controles y anémicos alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca ($p < 0,05$).

La anemia aumentó el VPM en animales alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de cabra con contenido normal $p < 0,05$ y alto de hierro ($p < 0,001$). La sobrecarga de hierro aumentó el VPM en ambos grupos de animales (controles y anémicos) alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca ($p < 0,01$).

La dieta basada en fermentados lácteos de cabra aumentó el ADP en los animales anémicos, ya sea con un contenido de hierro normal o alto ($p < 0,001$), en comparación con los animales alimentados con dietas a base de leche fermentada de vaca. La anemia aumentó el ADP en animales alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de cabra con contenido normal ($p < 0,01$) y alto de hierro ($p < 0,001$). La sobrecarga de hierro disminuyó el ADP en animales anémicos alimentados con ambas dietas basadas en leche fermentada ($p < 0,01$) (Tabla XIII).

5.2.5 Parámetros bioquímicos

En el PE, la concentración sérica de proteínas totales fue mayor en los animales controles y anémicos alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de cabra con alto contenido de hierro ($p < 0,01$), en comparación con los animales alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca.

El nivel sérico de albúmina fue mayor en ambos grupos de animales (controles y anémicos) alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de cabra con alto contenido de hierro ($p < 0,05$) y en los animales controles alimentados con contenido normal de hierro ($p < 0,05$), en comparación con los animales alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca.

Los niveles séricos de globulina fueron mayores en los animales anémicos alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de cabra con contenido normal de hierro ($p < 0,05$) y en los animales controles y anémicos alimentados con alto contenido de hierro ($p < 0,05$), en comparación con los animales alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca. La anemia disminuyó los niveles séricos de globulina en animales alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca con contenido normal de hierro ($p < 0,05$).

La relación A/G fue menor en los animales anémicos alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de cabra con contenido de hierro normal o alto ($p < 0,05$), en comparación con los animales alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca.

La sobrecarga de hierro aumentó la concentración de glucosa en los animales controles y anémicos alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca ($p < 0,01$) y en los animales anémicos alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de cabra ($p < 0,01$).

La concentración de colesterol total fue mayor en los animales controles y anémicos alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca con contenido normal de hierro ($p < 0,01$), en comparación con los animales alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de cabra. La anemia disminuyó la concentración de colesterol en animales alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de cabra con contenido normal de hierro ($p < 0,05$). La sobrecarga de hierro disminuyó la

concentración de colesterol en ambos grupos de animales (controles y anémicos) alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca y en los animales controles alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de cabra ($p < 0,01$).

La dieta basada en fermentados lácteos de cabra con alto contenido en hierro disminuye la concentración de colesterol HDL en animales controles. La sobrecarga de hierro disminuyó la concentración de colesterol HDL en los animales controles y anémicos alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca y cabra ($p < 0,05$).

La concentración de colesterol LDL fue mayor en los animales controles y anémicos alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca con contenido normal y alto de hierro ($p < 0,001$), en comparación con los animales alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de cabra. La anemia disminuyó la concentración de colesterol LDL en animales alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca con contenido normal de hierro ($p < 0,001$).

Los animales controles y anémicos alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de cabra tienen menores concentraciones séricas de triglicéridos ($p < 0,001$), en comparación con la dieta basada en leche fermentada de vaca. La anemia aumenta el nivel de triglicéridos en animales alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca con contenido normal y alto de hierro ($p < 0,01$) y en animales alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de cabra con contenido normal de hierro ($p < 0,01$).

Los niveles séricos de transaminasas, AST y ALT, fueron menores en ratas alimentadas con dietas a base de leche fermentada de cabra en comparación con ratas alimentadas con dietas a base de leche fermentada de vaca ($p < 0,01$). El alto contenido de hierro no afectó a los niveles transaminasas al suministrar ambas dietas a base de leche fermentada.

La concentración sérica de bilirrubina fue mayor en los animales controles y anémicos alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de cabra con contenido normal o alto de hierro ($p < 0,001$).

La concentración sérica de ácido úrico fue mayor en los animales controles y anémicos alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca con contenido

normal de hierro ($p < 0,01$) y en animales anémicos alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca con alto contenido de hierro ($p < 0,05$), en comparación con los animales alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de cabra. La anemia disminuyó la concentración de ácido úrico en animales alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca con contenido normal de hierro ($p < 0,05$).

La concentración sérica de urea fue mayor en los animales controles y anémicos alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca con contenido normal de hierro ($p < 0,001$), en comparación con los animales alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de cabra. La sobrecarga de hierro aumentó la concentración de urea en ambos grupos de animales (controles y anémicos) alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de cabra ($p < 0,05$).

Los niveles séricos de hierro fueron mayores en los grupos con sobrecarga de hierro ($p < 0,01$). La sobrecarga de hierro también aumentó el TIBC ($p < 0,01$), la saturación de transferrina ($p < 0,01$) y la ferritina sérica ($p < 0,01$).

Los niveles séricos de hepcidina fueron más altos en los animales controles y anémicos alimentados con dieta basada en leche fermentada de cabra con contenido normal o con sobrecarga de hierro, en comparación con los alimentados con dieta basada en leche fermentada de vaca ($p < 0,01$) (Tabla XIV).

5.2.6 Parámetros inmunológicos

La dieta basada en fermentados lácteos de cabra con contenido normal de hierro redujo la concentración sérica de eotaxina en animales controles ($p < 0,001$) y en animales anémicos alimentados con dietas de leche fermentada de cabra con contenido normal ($p < 0,001$) o alto contenido de hierro ($p < 0,01$), en comparación con los animales alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca. La anemia previamente inducida aumentó la concentración sérica de eotaxina en los animales alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca con contenido normal de hierro ($p < 0,05$) y alto contenido de hierro ($p < 0,001$). Por el contrario, la anemia disminuyó los niveles séricos de eotaxina en animales alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de cabra, especialmente con contenido normal de hierro ($p < 0,001$). La sobrecarga de hierro disminuyó la concentración sérica de eotaxina en los

animales controles alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca ($p < 0,05$) (Tabla XV; Figura I).

La concentración sérica de fractalquina fue menor en los animales controles ($p < 0,05$) y en los animales anémicos ($p < 0,001$) alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de cabra con contenido de hierro normal o alto, en comparación con los animales alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca. La anemia redujo la concentración sérica de fractalquina en todos los animales alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de cabra (controles y anémicos) y la aumentó en ambos grupos de animales (controles y anémicos) alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca, ya sea con contenido de hierro normal ($p < 0,01$) o alto ($p < 0,001$) (Tabla XV; Figura II).

La concentración sérica de G-CSF fue mayor en los animales alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de cabra con contenido de hierro normal o alto ($p < 0,001$), excepto en el grupo control con contenido de hierro normal, donde no se observaron diferencias. La anemia redujo la concentración de G-CSF en animales alimentados con ambas dietas con alto contenido de hierro ($p < 0,001$) y la aumentó en animales alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de cabra con contenido normal de hierro ($p < 0,001$). La sobrecarga de hierro disminuyó la concentración de G-CSF en animales anémicos alimentados con ambas dietas ($p < 0,01$) y la aumentó en los animales controles alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de cabra ($p < 0,01$).

La dieta basada en fermentados lácteos de cabra aumentó la concentración de $\text{INF-}\gamma$ en ambos grupos de animales (controles y anémicos), ya sea con contenido de hierro normal ($p < 0,01$) o alto ($p < 0,01$), en comparación con los animales alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca (Tabla XV; Figura III). Por el contrario, la concentración sérica de $\text{TNF-}\alpha$ fue menor en los animales alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de cabra, ya sea con hierro normal o con alto contenido de hierro ($p < 0,01$), en comparación con los animales alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca (Tabla XV; Figura IV).

En general, la concentración sérica de LIX fue menor en animales alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de cabra, ya sea con contenido de hierro

normal o alto ($p < 0,001$), excepto en los animales controles con contenido normal de hierro en los que la concentración aumentó ($p < 0,001$). En animales alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca con contenido normal de hierro, la anemia aumentó los niveles séricos de LIX ($p < 0,001$). La sobrecarga de hierro aumentó la concentración de LIX en animales controles y anémicos alimentados con ambas dietas basadas en leche fermentada ($p < 0,001$).

Con respecto a los valores de MCP-1, la dieta basada en fermentados lácteos de cabra redujo la concentración sérica en animales controles y anémicos, ya sea con contenido de hierro normal o alto ($p < 0,001$). La anemia aumentó la concentración de MCP-1 en animales alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca, ya sea con contenido de hierro normal ($p < 0,01$) o alto ($p < 0,05$) (Tabla XV; Figura V).

La dieta basada en fermentados lácteos de cabra aumentó los niveles séricos de IL-4 en animales controles y anémicos, ya sea con contenido normal ($p < 0,01$) o alto contenido de hierro ($p < 0,05$). La anemia solo aumentó la concentración de esta citoquina en animales alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de cabra con alto contenido de hierro ($p < 0,05$). En general, el alto contenido de hierro aumentó la concentración de IL-4 en animales alimentados con ambas dietas ($p < 0,01$), excepto en los animales controles alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca (Tabla XV; Figura VI).

La concentración sérica de IL-6 fue menor en ambos grupos de animales (controles y anémicos) alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de cabra, ya sea con contenido de hierro normal o alto ($p < 0,01$) (Tabla XV; Figura VII).

Los niveles séricos de IL-10 fueron mayores en los animales controles y anémicos alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de cabra, ya sea con contenido normal ($p < 0,01$) o alto de hierro ($p < 0,01$). La anemia redujo la concentración de esta citoquina en animales alimentados con ambas dietas con contenido de hierro normal ($p < 0,01$), sin embargo, aumentó la concentración sérica de IL-10 en animales alimentados con ambas dietas con alto contenido de hierro ($p < 0,01$). Con respecto a la sobrecarga de hierro, en general aumentó los niveles séricos de IL-10 en los animales controles y anémicos alimentados con ambas dietas a base de leche fermentada ($p < 0,01$), excepto en los animales controles alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca (Tabla XV; Figura VIII).

La dieta basada en fermentados lácteos de cabra aumentó la actividad de la vía clásica del complemento en animales con contenido de hierro normal ($p < 0,05$) o alto ($p < 0,001$), excepto en el grupo control alimentado con dieta de leche fermentada de cabra con contenido de hierro normal, donde no se observaron diferencias significativas. La anemia disminuyó la actividad de la vía clásica del complemento en animales alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca ($p < 0,001$). La sobrecarga de hierro disminuyó la actividad de la vía clásica del complemento en animales controles alimentados con ambas dietas fermentadas ($p < 0,001$) y en animales anémicos alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de cabra ($p < 0,001$), mientras que aumentó la actividad en animales anémicos alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca ($p < 0,001$) (Tabla XVI; Figura IX).

Con respecto a la actividad del complemento por la vía de las lectinas, la dieta basada en fermentados lácteos de cabra con alto contenido de hierro aumentó la actividad de esta vía en animales controles y anémicos ($p < 0,01$). La sobrecarga de hierro aumentó la actividad de la vía de las lectinas en ambos grupos de animales (controles y anémicos) alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de cabra ($p < 0,01$), en comparación con el contenido normal de hierro (Tabla XVI; Figura X).

La dieta basada en fermentados lácteos de cabra con contenido de hierro normal o alto aumentó la actividad de la vía alternativa del complemento en animales controles y anémicos ($p < 0,001$). La anemia disminuyó la actividad de la vía alternativa del complemento en animales alimentados con ambas dietas con contenido de hierro normal ($p < 0,001$) o alto ($p < 0,01$), excepto en animales alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca con contenido de hierro normal, donde no se observaron diferencias significativas. La sobrecarga de hierro disminuyó la actividad de la vía alternativa en animales controles alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca ($p < 0,05$) (Tabla XVI; Figura XI).

La dieta basada en fermentados lácteos de cabra con un contenido de hierro normal o alto disminuyó la concentración sérica de lactoferrina en animales anémicos ($p < 0,05$). La anemia disminuyó los niveles séricos de lactoferrina en animales alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de cabra con contenido de hierro normal ($p < 0,05$) o alto ($p < 0,01$) y en animales alimentados con dietas basadas en fermentados lácteos de vaca con alto contenido de hierro ($p < 0,05$). En los animales controles alimentados con ambas dietas basadas en leches fermentadas, la sobrecarga de

hierro aumentó la concentración sérica de lactoferrina ($p < 0,05$) (Tabla XVII; Figura XII).

Tablas y figuras

6. TABLAS Y FIGURAS

Tabla I. Peso corporal inicial, peso corporal final e incremento de peso en ratas controles y anémicas

	Grupo control	Grupo anémico
Peso corporal inicial (g)	45.32 ± 5.14	47.21 ± 6.43
Peso corporal final (g)	238.71 ± 7.06	190.85 ± 3.17*
Incremento de peso (g/día)	4.68 ± 0.07	3.53 ± 0.04*

Diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control ($P < 0.05$; test de la t de Student).

Tabla II. Pesos de hígado, bazo y timo (absolutos y relativos al peso corporal) en ratas controles y anémicas

	Grupo control	Grupo anémico
Peso hígado (g)	6.42 ± 0.26	6.03 ± 0.34
Peso hígado/peso corporal (%)	2.59 ± 0.06	2.83 ± 0.09*
Peso bazo (g)	1.04 ± 0.07	2.60 ± 0.16*
Peso bazo/peso corporal (%)	0.004 ± 0.00	0.014 ± 0.00*
Peso timo (g)	0.79 ± 0.03	0.68 ± 0.03*
Peso timo/peso corporal (%)	0.003 ± 0.00	0.004 ± 0.02*

Diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control ($P < 0.05$; test de la t de Student).

Tabla III. Composición corporal en ratas controles y anémicas

	Grupo control	Grupo anémico
Masa grasa (g)	18.16 ± 1.83	12.59 ± 1.20*
Masa magra (g)	220.70 ± 4.01	185.55 ± 2.11*
Agua libre (g)	1.00 ± 0.14	1.46 ± 0.18*
Agua total (g)	187.05 ± 3.68	160.48 ± 2.98*

Diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control ($P < 0.05$; test de la t de Student).

Tabla IV. Parámetros eritrocitarios en ratas controles y anémicas

	Grupo control	Grupo anémico
Recuento de hematíes ($10^{12}/L$)	7.11 ± 0.20	3.10 ± 0.21*
Hemoglobina (g/L)	122.35 ± 2.65	60.17 ± 2.33*
Hematocrito (%)	41.10 ± 1.05	13.25 ± 1.29*
VCM (fL)	55.33 ± 0.51	37.01 ± 0.36*
HCM (pg)	19.33 ± 0.15	14.21 ± 0.54*
CHCM (g/dL)	34.98 ± 0.33	30.10 ± 0.52*
ADE (%)	16.26 ± 0.36	19.21 ± 0.37*

VCM: volumen corpuscular medio; HCM: hemoglobina corpuscular media; CHCM: concentración de hemoglobina corpuscular media; ADE: amplitud de distribución eritrocitaria

Diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control ($P < 0.05$; test de la t de Student).

