

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




**“ESTUDIO DE ALGUNOS MECANISMOS DE DEFENSA  
ANTIOXIDANTE Y PROCESOS DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA  
EN SITUACIÓN DE ANEMIA FERROPÉNICA Y EN LA  
RECUPERACIÓN CON DIETAS BASADAS EN LECHE DE VACA  
O CABRA CON O SIN SOBRECARGA DE HIERRO”**

**TESIS DOCTORAL**

**LUIS JAVIER PÉREZ SÁNCHEZ**

**2010**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Luis Javier Pérez Sánchez  
D.L.: GR 2014-2011  
ISBN: 978-84-694-1310-4

The seal of the University of Granada is a circular emblem. It features a central shield with a crown on top, flanked by two eagles with spread wings. The shield is supported by two columns. The entire emblem is surrounded by a circular border containing the Latin text "UNIVERSITATIS GRANATAE CAROLVS RO IMP SEMPER AVG HISPAN REX FVNDATOR".

*Esta memoria de Tesis Doctoral forma parte del Proyecto de Investigación AGL2006-02301/ALI, subvencionado por la Dirección General de Investigación Científica y Técnica (DGICYT) del Ministerio de Educación y Ciencia.*



D. Javier Díaz Castro. Profesor Sustituto Interino de la Universidad de  
Granada.

D<sup>a</sup> Margarita Sánchez Campos. Catedrática de Fisiología de la Universidad  
de Granada.

**CERTIFICAN:**

Que los trabajos de investigación que se exponen en la Memoria de Tesis Doctoral: **“Estudio de algunos mecanismos de defensa antioxidante y procesos de peroxidación lipídica en situación de anemia ferropénica y en la recuperación con dietas basadas en leche de vaca o cabra con o sin sobrecarga de hierro”**, han sido realizados bajo nuestra dirección por el Licenciado Luis Javier Pérez Sánchez y la encontramos conforme para ser presentada y aspirar al Grado de Doctor por la Universidad de Granada con el Tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, extendemos el presente en Granada, a tres de Diciembre de dos mil diez.





**MEMORIA QUE PRESENTA EL LDO. LUIS JAVIER PÉREZ SÁNCHEZ  
PARA ASPIRAR AL GRADO DE DOCTOR POR LA UNIVERSIDAD DE  
GRANADA**

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

Prof. Dr.D. Javier Díaz Castro

Prof. Dra.D<sup>a</sup> Margarita Sánchez Campos

Ldo. D. Luis Javier Pérez Sánchez

Granada, 2010







# AGRADECIMIENTOS



Quiero mostrar mi agradecimiento sincero a todos aquellos que, con su apoyo y colaboración, han hecho posible la realización de este proyecto:

- A mi directora, la Profesora D<sup>a</sup> Margarita Sánchez Campos, auténtico motor de este proyecto, por la confianza depositada en mí, su cercanía en todo momento, su paciencia, sus acertados consejos, su continua y valiosa ayuda, y por haberme empujado a volver al mundo de la investigación.
- A mi director, el Profesor D. Javier Díaz Castro, por su implicación, su empuje, su ilusión, su incansable apoyo y estímulo para que este proyecto pueda ser hoy una realidad y por su paciencia en su parte final.
- A las profesoras D<sup>a</sup> Inmaculada López Aliaga, D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> José Muñoz Alférez y D<sup>a</sup> Teresa Nestares, por compartir conmigo este proyecto haciéndome sentir parte del equipo de trabajo.
- Al Profesor D. Emilio Martínez de Victoria, director del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, por poner a mi disposición las instalaciones donde he realizado la parte experimental de esta Tesis.
- A la Directora del Departamento de Fisiología, la Profesora D<sup>a</sup> María López-Jurado Romero de La Cruz, por poner a mi disposición los recursos humanos para el desarrollo de esta Tesis.

- A mis compañeras, M<sup>a</sup> Ángeles Amat y Mercedes Ramírez López Frías, por su inestimable, impagable y desinteresada colaboración en las determinaciones analíticas de este trabajo de investigación.
  
- A Elisa Alcover, por su eficiencia solucionando los temas administrativos, por su sonrisa constante y por su ánimo.
  
- A mi mujer, Arancha, y a nuestros 5 hijos, Iñigo, Rocío, Loreto, Patricia y Miguel, por apoyarme en todo momento a pesar del tiempo que os he tenido que quitar.
  
- A mi madre y mis hermanos y a toda la familia, por ser como sois y por todo lo que he aprendido de vosotros desde que nací.
  
- A Seve, por su ánimo para embarcarme en este proyecto de investigación; a mi compadre Vicente, por su exigencia constante y a todos los que formáis parte de mi vida.

**A mi padre**, que supo transmitirme el cariño al mundo de la Farmacia, heredado de varias generaciones de boticarios y que siempre quiso que enfocara mi futuro por el camino de la Ciencia y la Investigación, por enseñarme que lo más importante en la vida es ser una buena persona y tomarse la vida con buen humor.



“De noche,  
iremos de noche,  
sin luna, iremos sin luna,  
que para encontrar la Fuente  
sólo la sed, nos alumbra”.

**Luis Rosales.**







# ÍNDICE



1. OBJETO.....	1
2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	
2.1. El hierro en la nutrición .....	3
2.1.1. Introducción.....	3
2.1.2. Deficiencia de hierro. Anemia ferropénica nutricional .....	4
2.1.3. Manifestaciones clínicas de la anemia ferropénica nutricional .....	6
2.1.4. Tratamiento de la ferropénica. Sobrecarga oral de hierro .....	11
2.1.5. Patologías relacionadas con la sobrecarga de hierro .....	15
2.1.5.1. Causas de la sobrecarga de hierro.....	15
2.1.5.2. Hemocromatosis hereditaria .....	16
2.1.5.3. Mecanismos de toxicidad del hierro.....	22
2.1.5.4. Consecuencias de la sobrecarga de hierro.....	23
2.1.6. Funciones del hierro .....	27
2.2. Fuentes alimentarias de hierro y biodisponibilidad.....	30
2.2.1. Utilización nutritiva de hierro .....	38
2.2.2. Requerimientos.....	41
2.2.3. Absorción intestinal y transporte de hierro .....	45
2.2.4. Distribución de hierro en los tejidos y captación celular.....	49
2.2.5. Depósitos y metabolismo del hierro .....	51
2.2.6. Eliminación.....	54
2.2.7. Mecanismos homeostáticos del hierro .....	55
2.3. Radicales libres y mecanismos de defensa antioxidante.....	61
2.3.1. Introducción.....	61
2.3.2. Tipos de radicales libres y especies reactivas del oxígeno.....	62
2.3.2.1. Anión superóxido.....	63
2.3.2.2. Peróxido de hidrógeno.....	64
2.3.2.3. Radical hidroxilo.....	65

2.3.3. Daños celulares provocados por radicales libres .....	68
2.3.3.1. Efectos sobre los lípidos. Peroxidación lipídica (PL) .....	68
2.3.3.2. Efectos sobre las proteínas .....	73
2.3.3.3. Efectos sobre el material genético .....	75
2.3.4. Fuentes de radicales libres relacionados con diversas patologías .....	76
2.4. Sistema de defensa antioxidante.....	78
2.4.1. Introducción.....	78
2.4.2. Mecanismos celulares de defensa antioxidante .....	80
2.4.2.1. Superóxido dismutasa (SOD).....	80
2.4.2.2. Catalasa (CAT) .....	81
2.4.2.3. Glutacion peroxidasa (GPx) .....	82
2.5. Características nutricionales de la leche de cabra.....	84
2.5.1. Características organolépticas.....	86
2.5.2. Composición de la leche de cabra .....	88
2.5.2.1. Proteínas y aminoácidos .....	90
2.5.2.2. Hidratos de carbono.....	94
2.5.2.3. Lipídeos.....	96
2.5.2.4. Minerales .....	98
2.5.2.5. Vitaminas .....	101
2.5.2.6. Factores bioactivos .....	103

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Diseño experimental .....	107
3.2. Dietas ensayadas .....	111
3.3. Técnicas analíticas .....	114
3.3.1. Materia seca.....	114
3.3.2. Materia grasa .....	114
3.3.3. Contenido proteico .....	114
3.3.4. Mineralización por vía húmeda .....	114
3.3.4.1. Determinación de hierro .....	115

3.3.5. Recuento de hematíes, hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio y plaquetas .....	116
3.3.6. Ferritina sérica .....	116
3.3.7. Hierro sérico, TIBC (Capacidad total de unión al hierro) y porcentaje de saturación de la transferrina .....	117
3.3.8. Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) .....	117
3.3.9. Obtención de muestras de citosol eritrocitario, hepático, cerebral y determinación del contenido proteico.....	118
3.3.10. Glutation Peroxidasa (GPx).....	120
3.3.11. Catalasa (CAT).....	121
3.3.12. Superóxido Dismutasa (SOD) .....	121
3.3.13. Tratamiento estadístico .....	122

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Parámetros hematológicos en situación de anemia ferropénica nutricional (PPE) .....	123
4.2. Peso corporal, hepático, relación hepatosomática y contenido de hierro en hígado en situación de anemia ferropénica nutricional (PPE) .....	125
4.3. Mecanismos de defensa antioxidante y peroxidación lipídica en situación de anemia ferropénica nutricional (PPE) .....	129
4.4. Contenido hepático de hierro en la recuperación de la anemia ferropénica nutricional con dietas basadas en leche con contenido normal o sobrecarga de hierro (PE) .....	133
4.5. Mecanismos de defensa antioxidante y peroxidación lipídica en la recuperación de la anemia ferropénica nutricional con dietas basadas en leche, con contenido normal o sobrecarga de hierro (PE).....	136

#### 5. RESUMEN Y CONCLUSIONES .....

#### 6. BIBLIOGRAFÍA.....

#### 7. APÉNDICE DE FIGURAS .....



## **ABREVIATURAS USADAS**

- ADN**: Ácido desoxirribonucleico.
- AFN**: Anemia ferropénica nutricional.
- AG**: Ácido graso.
- ATP**: Adenosín trifosfato.
- CAT**: Catalasa.
- CLA**: Ácido linoleico conjugado
- DCT1**: Transportador de cationes divalentes 1.
- DMT1**: Transportador de metales divalentes 1.
- Dcytb**: Citocromo duodenal b.
- EAA**: espectrofotometría de absorción atómica.
- EDTA**: Ácido etilendiaminotetraacético.
- EROS**: Especies reactivas del oxígeno.
- GOT**: Transaminasa glutámico-oxalacético.
- GPT**: Transaminasa glutámico-pirúvico.
- GPx**: Glutation peroxidasa.
- HAMP**: Gen de la hepcidina.
- Hb**: Hemoglobina.
- HDL**: Lipoproteína de alta densidad.
- HFE**: Gen responsable de la hemocromatosis.
- HIF**: Factor de hipoxia inducible.
- HJV**: Gen de la hemojuvelina.
- HPC1**: Proteína transportadora de hemo 1.
- IAN**: Instituto Americano de Nutrición.
- Ig**: Inmunoglobulina.
- IRE**: Elemento regulador de hierro.
- IREG1/FPN/MTP1**: Ferroportina.
- IRP**: Proteína reguladora de hierro citosólica.
- LDL**: Lipoproteína de baja densidad.
- LPL**: Lipoproteín-lipasa.
- MCT**: Triglicérido de cadena media.
- MDA**: Malondialdehido.
- MHC**: Complejo mayor de histocompatibilidad.
- MTP1**: Proteína transportadora de metales 1 (ferroportina 1).
- NADH**: Nicotín adenín dinucleótido reducido.
- NRAMP**: Proteína de resistencia asociada a macrófagos.
- PE**: Periodo experimental.
- PPE**: Periodo pre-experimental.
- PL**: Peroxidación lipídica.
- PTH**: Parathormona.
- PUFA**: Ácido graso poliinsaturado.
- RDA**: Ingesta diaria recomendada.
- RNA**: Ácido ribonucleico.
- TBA**: Ácido tiobarbitúrico
- TBARS**: Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico.
- TfR1,2**: Receptor de transferrina 1,2.
- TIBC**: Capacidad total de fijación al Fe.
- VCM**: Volumen corpuscular medio.
- WHO/OMS**: Organización mundial de la salud.







# OBJETO



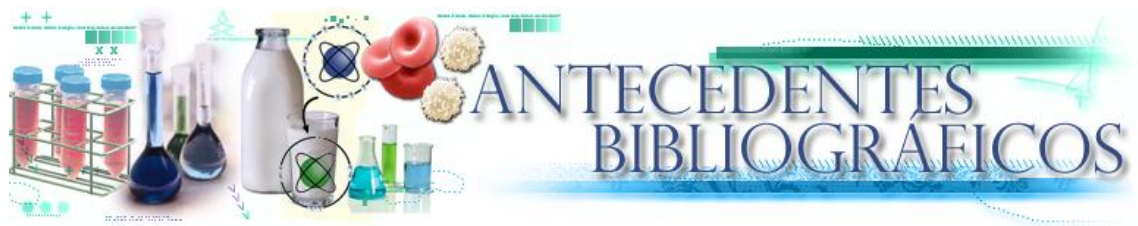
El hierro es un metal esencial para la vida, pero en cantidades elevadas resulta tóxico para la célula. Cuando la ingesta de hierro es insuficiente para satisfacer las demandas del organismo se produce anemia ferropénica, que constituye un importante problema de Salud Pública y en el otro extremo, cuando la ingesta es muy elevada, como puede ocurrir en el transcurso de la repleción crónica con Fe, el tratamiento más frecuente para paliar esta prevalente deficiencia nutricional, se produce sobrecarga. El hierro tiene la capacidad de ceder o donar electrones fácilmente y puede catalizar reacciones que dan lugar a la producción de especies reactivas altamente perjudiciales. En este sentido, el daño proteico, al material genético y la peroxidación lipídica son consecuencias directas de la sobrecarga de hierro en el organismo.

La principal defensa contra los radicales libres es llevada a cabo por un sistema enzimático que está constituido fundamentalmente por tres enzimas: la superóxido dismutasa, la catalasa, y la glutatión peroxidasa. Estas enzimas poseen minerales que actúan como cofactores y por tanto son fundamentales para su actividad catalítica. En ausencia de estrés oxidativo, las especies reactivas del oxígeno que se generan se mantienen a niveles muy bajos gracias a la acción coordinada de estas tres enzimas que neutralizan y eliminan estos perjudiciales radicales.

El Grupo de Investigación “Alimentación, Nutrición y Absorción” (AGR- 206) dirigido por la Profesora Sánchez Campos, con quienes he realizado la presente Memoria de Tesis, ha demostrado ampliamente en estudios experimentales en modelos animales, el efecto beneficioso de la leche de cabra respecto a la de vaca sobre la utilización nutritiva de proteína, grasa y minerales, en situación normal y en patologías

tales como síndrome de malabsorción y anemia ferropénica y más recientemente en estrés oxidativo y sobrecarga de Fe.

Estos antecedentes nos han llevado a aprovechar la experiencia del Grupo en situación de anemia ferropénica y dar un paso más, estudiando la hematología, mecanismos de defensa enzimática antioxidante y procesos de peroxidación lipídica, durante el establecimiento y recuperación de dicha patología, tras el consumo de dietas basadas en leche de vaca o cabra, con un contenido normal o con sobrecarga crónica de Fe.



# ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS



## **2.1. EL HIERRO EN LA NUTRICIÓN**

### **2.1.1. INTRODUCCIÓN**

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

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

La anemia ferropénica se produce cuando las pérdidas de Fe o los requerimientos del mismo superan el aporte que proporciona la dieta, con lo cual se

agotan las reservas del organismo, disminuye la síntesis de enzimas ferropendientes, desciende la eritropoyesis y por último, disminuye la concentración de hemoglobina (Haas y Brownlie, 2001).

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

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

La anemia ferropénica es una enfermedad con una alta prevalencia, especialmente en niños y mujeres en edad de gestación. Los grupos que tienen un mayor riesgo de sufrir anemia ferropénica son: niños menores de 2 años, chicas adolescentes, embarazadas y la tercera edad. Las embarazadas adolescentes tienen un elevadísimo riesgo de sufrir ferrodeficiencia, debido a sus pobres hábitos alimentarios y su continuo crecimiento. Mujeres en edad fértil que sufren ferrodeficiencia pueden beneficiarse de dietas ricas en Fe o suplementos orales (Patterson, 2001). Se ha observado que en países poco desarrollados, la prevalencia de la anemia ferropénica en mujeres supera normalmente el 20%, mientras que en hombres (5-6%), es similar a la observada en mujeres de países desarrollados (McPhail y Bothwell, 1992).



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

Las consecuencias negativas de la anemia ferropénica en el desarrollo cognoscitivo y físico de los niños y la productividad laboral de los adultos son motivo de gran preocupación (Stoltzfus, 2001). Así, la alta prevalencia de anemia en los pacientes quirúrgicos puede aumentar el riesgo de morbilidad y mortalidad postoperatoria (WHO, 2003).

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

La anemia por deficiencia de Fe se caracteriza por la reducción o ausencia de depósitos de Fe, baja concentración de Fe sérico, baja saturación de transferrina, una concentración de hemoglobina baja y una reducción del hematocrito. Inicialmente, los depósitos corporales de Fe, la ferritina y la hemosiderina decrecen, mientras que el hematocrito y la hemoglobina permanecen normales. Después de esto, disminuye el nivel de Fe sérico y de forma paralela aumenta la capacidad de fijación de Fe, reduciéndose el porcentaje de saturación de la transferrina. Consecuentemente, hay una rápida reducción de las células rojas en la circulación. Este estado se conoce como “deficiencia de Fe sin anemia”. La anemia por deficiencia de Fe es un estado más

avanzado de hiposiderosis, caracterizado por baja concentración de hemoglobina y descenso de hematocrito, con cambios en la citología y morfología del eritrocito, los cuales dan lugar a hematíes microcíticos e hipocrómicos, además de una disfunción del transporte de oxígeno (Hercberg y Galan, 1992).

Una insuficiente ingesta de Fe biodisponible con la dieta es una causa importante de la deficiencia de Fe y en todo el mundo se están realizando intervenciones orientadas a proporcionar suplementos de Fe a sectores especialmente vulnerables de la población, en particular a las mujeres embarazadas. Los enfoques basados en la alimentación para aumentar el aporte de Fe mediante la fortificación de alimentos y diversificación nutricional son estrategias sostenibles para prevenir la carencia de este mineral y la anemia ferropénica en la población en general (WHO, 2003).

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

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

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

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

El bazo se encuentra discretamente aumentado en sujetos con anemia severa y de larga duración. La esplenomegalia es debida al incremento en el proceso de destrucción de los glóbulos rojos, por disminución de la supervivencia eritrocitaria y aumento de la captación de Cr por el bazo (Lee, 1993).