Tabla V. Recuento total y diferencial de leucocitos en ratas controles y anémicas

	Grupo control	Grupo anémico
Glóbulos blancos ($10^3/\mu L$)	8.88 ± 0.38	8.04 ± 0.99
Neutrófilos (%)	8.92 ± 1.01	7.77 ± 1.53
Linfocitos (%)	81.56 ± 1.58	78.00 ± 2.73
Monocitos (%)	2.92 ± 0.26	6.53 ± 1.29*
Eosinófilos (%)	2.02 ± 0.69	2.10 ± 1.21
Basófilos (%)	4.58 ± 0.29	5.60 ± 0.62
NLR	0.12 ± 0.02	0.10 ± 0.01
PLR	2.49 ± 0.70	4.92 ± 0.54*

NLR: ratio neutrófilos/linfocitos; PLR: ratio plaquetas/linfocitos

Diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control ($P < 0.05$; test de la t de Student).

Tabla VI. Parámetros plaquetarios en ratas controles y anémicas

	Grupo control	Grupo anémico
Recuento de plaquetas ($10^9/L$)	765 ± 73.61	2021 ± 115*
Plaquetocrito (%)	0.50 ± 0.05	2.10 ± 0.21*
VPM (fL)	7.21 ± 0.20	11.66 ± 0.44*
ADP (%)	14.19 ± 1.00	24.39 ± 1.44*

VPM: volumen plaquetario medio; ADP: amplitud de distribución plaquetaria

Diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control ($P < 0.05$; test de la t de Student).

Tabla VII. Parámetros bioquímicos en ratas controles y anémicas

	Grupo control	Grupo anémico
Estatus nutricional		
Proteínas totales (g/dL)	5.35 ± 0.18	5.81 ± 0.15
Albumina (g/dL)	2.98 ± 0.06	3.31 ± 0.08
Globulina (g/dL)	2.38 ± 0.12	2.50 ± 0.14
Ratio A/G	1.28 ± 0.04	1.44 ± 0.17
Glucosa (mg/dL)	69.61 ± 3.97	86.13 ± 3.68*
Colesterol total (mg/dL)	71.83 ± 5.20	91.40 ± 9.64*
Colesterol-HDL (mg/dL)	21.32 ± 1.02	26.57 ± 1.44*
Colesterol-LDL (mg/dL)	52.82 ± 1.98	39.20 ± 1.02*
Triglicéridos (mg/dL)	73.92 ± 3.37	217.52 ± 28.46*
Función hepática		
AST (UI/L)	103.58 ± 8.93	228.04 ± 18.45 *
ALT (UI/L)	24.57 ± 1.16	52.28 ± 2.73 *
Bilirrubina (mg/dL)	0.81 ± 0.09	1.25 ± 0.13 *
Función renal		
Ácido úrico (mg/dL)	1.17 ± 0.15	1.54 ± 0.19
Urea (mg/dL)	34.79 ± 1.99	41.82 ± 1.77*
Creatinina (mg/dL)	0.048 ± 0.017	0.043 ± 0.015
Estatus de hierro		
Hierro sérico (µg/L)	1336 ± 99.12	601 ± 55.98 *
TIBC (µg/L)	2675 ± 189	17935 ± 598 *
Saturación de transferrina (%)	49.02 ± 5.87	3.93 ± 0.41 *
Ferritina (µg/L)	79.74 ± 2.12	49.65 ± 1.64 *
Hepcidina (ng/mL)	16.87 ± 0.46	13.48 ± 0.62*

A/G: ratio albumina/globulina; AST: aspartato aminotransferasa; ALT: alanina aminotransferasa; TIBC: capacidad total de fijación al hierro

Diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control ($P < 0.05$; test de la t de Student).

Tabla VIII. Peso corporal inicial, peso corporal final e incremento de peso en ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro.

	Contenido de hierro	Dieta basada en leche fermentada de vaca		Dieta basada en leche fermentada de cabra		ANOVA de dos vías		
		Grupo control	Grupo anémico	Grupo control	Grupo anémico	Dieta	Anemia	Contenido de hierro
Peso corporal inicial (g)	Normal	238.71 ± 7.06a	190.85 ± 3.18AC	321.13 ± 9.80b	298.67 ± 6.27BC	<0.001	<0.001	NS
	Sobrecarga	242.09 ± 5.28a	189.07 ± 7.04AC	316.08 ± 6.51b	276.69 ± 6.79BC	<0.001	<0.001	
Peso corporal final (g)	Normal	278.98 ± 3.70a	255.41 ± 2.85AC	365.23 ± 8.61b	347.20 ± 8.39BC	<0.001	<0.05	<0.01
	Sobrecarga	287.27 ± 4.92a	267.57 ± 4.03AC	339.40 ± 5.18bD	329.22 ± 5.81BD	<0.001	<0.05	
Incremento de peso (g/día)	Normal	1.34 ± 0.20	2.15 ± 0.11AC	1.47 ± 0.16	1.62 ± 0.13BC	<0.01	<0.05	<0.01
	Sobrecarga	1.51 ± 0.12a	2.62 ± 0.19ACD	0.92 ± 0.12bD	1.96 ± 0.26BCD	<0.001	<0.01	

NS No significativo

a, b Los valores medios en la misma fila entre grupos de ratas controles con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de Tukey).

A, B Los valores medios en la misma fila entre grupos de ratas anémicas con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de Tukey).

C Los valores medios entre grupos de ratas controles y anémicas con la misma dieta son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de la t de Student).

D Los valores medios del grupo correspondiente de ratas alimentadas con contenido normal de hierro son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de la t de Student).

Tabla IX. Pesos de hígado, bazo y timo (absolutos y relativos al peso corporal) en ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro

	Contenido de hierro	Dieta basada en leche fermentada de vaca		Dieta basada en leche fermentada de cabra		ANOVA de dos vías		
		Grupo control	Grupo anémico	Grupo control	Grupo anémico	Dieta	Anemia	Contenido de hierro
Peso hígado (g)	Normal	6.53 ± 0.24a	6.27 ± 0.10A	8.39 ± 0.23 b	8.52 ± 0.21B	<0.05	NS	NS
	Sobrecarga	6.76 ± 0.23a	6.56 ± 0.12a	7.69 ± 0.21b	7.93 ± 0.21B	<0.05	NS	
Peso hígado/peso corporal (%)	Normal	2.33 ± 0.06	2.45 ± 0.03C	2.30 ± 0.04	2.46 ± 0.08C	NS	<0.05	NS
	Sobrecarga	2.35 ± 0.05	2.46 ± 0.06	2.27 ± 0.06	2.41 ± 0.05C	NS	<0.05	
Peso bazo (g)	Normal	0.40 ± 0.01	0.51 ± 0.05	0.50 ± 0.03	0.47 ± 0.02	NS	NS	<0.001
	Sobrecarga	0.47 ± 0.03a	0.54 ± 0.03	0.51 ± 0.02bD	0.50 ± 0.02C	<0.001	<0.001	
Peso bazo/peso corporal (%)	Normal	0.14 ± 0.00	0.20 ± 0.01AC	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.01B	< 0.001	< 0.01	NS
	Sobrecarga	0.17 ± 0.01	0.20 ± 0.01A	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.01B	< 0.001	NS	
Peso timo (g)	Normal	0.31 ± 0.03a	0.23 ± 0.02	0.50 ± 0.06b	0.26 ± 0.03C	<0.001	<0.001	<0.001
	Sobrecarga	0.29 ± 0.02a	0.24 ± 0.03A	0.54 ± 0.02bD	0.28 ± 0.00B	<0.001	NS	
Peso timo/peso corporal (%)	Normal	0.11 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.08 ± 0.01C	NS	< 0.01	NS
	Sobrecarga	0.10 ± 0.01a	0.09 ± 0.01	0.16 ± 0.01b	0.09 ± 0.01C	< 0.01	<0.001	

NS No significativo

a, b Los valores medios en la misma fila entre grupos de ratas controles con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de Tukey).

A, B Los valores medios en la misma fila entre grupos de ratas anémicas con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de Tukey).

C Los valores medios entre grupos de ratas controles y anémicas con la misma dieta son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de la t de Student).

D Los valores medios del grupo correspondiente de ratas alimentadas con contenido normal de hierro son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de la t de Student).

Tabla X. Composición corporal en ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro

	Contenido de hierro	Dieta basada en leche fermentada de vaca		Dieta basada en leche fermentada de cabra		ANOVA de dos vías		
		Grupo control	Grupo anémico	Grupo control	Grupo anémico	Dieta	Anemia	Contenido de hierro
Masa grasa (g)	Normal	31.09 ± 1.88a	30.96 ± 1.21A	22.20 ± 0.97b	18.39 ± 1.06BC	<0.001	<0.001	<0.05
	Sobrecarga	33.14 ± 1.54aD	32.87 ± 1.85AD	23.31 ± 1.01bD	19.12 ± 1.13BC	<0.001	<0.001	
Masa magra (g)	Normal	314.01 ± 5.04a	300.28 ± 4.88AC	264.19 ± 4.37b	242.64 ± 4.41BC	<0.001	<0.001	<0.001
	Sobrecarga	311.98 ± 4.21a	302.10 ± 5.01AC	263.36 ± 4.25b	232.98 ± 4.03BCD	<0.001	<0.001	
Agua libre (g)	Normal	0.90 ± 0.08a	0.76 ± 0.07AC	1.17 ± 0.1b	1.11 ± 0.11B	<0.001	<0.001	NS
	Sobrecarga	0.92 ± 0.07a	0.79 ± 0.05AC	1.16 ± 0.15b	1.14 ± 0.12B	<0.001	<0.001	
Agua total (g)	Normal	265.84 ± 4.23a	254.96 ± 4.58AC	223.82 ± 4.10 b	206.83 ± 3.98 BC	<0.001	<0.001	NS
	Sobrecarga	263.54 ± 4.41a	257.10 ± 4.26AC	224.03 ± 4.56b	207.41 ± 3.85BC	<0.001	<0.001	

NS No significativo

a, b Los valores medios en la misma fila entre grupos de ratas controles con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de Tukey).

A, B Los valores medios en la misma fila entre grupos de ratas anémicas con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de Tukey).

C Los valores medios entre grupos de ratas controles y anémicas con la misma dieta son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de la t de Student).

D Los valores medios del grupo correspondiente de ratas alimentadas con contenido normal de hierro son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de la t de Student).

Tabla XI. Parámetros eritrocitarios en ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro

	Contenido de hierro	Dieta basada en leche fermentada de vaca		Dieta basada en leche fermentada de cabra		ANOVA de dos vías		
		Grupo control	Grupo anémico	Grupo control	Grupo anémico	Dieta	Anemia	Contenido de hierro
Recuento de hematíes ($10^{12}/L$)	Normal	7.06 ± 0.18	7.08 ± 0.22	7.39 ± 0.21	7.21 ± 0.20	NS	NS	<0.05
	Sobrecarga	6.94 ± 0.17a	7.19 ± 0.24	8.01 ± 0.30 b	7.11 ± 0.21C	<0.01	NS	
Hemoglobina (g/L)	Normal	129.55 ± 2.89	129.33 ± 2.61	131.95 ± 2.76	129.15 ± 2.48	NS	NS	<0.001
	Sobrecarga	142.63 ± 2.63	141.10 ± 2.92AD	141.30 ± 2.98	147.35 ± 3.01BD	<0.05	NS	
Hematocrito (%)	Normal	40.02 ± 1.19a	39.01 ± 0.97A	41.93 ± 1.23b	42.95 ± 0.98B	<0.01	NS	<0.01
	Sobrecarga	39.37 ± 1.33a	44.89 ± 2.76D	44.86 ± 1.26 b	45.42 ± 1.35D	<0.05	NS	
VCM (fL)	Normal	57.68 ± 0.54	55.34 ± 0.59	57.25 ± 0.56	55.04 ± 0.53	NS	NS	NS
	Sobrecarga	56.79 ± 0.58	53.18 ± 0.55A	56.44 ± 0.53	56.15 ± 0.53B	<0.05	NS	
HCM (pg)	Normal	19.15 ± 0.16	19.15 ± 0.22	19.89 ± 0.25	19.18 ± 0.20	NS	NS	<0.01
	Sobrecarga	16.91 ± 0.12aD	21.08 ± 0.19ACD	19.99 ± 0.20b	20.16 ± 0.18BCD	<0.05	<0.05	
CHCM (g/dL)	Normal	35.31 ± 0.29	35.81 ± 0.46A	36.59 ± 0.24	38.26 ± 0.14BC	<0.05	<0.05	<0.05
	Sobrecarga	34.98 ± 0.24aD	36.40 ± 0.13AC	37.02 ± 0.16bD	37.71 ± 0.18BD	<0.01	<0.05	
ADE (%)	Normal	13.91 ± 0.23	13.38 ± 0.16A	14.56 ± 0.26	19.89 ± 0.62BC	<0.01	<0.05	<0.01
	Sobrecarga	24.19 ± 0.80aD	13.58 ± 0.19AC	15.18 ± 0.58bD	17.89 ± 0.47BCD	<0.01	<0.001	

VCM: volumen corpuscular medio; HCM: hemoglobina corpuscular media; CHCM: concentración de hemoglobina corpuscular media; ADE: amplitud de distribución eritrocitaria

NS No significativo

a, b Los valores medios en la misma fila entre grupos de ratas controles con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de Tukey).

A, B Los valores medios en la misma fila entre grupos de ratas anémicas con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de Tukey).

C Los valores medios entre grupos de ratas controles y anémicas con la misma dieta son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de la t de Student).

D Los valores medios del grupo correspondiente de ratas alimentadas con contenido normal de hierro son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de la t de Student).

Tabla XII. Recuento total y diferencial de leucocitos en ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro

	Contenido de hierro	Dieta basada en leche fermentada de vaca		Dieta basada en leche fermentada de cabra		ANOVA de dos vías		
		Grupo control	Grupo anémico	Grupo control	Grupo anémico	Dieta	Anemia	Contenido de hierro
Glóbulos blancos (10 ³ /μL)	Normal	1.66 ± 0.12a	1.12 ± 0.12A	1.79 ± 0.16a	2.17 ± 0.39BC	<0.05	<0.05	<0.01
	Sobrecarga	0.99 ± 0.15aD	0.79 ± 0.10AD	1.80 ± 0.13b	2.22 ± 0.18B	<0.01	NS	
Neutrófilos (%)	Normal	14.37 ± 1.42 a	18.40 ± 1.44C	17.77 ± 1.29 b	14.46 ± 2.58	<0.05	<0.05	<0.01
	Sobrecarga	11.78 ± 1.12aD	17.87 ± 1.53 C	14.04 ± 1.17 bD	16.00 ± 1.23	<0.05	<0.05	
Linfocitos (%)	Normal	73.14 ± 3.82	73.50 ± 1.91	75.23 ± 2.14	78.42 ± 2.36	NS	NS	<0.05
	Sobrecarga	81.01 ± 1.94 D	70.62 ± 3.59C	80.24 ± 1.58 D	76.71 ± 2.52	NS	<0.05	
Monocitos (%)	Normal	1.41 ± 0.27	2.33 ± 0.21AC	1.81 ± 0.20	1.45 ± 0.45 B	<0.05	<0.05	<0.05
	Sobrecarga	1.86 ± 0.25a	3.03 ± 0.35 ACD	1.24 ± 0.12 b	1.59 ± 0.16 B	<0.01	<0.05	
Eosinófilos (%)	Normal	2.07 ± 0.78 a	1.58 ± 0.42	1.00 ± 0.21 b	1.15 ± 0.19	<0.05	<0.05	<0.05
	Sobrecarga	0.85 ± 0.14 a D	1.81 ± 0.49 C	1.32 ± 0.18 b	1.72 ± 0.33	<0.05	<0.05	
Basófilos (%)	Normal	4.65 ± 0.69	4.28 ± 0.51	3.98 ± 0.22	3.11 ± 0.52	NS	NS	<0.01
	Sobrecarga	3.61 ± 0.32a	7.29 ± 0.74 ACD	2.40 ± 0.21b D	2.98 ± 0.22 B	<0.01	<0.05	
NLR	Normal	0.22 ± 0.04	0.31 ± 0.05AC	0.26 ± 0.05	0.20 ± 0.04B	<0.05	<0.05	<0.05
	Sobrecarga	0.15 ± 0.03	0.34 ± 0.09AC	0.18 ± 0.03	0.22 ± 0.03B	<0.05	<0.05	
PLR	Normal	6.16 ± 0.65	9.28 ± 0.24AC	5.08 ± 0.83	6.99 ± 0.70B	<0.05	<0.05	<0.01
	Sobrecarga	1.34 ± 2.61aD	17.84 ± 3.99AD	5.47 ± 0.90b	6.55 ± 1.17B	<0.01	NS	

NLR: ratio neutrófilos/linfocitos; PLR: ratio plaquetas/linfocitos

NS No significativo

a, b Los valores medios en la misma fila entre grupos de ratas controles con diferentes superíndices son significativamente diferentes (P < 0.05; test de Tukey).

A, B Los valores medios en la misma fila entre grupos de ratas anémicas con diferentes superíndices son significativamente diferentes (P < 0.05; test de Tukey).

C Los valores medios entre grupos de ratas controles y anémicas con la misma dieta son significativamente diferentes (P < 0.05; test de la t de Student).

D Los valores medios del grupo correspondiente de ratas alimentadas con contenido normal de hierro son significativamente diferentes (P < 0.05; test de la t de Student).

Tabla XIII. Parámetros plaquetarios en ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro

	Contenido de hierro	Dieta basada en leche fermentada de vaca		Dieta basada en leche fermentada de cabra		ANOVA de dos vías		
		Grupo control	Grupo anémico	Grupo control	Grupo anémico	Dieta	Anemia	Contenido de hierro
Recuento de plaquetas (10 ⁹ /L)	Normal	933.00 ± 70.32	963.00 ± 66.45	926.00 ± 79.65	935.33 ± 66.89	NS	NS	NS
	Sobrecarga	939.67 ± 71.37	965.50 ± 72.22	933.59 ± 81.32	945.86 ± 70.26	NS	NS	
Plaquetocrito (%)	Normal	0.38 ± 0.04	0.37 ± 0.02A	0.40 ± 0.04	0.92 ± 0.14BC	< 0.05	< 0.01	< 0.05
	Sobrecarga	0.61 ± 0.02aD	0.62 ± 0.05AD	0.40 ± 0.01b	0.83 ± 0.09BC	< 0.01	< 0.01	
VPM (fL)	Normal	6.04 ± 0.05	6.01 ± 0.31A	6.33 ± 0.20	8.42 ± 0.42BC	< 0.05	< 0.05	< 0.01
	Sobrecarga	7.99 ± 0.13aD	8.02 ± 0.25CD	5.98 ± 0.05b	8.86 ± 0.36C	< 0.05	< 0.001	
ADP (%)	Normal	12.40 ± 0.81	11.51 ± 0.43A	12.66 ± 0.61	19.01 ± 0.68BC	< 0.001	< 0.01	< 0.01
	Sobrecarga	23.41 ± 0.94aD	9.94 ± 0.51ACD	12.65 ± 0.49b	16.27 ± 0.67BCD	< 0.001	< 0.001	

VPM: volumen plaquetario medio; ADP: amplitud de distribución plaquetaria

NS No significativo

a, b Los valores medios en la misma fila entre grupos de ratas controles con diferentes superíndices son significativamente diferentes (P < 0.05; test de Tukey).

A, B Los valores medios en la misma fila entre grupos de ratas anémicas con diferentes superíndices son significativamente diferentes (P < 0.05; test de Tukey).

C Los valores medios entre grupos de ratas controles y anémicas con la misma dieta son significativamente diferentes (P < 0.05; test de la t de Student).

D Los valores medios del grupo correspondiente de ratas alimentadas con contenido normal de hierro son significativamente diferentes (P < 0.05; test de la t de Student).

Tabla XIV. Parámetros bioquímicos en ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro

	Contenido de hierro	Dieta basada en leche fermentada de vaca		Dieta basada en leche fermentada de cabra		ANOVA de dos vías		
		Grupo control	Grupo anémico	Grupo control	Grupo anémico	Dieta	Anemia	Contenido de hierro
Estatus nutricional								
Proteínas totales (g/dL)	Normal	5.28 ± 0.14	5.07 ± 0.09	5.86 ± 0.11	5.96 ± 0.12	NS	NS	NS
	Sobrecarga	5.35 ± 0.22a	5.06 ± 0.17A	6.17 ± 0.18b	6.05 ± 0.12B	<0.01	NS	
Albumina (g/dL)	Normal	3.14 ± 0.04	3.03 ± 0.03A	3.18 ± 0.02	3.22 ± 0.04B	NS	NS	NS
	Sobrecarga	2.99 ± 0.08a	2.93 ± 0.08A	3.37 ± 0.06b	3.27 ± 0.05B	<0.05	NS	
Globulina (g/dL)	Normal	2.44 ± 0.10	2.05 ± 0.09AC	2.68 ± 0.10	2.74 ± 0.09B	<0.05	<0.05	NS
	Sobrecarga	2.36 ± 0.17a	2.13 ± 0.10A	2.80 ± 0.12b	2.78 ± 0.12B	<0.05	NS	
A/G	Normal	1.30 ± 0.04	1.50 ± 0.07A	1.20 ± 0.04	1.18 ± 0.03B	<0.01	NS	NS
	Sobrecarga	1.34 ± 0.14	1.39 ± 0.04 A	1.21 ± 0.03	1.20 ± 0.06B	<0.01	NS	
Glucosa (mg/dL)	Normal	119.47 ± 2.56	125.28 ± 3.69	137.67 ± 4.29	114.69 ± 3.37C	NS	<0.05	<0.01
	Sobrecarga	127.66 ± 3.39D	141.33 ± 3.40CD	134.89 ± 3.46	137.96 ± 6.64D	NS	<0.05	
Colesterol total (mg/dL)	Normal	45.69 ± 2.15a	45.60 ± 1.75A	40.10 ± 1.98b	36.81 ± 1.29BC	<0.01	<0.05	<0.001
	Sobrecarga	39.63 ± 3.16D	40.20 ± 1.67D	36.70 ± 2.85D	37.48 ± 1.79	NS	NS	
HDL-colesterol (mg/dL)	Normal	10.27 ± 1.13	11.38 ± 0.65	9.80 ± 0.61	10.75 ± 0.82	NS	NS	<0.01
	Sobrecarga	8.45 ± 0.69aD	8.61 ± 0.66D	6.14 ± 0.71bD	8.83 ± 1.02CD	<0.05	<0.05	
LDL-colesterol (mg/dL)	Normal	28.64 ± 1.86a	17.90 ± 1.17AC	2.45 ± 0.17b	4.28 ± 0.45B	<0.001	<0.001	NS
	Sobrecarga	23.26 ± 2.60a	22.24 ± 1.40A	2.12 ± 0.38b	3.15 ± 0.91B	<0.001	<0.001	
Triglicéridos (mg/dL)	Normal	33.87 ± 0.87a	37.60 ± 1.20AC	56.42 ± 4.54b	62.38 ± 3.52BC	<0.001	<0.01	<0.01
	Sobrecarga	39.60 ± 1.88aD	46.71 ± 1.73ACD	51.25 ± 2.27bD	51.96 ± 2.44BD	<0.001	<0.01	
Función hepática								
AST (U/L)	Normal	107.62 ± 4.29 a	80.86 ± 4.25 AC	67.99 ± 2.75 b	61.11 ± 2.12 B	<0.01	<0.05	NS
	Sobrecarga	82.92 ± 4.15 aD	78.19 ± 3.82 A	60.43 ± 1.10 b	68.47 ± 2.03 B	<0.01	NS	
ALT (U/L)	Normal	28.91 ± 1.34 a	27.77 ± 3.91 A	23.14 ± 1.9 b	16.49 ± 0.76 BC	<0.01	<0.01	NS
	Sobrecarga	24.04 ± 1.73 a	19.00 ± 1.21 A	19.47 ± 0.53 b	14.48 ± 0.35 BC	<0.01	<0.01	
Bilirrubina (mg/dL)	Normal	0.08 ± 0.00a	0.20 ± 0.08A	1.23 ± 0.01b	1.22 ± 0.00B	<0.001	NS	NS
	Sobrecarga	0.08 ± 0.02a	0.06 ± 0.01A	1.25 ± 0.01b	1.25 ± 0.01B	<0.001	NS	
Función renal								
Ácido úrico (mg/dL)	Normal	1.48 ± 0.06a	1.07 ± 0.04AC	0.79 ± 0.09b	0.88 ± 0.18B	<0.01	<0.05	<0.01
	Sobrecarga	1.24 ± 0.07	1.43 ± 0.11A	1.01 ± 0.07	1.08 ± 0.09B	<0.05	NS	
Urea (mg/dL)	Normal	46.01 ± 1.41a	44.40 ± 1.11A	34.82 ± 0.84b	36.49 ± 1.13 B	<0.001	NS	<0.01
	Sobrecarga	42.89 ± 2.61	44.37 ± 1.21	43.15 ± 0.38D	41.23 ± 0.70D	NS	NS	
Creatinina (mg/dL)	Normal	0.12 ± 0.03	0.15 ± 0.01	0.17 ± 0.02	0.22 ± 0.02	NS	NS	NS
	Sobrecarga	0.17 ± 0.03	0.10 ± 0.02	0.22 ± 0.03	0.18 ± 0.01	NS	NS	
Estatus de hierro								
Hierro sérico (µg/L)	Normal	1346 ± 86.18	1355 ± 86.35	1352 ± 88.96	1326 ± 94.35	NS	NS	<0.01
	Sobrecarga	1591 ± 100D	1587 ± 102D	1556 ± 99D	1576 ± 97D	NS	NS	
TIBC (µg/L)	Normal	2787 ± 158	2798 ± 137	2785 ± 144	2789 ± 166	NS	NS	<0.01
	Sobrecarga	3145 ± 177D	3254 ± 175D	3251 ± 169	3195 ± 166D	NS	NS	
Saturación de transferrina (%)	Normal	45.98 ± 0.91	45.32 ± 0.89	46.65 ± 0.76	46.37 ± 0.94	NS	NS	<0.01
	Sobrecarga	47.76 ± 1.32D	47.88 ± 1.02D	49.59 ± 0.98D	48.96 ± 1.05D	NS	NS	
Ferritina (µg/L)	Normal	83.25 ± 1.75	82.97 ± 1.68	84.33 ± 1.77	82.34 ± 1.82	NS	NS	<0.01
	Sobrecarga	87.73 ± 1.87D	86.87 ± 1.91D	87.91 ± 1.88D	86.65 ± 1.96D	NS	NS	
Hepcidina (ng/L)	Normal	14.25 ± 0.59a	14.42 ± 0.49A	16.85 ± 0.55b	16.66 ± 0.59B	<0.01	NS	NS
	Sobrecarga	15.75 ± 0.62aD	14.98 ± 0.58A	17.01 ± 0.61b	16.73 ± 0.63B	<0.01	NS	

A/G: ratio albumina/globulina; AST: aspartato aminotransferasa; ALT: alanina aminotransferasa; TIBC: capacidad total de fijación al hierro

NS No significativo

a, b Los valores medios en la misma fila entre grupos de ratas controles con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de Tukey).

A, B Los valores medios en la misma fila entre grupos de ratas anémicas con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de Tukey).

C Los valores medios entre grupos de ratas controles y anémicas con la misma dieta son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de la t de Student).

D Los valores medios del grupo correspondiente de ratas alimentadas con contenido normal de hierro son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de la t de Student).

Tabla XV. Biomarcadores de la función inmune en ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro

pg/mL	Contenido de hierro	Dieta basada en leche fermentada de vaca		Dieta basada en leche fermentada de cabra		ANOVA de dos vías		
		Grupo control	Grupo anémico	Grupo control	Grupo anémico	Dieta	Anemia	Contenido de hierro
Eotaxina	Normal	13.33 ± 0.55a	16.55 ± 1.12AC	10.37 ± 0.99b	8.99 ± 0.81BC	<0.001	<0.001	<0.05
	Sobrecarga	8.79 ± 0.76D	15.23 ± 1.29AC	9.63 ± 1.01	7.98 ± 0.90B	<0.01	<0.05	
Fractalquina	Normal	44.89 ± 3.22a	66.325 ± 3.39AC	32.303 ± 3.13b	25.68 ± 2.35BC	<0.001	<0.01	NS
	Sobrecarga	47.48 ± 2.83a	68.512 ± 3.97AC	35.518 ± 1.21b	28.32 ± 2.43BC	<0.001	<0.001	
G-CSF	Normal	8.223 ± 0.331	10.123 ± 0.412A	6.926 ± 0.28	24.21 ± 1.09BC	<0.01	<0.001	<0.01
	Sobrecarga	9.382 ± 0.074a	3.618 ± 0.391ACD	13.89 ± 1.31bD	6.43 ± 0.55BCD	<0.001	<0.001	
INF-γ	Normal	702.14 ± 43.89a	685.379 ± 41.13A	801.22 ± 42.2b	795.13 ± 41.41B	<0.01	NS	NS
	Sobrecarga	705.54 ± 43.23a	682.225 ± 43.22A	805.76 ± 43.67b	788.12 ± 40.34B	<0.01	NS	
TNF-α	Normal	8.51 ± 0.47a	9.01 ± 0.48A	6.19 ± 0.38b	6.30 ± 0.60B	<0.01	NS	NS
	Sobrecarga	8.43 ± 0.34a	8.65 ± 0.32A	6.31 ± 0.32b	6.20 ± 0.37B	<0.01	NS	
LIX	Normal	105.230 ± 8.74a	374.401 ± 166.11AC	302.228 ± 20.976b	302.692 ± 16.49B	<0.001	<0.05	<0.001
	Sobrecarga	4770.63 ± 437.30aD	4467.58 ± 245.62AD	1039.39 ± 40.83bD	1139.42 ± 45.43BD	<0.001	NS	
MCP-1	Normal	575.22 ± 31.14a	767.12 ± 52.11AC	458.23 ± 28.32b	507.34 ± 44.22B	<0.001	<0.01	NS
	Sobrecarga	580.351 ± 33.55a	696.896 ± 47.99AC	466.599 ± 39.43b	504.229 ± 52.11B	<0.001	<0.05	
IL-4	Normal	28.75 ± 2.18a	27.05 ± 1.19A	36.19 ± 1.05b	35.82 ± 1.03B	<0.01	NS	<0.01
	Sobrecarga	32.73 ± 1.01a	34.62 ± 2.77AD	43.01 ± 1.08bD	55.74 ± 2.09BCD	<0.05	<0.05	
IL-6	Normal	483.32 ± 48.19a	409.43 ± 44.11A	309.12 ± 51.32b	316.18 ± 42.21B	<0.01	NS	NS
	Sobrecarga	439.25 ± 21.12a	423.35 ± 35.15A	337.19 ± 18.21b	327.43 ± 31.45B	<0.01	NS	
IL-10	Normal	33.48 ± 0.77a	16.09 ± 0.66AC	38.07 ± 1.94b	23.48 ± 1.19BC	<0.01	<0.01	<0.01
	Sobrecarga	35.65 ± 2.03a	41.19 ± 1.83ACD	44.79 ± 1.04bD	74.59 ± 3.05BCD	<0.01	<0.01	

G-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos; INF-γ: interferón gamma; TNF-α: factor de necrosis tumoral alfa; MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos 1; IL: interleucina

NS No significativo

a, b Los valores medios en la misma fila entre grupos de ratas controles con diferentes superíndices son significativamente diferentes (P < 0.05; test de Tukey).