En cuanto a los síntomas y signos por falta de Fe tisular se puede presentar; la “pica” o sea el deseo irrefrenable de ingerir sustancias comestibles de escaso o nulo valor nutricional, tales como almidón, hielo, tierra o arcilla, la cual mejora rápidamente con el inicio de la feroterapia; la glosodinia (dolor en la lengua, causado por una inflamación aguda o crónica) y queilitis (lesiones labiales inflamatorias que cursan con dolor) en los ángulos de la boca. Además se encontrarán los llamados “signos de deficiencia hística de Fe” perfectamente correlacionados con los niveles bajos de ferritina sérica y que son: la depapilación de los bordes de la lengua y en casos severos

con lengua lisa; el cabello seco, quebradizo y fácilmente desprendible, y las uñas delgadas, quebradizas con onicoquisis (aumento de estriación transversal de las uñas) y en casos avanzados aparece la verdadera coiloniquia (uña en cuchara) (Punnonen y col., 1997).

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

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

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

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

La biopsia de estómago practicada en anemia por deficiencia de Fe ha demostrado que en el 75% de los casos se presentan diversos grados de gastritis, acompañada de disminución de la secreción gástrica, además se ha observado en los niños, pero no en adultos, malabsorción intestinal (Oski, 1993).

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

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

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

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



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

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

Las 3 principales estrategias para corregir la ferropdeficiencia en la población son:

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

El exceso de absorción intestinal de Fe, por lo general es el resultado de alteraciones hereditarias del metabolismo de dicho mineral, pero el Fe presente en ciertos preparados farmacológicos, también puede conducir a largo plazo a un exceso de Fe en el organismo. La fuente parenteral que conduce a la sobrecarga de Fe incluye transfusiones de sangre y en menor medida la terapia con Fe-dextrano. En algunas situaciones (por ejemplo en  $\beta$ -talasemia) pueden coexistir tanto la absorción elevada de Fe, como la carga de Fe por transfusión.

La sobrecarga de Fe por estos trastornos puede ser clasificada como primaria o secundaria, dependiendo del mecanismo subyacente (Pietrangelo, 2006). A continuación, se muestran los principales trastornos clínicos de sobrecarga de Fe (Anderson, 2007):

Sobrecarga primaria:

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

Sobrecarga secundaria:

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

Otros tipos:

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

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

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

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

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

Otros trastornos genéticos menos comunes, de sobrecarga primaria de Fe son resultado de mutaciones en los genes que codifican la Tfr2, hepcidina, y hemojuvelina, pero todos siguen un modelo similar de depósito de Fe en los tejidos (Bomford, 2002; Pietrangelo, 2006).

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

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

(Papanikolaou y col., 2005). El hecho de que la eritropoyesis conduzca a un aumento de la absorción de Fe, parece suprimir en estas condiciones la síntesis de hepcidina como se hace evidente por los bajos niveles urinarios de hepcidina en estos pacientes (Kearney y col., 2007).

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

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

Hay también formas mixtas de sobrecarga de Fe de etiologías variables, pero la mayor parte de estas son raras. Estas incluyen la sobrecarga farmacológica de Fe, la

hemocromatosis africana, las enfermedades raras que afectan a la síntesis de proteínas plasmáticas como la atransferrinemia congénita y la aceruloplasminemia, la hemocromatosis neonatal, la siderosis asociada con la enfermedad hepática crónica y la porfiria cutánea tardía (Anderson, 2007).

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

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

-El tipo 2 HH se caracteriza por una disfunción cardíaca y endocrina severa, debido a la sobrecarga aumentada de Fe que conduce a la mortalidad antes de los 30 años, y también conocida como Hemocromatosis juvenil. Las mutaciones en la hepcidina (HAMP) y hemojuvelina (HJV o HFE2) están implicadas en el desarrollo de

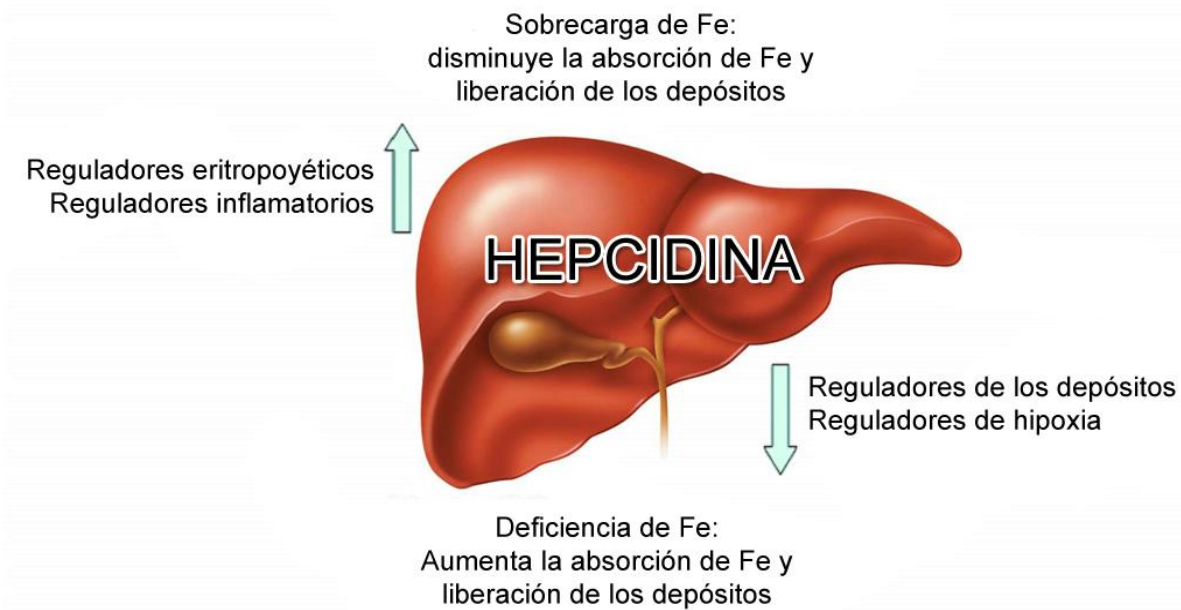
la enfermedad. El HJV actúa como co-receptor para la morfoproteína ósea (BMP) y por este mecanismo regulador aumenta la síntesis de hepcidina que conduce a la sobrecarga de Fe.

-El tipo 3 HH causada por mutaciones en TfR2, un homólogo de TfR1, con una distribución tisular limitada. La sobrecarga de Fe en esta enfermedad es lenta y no fatal. Los estudios sobre TfR2 apuntaron que mutaciones génicas en ratones parecen estar asociadas con la producción disminuida de hepcidina y en consecuencia la sobrecarga de Fe (Domenico y col., 2008).

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



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



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

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

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

Esposito y col. (2003) han definido el Fe lábil en plasma, como la forma no unida a transferrina que tiene actividad redox, es quelable, y capaz de entrar en los órganos e inducir sobrecarga de Fe en los tejidos. Además, el Fe lábil intracelular puede proceder de la degradación de la transferrina.

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

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

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

#### **2.1.5.4. CONSECUENCIAS DE LA SOBRECARGA DE HIERRO**

El Fe tiene la capacidad de aceptar y donar electrones fácilmente, por su conversión entre férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) y ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Esta capacidad hace que sea fisiológicamente indispensable, ya que participa en el metabolismo oxidativo, crecimiento y proliferación celular, así como en el transporte (hemoglobina) y almacenamiento de oxígeno (mioglobina). Sin embargo, el Fe también es bioquímicamente peligroso, por su interacción con el oxígeno, catalizando la conversión a peróxido de hidrógeno y a radical superóxido, mediante su participación en las

reacciones de Fenton y Haber-Weiss, que terminan generando radicales hidroxilos que inducen riesgos para las membranas celulares, proteínas y ADN, provocando la fragmentación y desestabilización de la doble hélice (Fiers y col., 1999; Haliwell, 2001; Soule y col., 2007; Wilcox y Pearlman, 2008). Por otra parte, (Cragg y col., 1998) examinaron los efectos del peróxido de hidrógeno en células HepG2. Ellos demostraron que la sobrecarga de Fe incrementaba enormemente el daño en el ADN inducido por peróxido de hidrógeno y que un quelante de Fe (desferritocina) ejercía un efecto protector en las células, confirmando el efecto genotóxico del Fe.

Existe controversia en la comunidad científica acerca de la susceptibilidad de las células al daño oxidativo en situación de anemia por deficiencia de Fe: algunos autores establecen que no existen diferencias en la susceptibilidad a la oxidación de pacientes con anemia en comparación con individuos sanos (Acharya y col., 1991; Isler y col., 2002), pero otros defienden que la producción de sustancias oxidantes estaba incrementada y los sistemas antioxidantes se encontraban disminuidos, por tanto, el equilibrio oxidativo/antioxidante estaba desequilibrado hacia la zona oxidativa en pacientes con anemia ferropénica (Vives Corrons y col., 1995; Kumerova y col., 1998; Aslan y col., 2006).

Las condiciones patológicas, el metabolismo del Fe y el del radical superóxido están íntimamente vinculados. Cada uno puede exacerbar la toxicidad de los demás. La sobrecarga de Fe puede amplificar los efectos nocivos de la sobreproducción del radical superóxido. Además, el estrés oxidativo crónico puede modular la absorción del Fe y su almacenamiento, lo que puede llevar a efectos citotóxicos y mutagénicos (Emerit y col., 2001).

El estrés oxidativo resulta de un desequilibrio entre la formación y neutralización de prooxidantes y se impone en la célula como resultado de uno de los siguientes factores: un incremento en la generación de agentes oxidantes (radicales libres), una disminución de los sistemas de protección antioxidante o un fallo en la reparación del daño oxidativo (Fiers y col., 1999; Halliwell, 2001). La alteración del balance prooxidante/antioxidante se considera también un factor importante en el daño oxidativo a las moléculas, causando roturas y desestabilización de las membranas celulares (Aust y Eveleigh, 1999; Soule y col., 2007; Wilcox y Pearlman, 2008).

Los radicales libres son especies químicas con electrones desapareados que les confieren gran reactividad química, hecho que les conducirá a interactuar rápidamente con cualquier molécula biológica con la que entren en contacto. Por su avidez para aceptar electrones de las moléculas diana, los radicales libres pueden modificar la estructura y/o la función de éstas, pudiendo actuar así sobre componentes estructurales como la membrana plasmática y sobre procesos críticos intracelulares, entre los que se incluyen la maquinaria genética y diversos procesos enzimáticos (Halliwell y Chirico, 1993; Cheeseman y Slater, 1993; Liu y col., 2002).

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

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

En el corazón, la formación de radicales hidroxilo inducidos por Fe no unido a transferrina causa una disfunción en la cadena respiratoria mitocondrial que conduce al paro cardíaco (Anderson y col., 2001). Los efectos cardíacos más destacados (p.ej. hipertrofia, degeneración de fibra, arritmias, y el paro cardíaco congestivo) tienden a ser vistos en situaciones donde hay carga muy rápida de Fe. Por ejemplo, complicaciones cardíacas son más comunes en las formas agresivas juveniles de hemocromatosis que en el inicio adulto de la enfermedad HFE, y el daño cardíaco a menudo acompañan la sobrecarga de Fe transfusional.

La sobrecarga de Fe también afecta el sistema endocrino, en particular la glándula pituitaria y las glándulas tiroideas/paratiroides. La disfunción gonadal es una consecuencia secundaria de la sobrecarga de Fe en la glándula pituitaria anterior.

La artritis es también muy común en la sobrecarga de Fe y, en algunos casos hay una sensibilidad aumentada a ciertas infecciones.

Otros factores que contribuyen al grado de daño en los tejidos está relacionado con la velocidad de acumulación de Fe (la carga rápida es más perjudicial que la carga lenta), la duración de Fe elevado, el equilibrio de la sobrecarga entre el parénquima (siendo estas células más susceptibles al daño oxidativo) y la carga de la célula

reticuloendotelial , la presencia de otros factores que causan daños hepáticos (p.ej. hepatotoxinas como el alcohol y la hepatitis viral en el hígado) y niveles de ascórbico.

### **2.1.6. FUNCIONES DEL HIERRO**

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

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

-Sensibilización al oxígeno: Un inadecuado aporte de oxígeno, (p. ej. el que experimentan las personas que viven a grandes altitudes, o los que sufren una enfermedad crónica de pulmón) induce una respuesta compensatoria fisiológica que incluye un aumento de la formación de células rojas, un aumento del crecimiento de vasos sanguíneos (angiogénesis) y una mayor producción de enzimas utilizadas en el metabolismo anaerobio. Bajo condiciones de hipoxia, los factores de transcripción conocidos como factores inducibles por la hipoxia, se unen a elementos de respuesta en ciertos genes que codifican varias proteínas implicadas en la respuesta compensatoria a la falta de oxígeno e incrementan la síntesis de dichas proteínas. Recientes estudios revelan que la enzima prolil-hidroxilasa Fe-dependiente juega un papel crucial en la regulación de estos factores inducibles por la hipoxia y consecuentemente en la respuesta fisiológica a esta situación. Cuando la tensión celular es adecuada, las subunidades  $\alpha$  de los recién sintetizados factores inducibles por la hipoxia, son modificados por la enzima prolil-hidroxilasa en un proceso dependiente de Fe que las hacen muy sensibles a la degradación. Cuando la tensión celular de oxígeno cae por debajo de un umbral crítico, la prolil-hidroxilasa no puede modificar la subunidad  $\alpha$  para su degradación, lo que permite que esta subunidad  $\alpha$  se una a la subunidad  $\beta$  y formen un factor de transcripción activo, que es capaz de entrar en el núcleo y unirse a elementos de respuesta específicos en ciertos genes (Ivan y col., 2001; Jaakkola y col., 2001).

-Transporte de electrones, metabolismo energético y detoxificación del organismo: El Fe interviene en el transporte de energía en todas las células, en la producción de ATP mitocondrial donde participan multitud de enzimas que contienen Fe hemo y no hemo. Los citocromos que tienen al grupo hemo en su composición,



presentes en prácticamente todas las células, ejercen su función en la cadena de transporte electrónico mitocondrial, transfiriendo electrones y almacenando energía gracias a las reacciones de oxidación y reducción del Fe. Numerosos xenobióticos insolubles en agua y moléculas orgánicas tóxicas son transformadas por el sistema del citocromo P-450 hepático, en otras moléculas mucho más hidrosolubles que pueden ser excretadas por vía biliar (Beard, 2001).

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

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

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

-Sistema nervioso: El Fe tiene un papel importante en sistema nervioso central ya que participa en la regulación los mecanismos bioquímicos en el cerebro, en la producción de neurotransmisores y otras funciones encefálicas relacionadas con la atención, aprendizaje y la memoria como así también en ciertas funciones motoras y reguladoras de la temperatura. En ferropdeficiencia, se pueden afectar determinadas estructuras cerebrales que requieren un contenido relativamente elevado de Fe, como demuestra el dato indirecto de las reservas hepáticas de dicho elemento. Las funciones más afectadas son las relacionadas con el sistema dopaminérgico de neurotransmisión, posiblemente porque conduce a una disminución del receptor D2 de la dopamina, asociado con alteración del catabolismo de las aaminas biógenas como la serotonina y el de opio péptidos endógenos. En el nacimiento solo existe en el encéfalo un 10% del Fe presente en la edad adulta, aumentando el contenido neuronal hasta el 50% a los 10 años y alcanzando el nivel máximo entre los 20 y 30 años. Se ha observado en animales de experimentación, que si no se alcanzan los niveles de Fe, sobre todo durante la época de crecimiento, no se pueden conseguir posteriormente a pesar de un importante suministro, lo que conlleva un riesgo de afectación neuronal (Hallterman y col., 2001).

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

La biodisponibilidad está definida como la eficiencia con la cual el Fe obtenido de la dieta es utilizado biológicamente (Wienk y col., 1999), depende del tipo de Fe que se suministre en los alimentos, de la cantidad del mismo, de la combinación de alimentos en una comida, el estado nutricional del Fe y de algunos eventos que requieran modificar la movilización de Fe entre los tejidos o la absorción del mismo como: la eritropoyesis aumentada, la hipoxia y las infecciones (Hallberg, 1981; Raja y

col., 1988; Lynch, 1997; Hallberg y col., 1998; Gaitán y col., 2006). La absorción de Fe se encuentra aumentada durante la deficiencia del metal, las anemias hemolíticas y en la hipoxia, mientras que en los procesos infecciosos o inflamatorios existe una reducción de la absorción del mismo.

Varios factores afectan la biodisponibilidad del Fe de la dieta. La tasa de absorción depende del estatus de Fe del individuo, es decir, del nivel de este nutriente en los depósitos del organismo. Una baja cantidad de Fe en los depósitos implica una mayor tasa de absorción. Individuos con anemia ferropénica son capaces de absorber entre un 20 y un 30% del Fe presente en la dieta, mientras que un individuo sin anemia sólo absorbe un 5-10% del total ingerido (Zlotkin, 2001; Conrad y Umbreit, 2002).

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

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

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

El Fe no hemo es la mayor fuente del mineral en la dieta de las poblaciones de los países en vías de desarrollo. El Fe hemo se halla en las carnes (rojas y blancas) y la sangre, también existe un contenido muy bajo de Fe hemo en las semillas de las plantas, asociado a los anillos tetrapirrólicos de la clorofila, el sirohemo, la fitocromobilina e incluso al grupo Hemo (Santana y col., 1998). A pesar del alto contenido de Fe no hemo de los alimentos, su biodisponibilidad varía desde menos del 1% hasta un 20%, esto se debe a que otros nutrientes de la dieta pueden aumentar o disminuir la eficiencia con la cual es solubilizado y/o reducido por el pH gástrico, compitiendo por el transportador DMT1 en la membrana apical del enterocito o afectando el metabolismo del metal. Sólo uno de estos efectos o la combinación de varios, hace que algunos compuestos tengan importancia como inhibidores o estimuladores de la biodisponibilidad del Fe (Hallberg, 1981; Lynch, 1997; Sandstrom, 2001; Miret y col., 2003).

Potenciadores de la absorción del Fe no hemo:

-Ácido ascórbico (Vitamina C) y otros ácidos orgánicos; cítrico, málico, tartárico y láctico tienen efecto potenciador sobre la absorción del Fe no hemo, tienen la cualidad de aumentar la biodisponibilidad del Fe y su efecto se atribuye a la capacidad que estos compuestos tienen para reducir el Fe no hemo y mantener su solubilidad a pH alto, por lo tanto, aumentan la cantidad de  $\text{Fe}^{2+}$  que es más soluble en el lumen duodenal

(Teucher y col., 2004). La vitamina C potencia fuertemente la absorción de Fe no hemo, reduciendo el Fe férrico de la dieta ( $\text{Fe}^{3+}$ ) a Fe ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) y formando un complejo absorbible Fe-ácido ascórbico.