A, B Los valores medios en la misma fila entre grupos de ratas anémicas con diferentes superíndices son significativamente diferentes (P < 0.05; test de Tukey).

C Los valores medios entre grupos de ratas controles y anémicas con la misma dieta son significativamente diferentes (P < 0.05; test de la t de Student).

D Los valores medios del grupo correspondiente de ratas alimentadas con contenido normal de hierro son significativamente diferentes (P < 0.05; test de la t de Student).

Tabla XVI. Evaluación funcional de la actividad de las vías del complemento en ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro

Actividad (%)	Contenido de hierro	Dieta basada en leche fermentada de vaca		Dieta basada en leche fermentada de cabra		ANOVA de dos vías		
		Grupo control	Grupo anémico	Grupo control	Grupo anémico	Dieta	Anemia	Contenido hierro
Clásica	Normal	43.94 ± 2.04a	14.82 ± 3.47AC	41.37 ± 4.21b	41.47 ± 2.95B	<0.05	<0.05	<0.001
	Sobrecarga	26.99 ± 1.95aD	23.08 ± 1.55AD	33.23 ± 3.22bD	34.57 ± 2.25BD	<0.001	NS	
Lectinas	Normal	91.25 ± 1.66a	91.38 ± 1.24A	87.14 ± 2.51b	85.36 ± 2.20B	NS	NS	<0.01
	Sobrecarga	81.27 ± 3.10a	85.26 ± 1.79A	94.28 ± 1.55bD	92.76 ± 1.39BD	<0.01	NS	
Alternativa	Normal	6.79 ± 1.64a	3.24 ± 0.79AC	15.77 ± 4.61b	6.44 ± 1.67BC	<0.001	<0.001	<0.05
	Sobrecarga	2.75 ± 0.22aD	2.79 ± 0.38A	12.68 ± 2.95b	8.94 ± 1.99BC	<0.001	<0.05	

NS No significativo

a, b Los valores medios en la misma fila entre grupos de ratas controles con diferentes superíndices son significativamente diferentes (P < 0.05; test de Tukey).

A, B Los valores medios en la misma fila entre grupos de ratas anémicas con diferentes superíndices son significativamente diferentes (P < 0.05; test de Tukey).

C Los valores medios entre grupos de ratas controles y anémicas con la misma dieta son significativamente diferentes (P < 0.05; test de la t de Student).

D Los valores medios del grupo correspondiente de ratas alimentadas con contenido normal de hierro son significativamente diferentes (P < 0.05; test de la t de Student).

Tabla XVII. Concentración sérica de lactoferrina en ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro

		Dieta basada en leche fermentada de vaca		Dieta basada en leche fermentada de cabra		ANOVA de dos vías		
pg/mL	Contenido de hierro	Grupo control	Grupo anémico	Grupo control	Grupo anémico	Dieta	Anemia	Contenido de hierro
Lactoferrina	Normal	769.28 ± 54.30a	755.49 ± 22.24A	740.10 ± 36.54b	625.91 ± 39.66BC	<0.05	<0.05	<0.05
	Sobrecarga	823.11 ± 50.73aD	786.34 ± 39.80AC	831.51 ± 40.24bD	635.51 ± 38.30BC	<0.05	<0.01	

NS No significativo

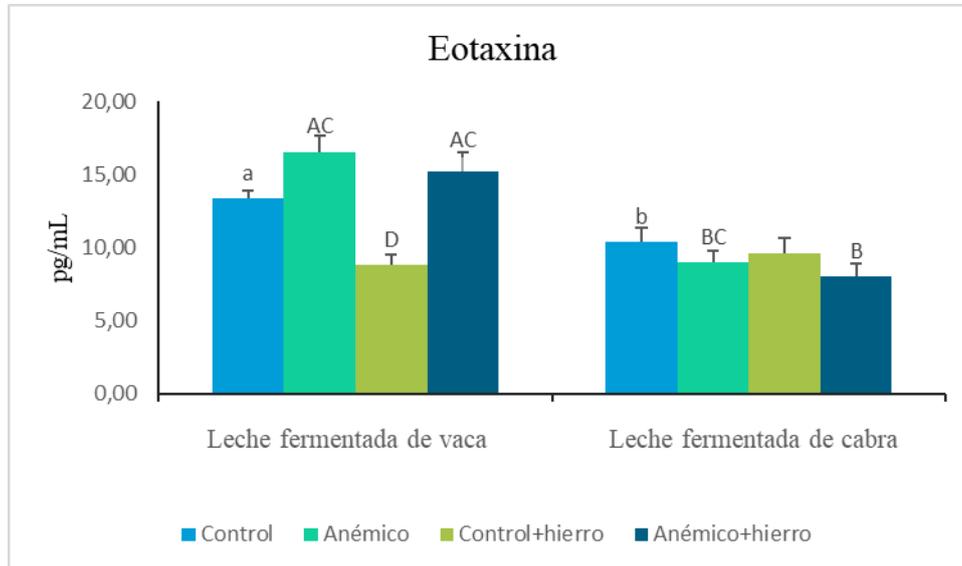
a, b Los valores medios en la misma fila entre grupos de ratas controles con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de Tukey).

A, B Los valores medios en la misma fila entre grupos de ratas anémicas con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de Tukey).

C Los valores medios entre grupos de ratas controles y anémicas con la misma dieta son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de la t de Student).

D Los valores medios del grupo correspondiente de ratas alimentadas con contenido normal de hierro son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de la t de Student).

Figura I. Concentración sérica de eotaxina en ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro



NS No significativo

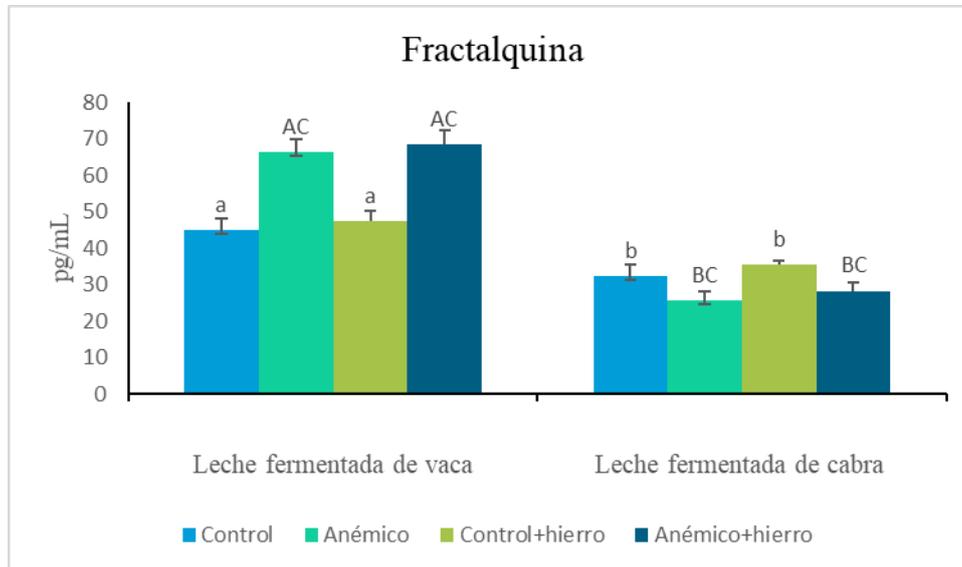
a, b Los valores medios en la misma fila entre grupos de ratas controles con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de Tukey).

A, B Los valores medios en la misma fila entre grupos de ratas anémicas con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de Tukey).

C Los valores medios entre grupos de ratas controles y anémicas con la misma dieta son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de la t de Student).

D Los valores medios del grupo correspondiente de ratas alimentadas con contenido normal de hierro son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de la t de Student).

Figura II. Concentración sérica de fractalquina en ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro



NS No significativo

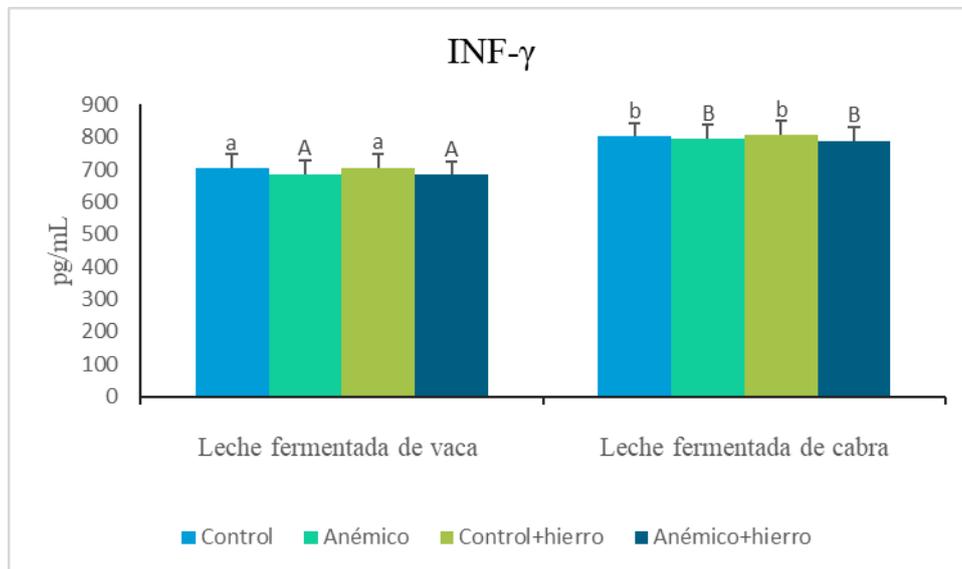
a, b Los valores medios en la misma fila entre grupos de ratas controles con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de Tukey).

A, B Los valores medios en la misma fila entre grupos de ratas anémicas con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de Tukey).

C Los valores medios entre grupos de ratas controles y anémicas con la misma dieta son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de la t de Student).

D Los valores medios del grupo correspondiente de ratas alimentadas con contenido normal de hierro son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de la t de Student).

Figura III. Concentración sérica de INF- γ en ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro



NS No significativo

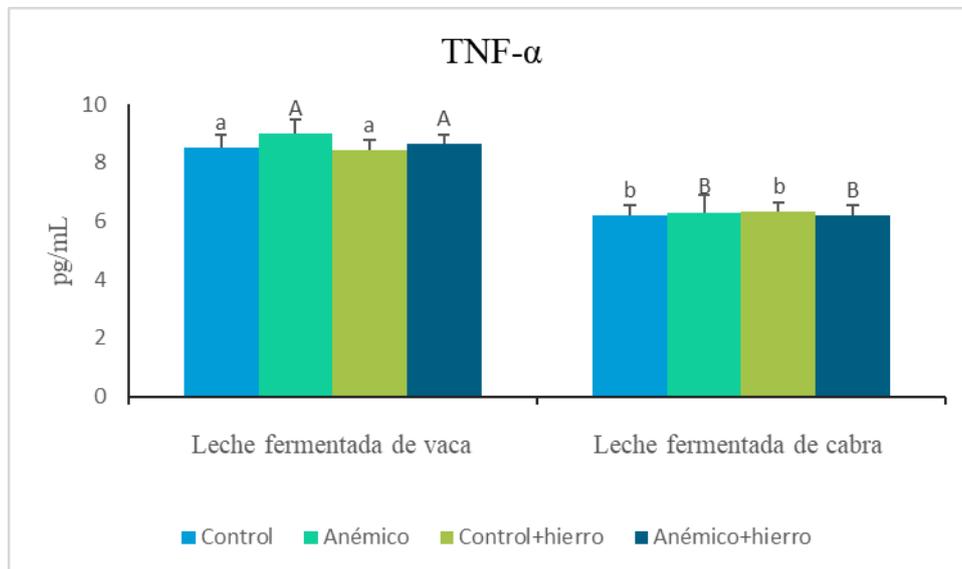
a, b Los valores medios en la misma fila entre grupos de ratas controles con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de Tukey).

A, B Los valores medios en la misma fila entre grupos de ratas anémicas con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de Tukey).

C Los valores medios entre grupos de ratas controles y anémicas con la misma dieta son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de la t de Student).

D Los valores medios del grupo correspondiente de ratas alimentadas con contenido normal de hierro son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de la t de Student).

Figura IV. Concentración sérica de TNF- α en ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro



NS No significativo

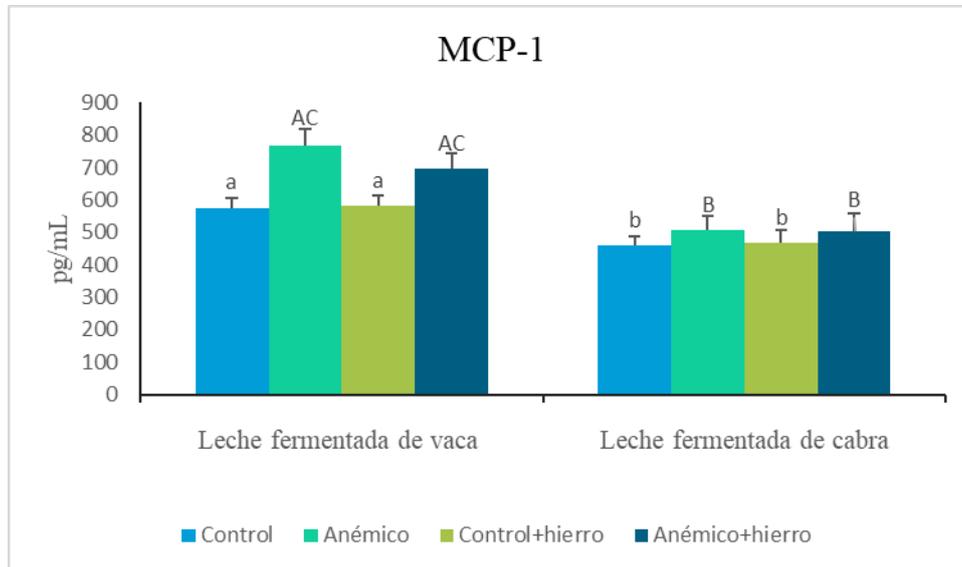
a, b Los valores medios en la misma fila entre grupos de ratas controles con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de Tukey).

A, B Los valores medios en la misma fila entre grupos de ratas anémicas con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de Tukey).

C Los valores medios entre grupos de ratas controles y anémicas con la misma dieta son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de la t de Student).

D Los valores medios del grupo correspondiente de ratas alimentadas con contenido normal de hierro son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de la t de Student).