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

-El factor carne: En la década de los 60, Layrisse propuso que el consumo de carnes a parte de contener Fe hemo aumentan la biodisponibilidad del Fe no hemo (Layrisse y col., 1968). En base a este hallazgo se propuso que la proteína de origen animal estaba implicada en este proceso. Sin embargo, estudios posteriores encontraron que este efecto positivo no se observaba con la proteína animal contenida en la clara de huevo o en la leche, la cual tiene grandes cantidades de coalbúmina (proteína quelante del metal) y caseína (proteína que oxida el  $\text{Fe}^{2+}$ ) (Hurrell y col., 1988; Emery, 1992; Gaitán y col., 2006) por lo tanto, al efecto de las proteínas sobre la absorción del Fe no hemo se le conoce como "factor cárnico". Las proteínas de la carne además de proveer Fe hemo (altamente absorbible) favorecen la absorción de Fe no hemo promoviendo la solubilidad del Fe ferroso. El mecanismo mediante el cual el factor cárnico aumenta la absorción del Fe no hemo se relaciona con el contenido de aminoácidos ricos en histidinas y en enlaces sulfhidrilos de la proteína ingerida, por esto, las carnes con alto contenido de actina y mucina son las que más aumentan la biodisponibilidad; estos enlaces, promueven la solubilidad del  $\text{Fe}^{2+}$  y además, facilitan la reducción del  $\text{Fe}^{3+}$  (Mulvihill y col., 1998).

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

-Vitamina A: Es usual que las deficiencias de vitamina A y Fe coexistan en los países en vías de desarrollo y está claramente establecido que las estrategias para mejorar el estado nutricional del Fe tengan mayor efectividad cuando se realiza suplementación del metal y de vitamina A. La combinación de vitamina A con Fe se usa para mejorar la anemia ferropénica. El mecanismo mediante el cual estos dos micronutrientes interaccionan no está dilucidado, sin embargo se ha postulado que esta vitamina es necesaria para la movilización de las reservas de Fe y para la reutilización del mismo durante la hematopoyesis, (Bloem, 1995; Gaitán y col., 2006) por otro lado, es posible que la vitamina A y los  $\beta$ -carotenos contribuyan en mantener solubilización del Fe no hemo contenido en alimentos ricos en algunos compuestos que lo fijan en el lumen e impiden su absorción, tal como ocurre con los fitatos y polifenoles (García-Casal y col., 1998; Gaitán y col., 2006).

Inhibidores de la absorción del Fe no hemo:

-Ácido Fítico: presente en las legumbres, el arroz y granos enteros, si bien en las legumbres y los cereales tienen un alto contenido de Fe no hemo, no se considera una

buena fuente de Fe, ya que también son ricos en fitatos (mioinositol hexafosfato) (Hurrell, 2003). Este compuesto une eficientemente varios metales en el duodeno inhibiendo su absorción (Agte y col., 2005). Debido a que las dietas de los países en vías de desarrollo son pobres en carne y ricas en legumbres y cereales, se le ha atribuido al fitato una gran responsabilidad en la génesis de las anemias ferropénicas. El efecto inhibitorio del fitato sobre la absorción del Fe no hemo se relaciona proporcionalmente con la cantidad del compuesto que se encuentra en los alimentos (Hallberg y Hulthen, 2000). La pérdida de los grupos fosfato del mioinositol hexafosfato genera los derivados mioinositol pentafofato, tetrafofato, trifosfato, difosfato y monofosfato. Esta degradación es catalizada por fitasas o por las temperaturas de cocción de los alimentos que podrían favorecer la absorción del Fe no hemo, debido a que se ha comprobado que los compuestos con menos de 5 grupos fosfato tienen una capacidad muy reducida para interferir con la biodisponibilidad de los micronutrientes minerales (Sandberg y col., 1999; Hurrell y col., 2003). Dentro de los programas de fortificación encaminados a prevenir las deficiencias del Fe, se contempla la adición de ácido ascórbico, debido a que al promover la reducción del metal, disminuye la cantidad de  $Fe^{3+}$  que es la forma del metal que se fija al fitato. Actualmente la industria alimentaria intenta disminuir el contenido de fitatos utilizando fitasas (capaces de degradar el ácido fítico), además se están manipulando genéticamente algunas plantas, con el fin de producir alimentos bajos en el compuesto y de este modo disminuir la incidencia de deficiencias de Fe (Gibson y col., 2003). Pequeñas cantidades de ácido fítico (de 5 a 10 mg) pueden reducir la absorción de Fe no hemo en un 50% (Fairbanks, 1999; Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, 2004).

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

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

-Algunos minerales: La absorción del Fe no hemo se ve afectada por distintos minerales con propiedades fisicoquímicas similares en cierta medida al Fe, entre los que se encuentran el Zn, Mn, Cu y Ca (Reddy y Cook, 1997). Se ha estudiado el efecto de estos minerales en la biodisponibilidad del Fe (Sharp, 2004). El efecto de estos minerales se debe a que compiten por los transportadores de membrana de los enterocitos, modifican el estado de oxidación o interfieren en el metabolismo del Fe (Sandstrom, 2001). La interacción del Ca y el Fe es de particular importancia, debido a que, además de afectar la biodisponibilidad del Fe no hemo, es el único micronutriente implicado en la disminución de la biodisponibilidad del Fe hemo. Es sabido que el efecto del Ca sobre la biodisponibilidad del Fe es dosis dependiente, no teniendo efectos a dosis menores a 40 mg de Ca y cuando es más de 300 mg de Ca la biodisponibilidad del Fe disminuye hasta en un 50% (Hallberg y col., 1991; Gaitán y col., 2006). El Ca y el Fe no hemo compiten por el transportador DMT1, lo cual explica este efecto. Sin embargo, López-Aliaga y col. (2000), estudiaron la influencia de la leche de cabra y vaca sobre la utilización digestiva y metabólica de Fe y Ca en ratas adultas. Este estudio



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

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

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

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

### 2.2.1. UTILIZACIÓN NUTRITIVA Y METABÓLICA DE HIERRO

El Fe es un elemento traza esencial requerido para todos los organismos vivos y es tóxico en exceso. En la naturaleza hay un equilibrio que controla la cadena de

entrada, transporte a los lugares que se necesita, y eliminación del exceso de Fe. Debido a la naturaleza del metabolismo y homeostasis del Fe, se integran mecanismos especializados en mantener los niveles celulares del organismo. En estos mecanismos implicados en la elevación de los niveles de Fe en enterocitos, transporte a nivel de membrana, y distribución en los diferentes tejidos, coordinando la homeostasis es clave la regulación molecular y está relacionada con la deficiencia o sobrecarga de Fe.

El papel y la participación de varias proteínas y moléculas peptídicas en el mantenimiento del equilibrio de la homeostasis del Fe, sugiere que la interrupción o la sobreexpresión de cualquiera de estas entidades puedan conducir a consecuencias de salud significativas. Los estudios comparativos en animales transgénicos y ciertas enfermedades genéticas humanas, implican mutaciones en HFE, TfR2, hepcidina, HJV, IREG1, Tf, ceruloplasmina y ferritina en algunas patologías relacionadas con la sobrecarga de Fe. Estas observaciones ayudan a un mejor entendimiento de los mecanismos moleculares implicados en la sobrecarga heredada de Fe (Domenico y col., 2008).

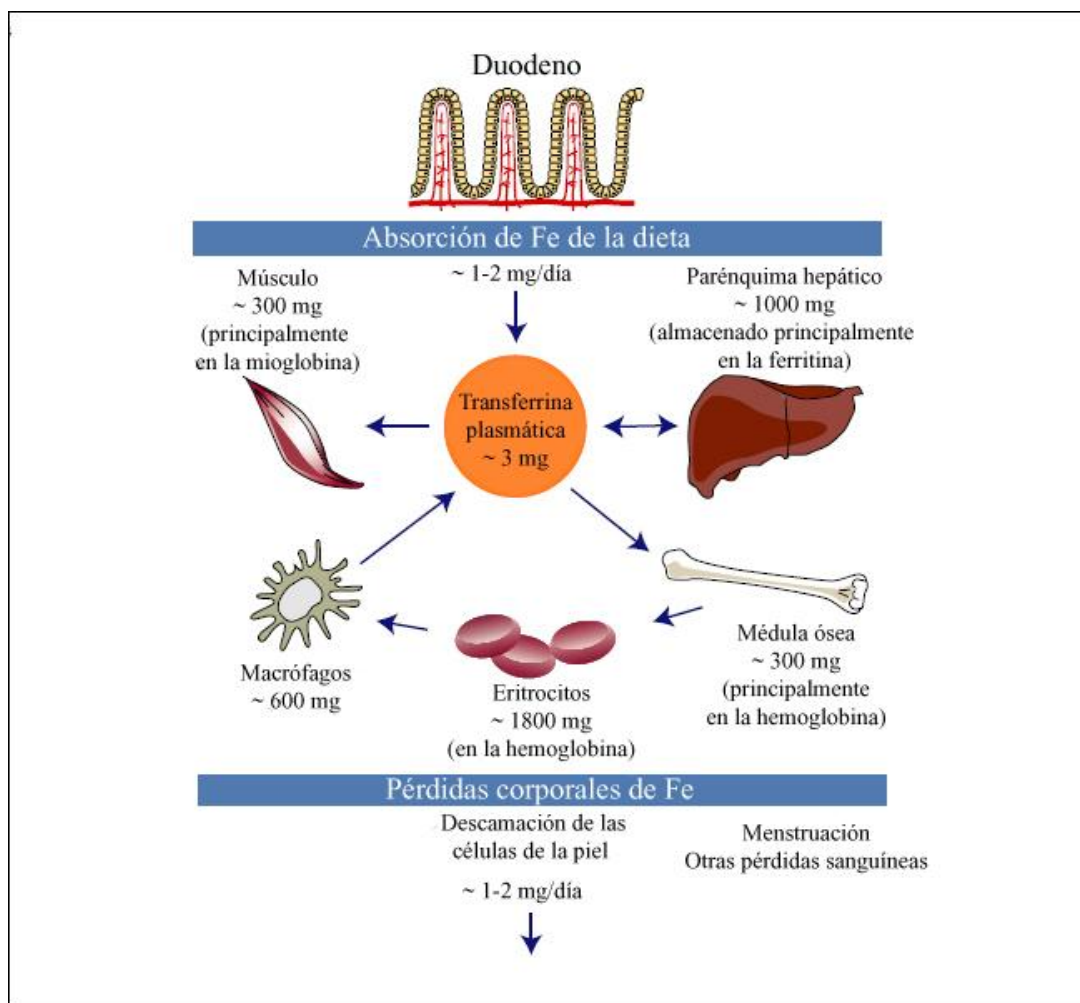
La alteración de la homeostasis, como elevación de los niveles de Fe, está relacionada con la patología hemocromatosis hereditaria y enfermedad de Parkinson debido a la influencia de factores medioambientales y estilos de vida (Rouault, 2006).

El Fe es un micronutriente por lo que debe ser ingerido en una cantidad adecuada para la salud del organismo. Es necesario para la vida participando en numerosos procesos metabólicos específicos para cada célula viva y formando parte de

complejos moleculares y enzimáticos. A pesar de los bajos requerimientos en la dieta, la deficiencia de Fe debido a la malnutrición es un problema de salud pública.

En un adulto el contenido de Fe es aproximadamente 4 g y un 50% de éste, está unido a hemoglobina de los hematíes, 25% en el hígado y el resto constituye mioglobina y otras proteínas que contienen Fe. El contenido total de Fe en los hombres es de unos 50 mg/Kg, mientras que las mujeres tienen una proporción ligeramente inferior (Papanikolau y Pantopoulos, 2004).

**Figura 3.** Distribución de Fe en el organismo (Papanikolau y Pantopoulos, 2004).



Los mamíferos obtienen Fe exclusivamente de la dieta, mientras que el Fe hemo, lo obtienen de la absorción de hemoglobina y mioglobina, el Fe inorgánico no-hemo proviene de una muy amplia variedad en la dieta y éste se absorbe ineficazmente. La ingesta humana es aproximadamente 12-18 mg/día de la cual solo 1-2 mg es absorbido (Crichton y col., 2002).

El estatus de Fe en el organismo es mantenido por la regulación de la absorción y depósito de este micronutriente, pero no es bien conocido el mecanismo corporal de eliminación de Fe.

### **2.2.2. REQUERIMIENTOS**

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

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

Durante el primer año de vida, el niño crece rápidamente, triplicando su peso y duplicando el contenido Fe corporal (Dallman y col., 1993). En este periodo se estima

que las necesidades de Fe oscilan en un rango de entre 0.6 y 1.0 mg/Kg/día (11 mg/día) (Bothwell, 1995; Food and Nutrition Board, 2004). Se pueden distinguir tres períodos característicos, dependientes del estado nutricional del Fe:

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

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

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

En niños prematuros y con bajo peso al nacer, la susceptibilidad de desarrollar una ferropdeficiencia es mucho mayor, ya que sus reservas corporales son menores, unido a un crecimiento postnatal más acelerado. Esto hace que las reservas se agoten

más fácilmente, por lo que se hace necesario el suministro de Fe exógeno antes del 4º mes de vida.

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

En la adolescencia se produce un nuevo incremento de las demandas de Fe, como consecuencia del crecimiento acelerado. Durante el desarrollo puberal, un adolescente aumenta unos 10 Kg de peso, y debe acompañarse de un incremento de 300 mg de su Fe corporal para mantener constante los niveles de la hemoglobina, que aumentan en este periodo de 50-100 g/L/año. En consecuencia, un adolescente varón requiere alrededor de 350 mg de Fe al año durante el pico de crecimiento (Uzel y Conrad, 1998). En las adolescentes las necesidades de Fe son superiores, ya que aunque la velocidad de crecimiento es menor, se adicionan las pérdidas menstruales (Lönnerdal y Dewey, 1995). El aumento de unos 9 Kg de peso de una adolescente durante la pubertad, implica un aporte de unos 280 mg de Fe para mantener la concentración de hemoglobina en niveles adecuados. Un sangrado menstrual promedio de unos 30 mL de sangre implica la pérdida de unos 75 mg de Fe. En consecuencia, una adolescente en pleno pico de crecimiento requiere unos 455 mg de Fe al año.

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

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

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

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

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



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

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

### 2.2.3. ABSORCION INTESTINAL Y TRANSPORTE DE HIERRO

El Fe de la dieta se absorbe principalmente en el intestino proximal, cerca de la unión gastroduodenal. Tres caminos se proponen en el proceso de la absorción. El Fe inorgánico no es eficientemente absorbido (Andrews, 1999a). Cada transportador de membrana es específico de un grupo de proteínas transportadoras y enzimas accesorias que cambian el estado de oxidación del Fe facilitando el proceso de transporte.

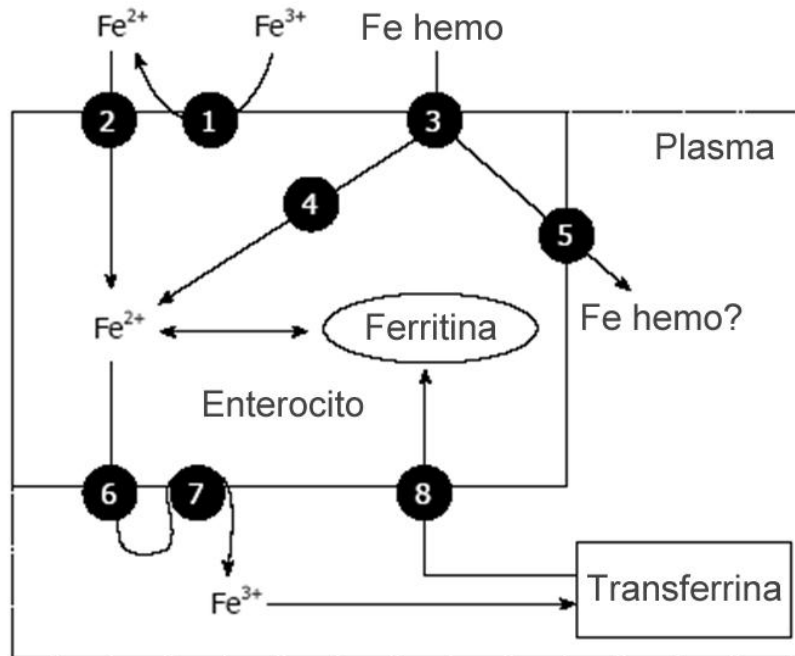
El Fe hemo es absorbido en los enterocitos por un transportador de proteínas 1 no identificado, el cual es reconocido por proteínas de membrana en el intestino proximal, donde es absorbido el grupo hemo en su mayoría. Sin embargo, queda incierto si algún grupo hemo podría atravesar las células intactas,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

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

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

absorción de Fe intestinal. Este efecto puede ser compensado con la eficaz absorción del Fe hemo, pero ha sido asociado con sobrecarga hepática de Fe.

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



- Transporte de Fe al plasma:

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

Simultáneamente y de forma independiente se identificó el transportador proteico, conocido como proteína reguladora de Fe 1 (IREG1), Ferroportina 1 (FPN) o (MTP1) (Abboud y Haile, 2000; Donovan y col., 2000; McKie y col., 2000).

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

El  $Fe^{3+}$  como forma más abundante encontrada en la sangre, se encuentra a la apotransferrina en el plasma como complejo “ $Fe^{3+}$ -transferrina (Tf)”.

La Transferrina es una glucoproteína de 80 KDa, con dominios de unión al Fe en su extremo homólogos N- y C-terminal. Es sintetizada en el hígado, retina, testículo y cerebro.

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

libres. Por esta razón la transferrina protege a los sistemas orgánicos de los efectos tóxicos del Fe.

Hay una clara especificidad que diferencia el porcentaje de saturación de la transferrina, siendo de un 80% en ratones y tan sólo 30% en células de humanos. También varía con el ciclo diurno (ritmo circadiano) o situaciones específicas tales como la circulación de la vena porta y la medula ósea (Uchida y col., 1983; Andrews y Schmidt, 2007).

#### **2.2.4. DISTRIBUCIÓN DE HIERRO EN LOS TEJIDOS Y CAPTACIÓN CELULAR**

La entrada, almacén y transporte de Fe depende de las demandas funcionales de los diferentes tipos de células. En la mayoría de las células eucariotas, el Fe circula primero por la vía endocitaria mediante el receptor de transferrina (TfR). En los acontecimientos moleculares asociados con la unión del complejo Fe-transferrina y liberación de la apotransferrina al plasma por la reutilización o reciclado, hay dos receptores de transferrina, llamados TfR1 y TfR2 (Crichton y col., 2008).

El TfR1, tiene una alta afinidad por el Fe, está involucrado en la entrada de Fe en la mayoría de las células, mientras que TfR2 es primero expresado en el hígado y se une con menos afinidad al complejo Fe<sup>3+</sup>-transferrina. Esto se demostró en células embrionarias muertas de ratones Knockout TfR-1, reforzando el importante papel de TfR-1 en los niveles de Fe celular (Hentze y col., 2004).

Una vez que el complejo  $\text{Fe}^{3+}$ -transferrina se une a su receptor en la superficie celular, el complejo transferrina-TfR-1 es englobado por las vesículas endocitarias. En el interior de las células el complejo se internaliza en el endosoma, siendo acidificado por la bomba  $\text{H}^+$ -ATPasa (V-ATPasa) que baja el pH del lumen a 5.5, proceso inducido por los cambios del complejo transferrina-TfR-1 con la consiguiente liberación de Fe (Sipe y Murphy, 1991; Andrews, 2008).

El transportador DMT1 endosomal de  $\text{Fe}^{2+}$  en el citosol, es el principal transportador de Fe y la transferrina, recién cargada de Fe, se reciclará para el transporte. En condiciones de pH ácido, la apotransferrina se mantiene unida a TfR1 y el complejo es reciclado en la superficie celular y con un pH neutro del plasma la apotransferrina se disocia de TfR1 y está preparada para una nueva captura de Fe. Es también reconocido que existe cierto sistema de transporte Fe-transferrina-independiente de Fe, facilitando el transporte de Fe en otros tejidos (Quidt y col., 2006).

Estudios con mutantes de ratón nm1054, explican el daño en la síntesis debido a la disminución de los niveles de Fe, identificando en 6 antígenos epiteliales transmembrana (STEAP3) la ferroreductasa endosomal, responsable de la reducción del  $\text{Fe}^{3+}$  endosomal (Ohgami y col., 2005a). Las mutaciones en el STEAP3 tienen una implicación en la anemia microcítica, debido al defecto del Fe en los reticulocitos (Ohgami y col., 2005b).

En estudios en pacientes con mutaciones que causan anemia microcítica hipocrómica, tienen como resultado el descenso eritroide de utilización del Fe, pero lo principal es el incremento de almacén de Fe en el hígado (Iolascon y col., 2009).

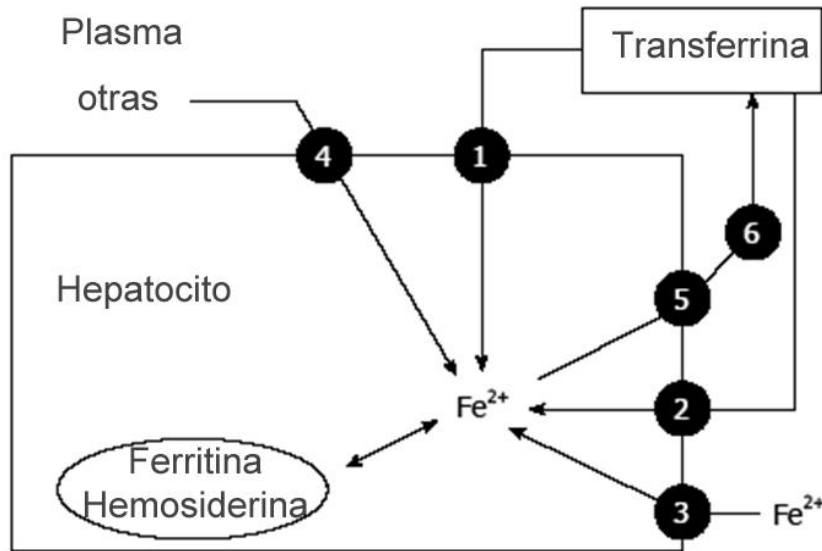
Sin embargo, el STEAP3 no se requiere para niveles eficaces de Fe en otros tipos celulares, sugiriendo la existencia de varias ferredoxinas que quedan por identificar (Conrad y Umbreit, 1993).

### **2.2.5. DEPÓSITOS Y METABOLISMO DEL HIERRO**

La entrada, almacén y salida de Fe está regida según las diferentes necesidades fisiológicas y metabólicas de los distintos tipos celulares. No todo el Fe es utilizado en procesos metabólicos, algo es almacenado en las reservas para usarlo cuando los niveles de Fe son bajos y previene de los efectos tóxicos del Fe libre en las células.

Los hepatocitos son el mejor depósito para almacenar Fe, aunque el ciclo de la transferrina pueda estar involucrado en la absorción, la unión de transferrina al Fe en su entrada parece jugar un papel importante cuando los niveles de Fe exceden de la capacidad de fijación de transferrina.

**Figura 5.** Principales rutas almacenamiento y liberación de Fe en los hepatocitos. (Muñoz y col., 2009). [1: TfR1; 2: TfR2; 3: DMT1; 4: Otras: hemoglobina, hemo, ferritina; 5: Ferroportina (IREG-1); 6: Ceruloplasmina]



El almacén de Fe supone un 20-30% del Fe corporal y la mayoría de éste se encuentra unido a la ferritina.

La Ferritina es un polímero de 24 subunidades que comprende dos subtipos H (pesada, 21 kD) o L (ligera, 9 kD) con un núcleo central que contiene 4,500 átomos de Fe (Koorts y Viljoen, 2007). Una característica importante de la subunidad H es su actividad ferroxidasa que facilita la oxidación del  $Fe^{2+}$  (forma predominante en citosol) a  $Fe^{3+}$ , uniéndose así a la ferritina. Las dos subunidades de ferritina son muy estables y muestran diferentes combinaciones dependiendo del tejido. Por ejemplo, en el hígado y el bazo abundan más las subunidades L, mientras que en corazón es rico en subunidad H.



En el interior de las células, el Fe puede ser almacenado en 2 formas en el citosol, como ferritina y el Fe en su forma insoluble es también almacenado en baja cantidad, en la proteína de almacén hemosiderina, que presumiblemente deriva de la degradación lisosomal de la ferritina y en su mayor parte en los macrófagos del sistema retículo endotelial, incrementando drásticamente en situación de sobrecarga (Vaghefi y col., 2005).

Bajo condiciones de sobrecarga, el contenido de esta proteína fue encontrada con un drástico incremento, en particular en el hígado, páncreas y corazón (Theil, 2004).

La recuperación de Fe desde los eritrocitos envejecidos también juega un importante papel en el mantenimiento de los niveles de Fe. Al final de 120 días, los eritrocitos experimentan una alteración superficial como señal para ser fagocitados y digeridos por los macrófagos en el bazo e hígado.

La importancia del almacén de Fe en los macrófagos es la seguridad de que no genera daño oxidativo. La eritropoyetina reduce la retención de Fe en los macrófagos por el decrecimiento de la expresión del DMT-1 y el incremento de la expresión de la ferroportina 1 (Kong y col., 2008).

En los macrófagos el Fe es recuperado en su mayor parte desde el grupo hemo, por acción de la forma inducida de la hemo-oxigenasa (Ganz, 2007) y los transportadores de metales, NRAMP-2 y DMT1. El Fe recuperado a través de la membrana fagosomal al citoplasma es almacenado en el fagocito unido a la ferritina. La

participación de las proteínas ferroportina y ceruloplasmina facilita el transporte eventual por la transferrina, del Fe almacenado (Harris y col., 1999; Donovan y col., 2005).

La observación en anemia severa de la rápida acumulación de Fe en ratones deficientes en ferroportina (FPN), sugiere que dicha proteína es esencial para la reutilización de Fe (Hahn y col., 1943; Nadadur y col., 2008).

### **2.2.6. ELIMINACIÓN**

De 1-2 mg de Fe se pierde diariamente en los procesos de descamación de la mucosa intestinal y epidermis (42 µg/Kg), por orina (14 µg/Kg) y bilis (84 µg/Kg). En mujeres hay una pérdida adicional asociada a la menstruación y en consecuencia los requerimientos son más altos que en los hombres (Anderson y Vulpe, 2002; Pietrangelo y col., 2002; Nemeth y Ganz, 2006<sup>a</sup>, Nemeth y Ganz, 2006b).

El contenido de Fe en la hemoglobina es 3.46 mg/g. Con una concentración de hemoglobina en sangre de 130 g/L, la pérdida de 1 mL de sangre equivale a 0.45 mg de Fe. Pérdidas escasas de sangre, usualmente de unos mililitros por día del tracto digestivo, es una causa común de deficiencia severa de Fe, especialmente en la tercera edad.

La lactancia materna supone unas pérdidas de Fe para la mujer de 0.3-0.6 mg/día (Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, 2004).

Las pérdidas de Fe por la orina son relativamente escasas, porque muchas proteínas que contienen Fe son demasiado grandes para filtrar a nivel glomerular. Además la hemoglobina libre y el hemo son eliminados rápidamente de la circulación bajo muchas circunstancias y la concentración de Fe libre en sangre es muy baja. Sin embargo, las pequeñas cantidades de transferrina que son filtradas se unen a cubilina en el borde en cepillo de la membrana del túbulo proximal y son captadas con la ayuda de la mesalina (Kozyraki y col., 2001). La falta de alguno de estos receptores incrementa las pérdidas de Fe notablemente.

### **2.2.7. MECANISMOS HOMEOSTÁTICOS DEL HIERRO**

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

-Sistema homeostático del Fe:

El sistema de homeostasis del Fe es llevado a cabo por la regulación de mecanismos de absorción, almacén y reciclaje. La absorción intestinal es regulada en respuesta a las necesidades de Fe y su biodisponibilidad. Los estudios de Hahn y col.

(1943) y Stewart y col (1950) hace 4 décadas indican que una gran dosis oral de Fe, reduce la absorción más que una pequeña dosis de Fe administrada después de unas horas (Nadadur y col., 2008). Esto demuestra la inmediatez de la regulación bajo el transportador de proteínas DMT1 en el borde de cepillo (Frazer y col, 2003), sin alterar el transporte basolateral de Fe en el intestino. Estas observaciones sugieren que esos enterocitos pueden recibir señales de otros tejidos o células que están involucradas en el consumo por precursores eritroides, almacén en hepatocitos, enterocitos duodenales y macrófagos para el mantenimiento de la homeostasis.

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

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

Se ha observado que, con la sobrecarga de Fe en ratones mutantes del factor 2(USF-2), se conduce a un error en el gen de la hepcidina (HAMP) que codifica un péptido antimicrobiano, mediador de la inmunidad innata (Nicolas y col., 2001). Hay 2 genes de la hepcidina en el ratón, pero solo un gen “Hepcidina-1” parece tener actividad

biológica (Lou y col., 2004). La delección puntual en ratones o mutación en el gen en humanos resulta de la elevación del almacén de Fe corporal, presumiblemente debido a la hiperabsorción asociada con el descenso de Fe en los macrófagos titulares (Knuston y col., 2003). La deficiencia de Fe observada en ratones transgénicos que expresan la hepcidina, sugiere que este péptido interviene regulando el almacenamiento del mineral (atenuando tanto la absorción intestinal de Fe como la liberación del Fe de los macrófagos). Por otra parte, una baja expresión de la hepcidina en la carga de Fe, observada en ratones con mutaciones en el gen de TfR (TfR-hpx), sugiere que la hepcidina es también un factor en la señal de la regulación eritroide (Weinstein y col., 2002).

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

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

Morphogenetic Proteins) y SMAD (Nemeth y Ganz, 2006a; Babit y col., 2007; Pauline y col., 2009).

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

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

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

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

Los IREs son estructuras localizadas en los extremos UTRs 5' y 3' de mRNA con gran parecido estructural. Los IREs en general tienen seis nucleótidos en el extremo apical del lazo con una secuencia de acuerdo general de 5'-CAGUGN-3' (Hentze y col.,

1988; Nadadur y col., 2008). Las proteínas citosólicas reconocen y unen los IREs a las proteínas llamadas reguladoras de Fe (IRP-1 y IRP-2), que controlan la expresión de genes que contienen los IREs. EL IRP1 fue reconocido como compañero de la aconitasa mitocondrial debido a su capacidad de unión al cluster [Fe-4S] (Rouault, 2006).

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

En condiciones de deficiencia de Fe, las IRPs activan la unión de la IRE y estabilizan al ARNm-TfR1, simultáneamente disminuyen la traducción de ARNm-ferritina, por consiguiente aumentando la respuesta de la disponibilidad de Fe en la célula. Por el contrario, cuando los niveles de Fe son altos, la unión de la IRE estará disminuida facilitando la traducción de ARNm-ferritina, disminuyendo la estabilidad del ARNm-TfR1 y conduciendo la respuesta a la captura de Fe. La mayoría de estos mecanismos reguladores son estudiados in vitro y su papel in vivo no está claro.

Los estudios con ratones knockout con bloqueo en IRP-1 o IRP-2 en el establecimiento de su papel son inconcluyentes (Hentze y col., 2004). Los mediadores inflamatorios como TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$  se ha visto que también regulan la expresión de

proteínas implicadas en la homeostasis celular del Fe (ferritina, TfR-1), incluyendo el DMT-1 por mecanismos IRP1/IREs (Torti y Torti, 2002; Ludwiczek y col., 2003).

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



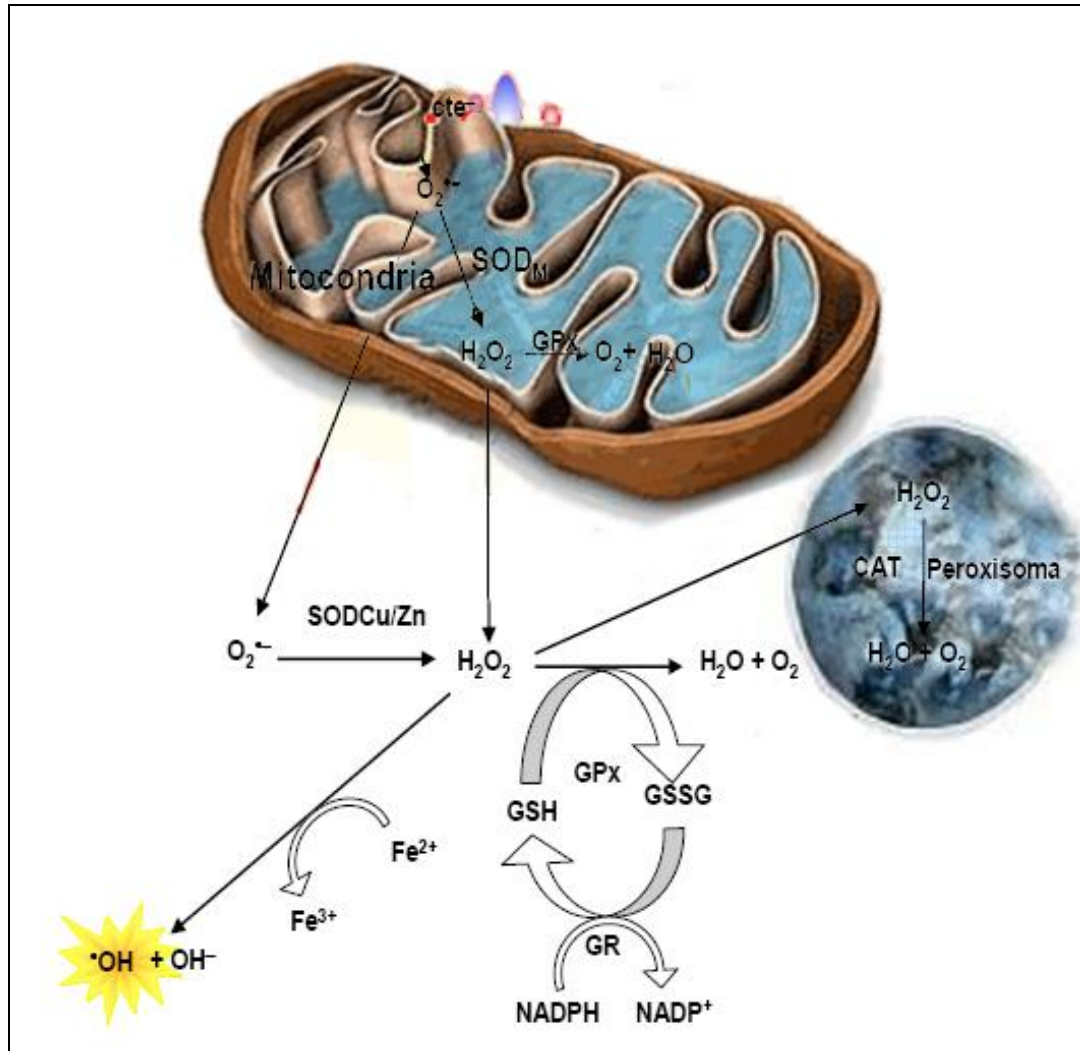
## **2.3. RADICALES LIBRES Y MECANISMOS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE**

### **2.3.1. INTRODUCCIÓN**

Los radicales libres son especies químicas con electrones desapareados que les confieren gran reactividad química, esto les conducirá a interactuar rápidamente con cualquier molécula biológica con la que entren en contacto. Por su avidez para aceptar electrones de las moléculas diana, los radicales libres pueden modificar la estructura y/o función de éstas, pudiendo actuar así sobre componentes estructurales como la membrana plasmática y sobre procesos críticos intracelulares, entre los que se incluyen la maquinaria genética y diversos procesos enzimáticos (Halliwell y Chirico, 1993; Cheeseman y Slater, 1993; Liu y col., 2002; Murphy, 2009).

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

**Figura 6.** Formación de radicales libres y su eliminación por sistemas defensivos enzimáticos.



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

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

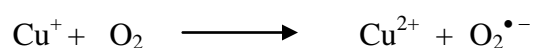
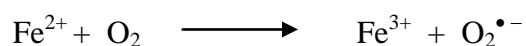
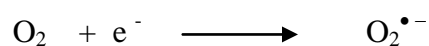
La actividad como agente prooxidante de un radical libre depende de su reactividad, especificidad, selectividad y difusibilidad (Cheeseman y Slater, 1993; Lindsay y col., 2002).

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

RADICAL	NOMBRE	SUSTRATO	VIDA MEDIA
HO•	Hidroxilo	Cualquier molécula	10-9 s
RO•	R-oxilo	LH (linoleato)	10-6 s
ROO•	R-peroxilo	LH	7 s
ROOH	Hidroperóxido	LH	-
L•	Linoleil	LH	10-6 s
O <sub>2</sub> • <sup>-</sup>	Superóxido	Enzimas	Dismutación espontánea y enzimática
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno	LH	Estable; Reducción enzimática
NO•	Nitroxilo	LH	5-6 s, 0,1 s (en corazón)
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Singlete	H <sub>2</sub>	10-6 s

### 2.3.2.1. ANIÓN SUPERÓXIDO

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

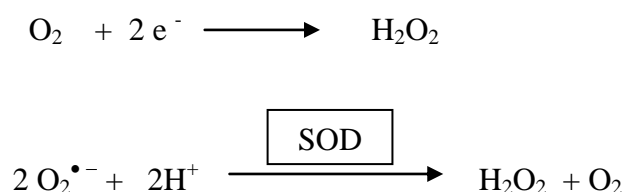


El anión superóxido, a pesar de no ser particularmente dañino, su importancia es como fuente de peróxido de hidrógeno y como reductor de metales de transición. La principal fuente de esta especie reactiva se produce en la mitocondria de forma accidental a nivel de los complejos I y III de la cadena de transporte electrónico, describiéndose que de 2-5% del oxígeno se reduce incompletamente hasta éste radical. Debido a que la formación de esta especie depende del flujo de la cadena de transporte de electrones, cualquier situación que aumente el consumo de O<sub>2</sub>, aumentará proporcionalmente la generación del anión superóxido (Finkel y Holbrook, 2000; Camougrand y Rigoulet, 2001; Barbi de Moura y col., 2010).