Figura V. Concentración sérica de MCP-1 en ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro



NS No significativo

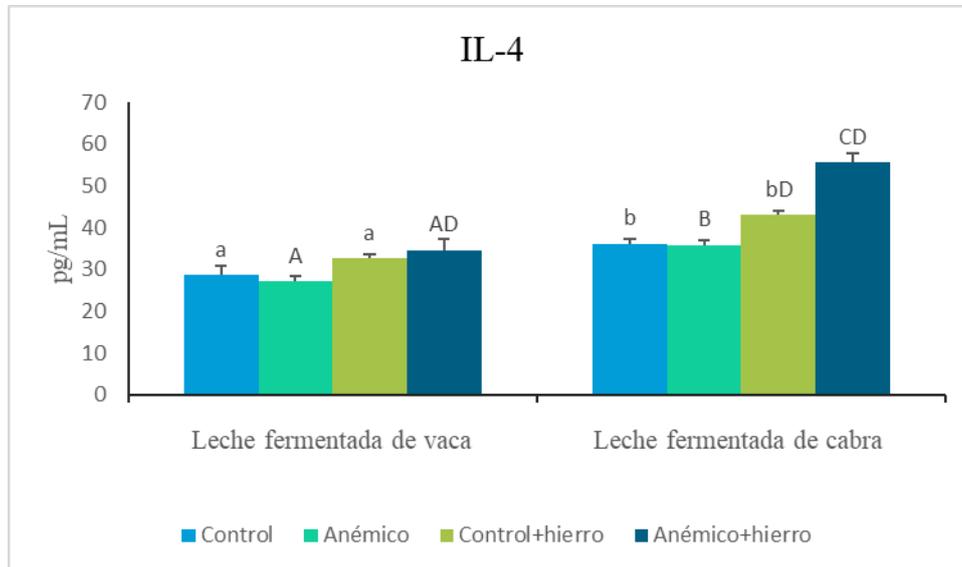
a, b Los valores medios en la misma fila entre grupos de ratas controles con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de Tukey).

A, B Los valores medios en la misma fila entre grupos de ratas anémicas con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de Tukey).

C Los valores medios entre grupos de ratas controles y anémicas con la misma dieta son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de la t de Student).

D Los valores medios del grupo correspondiente de ratas alimentadas con contenido normal de hierro son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de la t de Student).

Figura VI. Concentración sérica de IL-4 en ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro



NS No significativo

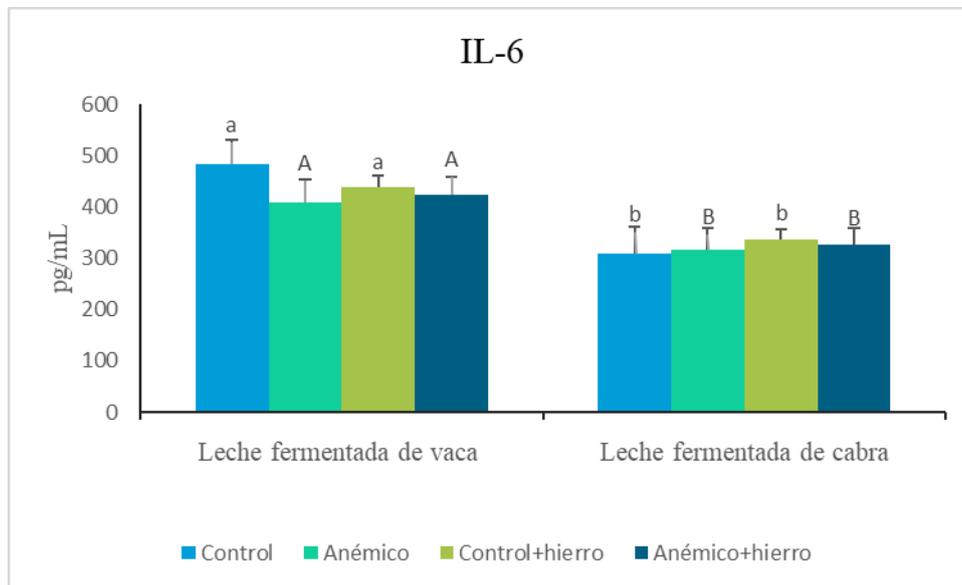
a, b Los valores medios en la misma fila entre grupos de ratas controles con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de Tukey).

A, B Los valores medios en la misma fila entre grupos de ratas anémicas con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de Tukey).

C Los valores medios entre grupos de ratas controles y anémicas con la misma dieta son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de la t de Student).

D Los valores medios del grupo correspondiente de ratas alimentadas con contenido normal de hierro son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de la t de Student).

Figura VII. Concentración sérica de IL-6 en ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro



NS No significativo

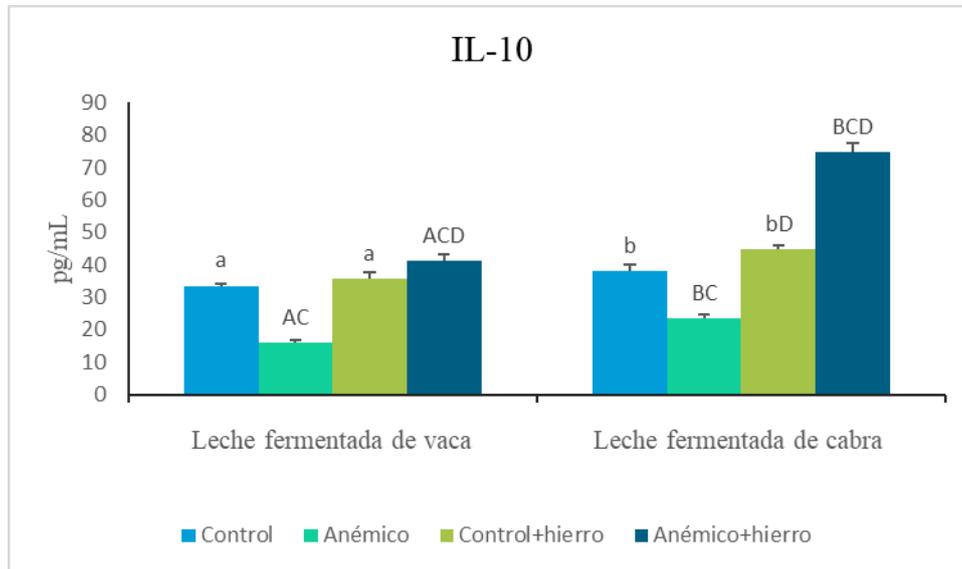
a, b Los valores medios en la misma fila entre grupos de ratas controles con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de Tukey).

A, B Los valores medios en la misma fila entre grupos de ratas anémicas con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de Tukey).

C Los valores medios entre grupos de ratas controles y anémicas con la misma dieta son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de la t de Student).

D Los valores medios del grupo correspondiente de ratas alimentadas con contenido normal de hierro son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de la t de Student).

Figura VIII. Concentración sérica de IL-10 en ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro



NS No significativo

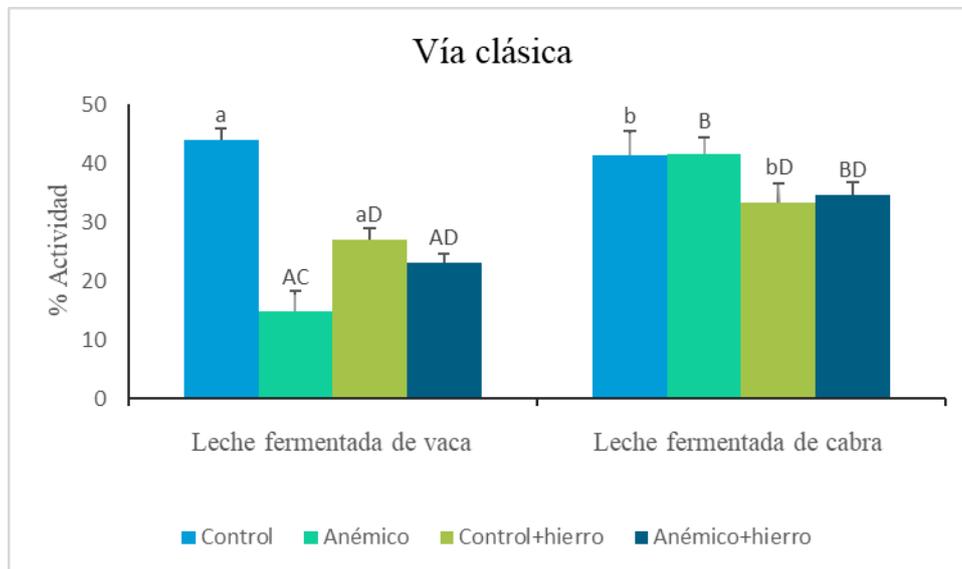
a, b Los valores medios en la misma fila entre grupos de ratas controles con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de Tukey).

A, B Los valores medios en la misma fila entre grupos de ratas anémicas con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de Tukey).

C Los valores medios entre grupos de ratas controles y anémicas con la misma dieta son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de la t de Student).

D Los valores medios del grupo correspondiente de ratas alimentadas con contenido normal de hierro son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de la t de Student).

Figura IX. Evaluación funcional de la actividad de la vía clásica del complemento en ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro



NS No significativo

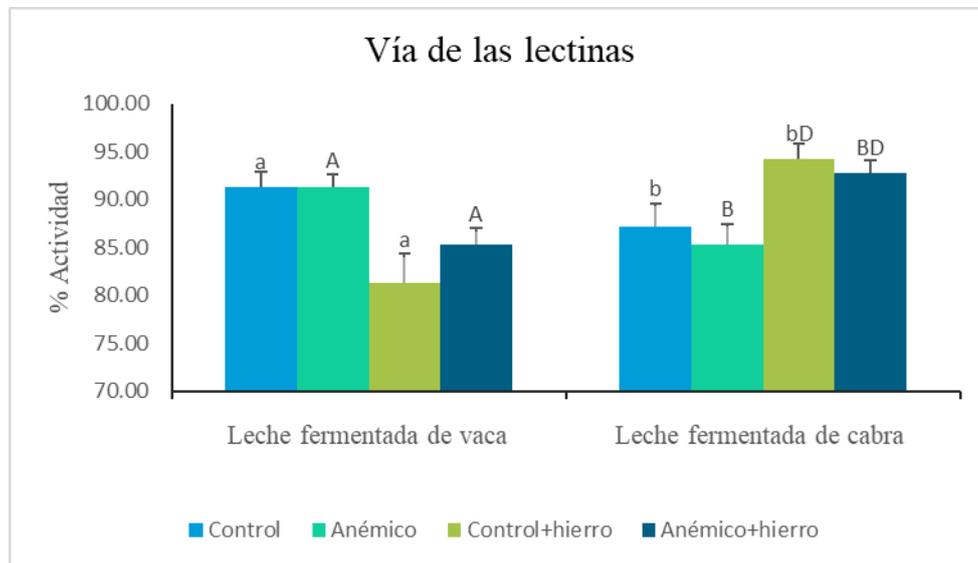
a, b Los valores medios en la misma fila entre grupos de ratas controles con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de Tukey).

A, B Los valores medios en la misma fila entre grupos de ratas anémicas con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de Tukey).

C Los valores medios entre grupos de ratas controles y anémicas con la misma dieta son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de la t de Student).

D Los valores medios del grupo correspondiente de ratas alimentadas con contenido normal de hierro son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de la t de Student).

Figura X. Evaluación funcional de la actividad de la vía de las lectinas del complemento en ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro



NS No significativo

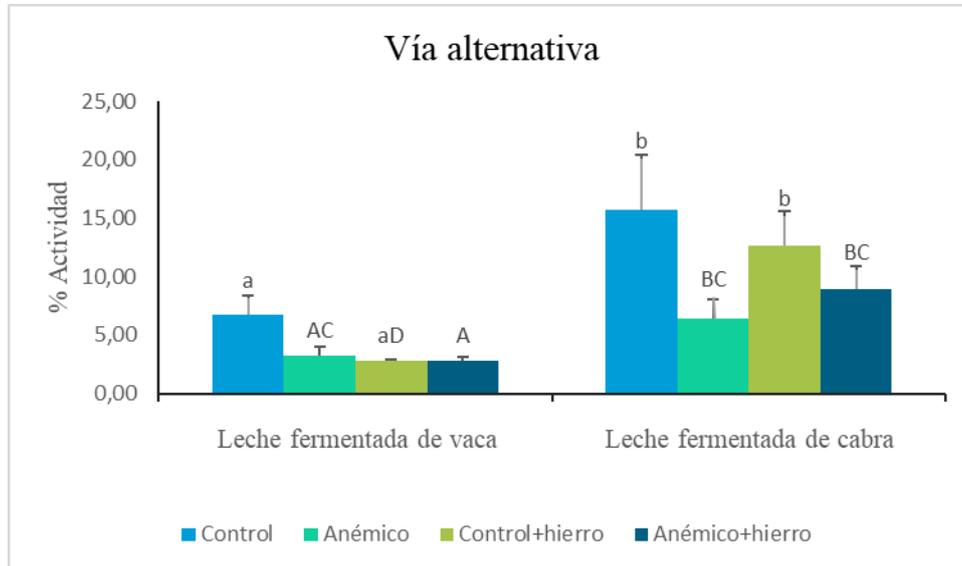
a, b Los valores medios en la misma fila entre grupos de ratas controles con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de Tukey).

A, B Los valores medios en la misma fila entre grupos de ratas anémicas con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de Tukey).

C Los valores medios entre grupos de ratas controles y anémicas con la misma dieta son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de la t de Student).

D Los valores medios del grupo correspondiente de ratas alimentadas con contenido normal de hierro son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de la t de Student).

Figura XI. Evaluación funcional de la actividad de la vía alternativa del complemento en ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro



NS No significativo

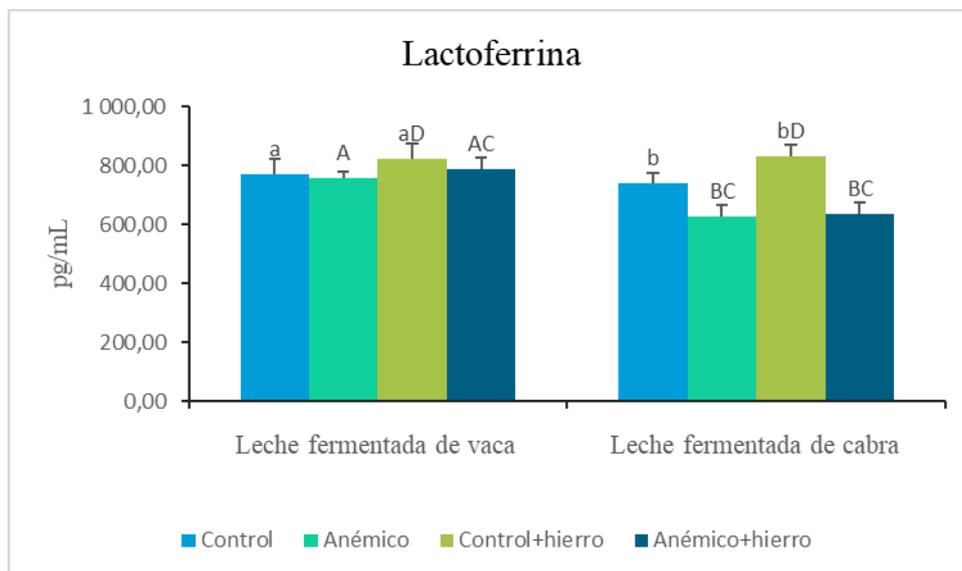
a, b Los valores medios en la misma fila entre grupos de ratas controles con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de Tukey).