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

### 2.3.2.2. PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

La génesis del peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) proviene de la reducción espontánea con dos electrones del oxígeno, pudiendo ser también generado en los sistemas biológicos por la reacción de dos moléculas de anión superóxido, catalizada por la superóxido dismutasa:

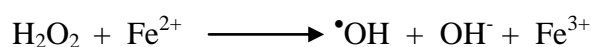


El peróxido de hidrógeno no es un radical libre pero está dentro de las especies reactivas derivadas del oxígeno y envuelto en la producción de otros radicales libres. En presencia de iones metálicos produce el más reactivo y dañino radical, el hidroxilo (Cheeseman y Slater, 1993; Lindsay y col., 2002).

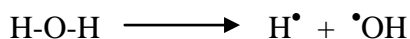
### 2.3.2.3. RADICAL HIDROXILO

El radical hidroxilo es extremadamente oxidante ya que reacciona con cualquier tipo de biomolécula (Halliwell y Gutteridge, 1989; Barbi de Moura y col., 2010). No tiene gran poder de difusión y su vida media es corta, produciendo gran daño a moléculas alrededor del lugar de producción. Los mecanismos de generación de este radical son:

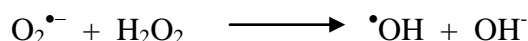
(a) Por la descomposición del peróxido de hidrógeno en presencia de metales de transición, principalmente hierro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) (Aust y col., 1985; Minotti y Aust, 1987; Soule y col., 2007; Wilcox y Pearlman, 2008) y cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) (Auroma y col., 1991). En el caso del hierro se trata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



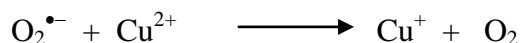
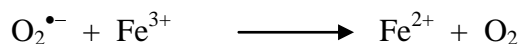
(b) Cuando se exponen los tejidos a radiaciones  $\gamma$ , la mayor parte de la energía captada es absorbida por el agua de las células. Se produce entonces la separación de una de las uniones covalentes entre el oxígeno y el hidrógeno del agua, dejando un único electrón en el hidrógeno, formando el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



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



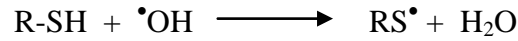
La reacción de Haber-Weiss, se podría entender como el resultado de la unión o colaboración de Fenton con la capacidad del ión superóxido para reducir metales iónicos de transición:



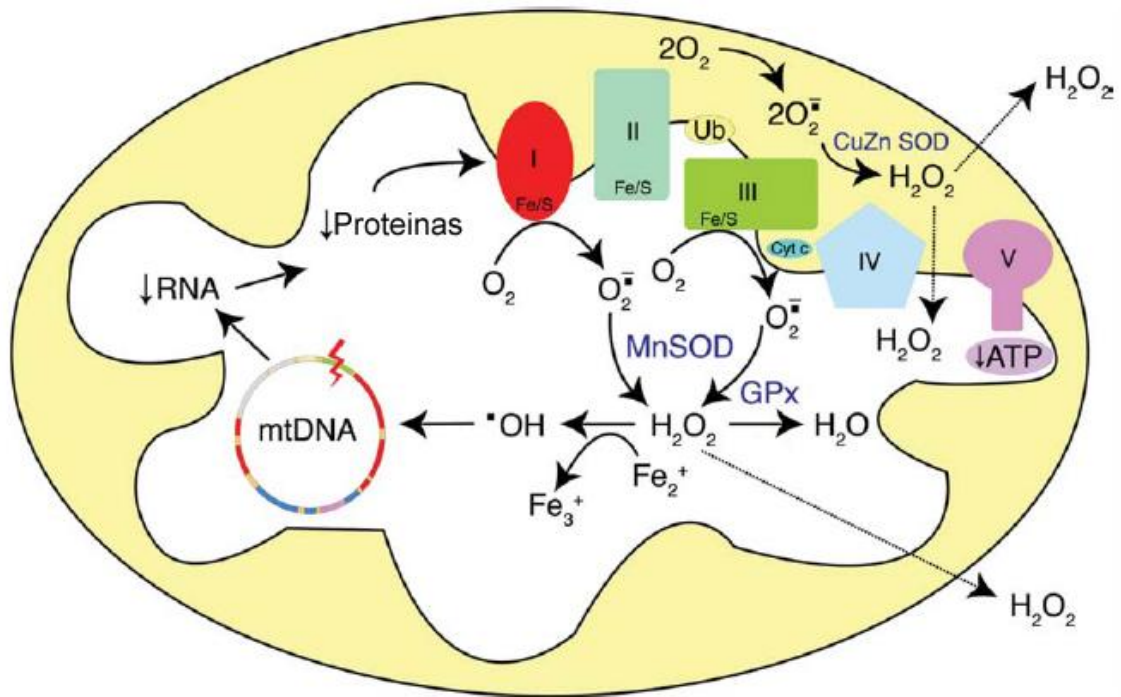
Los radicales hidroxilo son los más reactivos que se conocen en química, teniendo capacidad para reaccionar con las bases púricas y pirimidínicas del ADN (Cadenas y col., 2000; Remmen y Richardson, 2001; Halliwell, 2001; Barbi de Moura y col., 2010).

Otros radicales libres importantes son los radicales que se centran en el átomo de carbono ( $\text{R}^\bullet$ ) formados a partir del ataque sobre moléculas (RH) como los lípidos. Producen la peroxidación lipídica y atacan las cadenas de ácidos grasos, ácidos nucleicos, carbohidratos o proteínas. Estas ERO reaccionan rápidamente con el oxígeno

para formar el radical peroxilo ( $\text{ROO}^\bullet$ ). Y a su vez estos pueden reaccionar y generar radicales alcoxilo ( $\text{RO}^\bullet$ ). Átomos con sulfuro también son atacados por radicales libres para producir el radical thiilo ( $\text{RS}^\bullet$ ), formado a partir de la oxidación del glutation (Asmus, 1983):



**Figura 7.** Modelo esquemático de la producción de EROs a nivel mitocondrial (modificado de Barbi de Moura y col., 2010)



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

radicales hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ). Este radical ataca fácilmente las moléculas, incluyendo el mtDNA y consecuentemente altera la expresión de proteínas mitocondriales necesarias para la síntesis de ATP (Barbi de Moura y col., 2010).

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

#### **2.3.3.1. EFECTOS SOBRE LOS LÍPIDOS. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA (PL)**

La peroxidación lipídica es la destrucción de los ácidos grasos poliinsaturados en una reacción autocatalítica e incontrolada donde se forman hidroperóxidos y productos secundarios (Halliwell y Chirico, 1993). Las membranas biológicas y las lipoproteínas plasmáticas son susceptibles de peroxidación porque contienen los sustratos necesarios para ello, como el ácido linoleico, araquidónico y docosahexaenoico (Cheeseman y Slater, 1993; Lindsay y col., 2002).

En la PL se produce la oxigenación de AG poliinsaturados (con 18 ó más átomos de carbono y con dos o más dobles enlaces conjugados en cis tanto en la forma libre como esterificada) generándose peróxidos de AG (Niki, 1987).

La peroxidación de los ácidos grasos modifica la estructura molecular de los lípidos que los contienen y provoca un cambio conformacional que será más importante cuando los lípidos sean integrantes de membranas y sobre todo en la membrana mitocondrial ya que el mal funcionamiento de la fosforilación oxidativa se asocia a destrucción de la membrana por alteraciones en la fluidez y la pérdida de AG (Muggli, 1993; Lenaz, 1998).



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

Clásicamente el proceso de peroxidación lipídica consta de tres etapas:

A) Iniciación:

El mecanismo más frecuente tiene lugar a partir de los radicales hidroxilo, generados a través de la vía de Fenton (Soule y col., 2007; Wilcox y Pearlman, 2008). La PL comienza con la sustracción de un átomo de H de un ácido graso (LH) para formar un radical lipídico ( $L^{\bullet}$ ). El radical iniciador debe ser una especie lo suficientemente oxidante para reaccionar con los AG poliinsaturados, por ejemplo el radical hidroxilo ( $^{\bullet}\text{OH}$ ) la mayoría de los radicales peroxilo ( $\text{ROO}^{\bullet}$ ) y la mayoría de los alcoxilo ( $\text{RO}^{\bullet}$ ). El radical anión superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), no es lo suficientemente oxidante, pero su forma protonada ( $\text{HO}_2^{\bullet}$ ) si es capaz de promover la iniciación, si bien, a pH fisiológico se

encuentra a bajas concentraciones. Algunos complejos metálicos también son capaces de iniciar la peroxidación (Halliwell y Chirico, 1993).

Existe otro mecanismo de iniciación de las reacciones de peroxidación, como es la ruptura de enlaces químicos por acción fotolítica (Elgendy y Abou-Seif, 1998). No se debe olvidar el papel de las radiaciones ionizantes como mecanismo iniciador del daño tisular. Es un hecho suficientemente conocido no sólo en la patología clínica, sino también en la industria de síntesis de polímeros, el papel de las radiaciones ionizantes y las especies intermediarias reactivas en dichos procesos (Bertsche, 1984).

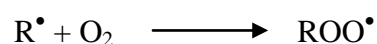
Finalmente, hay que mencionar el papel de las reacciones tóxicas desencadenadas por diversos xenobióticos como el tetracloruro de carbono, o fármacos antitumorales como la adriamicina, en cuyo mecanismo de acción farmacológica está implicada la formación de especies moleculares activadas (Valls-Bellésy col., 1994).

El producto de la reacción da rápidamente un dieno conjugado que reacciona rápidamente para formar un radical peroxilo ( $\text{LOO}^\bullet$ ). Este radical puede reaccionar con otros e iniciar una nueva cadena, que formará un hidroperóxido lipídico (LOOH) sobre el original AG poliinsaturado, considerado el primer producto de peroxidación.

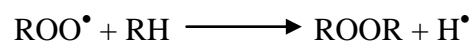
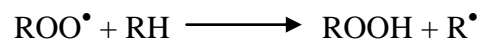
La peroxidación lipídica en membranas biológicas provoca desajustes en el funcionamiento de las mismas, cambios de la fluidez, inactivación de enzimas y receptores ligados a la membrana, así como un aumento no específico de la permeabilidad a iones tipo calcio (Halliwell y Chirico, 1993; Littarru y Battino,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

B) Propagación:

La propagación implica inicialmente la reacción del radical lipídico centrado en el átomo de carbono con oxígeno molecular para generar un radical peroxilo, altamente reactivo (Girotti, 1985):



El radical peroxilo formado va a atacar a cualquier compuesto peroxidable que esté a su alcance. Puede actuar sobre una molécula lipídica, generando un nuevo radical centrado en el carbono, que iniciaría a su vez la cadena de propagación; también puede actuar adicionándose a un doble enlace:



Los hidroperóxidos poliinsaturados se oxidan generando gran número de productos de reacción monoméricos y poliméricos (Cheeseman y Slater, 1993; Lindsay y col., 2002). La magnitud de la cadena de propagación depende de muchos factores, entre ellos el índice de lípidos/proteínas de la membrana (a mayor cantidad de proteína mayor nivel de reacción con ella), la composición en ácidos grasos, la concentración de oxígeno, así como la presencia de antioxidantes que rompen la cadena de reacciones de la peroxidación lipídica (Halliwell y Chirico, 1993).

Esta etapa tiene la capacidad aparente para consumir todos los ácidos grasos disponibles en un sistema, aunque esto no suele ocurrir, gracias a las reacciones de terminación. Es obvio por tanto el daño potencial de la peroxidación lipídica (Cheeseman y Slater, 1993; Lindsay y col., 2002).

### C) Terminación:

Las células tienen defensas contra los radicales libres como la eficiencia de la cadena de transporte de electrones, para evitar la escapada de éstos y la formación de  $O_2^{\bullet-}$ . El cual es eliminado por la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa.

Las defensas antioxidantes juegan un papel preventivo en la peroxidación lipídica (Viña y col., 1993). Las células vivas poseen una significativa defensa que es la glutatión peroxidasa selenio dependiente (Wendel, 1993) la cual reduce los hidroperóxidos lipídicos a ácidos grasos hidroxilados. Es activa frente a hidroperóxidos de ácidos grasos libres pero no de los unidos a fosfolípidos, con lo cual, necesita la acción de la fosfolipasa A2. También se ha descrito una glutatión peroxidasa que no necesita previa acción de esta enzima, se trata de una enzima dependiente de fosfolípido la cual actúa sobre hidroperóxidos de fosfolípidos y es exclusiva de membrana mitocondrial (Ursini y Bindoli, 1987).

La transferrina y la ferritina secuestran metales, lo que hace inviable la rotura de hidroperóxidos (Halliwell y Gutteridge, 1986; Auroma y col., 1991). La ceruloplasmina también juega un papel importante al unir cobre y oxida al hierro a su forma férrica que es menos reactiva (Halliwell y Gutteridge, 1984).

Una forma de apagar la cadena es utilizando antioxidantes por ejemplo,  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -tocoferol y ubiquinona. La vitamina E intercepta un radical peroxilo y se convierte en un radical libre fenoxilo. Éste radical puede interceptar otro igual y terminar la reacción y también puede regenerarse con ascorbato o glutatión (Kelso y col., 2002; Lenaz y col., 2002, Miyadera y col., 2002).

El  $\alpha$ -tocoferol está presente en las membranas en proporción 1/100 AG poliinsaturados, siendo muy efectivo por varias razones, por su cola liposoluble que hace que se intercale en la membrana, por la estabilidad del radical que previene la iniciación y su capacidad para regenerar la membrana (Viña y col., 1993).

La finalización de la serie de reacciones en cadena, puede producirse por el emparejamiento de dos radicales o por transferencia de un grupo entre ambos y también cabe la posibilidad de que la reacción de dos peróxidos lipídicos de lugar a la formación del singlete de oxígeno (Halliwell y Chirico, 1993; Cheeseman y Slater, 1993; Lindsay y col., 2002).

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

Las proteínas también son objeto de daño oxidativo alterándose su funcionamiento normal y por tanto su actividad biológica (Cheeseman y Slater, 1993; Melov, 2002). Alteraciones como fragmentación, agregación y susceptibilidad a la degradación proteolítica (Griffiths y cols., 1989). Así es conocida la fragmentación de la albúmina (Marx y Chevion, 1986) colágeno y  $\gamma$ -globulina (Wolf y Dean, 1986) como consecuencia del daño oxidativo. Los daños oxidativos en las proteínas originan

agregación de las mismas por desnaturalización, tal y como ocurre en la ceruloplasmina (Cheeseman y Slater, 1993; Lindsay y col., 2002). Otro ejemplo de la importancia de la oxidación de proteínas lo representan las LDL o lipoproteínas de baja densidad, donde las histidinas y lisinas son modificadas por oxidación, lo que causa una alteración en el reconocimiento del receptor. (Griffiths y col., 2002).

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

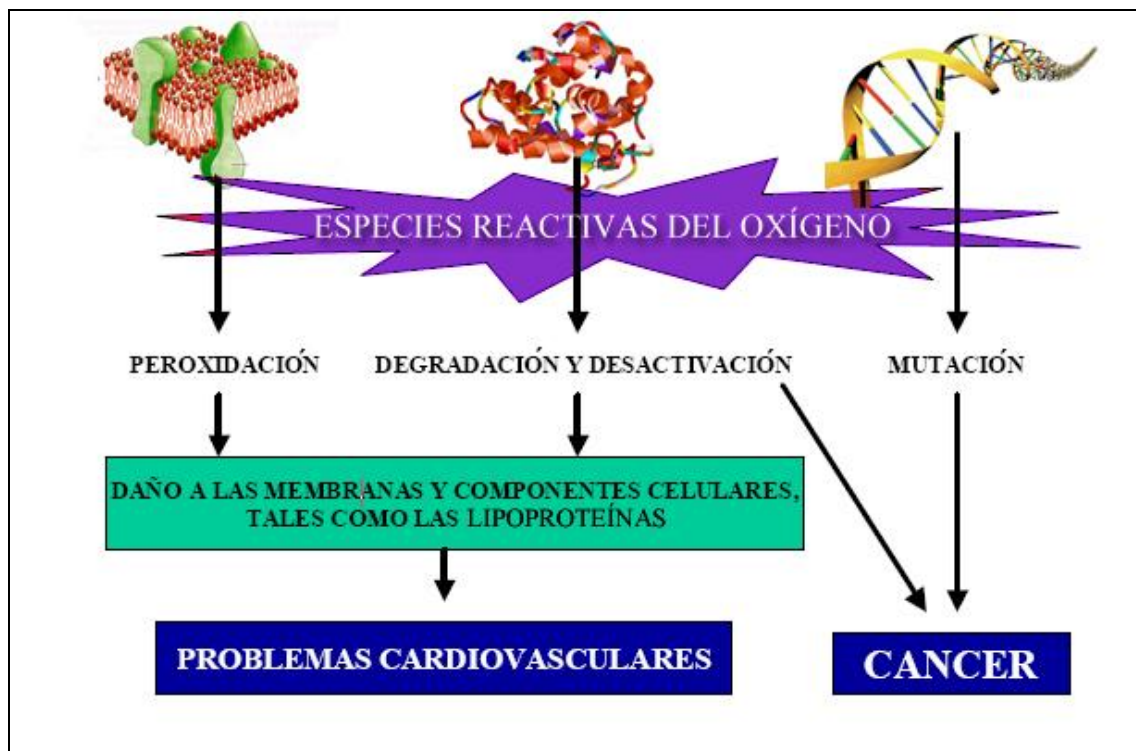
La oxidación proteica causa un aumento de la degradación proteolítica, incrementando la actividad de atrapadores de EROs. Además los procesos de oxidación proteica introducen frecuentemente nuevos grupos funcionales como grupos hidroxilos y grupos carbonilos, que contribuyen a alterar la movilidad y la función proteica. Una mejora en la caracterización de los efectos ha permitido identificar varios procesos secundarios que incluyen la fragmentación, el entrecruzamiento y el desdoblamiento, que puede acelerar o impedir la proteólisis mediada por proteosomas, de acuerdo con la gravedad del daño oxidativo (Griffiths y col., 2002).

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

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

La acumulación de lesiones del ADN nuclear (fragmentaciones y deleciones) producidas por los agentes endógenos, producen alteraciones somáticas que contribuyen al envejecimiento. Según la teoría de los radicales libres la acumulación de ERO y el daño que producen sobre el ADN puede ser la causa fundamental de los cambios fisiológicos asociados al envejecimiento. El ADN nuclear aislado de varios tejidos de ratas muestran un aumento del daño oxidativo con la edad, medido con el biomarcador 8-OH-dG (Lenaz, 1998). En una célula humana cualquiera, alrededor de 500 bases sufren daño oxidativo cada día. De estas lesiones oxidativas, las más peligrosas son las roturas de doble hélice, ya que son difíciles de reparar y pueden producir mutaciones puntuales, inserciones y deleciones de la secuencia de ADN, así como translocaciones cromosómicas (Valerie y Povirk, 2003).