A, B Los valores medios en la misma fila entre grupos de ratas anémicas con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de Tukey).

C Los valores medios entre grupos de ratas controles y anémicas con la misma dieta son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de la t de Student).

D Los valores medios del grupo correspondiente de ratas alimentadas con contenido normal de hierro son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de la t de Student).

Figura XII. Concentración sérica de lactoferrina en ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche fermentada de vaca o cabra con contenido normal o sobrecarga de hierro



NS No significativo

a, b Los valores medios en la misma fila entre grupos de ratas controles con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de Tukey).

A, B Los valores medios en la misma fila entre grupos de ratas anémicas con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de Tukey).

C Los valores medios entre grupos de ratas controles y anémicas con la misma dieta son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de la t de Student).

D Los valores medios del grupo correspondiente de ratas alimentadas con contenido normal de hierro son significativamente diferentes ($P < 0.05$; test de la t de Student).

Discusión

7. DISCUSIÓN

7.1 PERIODO PRE-EXPERIMENTAL

El período pre-experimental se desarrolló para inducir la deficiencia de hierro en el grupo anémico. En los animales controles, todos los parámetros hematológicos estudiados están dentro del rango de valores normales para esta especie (Campos, et al. 1998). Después de la ingesta de una dieta con bajo contenido en hierro durante 40 días, todos los parámetros hematológicos fueron menores en el grupo anémico con respecto al grupo control, excepto el valor de ADE que fue mayor en el grupo anémico, debido a que el hierro circulante no llega a alcanzar la médula ósea y se producen tanto hematíes microcíticos como de tamaño normal por lo que el valor de ADE aumenta (Pasricha et al., 2011).

En el presente estudio, el recuento de monocitos fue mayor durante la inducción de la anemia ferropénica nutricional, lo que concuerda con los resultados de Theurl et al. (2006), que pone de manifiesto que este aumento es una consecuencia de la regulación a la baja de la función de la ferroportina por la hepcidina y las citocinas durante la anemia.

El recuento de plaquetas aumentó durante la deficiencia de hierro, por lo tanto, la proporción de PLR también aumentó. La deficiencia de hierro es una causa de trombocitosis, sin embargo, el mecanismo exacto del aumento de los niveles de plaquetas no se conoce completamente. Es conocido que la deficiencia de hierro aumenta los niveles de citocinas proinflamatorias las cuales juegan un papel clave en la trombocitosis al aumentar la síntesis de proteínas de fase aguda, disminuir la biosíntesis de albúmina hepática, estimular la proliferación megacariocítica y la producción de trombopoyetina (Uz et al., 2016).

Estos resultados confirman que el modelo de anemia ferropénica nutricional desarrollado produce la inducción experimental de esta patología tras el suministro de una dieta con bajo contenido en hierro durante 40 días.

En el presente estudio el incremento en los animales anémicos de las concentraciones séricas de glucosa, colesterol total, colesterol-HDL, triglicéridos, transaminasas (AST y ALT), bilirrubina, urea y TIBC, podría estar relacionado con el deterioro de la función hepática por la ferropénica (Tolman & Re, 1999). La ferropénica y el aumento de la secreción de cortisol están asociados con un

aumento de la lipólisis y la concentración plasmática de triglicéridos y colesterol (Ikeuchi et al., 2007).

Además, durante la deficiencia de hierro se observó un aumento en los niveles séricos de hepcidina sérica. El aumento de hepcidina, al inducir la degradación de la ferroportina, disminuye la salida de hierro de las células duodenales, ya que este aumento pocas horas después de una infección o un ataque inflamatorio, da lugar a una reducción de los niveles plasmáticos de hierro. Esto produce una restricción de la disponibilidad de hierro, limitando la proliferación de los microorganismos patógenos (Hassan et al., 2016).

También se muestra un aumento de agua libre en animales anémicos, lo que podría indicar la presencia de edema y por lo tanto una alteración hemodinámica severa lo que explica que no se pueda mantener la distribución de agua entre los compartimentos intracelulares y extracelulares (Colin-Ramirez et al., 2006).

En situación de ferropdeficiencia, disminuye drásticamente el suministro de oxígeno a las células debido a una menor concentración de hemoglobina y un menor recuento de glóbulos rojos. El bajo consumo de oxígeno que se produce durante la ferropdeficiencia (Moreno-Fernández et al., 2019) afecta de manera negativa a la síntesis de ATP, limitando y reduciendo la eficiencia energética y el aumento de peso. Estos resultados confirman los hallazgos de Schneider et al. (2008) donde se observó que bajos niveles de hemoglobina podrían alterar significativamente el aumento de peso, explicando por lo tanto la asociación encontrada en el presente estudio entre el bajo peso corporal y la deficiencia de hierro.

7.2 PERIODO EXPERIMENTAL

En la presente Tesis Doctoral, se ha estudiado la homeostasis del sistema inmune en un modelo de deficiencia severa de hierro y se observó que el consumo de leche fermentada de cabra modula positivamente la respuesta del sistema inmunológico. Lo cual significa que los beneficios observados tras el consumo de una dieta basada en leche fermentada de cabra no solo representan una mejora en el recuento celular debido a la recuperación del estado de hierro y parámetros hematológicos, sino también una modulación del sistema inmunológico.

La dieta basada en leche fermentada de cabra mejora el metabolismo del hierro porque aumenta la expresión de proteínas clave duodenales implicadas en el metabolismo intestinal del hierro, tales como DMT1 y Dcytb, mejorando la absorción intestinal de hierro después de la anemia inducida y contribuyendo a una mejor recuperación de los parámetros hematológicos (Moreno-Fernández et al., 2016).

Durante el PE, el peso corporal fue estadísticamente mayor en los animales alimentados con dieta a base de leche fermentada de cabra. Este hallazgo puede explicarse debido a que el consumo de leche fermentada de cabra durante la recuperación de la anemia mejora la lipólisis y la termogénesis en el músculo esquelético e influye en la homeostasis del depósito de tejido adiposo disminuyendo la masa grasa (Moreno-Fernández et al., 2019). La dieta elaborada con leche fermentada de cabra podría favorecer la síntesis y regeneración de fibras musculares, lo que explica también la mayor cantidad de masa magra en estos animales (Moreno-Fernández et al., 2017).

El hierro tiene un papel clave en la inmunidad innata y la sobrecarga de hierro inhibe las funciones de los macrófagos ya que el almacenamiento de hierro en ellos afecta directamente a la actividad vinculada con los factores de transcripción proinflamatorios (Weis et al., 1995). Una de las principales respuestas es la privación y el secuestro de hierro de la circulación sistémica, coordinada por dos proteínas claves en la regulación hormonal de homeostasis del hierro, la hepcidina y la ferroportina, de modo que se reduce la disponibilidad de hierro para la utilización bacteriana. La hepcidina regula los niveles séricos de hierro y su localización, reduce su absorción a nivel duodenal, disminuye la liberación de este metal de los macrófagos que reciclan los eritrocitos viejos y otras células, y estabiliza el hierro almacenado en los hepatocitos. Todo ello se explica por el hecho de que la unión de la hepcidina a la FPN1 expresada en macrófagos, hepatocitos y otros tipos de células induce la internalización y degradación lisosomal de la proteína exportadora de hierro lo que conduce a la retención celular de este metal (Ward et al., 2011).

Las células T auxiliares tipo 1 (Th-1) producen IFN- γ (Romagnani, 1997), y en el presente estudio, la deficiencia de hierro disminuye la concentración de IFN- γ en los animales alimentados con dieta basada en fermentados lácteos de vaca porque estas células eran extremadamente sensibles a las alteraciones de la homeostasis del hierro;

sin embargo, el grupo de animales que consume la dieta basada en fermentados lácteos de cabra presenta un aumento de la expresión de IFN- γ , mejorando la función inmunológica, debido a su papel positivo en la homeostasis del hierro. Además, los cambios en el contenido total de hierro de los macrófagos alteran la actividad de la NADPH oxidasa en la deficiencia de hierro y en la sobrecarga de hierro, donde está disminuida y aumentada, respectivamente, lo que puede comprometer la eficacia de estos macrófagos para hacer frente a los agentes patógenos (Ward et al., 2009). Los efectos inducidos por la deficiencia de hierro incluyen la reducción de la función de los neutrófilos, la disminución de la actividad de la mieloperoxidasa y posiblemente la alteración de la actividad antibacteriana intracelular, la disminución del recuento de linfocitos T, la respuesta proliferativa defectuosa inducida por los linfocitos T y la alteración de la actividad de las células natural killer (Oppenheimer, 2001).

Por otra parte, los macrófagos son productores y también células diana para la hepcidina, lo que proporciona un mecanismo potencial de autorregulación y un vínculo adicional entre la homeostasis del hierro y la inmunidad (Armitage et al., 2011).

Uno de los principales activadores inmunitarios de la infiltración tisular de eosinófilos es la quimioquina eotaxina, que induce la liberación de especies reactivas de oxígeno, y es quimioatrayente e, indirectamente, es un agente dañino tisular en los lugares de inflamación (Badewa et al., 2002). La fractalquina aumenta la transferencia de células inflamatorias y la destrucción de tejidos a través del aumento de la secreción de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), metaloproteinasas de matriz e interferón gamma (IFN- γ). La citocina IFN- γ derivada de Th-1, activa los macrófagos, contribuyendo así a la formación de citocinas proinflamatorias como el TNF- α , IL-1 o IL-6, y a la inducción de mecanismos efectores inmunes citotóxicos de estas células. Por el contrario, las células Th-2 producen IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, que en parte ejercen acciones antiinflamatorias mediante la inhibición de diversas funciones de los macrófagos y que también activan las células inmunes (Oexle et al., 2003). El consumo de dieta basada en fermentados lácteos de cabra disminuye los niveles séricos citocinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-2, IL-12p70, IP-10 y TNF- α) y aumenta los de las citocinas antiinflamatorias (IL-4, IL-13 e IL-10) debido a las propiedades antiinflamatorias de sus lípidos y al mayor contenido en ácido linoleico, en comparación con la dieta basada en fermentados lácteos de vaca.

Además, el consumo de leche fermentada de cabra aumenta el estado antioxidante total y disminuye los biomarcadores de daño oxidativo, lo que se correlaciona directamente con la expresión y la actividad de las enzimas antioxidantes en el hígado, revelando que la leche fermentada de cabra protege a los principales bioconstituyentes de las células del daño oxidativo provocado durante la recuperación de la anemia (Moreno-Fernández et al., 2017b). En este sentido, la inducción de eotaxina está relacionada con el estrés oxidativo y la señalización inflamatoria debido a la producción de EROs (Yang et al., 2011) y la dieta basada en fermentados lácteos de cabra suprimió la expresión de eotaxina y fractalcina inducida por oxidantes debido a la reducción concurrente de la producción de EROs y citocinas proinflamatorias. Recientemente, se ha demostrado que el probiótico presente en la leche fermentada podría activar las células natural killer asociadas al intestino para secretar TNF- α , que es una citoquina proinflamatoria ampliamente documentada (Aziz & Bonavida, 2016). Además, la granzima B y la perforina son factores citotóxicos implicados en la eliminación de bacterias patógenas durante la infección (Voskoboinik et al., 2015). En el estudio de Xiaoxin et al. (2020) el tratamiento con leche fermentada de cabra aumentó los niveles séricos de TNF- α , mientras que disminuyó la granzima B y la perforina, lo que podría justificarse como una respuesta inmune local del huésped al consumo de bacterias probióticas exógenas. Por el contrario, en el presente estudio, el TNF- α disminuyó en los animales alimentados con dieta basada en fermentados lácteos de cabra, lo que podría inducir un aumento de la granzima B y la perforina, lo cual podría mejorar la respuesta inmune sistémica.

Se ha demostrado que la vitamina A desempeña importantes propiedades inmunomoduladoras y su efecto sobre el sistema inmunológico también está influenciado por la deficiencia de hierro (de Azevedo Paiva et al., 2010). En este sentido, la leche fermentada de cabra contiene más vitamina A que la leche fermentada de vaca (Moreno-Fernández et al., 2016), lo que contribuye a estimular la respuesta inmunitaria, incluso durante la deficiencia de hierro.

La dieta basada en fermentados lácteos de cabra también indujo una disminución de la proteína MCP-1 que puede atribuirse al alto valor nutricional de la grasa y disminuye la generación de radicales libres y la migración y adhesión de monocitos. Además, la capacidad de los péptidos de la leche fermentada de cabra para inhibir los cambios causados por la oxidación de los lípidos parece estar relacionada con ciertos

residuos de aminoácidos de estos péptidos, como tirosina, metionina, histidina, lisina y triptófano, que inhiben la oxidación de lípidos y reducen los hidroperóxidos (Muñoz Alférez et al., 2019).

En el presente estudio, se han registrado niveles más altos de IFN- γ en animales alimentados con dieta basada en fermentados lácteos de cabra. Estos resultados concuerdan con los documentados por Kao et al. (2020) los cuales se pueden atribuir a sus factores bioactivos, como proteínas, ácidos grasos poliinsaturados, oligosacáridos y micronutrientes presentes en la leche de cabra que confieren colonización inmunológica de la microbiota intestinal mejorando el desarrollo intestinal y disminuyendo la inflamación.

La lactoferrina influye en sistema inmunitario, regulando negativamente la activación, la migración y el crecimiento de las células inmunitarias. La lactoferrina es una proteína quelante de hierro y tiene una alta afinidad por el hierro férrico, lo que priva a los microbios del hierro libre necesario para su crecimiento y de su propensión a interactuar con superficies de las células diana del huésped (Legrand, 2016), lo que explica los bajos niveles de esta proteína durante la anemia por deficiencia de hierro. Por otro lado, el consumo de la dieta basada en fermentados lácteos de cabra aumenta la expresión de genes relacionados con el estado del hierro (citocromo b, ferroportina 1, ferritina y TfR1) y su almacenamiento, lo que explica los niveles más bajos de lactoferrina encontrados al consumir la dieta basada en fermentados lácteos de cabra. La regulación a la baja de la señalización proinflamatoria inducida por la dieta basada en fermentados lácteos de cabra (López-Aliaga et al., 2018) también puede explicar los niveles más bajos de lactoferrina. Además, la regulación a la baja de lactoferrina al consumir dieta basada en fermentados lácteos de cabra puede ser un efecto protector contra el estrés oxidativo. El consumo de una dieta basada en fermentados lácteos de cabra reduce la expresión génica de glutatión peroxidasa 1 en la mucosa duodenal, limitando el daño oxidativo a las principales biomoléculas del organismo, aumentando la capacidad antioxidante total y disminuyendo los biomarcadores de daño oxidativo, revelando que la leche protege los principales componentes biológicos de las células del daño oxidativo provocado durante la recuperación de la anemia (Moreno-Fernández et al., 2017b).