**Figura 8.** Esquema de los daños causados por las EROs en las biomoléculas.



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

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

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



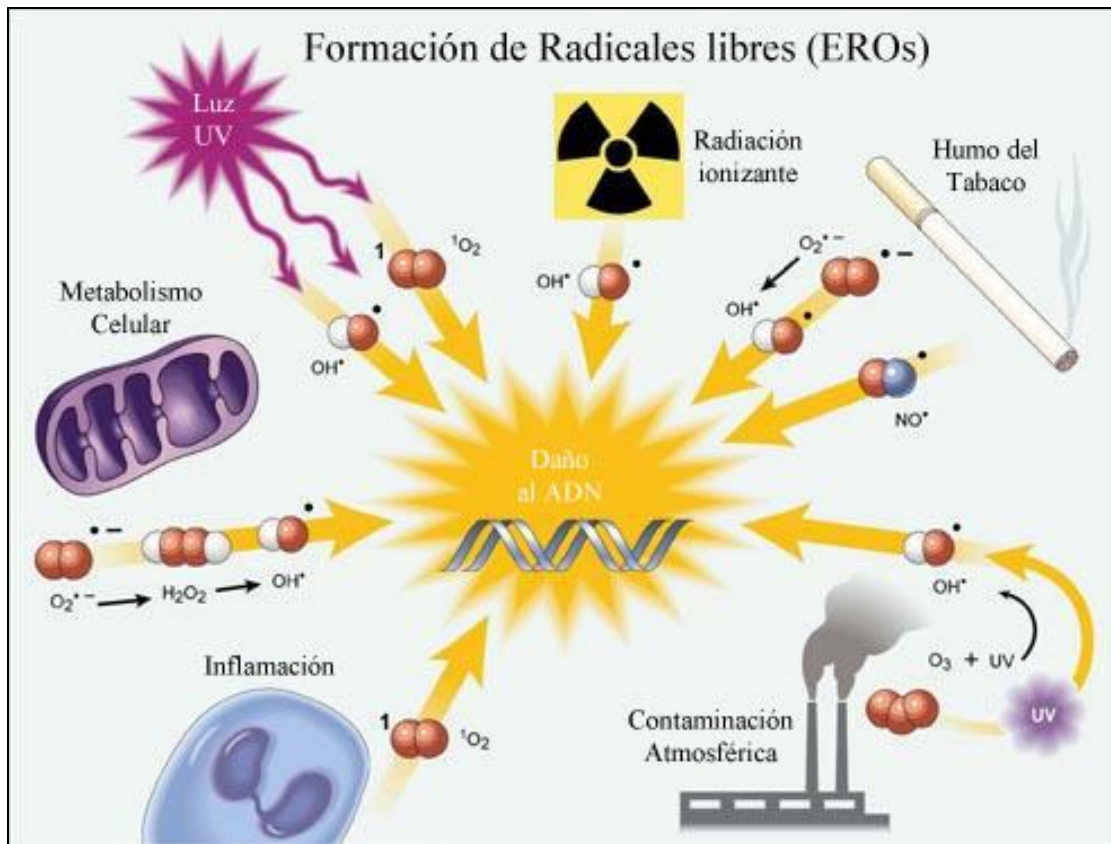
digestivo y trastornos degenerativos del sistema nervioso como el Parkinson o el Alzheimer (Multhaup y Rupper, 1997; Kester y Scheltens, 2009).

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

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

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

**Figura 9.** Principales fuentes generadoras de radicales libres (EROs).



## 2.4. SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE

### 2.4.1. INTRODUCCIÓN

Una sustancia se define como antioxidante cuando es capaz de disminuir o inhibir el daño oxidativo sobre una molécula. Para la desintoxicación de ERO los organismos han desarrollado numerosos tipos de sistemas defensivos de prevención, interceptación y reparación, formados por atrapadores y sustancias neutralizantes no enzimáticas, así como por sistemas enzimáticos entre los que están las superóxido dismutasas, glutatión peroxidasas y la catalasa, entre otras. También otros sistemas

importantes son las reacciones de regeneración y el sistema del glutatión (Camougrand y Rigoulet, 2001; Navarro y cols., 2001).

Como se ha mencionado anteriormente, en la célula se forman continuamente radicales libres frente a los cuales se debe actuar, por ejemplo: 1) formación de  $O_2^{\bullet-}$  en la cadena de transporte electrónico y citocromo  $P_{450}$ , por reacciones de autooxidación y por la acción de ciertas enzimas como la xantina-oxidasa, 2) formación de  $H_2O_2$  por dismutación del  $O_2^{\bullet-}$  y la acción de ciertas oxidasas, 3) formación de  $HO^{\bullet}$  por continua exposición a bajas radiaciones (Lenaz, 1998).

Los sistemas defensivos pueden actuar capturando la mayor cantidad posible de metales como el hierro y cobre en proteínas almacenadoras o transportadoras (Halliwell y Gutteridge, 1999). Un ejemplo es la transferrina, que tiene capacidad de unirse al hierro plasmático de humanos, la ceruloplasmina y la albúmina al cobre plasmático (Gutteridge y Halliwell, 1994).

El ácido ascórbico también es un antioxidante importante, pero sólo en ausencia de iones metálicos, ya que se ha comprobado que en pacientes con sobrecarga de hierro, en cuya sangre circulan quelatos de iones de hierro y citrato, pueden presentar lesión hepática, diabetes, artropatía y hepatoma (Cheeseman y Slater, 1993; Viña y col., 1993).

## 2.4.2. MECANISMOS CELULARES DE DEFENSA ANTIOXIDANTE

### 2.4.2.1. SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD)

La enzima superóxido dismutasa (SOD) fue descrita por McCord y Fridovich en 1968. Está presente en la mayoría de los organismos aeróbicos y contiene en su estructura metales esenciales para su función catalítica, según los cuales hay varios tipos que catalizan la misma reacción (Gutteridge y Halliwell, 1994; Barbi de Moura y col., 2010).

**Tabla 4.** Tipos de SOD (modificado de Gutteridge y Halliwell, 1994)

METAL PRESENTE	ORGANISMOS	LOCALIZACIÓN SUBCELULAR
<b>Cobre y Zinc (Cu/Zn SOD)</b>	Células eucariotas nucleadas	Citosol, núcleos, peroxisomas
<b>Manganeso (Mn SOD)</b>	Bacterias y células aerobias eucariotas	Mitocondrias y citosol
<b>Hierro (Fe SOD)</b>	Bacterias y plantas	No en humanos

Los metales de la SOD reaccionan con  $O_2^{\bullet-}$  y con  $H^+$ , para formar  $H_2O_2$  y  $O_2$ . La escisión no enzimática del  $O_2^{\bullet-}$  ocurre también lentamente a pH 7.4, pero la enzima la acelera 10.000 veces (Fridovich, 1974):

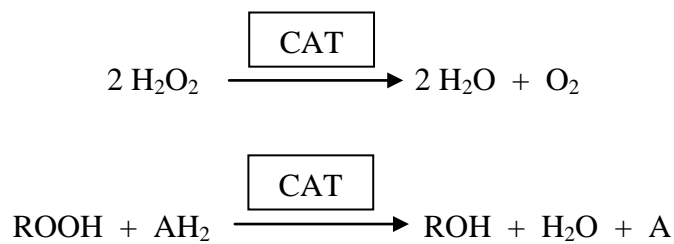


En humanos, la Mn SOD mitocondrial elimina el  $O_2^{\bullet-}$  producido por la cadena de transporte de electrones y por las oxidasas de dicho orgánulo celular. La Cu,Zn SOD

elimina el  $O_2^{\bullet-}$  de oxidasas citosólicas y de las enzimas del citocromo  $P_{450}$  presentes en el retículo endoplásmico de la célula. Algunas Cu,Zn SOD pueden estar presentes en peroxisomas. La SOD debe actuar en conjunto con otras enzimas que descompongan el  $H_2O_2$ , porque puede éste formar  $HO^{\bullet}$  cuando contacta con iones metálicos produciendo daño tisular. A su vez altos niveles de  $H_2O_2$  pueden inhibir a la enzima (Cheeseman y Slater, 1993; Melov, 2002).

#### 2.4.2.2. CATALASA (CAT)

La catalasa es una enzima presente en la mayoría de los tejidos de mamíferos que se encuentra localizada en pequeñas orgánulos llamados peroxisomas (80%) y en citosol (20%), aunque también en tejido cardíaco se halla en la mitocondria a baja concentración (Roberfroid y Buc-Calderon, 1995) donde ejerce un importante papel antioxidante (Radi y cols., 1993). La catalasa elimina el  $H_2O_2$  rompiéndolo directamente hasta  $O_2$ . También tiene actividad peroxidante (Aebi, 1984) produciendo la oxidación de donadores de hidrógeno como el etanol, metanol, ácido fórmico y fenoles con el consumo de un mol de peróxido:

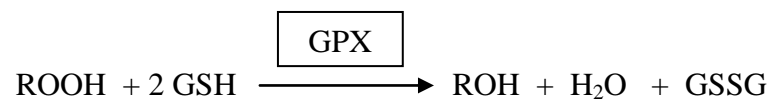


La actividad predominante depende de la concentración del donador de hidrógeno y de la concentración o producción de  $H_2O_2$  en el sistema. La catalasa tiene enorme capacidad para destruir el  $H_2O_2$ , es una de las enzimas más activas conocidas.

De todas formas su afinidad por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es también baja y necesita elevadas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para actuar rápidamente (Cheeseman y Slater, 1993; Roberfroid y Buc-Calderon, 1995).

#### 2.4.2.3. GLUTATION PEROXIDASA (GPx)

Se trata de una familia de enzimas que utilizan glutatión (GSH) como donador de hidrógeno y que pueden aceptar otros peróxidos orgánicos además del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como sustratos (Flohé y Gunzler, 1984; Wendel, 1993; McCord, 2000). El radical R puede ser un grupo alifático, un grupo orgánico aromático o simplemente H. Los productos de reacción son H<sub>2</sub>O y un alcohol (ROH) o una segunda molécula de H<sub>2</sub>O, cuando el sustrato es H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:



Los tejidos humanos contienen glutatión peroxidasa, como la mayor enzima eliminadora de peróxidos. La regeneración del glutatión oxidado es efectuada por la enzima glutatión reductasa:



Hay dos grandes grupos de glutatión peroxidasa, un primer grupo contiene selenocisteína en su centro activo, siendo una enzima activa frente a hidroperóxidos y a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el segundo grupo de enzimas no depende de Se para su catálisis y no es activa

frente a  $H_2O_2$  (Lawrence y Burk, 1976; Flohé y Gunzler., 1984; Rayman, 2000; Bügel y col., 2001).

Flohé y Schlepel (1971) hallaron GPX en humanos, su localización subcelular es a nivel de citosol y de matriz mitocondrial para los dos tipos y aunque tiene mayor afinidad por el  $H_2O_2$  que la catalasa (Roberfroid y Buc-Calderon, 1995), presenta menor actividad que ésta a elevadas concentraciones. Esto podría implicar que la GPX está más adaptada a eliminar el  $H_2O_2$  que se produce en la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Esta enzima puede reducir peróxidos lipídicos, por tanto es muy importante para el mantenimiento de la estructura y función de las membranas biológicas (McCord, 2000; Barbi de Moura y col., 2010).

## **2.5. CARACTERÍSTICAS NUTRICIONALES DE LA LECHE DE CABRA**

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

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

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

La leche de cabra ha sido un componente esencial de la “dieta mediterránea” desde sus orígenes (los murales egipcios o los textos bíblicos hablan de su consumo)



especialmente mediante su transformación en queso. Tradicionalmente se ha dado a bebés y niños que no podían tomar leche materna y no toleraban la de vaca.

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

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

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

Estudios en niños han demostrado que los resultados obtenidos en cuanto a ganancia de peso, aumento en la estatura, mineralización esquelética, densidad de hueso y contenido de vitaminas en sangre (vitamina A, niacina, tiamina y riboflavina) son superiores cuando se suministra una alimentación con leche de cabra (Chacón, 2005). No obstante, los pediatras no la recomiendan como sustituto total de la leche materna en niños menores de un año dado su alto nivel proteico y mineral, y por su bajo contenido de carbohidratos, ácido fólico y vitaminas B<sub>6</sub> y B<sub>12</sub> (Darnton y col., 1987).

### **2.5.1. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS**

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

El fuerte olor y sabor que caracteriza la leche caprina se produce como consecuencia de la absorción de compuestos aromáticos durante su manejo. Sin embargo, estas características organolépticas poco atractivas desde el punto de vista del consumo humano, pueden eliminarse en gran parte por un sencillo tratamiento de desodorización al vacío (Borrás, 1968). Sin embargo, si la leche de cabra es manipulada adecuadamente no tiene por qué producirse ese característico olor de la misma que en muchas personas provoca rechazo, ya que los los ácidos grasos de cadena media se

encuentran encapsulados dentro del glóbulo graso y las lipasas necesarias para liberarlos de los triglicéridos que los contienen se destruyen en el proceso de pasteurización. Además hay que añadir, que una vez rota la integridad de los glóbulos, la leche es más propensa a enranciarse (Chacón, 2005).

El sabor se debe, según Kim Ha y Lindsay (1991), a los ácidos grasos libres, especialmente a los de cadena ramificada 4-metiloctanoico y 4-etiloctanoico. También contribuyen al fuerte sabor de la leche caprina las mayores concentraciones de ácidos grasos caproico, caprílico y cáprico, de 6, 8 y 10 átomos de carbono respectivamente. Además, su mayor contenido con respecto a otras leches en Cl y minerales, le confieren un sabor ligeramente salobre.

Se diferencia de la leche de vaca en que ésta es ligeramente ácida, mientras que la de cabra es casi alcalina (pH 6,7), debido a su mayor contenido proteico y a las diferentes combinaciones de sus fosfatos (Saini y Gill, 1991), por lo que esta leche se utiliza en personas con problemas de acidez (Jandal, 1996).

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

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

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

La composición general de la leche de cabra varía dentro de un amplio margen dependiendo de las características genéticas propias de cada raza. Estas diferencias genéticas tienen una considerable influencia en la digestión de esta leche. Aún más, el estado y el momento de lactancia en que se hace el ordeño, así como la dieta del animal, su salud y su estado fisiológico general tiene un efecto directo sobre todos los constituyentes mayores y menores de la leche (Chacón, 2005).

De manera que el contenido graso puede variar desde un mínimo del 3,00% hasta un máximo de 6,63% la proteína desde un 2,90% hasta un 4,60%, la lactosa puede oscilar entre un 3.80-5.12% mientras que la caseína se altera menos por esos factores: 2.45-2.72% (Gnan y col., 1985; Espie y Mullan, 1990; Faria y col., 1999):

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

se reducen significativamente en los países que experimentan las cuatro estaciones (Chacón, 2005).

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

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

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

En cuanto al porcentaje de materia grasa y su composición, como ya se ha comentado, depende en gran medida de la dieta y carga genética del animal, así como de la naturaleza y composición de la dieta que recibe, puesto que ésta determina cambios en la fermentación ruminal, modificando la producción de los diferentes ácidos grasos y con ello el contenido graso de la leche. La modificación de la composición láctea en los rumiantes es más difícil que la de los animales monogástricos, debido al proceso de hidrogenación que sufre la grasa de piensos y forrajes en el rumen, incrementando el contenido de ácidos grasos saturados y reduciendo el de los esenciales en la leche. Las grasas “protegidas” suministradas en los piensos, salvan el obstáculo

del rumen y parecen una buena estrategia para mejorar la calidad láctea, aumentando el contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), con marcados efectos beneficiosos en el metabolismo lipídico humano (Sanz Sampelayo y col., 2004).

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

**Tabla 5.** Composición química de la leche de cabra en comparación con la de vaca (modificado de Sanz Ceballos y col., 2009).

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

### 2.5.2.1. PROTEÍNAS Y AMINOÁCIDOS

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

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

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

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

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

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

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

Algunos estudios prospectivos han estimado que la alergia a las proteínas de la leche de vaca afecta aproximadamente el 3-5% de los lactantes en países industrializados, aunque en nuestro país la incidencia puede ser algo más baja (García Ara y col., 2003). Infante y col., (2003) demostraron que una vez asegurada la tolerancia de estos pacientes a la proteína de la leche caprina, ésta constituye un excelente sustituto en el 25% de los niños de más de dos años de vida. Y según Haenlein (2004), en diversos estudios realizados en Francia así como en otros países, la sustitución de la leche de vaca por la de cabra produjo efectos positivos hasta en un 93%



de los niños con alergia a la leche de vaca; lo cual pone de manifiesto que la leche de cabra es más tolerable y menos alergénica (Bevilacqua y col., 2001; Lara-Villoslada y col., 2004; Sanz Ceballos, 2007). La patología se produce como consecuencia de la generación de inmunoglobulinas E al entrar en contacto con las proteínas de la leche, especialmente en niños donde éstas suelen ser las primeras proteínas extrañas con las que tienen contacto. En este sentido las  $\alpha$ -lactoalbúminas y  $\beta$ -lactoglobulinas que se encuentran en la fracción acuosa de la leche (el suero), son menos problemáticas ya que son alterables por la acción del calor, al ser termosensibles, y por lo tanto su poder alergénico se inactiva en productos tratados térmicamente como son las leches en polvo o de larga duración pasteurizadas con un sistema de ultra alta temperatura a 100 °C durante 10 segundos por UHT; sin embargo, las caseínas son termoestables a los tratamientos estándar, y por lo tanto las personas sensibles a ellas reaccionarán ante cualquier producto que las contengan aunque haya sido tratado térmicamente (Chacón, 2005).

El menor contenido de  $\alpha$ s1-caseína que caracteriza a la leche de cabra, puede contribuir al mayor valor nutritivo de la proteína de la misma, ya que el tamaño de los conjuntos de caseínas o micelas es más pequeño en la leche de cabra (50 nm) respecto a la vaca (75 nm) reduciendo el tiempo de coagulación, de manera que son más fácilmente degradadas por las proteasas mejorando el aprovechamiento de la proteína a nivel digestivo (Park, 1994; Haenlein, 2004; Park, 2006; Haenlein, 2007).

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

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

De acuerdo con Chandan y col. (1992), la concentración enzimática en las leches de cabra y vaca son bastante diferentes. La actividad proteolítica de la leche de cabra fresca es más alta que la de vaca, mientras que la actividad xantina-oxidasa (XO) es un 10% menor en la leche de cabra. La lipólisis de la leche de cabra es muy diferente a la de vaca, generándose en aquella ácidos grasos libres y productos aromáticos característicos, debidos a la distribución de la lipoprotein-lipasa (LPL) en varias de sus fracciones.

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

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

El contenido de lactosa en la leche de cabra es bajo en comparación con la leche de otras especies animales (aproximadamente de 1% a 13% menos que la de vaca y hasta 41% menos que la humana), lo cual está directamente relacionado con que esta leche presente menos problemas asociados con la intolerancia (Chacón, 2005).

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

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

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

### **2.5.2.3. LÍPIDOS**

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

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

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

La leche de cabra es más saludable que la de otros rumiantes, en gran medida, gracias a su perfil de ácidos grasos (Haenlein, 2004). Una de las principales diferencias en la composición lipídica de las leches de cabra y vaca está en el tipo de ácidos grasos que componen los triglicéridos. En la leche de cabra el porcentaje de ácidos grasos de cadena media (C6:0 caproico, C8:0 caprílico, C10:0 cáprico) es superior al de la leche de vaca (en un 46%). Así, la leche de cabra es más rica en triglicéridos de cadena media (MCT). Estos triglicéridos son una fuente de energía rápida, ya que se absorben directamente en el intestino delgado proximal y no necesitan la participación de las sales biliares para su absorción. Por ello son muy útiles en dietas para pacientes con insuficiencia pancreática, fibrosis quística, déficit o ausencia de sales biliares, hepatitis crónica o neonatal, cirrosis biliar o alcohólica, ictericia obstructiva e hiperlipoproteinemia (Boza y Sanz Sampelayo, 1997). Además, la oxidación mitocondrial de los ácidos grasos de cadena media es, en parte, independiente de los niveles de carnitina, lo cual supone una ventaja en casos de déficits de este enzima (Odle, 1997). Debido a su rápida absorción, los MCT han sido utilizados en la prevención de la obesidad. Los ácidos grasos derivados de estos triglicéridos son rápidamente oxidados en el hígado, por lo que estimulan la saciedad de forma rápida, disminuyen los depósitos de grasa y facilitan el control de peso, sin modificar el aporte energético (St-Onge y Jones 2002).

En un estudio realizado en ratas con resección intestinal del 50% de intestino delgado distal, la utilización digestiva de la grasa fue mayor en los animales que consumieron dieta elaborada a base de leche de cabra (rica en MCT), con respecto a los que consumían dieta basada en leche de vaca (Alférez y col., 2001).

La leche de cabra excede a la de vaca en la cantidad de ácidos grasos esenciales que no son sintetizados por el organismo humano como el linoleico, linolénico, araquidónico que también presentan beneficios para la salud humana (Haelein, 2004), lo cual es muy valioso en términos de la aceptación de este alimento debido a la creciente preocupación por la nutrición. Se ha demostrado que la leche de cabra es un alimento cardiosaludable, ya que reduce los niveles de LDL-colesterol, manteniendo dentro del rango fisiológico los niveles de triglicéridos, HDL-colesterol y transaminasas (GOT y GPT) (López-Aliaga y col., 2005). Varios estudios han investigado, los posibles efectos del ácido linoleico conjugado (CLA) sobre la salud humana, sus propiedades están relacionadas con isómeros específicos, con propiedades anticancerígenas (Ip y col., 1999), antiaterogénicas, (McGuire y McGuire, 2000) y antidiabéticas (tipo II) (Ryder y col., 2001), alterando la división de sustancia nutritiva y el metabolismo lipídico (Park y col., 1999), reduciendo la hiperglucemia, con modulación inmune y mejora de la mineralización de hueso (McGuire y McGuire, 2000; Pariza y col., 2001). El contenido de CLA está muy relacionado con la dieta del animal.

#### **2.5.2.4. MINERALES**

La composición mineral de las leches de cabra y vaca no presenta grandes diferencias (Haenlein, 2001). Sin embargo, es destacable la mayor cantidad de Ca, P, K, Mg y Cl, y la menor de Na y S, de la leche de cabra respecto a la de vaca (Park, 2006). Asimismo, existen estudios científicos que demuestran que la biodisponibilidad de ciertos minerales si es diferente, siendo mucho más ventajosa en la leche de cabra (Gueguen, 1996). La composición mineral de la leche depende de la especie animal y de la alimentación proporcionada.

**Tabla 7.** Contenido mineral de la leche de cabra (modificado de Sanz Ceballos y col., 2009).

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

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

absorción del metal (Van Campen, 1973). Por otra parte, el mayor contenido de ácido ascórbico (vitamina C) en la leche de cabra, contribuye a aumentar la absorción de Fe en las ratas alimentadas con dieta elaborada con leche de cabra, ya que es conocido que la vitamina C forma un quelato con este mineral que permanece soluble a un pH más alto del intestino delgado (Czajka-Narins, 1998).

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

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

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



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

La leche de la cabra contiene Se en una cantidad similar a la leche materna (13,3  $\mu\text{L}$  vs. 15,2  $\mu\text{L}$ ) y muy superior a la leche de vaca (9,5  $\mu\text{L}$ ). Este mineral se caracteriza por su acción antioxidante (USDA, 2004) puesto que actúa como cofactor de la enzima glutatión peroxidasa, implicada en los procesos de eliminación de radicales libres del organismo. Así pues, el aporte de Se es muy importante no sólo porque suele ser deficiente en el cuerpo humano, si no porque ayuda a controlar el sistema inmunológico y actúa directamente sobre ciertos virus impidiendo su multiplicación. El Se se vincula más con la parte acuosa que con la fracción grasa de la leche, pues en la leche descremada queda el 94% del Se total, del cual un 69% se asocia con la fracción de caseína (Dael y col., 1992).

#### **2.5.2.5. VITAMINAS**

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

La leche de cabra provee aproximadamente el doble de vitamina A que la leche de vaca. El alto contenido de esta vitamina, explica la ausencia de carotenoides en la

leche de cabra, pues todos estos se encuentran ya como vitamina A. A esto se suma el hecho de que la leche de cabra es muy rica en riboflavina, importante como factor del crecimiento (Chacón, 2005).

El principal inconveniente de la leche de cabra es su bajo contenido en ácido fólico (vitamina B<sub>9</sub>) en comparación con el de la leche de vaca y la humana. Algunos casos descritos de anemia megaloblástica (patología asociada al déficit de esta vitamina) en niños de 3 a 12 meses alimentados exclusivamente con leche de cabra, fue una de las razones del descrédito que sufrió la leche caprina en los años 60 y 70 (Sullivan y col., 1966). Esta carencia se debe a una glicoproteína que presenta la capacidad de unir ácido fólico y que no se encuentra en la leche de vaca (Chandan y col., 1992). Esta patología responde muy bien al tratamiento con ácido fólico. Trabajos experimentales han demostrado que la fortificación de la leche de cabra con ácido fólico no solo eleva su nivel nutricional si no que debería ser un estándar cuando esta leche se destina a dietas infantiles (Chacón, 2005).

**Tabla 8.** Composición vitamínica de las leches de cabra y vaca (modificado de Chandan y col., 1992; O'Connor, 1994).

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

#### 2.5.2.6. FACTORES BIOACTIVOS

Las poliaminas (espermidina, espermina y putrescina) son compuestos nitrogenados presentes en la leche de diferentes mamíferos que parecen jugar un papel importante en el desarrollo intestinal de los neonatos de distintas especies; su concentración en la leche varía en función del periodo de lactancia, probablemente

debido a una adaptación de las necesidades del neonato (Ploszaj y col., 1997). En la leche de vaca, la concentración de espermina y espermidina es máxima en el calostro, debido a que la capacidad de síntesis es máxima; durante el primer mes de lactancia, la concentración de estas sustancias disminuye y permanece baja hasta el final de la lactancia. Mientras que en la leche de cabra permanece estable durante todo el periodo de lactación (a excepción de la putrescina que disminuye durante las primeras semanas) y siempre los niveles son superiores a los de la leche de vaca (Ploszaj y col., 1997). Este patrón de secreción es parecido al que ocurre en la leche humana.

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

La leche de cabra también es más rica en nucleótidos. Al contrario de lo que ocurre con las poliaminas, el patrón de secreción de nucleótidos es muy similar en las leches caprina y bovina. En el calostro, la concentración es máxima, y a partir de las primeras semanas, disminuye. Sin embargo, el contenido en nucleótidos totales es siempre mayor en la leche de cabra. La leche de vaca sólo es más rica en ácido orótico (73 mg/L) (Belitz y Grosch, 1997), producto intermedio de la biosíntesis de los nucleótidos de pirimidina asociado con el síndrome del hígado graso, del que solo existen trazas en la leche humana (Jauber, 1996).

La leche de cabra es particularmente rica en la Coenzima Q, por lo que también se le ha atribuido cierta actividad anticancerígena (Chacón, 2005).

Otros factores bioactivos presentes en cantidades traza se recogen en la siguiente tabla:

**Tabla 9.** Factores bioactivos presentes en la leche de cabra (Chacón, 2005).

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





# MATERIAL Y MÉTODOS





### 3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se han empleado 180 ratas macho (*Ratus norvegicus*, raza Wistar albina), recién destetadas, procedentes del Servicio de Animales de Laboratorio de la Universidad de Granada. Los protocolos de manejo, cuidado y sacrificio de animales empleados fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de Granada y de acuerdo con las directrices comunitarias de la Unión Europea.

Tras el destete, las ratas son divididas en dos grupos experimentales. La ferredodeficiencia es inducida en uno de los grupos por la técnica desarrollada previamente por nuestro grupo de investigación (Pallarés y col., 1993): las ratas son sometidas a un periodo pre-experimental (PPE) de 40 días, en los cuales se les suministra dieta estándar AIN-93G (Reeves y col., 1993), pero con bajo contenido en Fe (5 mg Fe/kg dieta). La dieta baja en Fe utilizada para inducir la anemia se obtuvo omitiendo el Fe del suplemento mineral de la dieta. El grupo control recibió la misma dieta, pero con un contenido normal en Fe (45 mg Fe/kg dieta) (Reeves y col., 1993).

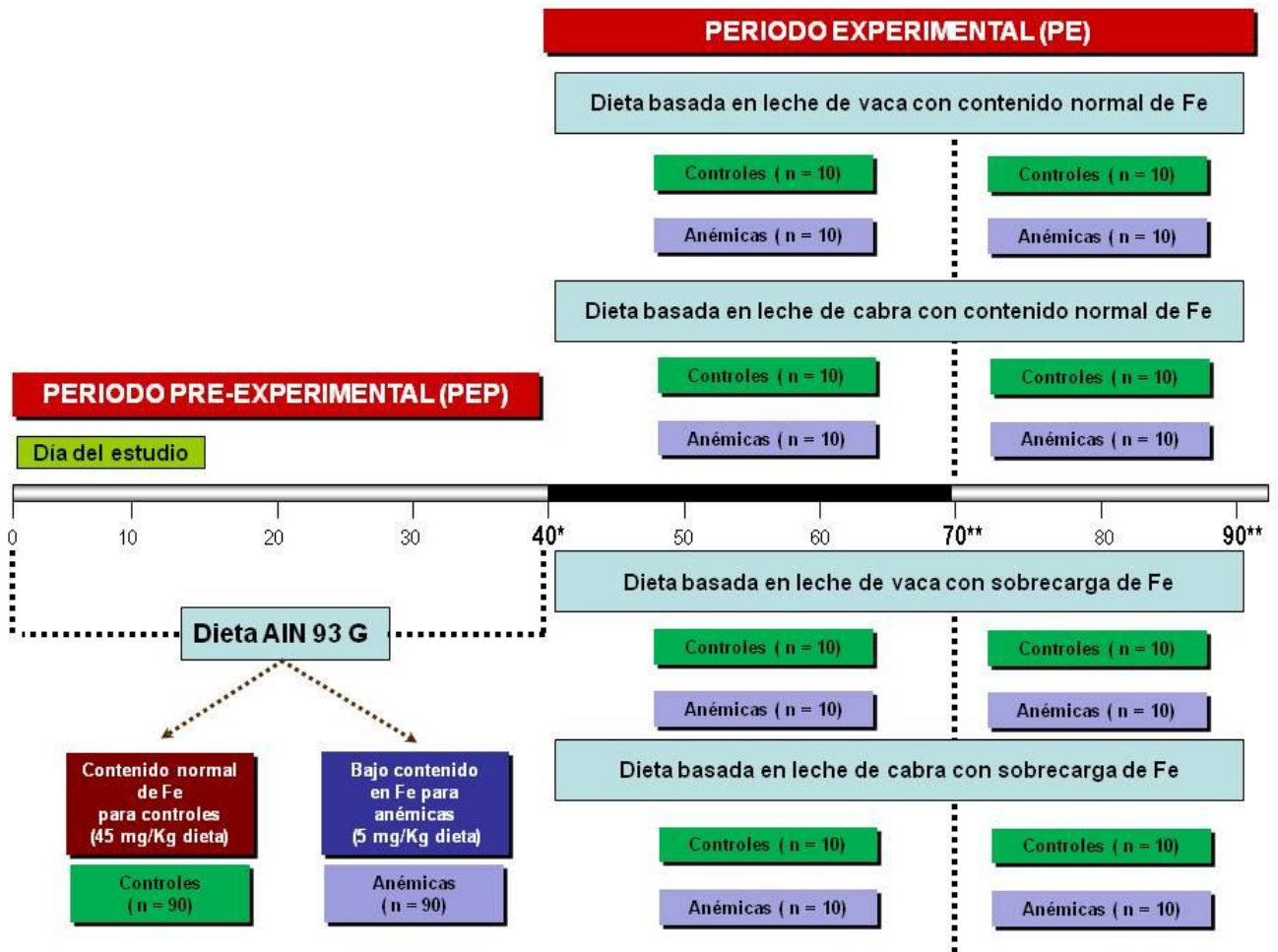
Desde el comienzo del estudio, las ratas fueron alojadas en células individuales de metabolismo. Estas células se encuentran situadas en una habitación aireada y termorregulada ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ) con fotoperíodo controlado de 12 horas (luz-oscuridad) y un 55-60% de humedad. El agua bidestilada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

de la vena caudal para el control hematológico de la anemia y se sacrifican 10 animales por grupo (10 controles y 10 anémicos) siguiendo el Protocolo del Comité de Ética de la Universidad de Granada. Se anestesia al animal con pentobarbital sódico (Sigma Diagnostics, St Louis, MI, USA) a una dosis de 5 mg/100 g de peso por vía intraperitoneal y tras laparotomía media, las ratas son desangradas mediante canulación de la aorta abdominal. Parte de sangre es obtenida con EDTA como anticoagulante, se centrifuga (1500g, 4°C, 15 min) para la obtención de plasma y se emplea para la determinación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y SOD. Otra alícuota es obtenida sin anticoagulante, para separar las células rojas del suero. Posteriormente se extraen el cerebro e hígado, se lavan con solución salina (NaCl al 0.9%) y éste último se divide en dos porciones homogéneas (una para determinar Fe que se conserva congelada a -40°C y la otra para estudiar la actividad enzimática antioxidante). Las fracciones citosólicas de hígado, cerebro y eritrocito se obtienen por centrifugación diferencial con hemolisis hipotónica el mismo día del sacrificio y se conservan congeladas a -80°C hasta posterior análisis del resto de enzimas antioxidantes (GPx y CAT).

Tras el PPE, el resto de animales (n=160) se sometieron a un periodo experimental (PE) en el cual, los grupos controles y anémicos eran divididos en cuatro subgrupos, alimentados durante 30 ó 50 días con 4 tipos diferentes de dieta: basadas en leche de vaca o cabra, y con contenido normal (45 mg/kg dieta) o sobrecarga de Fe (450 mg/kg dieta). La dosis de 450 mg Fe/kg dieta es la más común para inducir la sobrecarga crónica de Fe en estudios animales (Raja y col., 1994). Posteriormente, durante el PE, los animales son sacrificados (siguiendo el Protocolo del Comité de Ética de la Universidad de Granada) en cada periodo experimental (n=80) en el día 70 y el resto (n=80) en el día 90 del estudio. Se anestesian los animales del mismo modo que en el PPE

y tras laparotomía media, las ratas son desangradas. Parte de sangre es obtenida con EDTA como anticoagulante, para la obtención de plasma que se emplea para la determinación de TBARS. Otra alícuota es obtenida sin anticoagulante, para obtener suero. Posteriormente, se extraen el hígado y cerebro. El hígado se divide en dos porciones homogéneas, una para determinar Fe, que se conserva congelada a  $-40^{\circ}\text{C}$  y la otra para estudiar la actividad enzimática antioxidante. Las fracciones citosólicas de hígado, cerebro y eritrocito se obtienen por centrifugación diferencial con hemólisis hipotónica el mismo día del sacrificio y se conservan congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta posterior análisis de enzimas antioxidantes (GPx, SOD y CAT). La figura 10 muestra el diseño experimental del estudio.

**Figura 10.** Diseño experimental del estudio



Leyenda de la figura 10:

\* Toma de sangre de la vena caudal para el control hematológico de la anemia y sacrificio de 10 animales por grupo para extirpación de hígado y cerebro, determinación de Fe hepático, relación hepatosomática, TBARS y mecanismos de defensa antioxidante (GPx, SOD y CAT)

\*\* Sacrificio de los animales para extirpación de hígado y cerebro, determinación de Fe hepático, TBARS y mecanismos de defensa antioxidante (GPx, SOD y CAT).

### 3.2. DIETAS ENSAYADAS

La Tabla 10 muestra la composición de las dietas ensayadas durante el PPE y PE.

**Tabla 10.** Dietas ensayadas durante el PPE y PE

<b>COMPONENTE</b>	<b>CANTIDAD (g/kg)</b>
<b>PPE</b>	
<b>Dieta AIN 93 G (contenido normal o bajo contenido en Fe)<sup>a</sup></b>	
Caseína	200
Aceite de Oliva Virgen	100
Almidón de trigo	501
Ingredientes constantes <sup>b</sup>	199
<b>PE</b>	
<b>Dietas con leche de vaca (contenido normal o sobrecarga de Fe)<sup>c</sup></b>	
Proteína de leche de vaca	200
Lactosa de leche de vaca	353
Grasa de leche de vaca	100
Almidón de trigo	148
Ingredientes constantes <sup>b</sup>	199
<b>Dietas con leche de cabra (contenido normal o sobrecarga de Fe)<sup>c</sup></b>	
Proteína de leche de cabra	200
Lactosa de leche de cabra	341
Grasa de leche de cabra	100
Almidón de trigo	160
Ingredientes constantes <sup>b</sup>	199

Leyenda de la Tabla 10:

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

<sup>b</sup>Los ingredientes constantes (g/kg dieta) fueron: fibra (celulosa micronizada) 50, sacarosa 100, Cloruro de colina 2.5, L-cistina 1.8, corrector mineral 35, corrector vitamínico 10. El corrector vitamínico se preparó de acuerdo a las directrices del Instituto Americano de Nutrición (Reeves y col., 1993). El corrector mineral se preparó de acuerdo a las recomendaciones del Instituto Americano de Nutrición (Reeves y col., 1993) para las dietas en el PPE. Para las dietas basadas en leche de vaca y cabra empleadas en el PE se formularon correctores minerales específicos teniendo en cuenta el contenido mineral que aportaban las leches para alcanzar las citadas recomendaciones.

<sup>c</sup>Contenido de Fe en la dieta durante el PE: Las dietas se prepararon de acuerdo a las recomendaciones del del Instituto Americano de Nutrición (Reeves y col., 1993) para los grupos control (45 mg/kg dieta) y con elevado contenido en Fe (450 mg/kg dieta) para los grupos de sobrecarga (Raja y col., 1994).