El hierro es un regulador central de la proliferación y función de las células inmunes (Latunde-Dada & Young, 1992). Todos los subconjuntos de linfocitos, que incluyen linfocitos B y T y células NK, dependen de la captación de hierro mediada por el TfR, y un bloqueo de esta vía conduce a una proliferación y diferenciación disminuida de estas células (Seligman et al., 1992), lo que explica el deterioro de la respuesta inmune observada durante la deficiencia de hierro y la mejora de esta respuesta inducida por el consumo de la dieta basada en fermentados lácteos de cabra, aumentando la homeostasis del hierro (Moreno-Fernández et al., 2016), mejorando la proliferación de las células inmunes y la función inmunológica.

El sistema del complemento es un elemento crucial en la activación de la respuesta inmune innata y adaptativa. La activación del complemento puede ocurrir a través de tres vías principales: vía clásica, vía alternativa y vía de las lectinas. La sobrecarga de hierro se asocia con funciones suprimidas del sistema del complemento (vía clásica y vía alternativa). En general, la dieta basada en fermentados lácteos de cabra aumenta la actividad de la vía clásica, vía alternativa y vía de las lectinas en animales controles y anémicos, ya sea con sobrecarga o contenido normal de hierro, mientras que la anemia disminuyó la actividad de las vías alternativa y de las lectinas, ya que la dieta basada en fermentados lácteos de cabra mejora la homeostasis del hierro (Moreno-Fernández et al., 2016), de importancia crítica en el funcionamiento normal del sistema inmunológico (Wen et al., 2020). Además, la dieta basada en fermentados lácteos de cabra aumenta la producción y la expresión de marcadores celulares relacionados con las respuestas innatas y adaptativas, lo que conduce a una mayor actividad del sistema del complemento (De Moreno de Leblanc & Perdígón, 2010).

Conclusiones

8. CONCLUSIONES

Tras el análisis de los resultados obtenidos en el presente estudio, se han alcanzado las siguientes conclusiones:

Primera conclusión

La dieta basada en fermentados lácteos de cabra durante la recuperación de la deficiencia de hierro influye positivamente en el estado nutricional y la composición corporal, disminuyendo la masa grasa y aumentando la masa magra, agua libre y agua total.

Segunda conclusión

El consumo de la dieta basada en fermentados lácteos de cabra disminuye los niveles séricos de citocinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-2, IL-12p70, IP-10 y TNF- α) y aumenta los de citocinas antiinflamatorias (IL-4, IL-13 e IL-10) gracias a las propiedades antiinflamatorias de sus lípidos y al mayor contenido en ácido linoleico, en comparación con la dieta basada en fermentados lácteos de vaca.

Tercera conclusión

La dieta basada en fermentados lácteos de cabra disminuye la expresión de las citocinas eotaxina y fractalquina debido a la reducción en la producción de especies reactivas de oxígeno y citocinas proinflamatorias como el TNF- α , que junto al incremento de los niveles séricos de IFN- γ , contribuyen a mejorar la respuesta inmune sistémica.

Cuarta conclusión

El consumo de dieta basada en fermentados lácteos de cabra indujo una disminución de la expresión de la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), que puede atribuirse al alto valor nutricional de su grasa, que proporciona un menor sustrato para la peroxidación de lípidos y generación de radicales libres y, en consecuencia, disminuye la adhesión y la migración de los monocitos. Además, la capacidad de los péptidos presentes en leche fermentada de cabra para inhibir los cambios deletéreos causados por la oxidación de los lípidos parece estar relacionada con ciertos residuos de aminoácidos, como la tirosina, la metionina, la histidina, la lisina y el triptófano, que inhiben la oxidación de los lípidos y reducen los hidroperóxidos.

Quinta conclusión

La dieta basada en fermentados lácteos de cabra aumenta la actividad de la vía clásica, la vía alternativa y la vía de las lectinas del sistema del complemento, junto con una disminución de los niveles séricos de lactoferrina, modificando la homeostasis del hierro, debido a su gran afinidad por este elemento, lo que priva a los microbios del hierro libre necesario para su crecimiento y de su propensión a interactuar con las superficies de las células microbianas y del huésped, influyendo así en la compleja maquinaria inmunitaria y regulando a la baja la activación, migración y crecimiento de las células inmunitarias.

Conclusión general

El consumo de una dieta basada en leche fermentada de cabra, en comparación con la de vaca, mejora el estado nutricional y la composición corporal, propiciando un entorno más favorable para el correcto funcionamiento del sistema inmune. Además, condiciona positivamente la función inmunológica durante la recuperación de la anemia ferropénica, ya que disminuye la producción de quimiocinas inducidas por agentes oxidantes debido a la reducción simultánea de la producción de radicales libres y citoquinas proinflamatorias, y aumenta la producción y la expresión de biomarcadores relacionados con la respuestas innata y adaptativa, de vital importancia en el funcionamiento normal del sistema inmunitario.

Conclusions

8. CONCLUSIONS

After analysing the data obtained, we have reached the following conclusions:

First conclusion

Fermented goat milk-based diet during nutritional iron deficiency recovery positively influences nutritional status and body composition, decreasing fat mass and increasing lean mass, free water and total water.

Second conclusion

Fermented goat milk-based diet consumption decreases the serum levels of proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-2, IL-12p70, IP-10 and TNF- α) and increases those of anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-13 and IL-10) thanks to the anti-inflammatory properties of their lipids and the higher content of linoleic acid, compared to cow milk-based diet.

Third conclusion

Fermented goat milk-based diet decreases the expression of eotaxin and fractalkine due to the reduction in the production of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines such as TNF- α , added to the increase in serum levels of IFN- γ , contribute to improving the systemic immune response.

Fourth conclusion

Fermented goat milk-based diet consumption decreases the expression of monocyte chemotactic protein (MCP-1), which can be attributed to the high nutritional fat value, which provides a lower substrate for lipid peroxidation and generation of free radicals and, consequently, decreases the adhesion and migration of monocytes. Furthermore, the ability of fermented goat milk peptides to inhibit deleterious changes caused by lipid oxidation can be related to certain amino acid residues, such as tyrosine, methionine, histidine, lysine, and tryptophan that inhibit lipid oxidation and reduce hydroperoxides.

Fifth conclusion

Fermented goat milk-based diet increases the classical, lectin and alternative complement pathway activity, added to a decrease in serum levels of lactoferrin, modifying iron homeostasis, due to its high affinity for this element, depriving microbes of the free iron necessary for their growth and their propensity to interact with microbial and host cell surfaces, influencing the complex immune machinery and downregulating activation, migration and growth of immune cells.

Overall conclusion

Fermented goat milk-based diet consumption, compared to cow milk-based diet, improves nutritional status and body composition, providing a more favourable environment for the correct functioning of the immune system. In addition, it positively conditions immune function during nutritional iron deficiency anemia recovery, since it decreases the production of chemokines induced by oxidizing agents due to the simultaneous reduction in the production of free radicals and proinflammatory cytokines, and increases the production and expression of biomarkers related to innate and adaptive responses, of vital importance in the normal functioning of the immune system.

Bibliografía

9. BIBLIOGRAFÍA

Abbas, A.K., Andrew, H., Lichtman, A.H., & Pillai, S. *Cellular and Molecular Immunology*. 7^a ed. Elsevier, 2011.

Alejandro Mazariegos Lanseros. Determinación de la actividad inmunomoduladora del Hongo *Grifola frondosa* por medio de un ensayo hemolítico para la valoración de la actividad del sistema de complemento. Guatemala: USAC, 2009.

Anderson, G. J., & Frazer, D. M. Current understanding of iron homeostasis. *Am J Clin Nutr*. 2017; 106(6), 1559S-1566S.

Anderson, G. J., Frazer, D. M., & McLaren, G. D. Iron absorption and metabolism. *Curr Opin Gastroenterol*. 2009; 25(2), 129-135.

AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th ed. Arlington: Association of Official Analytical Chemists; 2005.

Armitage, A. E., Eddowes, L. A., Gileadi, U., Cole, S., Spottiswoode, N., Selvakumar, T. A., et al. Hepcidin regulation by innate immune and infectious stimuli. *Blood*. 2011;118(15):4129-4139.

Auerbach, M., & Adamson, J. W. How we diagnose and treat iron deficiency anemia. *Am J Hematol*. 2016; 91(1), 31-38.

Aziz, N., & Bonavida, B. Activation of natural killer cells by probiotics. *For Immunopathol Dis Therap*. 2016;7(1-2):41-55.

Badewa, A. P., Hudson, C. E., & Heiman, A. S. Regulatory effects of eotaxin, eotaxin-2, and eotaxin-3 on eosinophil degranulation and superoxide anion generation. *Exp Biol Med*. 2002; 227(8), 645–651.

Baró, L., Lara, F., & Corral, E. Composición y calidad nutritiva de los alimentos. Lácteos y derivados lácteos. In: A. Gil Hernández, editor. Tratado de nutrición (Tomo II). 2^a ed ed. Madrid: Médica Panamericana; 2010.

Beard JL. Iron biology in immune function, muscle metabolism and neuronal functioning. *J Nutr*. 2001; 131:568–580.

Boccio, J., & Bressan Monteiro, J. Fortificación de alimentos con hierro y zinc: pros y contras desde un punto de vista alimenticio y nutricional. *Rev Nutr.* 2004; 17(1):71-78.

Bonilla F.A., & Oettgen H.C. Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(2), S33-S40.

Bourrie, B. C. T., Willing, B. P., & Cotter, P. D. The Microbiota and health promoting characteristics of the fermented beverage kefir. *Front Microbiol.* 2016;7:647.

Camaschella, C. New insights into iron deficiency and iron deficiency anemia. *Blood Rev.* 2017; 31(4), 225-233.

Camaschella, C. Iron deficiency. *Blood.* 2019;133(1),30-39.

Camaschella, C., Nai, A., & Silvestri, L. Iron metabolism and iron disorders revisited in the hepcidin era. *Haematologica.* 2020;105(2):260-272.

Campos, M. S., Barrionuevo, M., Alférez, M. J., Gómez-Ayala, A. E., Rodríguez-Matas, M. C., Lopez Aliaga, I., et al. Interactions among iron, calcium, phosphorus and magnesium in the nutritionally iron-deficient rat. *Exp Physiol.* 1998; 83(6), 771–781.

Chen, M., Ye, X., Shen, D., & Ma, C. Modulatory effects of gut microbiota on constipation: The Commercial Beverage Yakult Shapes Stool Consistency. *J Neurogastroenterol Motil.* 2019;25(3),475-477.

Colín-Ramírez, E., Castillo-Martínez, L., Orea-Tejeda, A., Asensio Lafuente, E., Torres Villanueva, F., Rebollar González, V., et al. Body composition and echocardiographic abnormalities associated to anemia and volume overload in heart failure patients. *Clin Nutr.* 2006; 25(5), 746–757.

Cronin, S., Woolf, C. J., Weiss, G., & Penninger, J. M. The role of iron regulation in immunometabolism and immune-related disease. *Front Mol Biosci.* 2019; 6, 116.

De Azevedo Paiva, A., Rondó, P. H., Rehder Vaz-de-Lima, L., de Freitas Oliveira, C., Ueda, M., Gonçalves-Carvalho, C., et al. The impact of vitamin A supplementation on the immune system of vitamin A-deficient children. *Int J Vitam Nutr Res.* 2010; 80(3), 188–196.

De Moreno de LeBlanc, A., Matar, C., & Perdigón, G. The application of probiotics in cancer. *Br J Nutr.* 2007;98 (1): S105-S110.

De Moreno de Leblanc, A., & Perdigón, G. The application of probiotic fermented milks in cancer and intestinal inflammation. *Proc Nutr Soc.* 2010;69(3), 421-428.

Diaz-Castro, J., Moreno-Fernandez, J., Pulido-Moran, M., Alferez, M., Robles-Rebollo, M., Ochoa, J. J., et al. Changes in adiposity and body composition during anemia recovery with goat or cow fermented milks. *J Agric Food Chem.* 2017;65(20),4057-4065.

Drakesmith, H., & Prentice, A. Viral infection and iron metabolism. *Nat Rev Microbiol.* 2008; 6(7), 541-552.

Drakesmith, H., & Prentice, A. M. Hepcidin and the iron-infection axis. *Science.* 2012; 338(6108), 768-772.

Ebringer, L., Ferencik, M., & Krajcovic, J. Beneficial health effects of milk and fermented dairy products-review. *Folia Microbiol.* 2008;53(5),378-394.

FAO/WHO. CODEX Standard for fermented milks. 2nd ed. Rome: World Health Organization; 2010.

Fernández Fernández, E., Martínez Hernández, J. A., Martínez Suárez, V., Moreno Villares, J. M., Collado Yurrita, L. R., Hernández Cabria, M., et al. Documento de Consenso: importancia nutricional y metabólica de la leche. *Nutr Hosp.* 2015; 31, 92-101.

Fuqua, B.K., Vulpe, C.D., & Anderson, G.J. Intestinal iron absorption. *J Trace Elem Med Biol.* 2012;26(2-3):115-119.

Gallastegui, C., Bernardez, B., Regueira, A., Dávila, C., & Leboeiro, B. *Inmunología. Farmacia Hospitalaria Tomo II.* Madrid: Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria, 2002. pp. 1077-1106.

Ganz, T., & Nemeth, E. Iron metabolism: interactions with normal and disordered erythropoiesis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(5):a011668.

García-Burgos M., Moreno-Fernandez, J., M., Alferez, M. J. M., Díaz-Castro, J., & López-Aliaga, I. New perspectives in fermented dairy products and their health relevance. *J Funct Food*. 2020;72:104059.

Getaneh, G., Mebrat, A., Wubie, A., & Kendie, H. Review on goat milk composition and its nutritive value. *J Nutr Health Sci*. 2016; 3(4), 401.

Goldsby, R., Kindt, T.J., Osborne, B.A. & Kuby, J. Cells and Organs of the Immune System. In: Immunology, 5^a ed, W. H. Freeman and Company, New York, 2003.

Gómez-Álvarez Salinas, P. El hierro en la alimentación. *Farmacia Profesional*. 2004; 18(2), 54-56.

Granier, A., Goulet, O., & Hoarau, C. Fermentation products: immunological effects on human and animal models. *Pediatr Res*. 2013;74(2), 238-244.

Guarner, F., Khan, A. G., Garisch, J., Eliakim, R., Gangl, A., Thomson, A., et al. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines: probiotics and prebiotics October 2011. *J Clin Gastroenterol*. 2012; 46(6), 468-481.

Gulec, S., Anderson, G. J., & Collins, J. F. Mechanistic and regulatory aspects of intestinal iron absorption. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2014;307(4):G397-409.

Haschka, D., Hoffmann, A., & Weiss, G. Iron in immune cell function and host defense. *Semin Cell Dev Biol*. 2021; 115, 27–36.

Hassan, T. H., Badr, M. A., Karam, N. A., Zkaria, M., El Saadany, H. F., Abdel Rahman, D. M., et al. Impact of iron deficiency anemia on the function of the immune system in children. *Medicine (Baltimore)*. 2016; 95(47), e5395.

Hill, D., Sugrue, I., Arendt, E., Hill, C., Stanton, C., & Ross, R. P. Recent advances in microbial fermentation for dairy and health. *F1000Res*. 2017;6:751.

Ikeuchi, M., Koyama, T., Takahashi, J., & Yazawa, K. Effects of astaxanthin in obese mice fed a high-fat diet. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2007; 71(4), 893-899.

Kao, H. F., Wang, Y. C., Tseng, H. Y., Wu, L. S., Tsai, H. J., Hsieh, M. H., et al. Goat milk consumption enhances innate and adaptive immunities and alleviates allergen-induced airway inflammation in offspring mice. *Front Immunol.* 2020;11,184.

Latunde-Dada, G. O., & Young, S. P. Iron deficiency and immune responses. *Scand J Immunol Suppl.* 1992;11:207-209.

Legrand, D. Overview of lactoferrin as a natural immune modulator. *J Pediatr.* 2016;173: S10-S15.

Li, Y., Huang, X., Wang, J., Huang, R., & Wan, D. Regulation of iron homeostasis and related diseases. *Mediators Inflamm.* 2020; 6062094.

Levri, K. M., Ketvertis, K., Deramo, M., Merenstein, J. H., & D'Amico, F. Do probiotics reduce adult lactose intolerance? A systematic review. *J Fam Pract.* 2005; 54(7), 613-620.

López-Aliaga, I., García-Pedro, J. D., Moreno-Fernandez, J., Alférez, M. J. M., López-Frías, M., & Díaz-Castro, J. Fermented goat milk consumption improves iron status and evokes inflammatory signalling during anemia recovery. *Food Funct.* 2018; 9(6), 3195-3201.

Marshall J.S., Warrington R., Watson W., & Kim H.L. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2018; 14(2), 49.

Matar, C., Valdez, J. C., Medina, M., Rachid, M., & Perdigon, G. Immunomodulating effects of milks fermented by *Lactobacillus helveticus* and its non-proteolytic variant. *J Dairy Res.* 2001;68(4):601-609.

McDowell, L. Minerals in Animal and Human Nutrition 2nd Edition. Amsterdam: Elsevier Science; 2003.

McFarland, L.V. From yaks to yogurt: the history, development, and current use of probiotics. *Clin Infect Dis.* 2015;60 (2) S85-S90.

Mercadante, C. J., Prajapati, M., Parmar, J. H., Conboy, H. L., Dash, M. E., Pettiglio, M. A., et al. Gastrointestinal iron excretion and reversal of iron excess in a mouse model of inherited iron excess. *Haematologica.* 2019; 104(4), 678–689.

Miller, J. L. Iron deficiency anemia: a common and curable disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013; 3(7): a011866.

Moreno Aznar, L. A., Cervera Ral, P., Ortega Anta, R. M., Díaz Martín, J. J., Baladia, 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):2039-2089.

Moreno-Fernandez, J., Diaz-Castro, J., Alférez, M. J., 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 Agric.* 2017b;97(5):1433-1442.

Moreno-Fernández, J., Díaz-Castro, J., Alférez, M. J., Hijano, S., Nestares, T., & López-Aliaga, I. Production and chemical composition of two dehydrated fermented dairy products based on cow or goat milk. *J Dairy Res.* 2016; 83(1), 81-88.

Moreno-Fernandez, J., Diaz-Castro, J., Pulido-Moran, M., Alferez, M. J., 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.* 2016;64(12):2560-2568.

Moreno-Fernandez, J., Díaz-Castro, J., Alférez, M., & López-Aliaga, I. Iron deficiency and neuroendocrine regulators of basal metabolism, body composition and energy expenditure in rats. *Nutrients.* 2019;11(3):631.

Moreno-Fernandez, J., Diaz-Castro, J., Pulido-Moran, M., Alferez, M. J. M., Nestares, T., & Lopez-Aliaga, I. Fermented goat milk consumption during anaemia recovery: ergogenic effect and improvement of skeletal muscle homeostasis. *Eur J Nutr.* 2017a; 56(7), 2277-2287.

Moreno-Fernández, J., López-Aliaga, I., García-Burgos, M., Alférez, M. J. M., & Díaz-Castro, J. Fermented goat milk consumption enhances brain molecular functions during iron deficiency anemia recovery. *Nutrients.* 2019; 11(10), 2394.

Moreno-Fernandez, J., Diaz-Castro, J., Alférez, M. J., Nestares, T., Ochoa, J. J., Sánchez-Alcover, A., et al. Fermented goat milk consumption improves melatonin

levels and influences positively the antioxidant status during nutritional ferropenic anemia recovery. *Food Funct.* 2016;7(2):834-842.

Moreno-Montoro, M., Jauregi, P., Navarro-Alarcón, M., Olalla-Herrera, M., Giménez-Martínez, R., Amigo, L., et al. Bioaccessible peptides released by in vitro gastrointestinal digestion of fermented goat milks. *Anal Bioanal Chem.* 2018;410(15):3597-3606.

Muckenthaler, M.U., Rivella, S., Hentze, M.W., & Galy, B. A red carpet for iron metabolism. *Cell.* 2017;168(3):344-361.

Muñoz Alférez, M. J., Muñoz-García, A., Moreno-Fernández, J., López-Aliaga, I., & Díaz-Castro, J. Fermented goat milk consumption improves cardiovascular health during anemia recovery. *J Sci Food Agric.* 2019; 99(1), 473-481.

Muñoz Alférez, M. J., Robles-Rebollo M., Moreno-Fernández, J., Díaz-Castro, J., & López-Aliaga, I. Efecto de la leche fermentada de cabra sobre la composición corporal, el metabolismo basal y el control de la ingesta en ratas. *Nutr Hosp.* 2020;37(1),123-128.

Muñoz, P., & Humeres, A. Iron deficiency on neuronal function. *Biometals.* 2012;25(4):825-835.

Murphy, K.P. *Janeway's Immunobiology*, 8ª ed. New York: Garland Science, 2011.

Nairz, M., & Weiss, G. Iron in infection and immunity. *Mol Aspects Med.* 2020; 75:100864.

Nayik, G. A., Jagdale, Y. D., Gaikwad, S. A., Devkate, A. N., Dar, A. H., Dezmirean, et al. Recent insights into processing approaches and potential health benefits of goat milk and its products: a review. *Front Nutr.* 2021; 8:789117.

Nespolo, M. Iron metabolism. From molecular mechanisms to clinical consequences. 4ª ed. Francia: Structural Biology; 2017.

Ochoa Ramírez, L.A. Evaluación del efecto de antibióticos quinolónicos de nueva generación e inmunopotente CRP sobre el sistema inmune (Tesis). Nuevo León (México); 2011.

- Oppenheimer, S. J. Iron and its relation to immunity and infectious disease. *J Nutr.* 2001; *131*(2s-2), 616S-633S.
- Ortega R.M, Mena M.C., & López-Sobaler A.M. Leche, lácteos y salud. Madrid: Médica Panamericana. In: J Aranceta Bartrina J, L.Serra Majem (Eds). Leche y lácteos: valor nutricional Madrid: Panamericana; 2004. pp. 21-30.
- Ostan, N.K.H., Moraes, T.F., & Schryvers A.B. Lactoferrin receptors in Gram-negative bacteria: an evolutionary perspective. *Biochem Cell Biol.* 2021;1-7.
- Owen, J., Punt, J., & Stranford, S., *Kuby Immunology*, 7th ed. New York: Freeman & Company, W.H.W., 2013.
- Oexle, H., Kaser, A., Möst, J., Bellmann-Weiler, R., Werner, E. R., Werner-Felmayer, G., et al. Pathways for the regulation of interferon-gamma-inducible genes by iron in human monocytic cells. *J Leukoc Biol.* 2003;74(2):287-294.
- Pallarés, I., Lisbona, F., Aliaga, I. L., Barrionuevo, M., Alférez, M. J., & Campos, M. S. Effect of iron deficiency on the digestive utilization of iron, phosphorus, calcium and magnesium in rats. *Br J Nutr.* 1993; *70*(2), 609-620.
- Panesar, P. S. Fermented dairy products: Starter cultures and potential nutritional benefits. *Food Sci Nutr.* 2011; *2*, 47-51.
- Pantopoulos, K., Porwal, S. K., Tartakoff, A., & Devireddy, L. Mechanisms of mammalian iron homeostasis. *Biochemistry.* 2012; *51*(29), 5705-5724.
- Parham, P. *The Immune System*, 3^a ed. New York: Garland Science, 2009.
- Pasricha SR, McQuilten Z, Westerman M, Keller A, Nemeth E, Ganz T, et al. Serum hepcidin as a diagnostic test of iron deficiency in premenopausal female blood donors. *Haematologica.* 2011; *96* (8): 1099–1105.
- Pérez Surribas, D., Gella Concustella, A., Cruz Iglesias, E., Hermoso Durán, S., Urrechaga Igartua, E., Alcaide Martín, M.J., et al. Estudio de la ferropenia en el laboratorio clínico. *Rev Lab Clin.* 2019;12(4), 34-53.

Raja, K. B., Simpson, R. J., & Peters, T. J. Intestinal iron absorption studies in mouse models of iron-overload. *Br J Haematol*. 1994; 86(1), 156-162.

Raynal-Ljutovac, K., Lagriffoul, G., Paccard, P., Guillet, I., & Chilliard, Y. Composition of goat and sheep milk products: an update. *Small Rumin. Res*. 2008; 79(1), 57-72.

Recalcati, S., Gammella, E., Buratti, P., & Cairo, G. Molecular regulation of cellular iron balance. *IUBMB Life*. 2017; 69(6), 389-398.

Reeves, P. G., Nielsen, F. H., & Fahey, G. C., Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition *ad hoc* writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*. 1993;123(11), 1939-1951.

Richardson, C. W. Let's learn about dairy goats and goat's milk. In O. C. E. Service (Ed.), vol. 424, 2004.

Rizzoli, R., & Biver, E. Effects of fermented milk products on bone. *Calcif Tissue Int*. 2018;102(4):489-500.

Romagnani, S. The Th1/Th2 paradigm. *Immunol Today*. 1997;18(6):263-266.

Rubin, M., Modai, S., Rayman, S., Meyorat Kaplan, K., Mendelson, E., & Lichtenberg, D. Antiviral properties of goat milk. *Clin Nutr*. 2021;37,1-11.

Salaris, C., Scarpa, M., Elli, M., Bertolini, A., Guglielmetti, S., Pregliasco, F., et al. Protective effects of lactoferrin against SARS-CoV-2 infection in vitro. *Nutrients*. 2021;13(2):328.

Salva, S., Nuñez, M., Villena, J., Ramón, A., Font, G., & Alvarez, S. Development of a fermented goats' milk containing *Lactobacillus rhamnosus*: in vivo study of health benefits. *J Sci Food Agric*. 2011; 91(13), 2355-2362.

Sanderson, P. A new method of analysis of feeding stuffs for the determination of crude oils and fat. In: W. Haresing & D. J. A. Cole, editors. Recent advances in animal nutrition. London, UK: Butterworths; 1986. pp. 77–86.

Schneider, J. M., Fujii, M. L., Lamp, C. L., Lönnerdal, B., Dewey, K. G., & Zidenberg-Cherr, S. The use of multiple logistic regression to identify risk factors associated with

anemia and iron deficiency in a convenience sample of 12–36-mo-old children from low-income families. *Am. J. Clin. Nutr.* 2008; 87: 614–620.

Seligman, P. A., Kovar, J., & Gelfand, E. W. Lymphocyte proliferation is controlled by both iron availability and regulation of iron uptake pathways. *Pathobiology.* 1992;60(1):19-26.

Shiby, V. K., & Mishra, H. N. Fermented milks and milk products as functional foods-a review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2013; 53(5), 482-496.

Silva, B., & Faustino, P. An overview of molecular basis of iron metabolism regulation and the associated pathologies. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1852(7):1347-1359.

Sukhbaatar, N., & Weichhart, T. Iron Regulation: macrophages in control. *Pharmaceuticals (Basel).* 2018;11(4), 137.

Theurl, I., Mattle, V., Seifert, M., Mariani, M., Marth, C., & Weiss, G. Dysregulated monocyte iron homeostasis and erythropoietin formation in patients with anemia of chronic disease. *Blood.* 2006; 107(10), 4142–4148.

Tojo Sierra, T., Leis-Trabazo, R & Barros-Velázquez, J. Probióticos en nutrición infantil. Productos Lácteos Fermentados. *An Pediatr.* 2006; 4(1), 54–66.

Tolman, K.G., & Re, J.R. Liver function. In *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*; Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Eds.; W.B. Saunders: Philadelphia, PA, USA, 1999; pp.1125–1177.

Tortora, G. J., & Derrickson, B. Principios de anatomía y fisiología. 15ª ed. México: Médica Panamericana; 2018.

Uz, B., Dolasik, I., Atli, H., & Duzenci, D. The effect of iron deficiency anemia treatment on neutrophil to lymphocyte ratio and platelet to lymphocyte ratio. *Global J Hematol Blood Trans.* 2016; 3:1–5.

Van de Veerdonk F.L., Gresnigt M.S., Kullberg B.J., van der Meer J.W.M., Joosten L.A.B., & Netea M.G. Th17 responses and host defence against microorganisms: an overview. *BMB Reports.* 2010; 42: 776-787

Verruck, S., Dantas, A., & Prudencio, E. S. Functionality of the components from goat's milk, recent advances for functional dairy products development and its implications on human health. *J Funct Foods*. 2019; 52, 243-257.

Vogt, A. S., Arsiwala, T., Mohsen, M., Vogel, M., Manolova, V., & Bachmann, M. F. On iron metabolism and its regulation. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(9):4591.

Voskoboinik, I., Whisstock, J. C., & Trapani, J. A. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(6):388-400.

Waldvogel-Abramowski, S., Waeber, G., Gassner, C., Buser, A., Frey, B.M., Favrat, B., et al. Physiology of iron metabolism. *Transfus Med Hemother*. 2014;41(3):213-221.

Ward, R. J., Wilmet, S., Legssyer, R., Leroy, D., Toussaint, L., Crichton, R. R., et al. Effects of marginal iron overload on iron homeostasis and immune function in alveolar macrophages isolated from pregnant and normal rats. *Biometals*. 2009;22(2):211-223.

Ward, R. J., Crichton, R. R., Taylor, D. L., Della Corte, L., Srai, S. K., & Dexter, D. T. Iron and the immune system. *J Neural Transm (Vienna)*. 2011;118(3):315-328.

Wen, S., Sha, Y., Li, Y., Rui, Z., Si, C., Zhou, Y., et al. Serum iron and ferritin levels are correlated with complement C3. *Biol Trace Elem Res*. 2021;199(7):2482-2488.

Xiaoxin, C., Zheng, R., Liu, R., & Li, L. Goat milk fermented by lactic acid bacteria modulates small intestinal microbiota and immune responses. *J Funct Foods*. 2020;65:103744.

Yang, J., Li, Q., Zhou, X. D., Kolosov, V. P., & Perelman, J. M. Naringenin attenuates mucous hypersecretion by modulating reactive oxygen species production and inhibiting NF- κ B activity via EGFR-PI3K-Akt/ERK MAPKinase signaling in human airway epithelial cells. *Mol Cell Biochem*. 2011;351(1-2):29-40.

Yatim K.M., & Lakkis F.G. A brief journey through the immune system. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015;10(7):1274-1281.

Zhang, J., Zhao, X., Jiang, Y., Zhao, W., Guo, T., Cao, Y., et al. Antioxidant status and gut microbiota change in an aging mouse model as influenced by exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW11 isolated from Tibetan kefir. *J Dairy Sci*. 2017;100(8):6025-6041.

Zimmermann, M. B., & Hurrell, R. F. Nutritional iron deficiency. *Lancet*. 2007; 370(9586), 511-520.