La dieta estándar AIN 93-G del PPE y los suplementos minerales y vitamínicos son preparados de acuerdo a las recomendaciones del Instituto Americano de Nutrición (Reeves y col., 1993) pero con ligeras modificaciones en la fuente y nivel de grasa: la grasa proviene de aceite de oliva en lugar de soja (debido a sus conocidos efectos beneficiosos sobre la salud y por ser la más comúnmente consumida en nuestro país) y la proporción de grasa es 10% en lugar del 7%. La fuente de Fe empleada fue citrato férrico. El contenido en Fe por análisis en las dietas ensayadas utilizadas durante el PPE fue: 44.71 mg/kg en la dieta para los animales controles y 6.31 mg/kg en la dieta que recibieron las ratas anémicas. Las dietas basadas en leche se elaboraron con leche en polvo desnatada de vaca (raza Holstein) o cabra (raza Murciano-Granadina). Se tomaron las cantidades necesarias de leche en polvo de vaca o cabra para obtener una dieta con un 20% de proteína (570.13 g/kg dieta de leche de vaca y 553.71 g/kg dieta de leche de cabra). Puesto que el contenido de grasa en la dieta era indetectable ( $< 0.01\%$ , debido a que se trata de leches desnatadas), ésta se añadió para conseguir una dieta con un 10% de grasa. La grasa se obtuvo por purificación de mantequilla o nata (de vaca o cabra, respectivamente). Ambos tipos de grasa se fundían al baño maría y posteriormente se centrifugaban a 300 g (Hetticj, Universal 30 RF, Germany) durante 15 min a 4°C, para separar el sobrenadante que constituía la grasa pura. El contenido en Fe (mg/kg dieta) en las dietas usadas durante el PE, fue el siguiente por análisis:

-Dietas con contenido normal en Fe: 39.6 (dieta basada en leche de vaca) y 40.5 (dieta basada en leche de cabra).

-Dietas con sobrecarga de Fe: 481.87 (dieta basada en leche de vaca) y 476.44 (dieta basada en leche de cabra).

### **3.3. TÉCNICAS ANÁLITICAS**

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

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

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

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

#### **3.3.3. CONTENIDO PROTEICO**

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

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

Un gramo de muestra (hígado y dietas) en sustancia seca se coloca en un vaso de precipitado, se añaden 10-12 mL de ácido nítrico concentrado (riqueza del 69%) y se tapa con un vidrio de reloj. Se coloca en un baño de arena SELECTA (Selecta, Barcelona,



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

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

Las concentraciones de Fe en el hígado y en las dietas se determinan por espectrofotometría de absorción atómica (EAA) (PERKIN ELMER 1100B, Norwalk, USA) a partir de una muestra adecuada, previamente mineralizada por vía húmeda y diluida convenientemente, comparándose frente a una serie de patrones de concentración conocida. En la espectroscopia atómica se consigue que los átomos individuales de una especie interactúen con la radiación electromagnética.

Dada la importancia de una exacta determinación de los distintos parámetros estudiados se ha llevado a cabo un control de calidad de estas determinaciones. Este control incluye el análisis de un conjunto de patrones primarios y muestras problemas. Los estándares primarios son de dos tipos: propios de cada determinación y sueros controles liofilizados (BCR certified reference material BCR 185; Community Bureau of

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

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

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

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

### **3.3.6. FERRITINA SÉRICA**

Los niveles de ferritina sérica se determinan usando el kit comercial Rat Ferritin ELISA (Biovendor Gmbh, Heidelberg, Germany). Los patrones, calibradores, controles y muestras se mezclan con la solución de trabajo. Posteriormente, las muestras convenientemente diluidas se incuban en microplacas con pocillos recubiertos de anticuerpos altamente específicos contra la ferritina de rata, durante 2 h a temperatura ambiente, procediendo posteriormente a la aspiración y lavado de los pocillos. Tras este paso, se procede a la adición de la solución enzimática que se unirá selectivamente a los pocillos y tras un último lavado, el color se desarrolla usando un sustrato cromógeno

(3,3',5, 5'-tetrametilbenzidina, TMB). La absorbancia de la reacción se monitoriza en un lector de microplacas a 450 nm, usando un lector de microplacas Bio-Rad microplate reader (Bio-rad Laboratories Inc., California, USA) en un plazo de 30 min. La intensidad de color desarrollada es inversamente proporcional a la concentración de ferritina sérica.

### **3.3.7. HIERRO SÉRICO, TIBC (CAPACIDAD TOTAL DE UNIÓN AL HIERRO) Y PORCENTAJE DE SATURACIÓN DE LA TRANSFERRINA**

Para calcular la tasa de saturación de transferrina, primero se determina el TIBC colorimétricamente (capacidad total de fijación al Fe) y los niveles de Fe sérico enzimáticamente, usando un kit comercial SIGMA Iron and total iron-binding capacity (Sigma Diagnostics, St. Louis, MI, USA). El ensayo se adapta a microplacas, usando 50 µL de suero en 250 µL de tampón más 5µL de reactivo cromógeno. La absorbancia de la reacción se monitoriza en un lector de microplacas a 550 nm usando un lector Bio-Rad microplate reader (Bio-rad Laboratories Inc., California, USA). El porcentaje de saturación de la transferrina ha sido calculado usando la siguiente ecuación:

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

### **3.3.8. ESPECIES REACTIVAS AL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)**

La peroxidación lipídica se evalúa en plasma determinando la concentración de TBARS, siguiendo el método descrito por Yagi (1976) y Ohkawa y col. (1979). 0.5 mL de plasma se mezclan con 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 15% (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland) y se centrifuga a 80 g durante 10 min. 1 mL de sobrenadante se mezcla con 1 mL de reactivo TBA (0.67%) y la mezcla fue mantenida

en un baño a 100°C durante 20 min. El producto de la reacción se extrae y se mide mediante análisis espectrofotométrico (Thermo Spectronic, Rochester, NY, USA) a 532 nm. El ensayo se calibra usando una curva de tetraetoxipropano (TEP) (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland) como fuente de malondialdehído (MDA).

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

Se llevaron a cabo distintas centrifugaciones diferenciales para separar las fracciones citosólicas de eritrocito, hígado y cerebro de acuerdo al procedimiento descrito previamente (DeSandro y col., 1991). Las muestras de hígado y cerebro son homogenizadas, tras la adición de 4 mL de tampón de sacarosa en el caso de los cerebros y tampón sacarosa-albumina para los hígados. Ambos órganos fueron fraccionados con una cuchilla automática (Polytron-Vertrieb GmbH, Langwiesenweg, Deutschland) y homogeneizados en un Potter con pistón de teflón (Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Germany). Para la obtención de sobrenadantes y pellets se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos en una centrífuga J2-21 (Beckman, Brea, CA, USA) a una temperatura de 4°C, los sobrenadantes obtenidos de ambos órganos fueron filtrados con gasa y ambos centrifugados a 8000 rpm durante 20 minutos. Los pellets obtenidos fueron guardados en hielo y oscuridad y los sobrenadantes fueron centrifugados a 10000 rpm durante 10 minutos de los cuales se obtuvieron los citosoles de cerebros e hígados, los pellets obtenidos se unieron a los guardados y se resuspendieron en 25 mL de tampón de sacarosa y centrifugados a 12000 rpm durante 10 minutos, los sobrenadantes obtenidos se desecharon dejando solamente los pellets

para la obtención de membranas mitocondriales de ambos órganos, que fueron resuspendidos en 2 mL de tampón de sacarosa para luego ser homogeneizados y congelados en sus respectivos viales a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

La fracción citosólica de los eritrocitos se obtiene por centrifugación diferencial con hemólisis hipotónica, de acuerdo al método de Hanahan and Ekholm (1974), eliminando los leucocitos mediante un lavado con tampón isotónico Tris a pH 7.6, con posterior centrifugación a 100 g a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. El sobrenadante y la capa superficial de células obtenidas se separan mediante una pipeta Pasteur. Este procedimiento de lavado y eliminación se repitió dos veces más en cada muestra. Para resuspender los eritrocitos lavados obtenidos, se emplea un tampón Tris isotónico hasta un hematocrito aproximado del 50%. A la suspensión se le adiciona posteriormente tampón Tris hipotónico de pH 7.6 en proporción 1/5. La operación de lavado con tampón hipotónico se repitió tres veces, quedando finalmente las membranas con un ligero tono rosáceo y el sobrenadante obtenido de la hemólisis de eritrocitos incoloro, que corresponde a la fracción citosólica.

La concentración de proteína en las diferentes muestras citosólicas se determina mediante el método de Lowry y col. (1951), que se basa en la asociación entre las reacciones de Biuret y de Folin, la primera característica del enlace peptídico y de los grupos fenólicos y la segunda de la tirosina. Se toman 15  $\mu\text{L}$  de muestra y se le añaden 5 mL de reactivo de Biuret, se agita y, tras 15 minutos, se adicionan 0.5 mL de reactivo de Folin, se vuelve a agitar y tras 20 minutos, manteniendo los tubos en ambiente oscuro, se procede a su lectura en espectrofotómetro (Thermo Spectronic, Rochester,

NY, USA) a una longitud de onda de 640 nm. Para el cálculo de concentración existente se emplea una curva patrón con albúmina sérica.

### **3.3.10. GLUTATION PEROXIDASA (GPx)**

La actividad de esta enzima se determina a 25°C usando citosol de hígado, cerebro y eritrocito, mediante un método indirecto descrito previamente (Flohé y Gunzler, 1984). Para la determinación de la verdadera actividad GPx, interesa la fracción enzimática, dependiente de hidroperóxidos, por lo que se debe obviar la independiente de hidroperóxidos y la reacción no enzimática, en la que no interviene la GPx. Para proceder, pues, a la determinación se mezclan: 700 µL de tampón fosfato potásico 0,1 M a pH 7.0 (al que se ha añadido previamente EDTA 1 mM y azida sódica 1mM); 100 µL de glutation reductasa (2,4 U/mL en tampón sin azida); 100 µL de NADPH 10 mM en una solución de NaHCO<sub>3</sub> al 0,1%; 100 µL de glutation reducido 10 mM en tampón sin azida y 5 µL de una dilución de citosol 90:10 (agua/citosol). Se incubaba a 37°C durante 3 minutos, tras los que se vierten en una cubeta de cuarzo de 1 ml y se añaden 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 12 mM, que dispara la reacción, procediéndose a la monitorización espectrofotométrica (Thermo Spectronic, Rochester, NY, USA) del descenso de NADPH a 240 nm durante 5 minutos, enfrentada a un blanco con un contenido igual salvo el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Para eliminar el descenso no enzimático se realiza otra lectura en la que la muestra se reemplaza por tampón, efectuándose dicha lectura frente a un blanco sin muestra ni H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El valor que se obtiene se resta del conseguido en la determinación descrita anteriormente, con lo que se averigua el descenso enzimático dependiente del peróxido.

### 3.3.11. CATALASA (CAT)

La actividad de esta enzima se determina mediante el método de Aebi (1984), monitorizando espectrofotométricamente (Thermo Spectronic, Rochester, NY, USA) a 240 nm la descomposición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{O}_2$ . La técnica es la siguiente: en una cubeta de cuarzo, a 200  $\mu\text{L}$  de una dilución del citosol en agua bidestilada (proporción 50:950) se le añaden 1800  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato 50 mM ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  50 mM a pH 7.0) y 1000  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30 mM, se agita y se observa el descenso de absorbancia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 240 nm durante 60 segundos a 20°C, frente a un blanco realizado con 2800  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato y 200  $\mu\text{L}$  de la dilución del citosol en agua bidestilada. Para el cálculo de unidades es recomendable el uso de una constante de reacción de primer orden (K), puesto que es éste el tipo de reacción de descomposición del  $\text{H}_2\text{O}_2$  con concentraciones relativamente bajas de sustrato. Lo que obedece al hecho de que con la formación de complejos inactivos a las concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de saturación, no es posible medir la actividad enzimática a través de la saturación.

### 3.3.12. SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD)

La actividad de la SOD fue determinada usando una versión ligeramente modificada del método de Crapo y col. (1978). Este método está basado en la inhibición de la reducción del citocromo *c* por la SOD, determinada espectrofotométricamente (Thermo Spectronic, Rochester, NY, USA) a 550 nm. Una unidad de actividad SOD

se define como la cantidad de enzima necesaria para producir una inhibición del 50% en la tasa de reducción del citocromo *c*. La ligera modificación introducida consiste en la preparación de reactivos: éstos fueron preparados en un tampón 20 mM de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> (pH 10) en lugar de 50mM PO<sub>4</sub>K<sub>2</sub> (pH 7.8); también empleamos EDTA 1 mM en lugar de 0.1 mM. Estas modificaciones fueron inducidas para favorecer la reacción y monitorizar de manera más patente la reducción del citocromo *c*.

### 3.3.13. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Los datos se presentan como valor medio  $\pm$  EEM. Para comprobar las diferencias entre grupos (controles vs. anémicas, y contenido normal de Fe vs. sobrecarga de Fe) se usa el test de la “t de Student” para muestras independientes. Se usa el análisis de la varianza (One-Way ANOVA) para comparar las diferentes dietas suministradas a los dos grupos de animales (controles y anémicas) durante el PE. Las medias individuales se compararon usando el test “post hoc” de Tukey, cuando los efectos principales y sus interacciones resultaban significativas. Las diferencias son consideradas significativas para todos los tratamientos estadísticos a un nivel de  $P < 0.05$ . Todos los análisis se han efectuado con el paquete estadístico “Statistical Package for Social Sciences” (SPSS, versión 15.0, 2008).





# RESULTADOS Y DISCUSIÓN



#### **4.1. PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS EN SITUACIÓN DE ANEMIA FERROPÉNICA NUTRICIONAL (PPE)**

En los animales controles, todos los parámetros hematológicos estudiados (recuento de hematíes, VCM, hematocrito, plaquetas, Hb, Fe sérico, ferritina sérica, porcentaje de saturación de la transferrina y TIBC) están dentro de los límites normales (Campos y col., 1998) para esta especie al final del PPE. Sin embargo, cuando los animales consumen una dieta con bajo contenido en Fe durante 40 días (PPE), eran anémicos, con una baja concentración de Hb ( $P < 0.001$ ). Además, el hematocrito, el Fe sérico, ferritina sérica y la saturación de la transferrina eran bajos ( $P < 0.001$ ), en tanto, los niveles de plaquetas y TIBC estaban marcadamente elevados ( $P < 0.001$ ) (Tabla 11), consecuencia de la depleción progresiva de Fe desde los depósitos corporales (Brownlie y col. 2002). Todo ello era de esperar y consistente con la anemia ferropénica severa inducida experimentalmente tras 40 días de suministro de una dieta con bajo contenido en Fe.

**Tabla 11.** Parámetros hematológicos de ratas controles y anémicas en el día 40 del PPE (datos expresados como media  $\pm$  error estándar de la media).

Parámetros hematológicos	<u>Dieta</u>	
	Contenido normal en Fe grupo control	Contenido bajo en Fe grupo anémico
Fe sérico ( $\mu\text{g/L}$ )	1392 $\pm$ 121	701 $\pm$ 57 *
Concentración de Hb (g/L)	129.1 $\pm$ 2.8	76.5 $\pm$ 2.7 *
Glóbulos rojos ( $10^{12}/\text{L}$ )	7.2 $\pm$ 0.15	6.3 $\pm$ 0.17 *
Hematocrito (%)	39.1 $\pm$ 0.7	27.8 $\pm$ 0.5*
Plaquetas ( $10^9/\text{L}$ )	725 $\pm$ 24.1	1392 $\pm$ 67.8 *
VCM (fL)	55.7 $\pm$ 0.2	39.1 $\pm$ 0.6 *
Ferritina sérica ( $\mu\text{g/L}$ )	83.1 $\pm$ 2.7	50.3 $\pm$ 1.4 *
Saturación transferrina (%)	47.2 $\pm$ 7.2	3.8 $\pm$ 0.3 *
TIBC ( $\mu\text{g/L}$ )	2849 $\pm$ 203	17800 $\pm$ 728 *

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

#### 4.2. PESO CORPORAL, HEPÁTICO, RELACIÓN HEPATOSOMÁTICA Y CONTENIDO DE HIERRO EN HÍGADO EN SITUACIÓN DE ANEMIA FERROPÉNICA NUTRICIONAL (PPE)

El hígado es el principal órgano de almacén de Fe en el organismo, y juega un papel crucial en la homeostasis de dicho mineral. Los niveles de Fe en hígado pueden ser considerados por tanto un reflejo del estatus de Fe en el organismo (Ramm y Ruddell, 2005; Nemeth y Ganz, 2006a; Nemeth y Ganz, 2006b).

**Tabla 12.** Contenido de Fe en hígado en el día 40 del PPE (datos expresados como media  $\pm$  error estándar de la media).

Grupo experimental	Contenido de Fe en hígado ( $\mu\text{g}/\text{g}$ sustancia seca)
Controles	401.16 $\pm$ 19.43
Anémicas	284.02 $\pm$ 21.12*

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

Como se puede observar en el día 40 del PEP (Tabla 12), las diferencias entre ratas controles y anémicas ( $P < 0.001$ ) revelan que los depósitos de Fe hepáticos se encuentran deplecionados, indicando que se ha alcanzado una severa ferropénica inducida por el consumo de una dieta con bajo contenido en Fe (Nemeth y Ganz, 2006a, Nemeth y Ganz, 2006b).

Los efectos de la anemia ferropénica nutricional tras 40 días de suministro de una dieta con bajo contenido en Fe sobre el peso corporal y hepático se muestran en la Tabla 13:

**Tabla 13.** Peso corporal, hepático y relación hepatosomática de ratas controles y anémicas en el día 40 del PPE (datos expresados como media  $\pm$  error estándar de la media).

Grupo experimental	Peso corporal (g)	Peso hígado (g)	Peso hígado/Peso corporal (%)
Controles	299.5 $\pm$ 7.9	7.91 $\pm$ 0.24	2.63 $\pm$ 0.06
Anémicas	268.2 $\pm$ 7.5 *	7.61 $\pm$ 0.32	2.81 $\pm$ 0.09 †

† Valores significativamente diferentes ( $P < 0.01$ ) del grupo control mediante el test de la “*t de Student*”.

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

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

Las ratas en el momento del nacimiento tienen un nivel alto de Fe sérico, pero durante las primeras semanas de vida muchos eritrocitos se hemolizan, en un proceso

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

El menor contenido de Fe en hígado observado en situación de anemia ferropénica se atribuye a la disminución de la hepcidina hepática descrita en esta patología (Theurl y col., 2009). La hepcidina es un péptido hepático, que resulta clave en el metabolismo del Fe. Hay varios factores que regulan la síntesis de esta hormona peptídica. Entre los estímulos con mayor capacidad reguladora de la hepcidina destacan la inflamación, ciertas infecciones, demanda eritropoyética, hipoxia y de manera especial el estatus de Fe corporal (Zang y Enns, 2009). Estudios de deficiencia de Fe observada en ratones *knockout* para el gen de la hepcidina, sugieren que este péptido

interviene regulando el almacenamiento del mineral (atenuando tanto la absorción intestinal de Fe como la liberación de Fe de los macrófagos). La expresión disminuida de la hepcidina en respuesta a la hipoxia anémica, y su expresión aumentada en ratones y humanos con inflamación, sugiere que esta hormona peptídica también puede participar en la mediación de la hipoxia y en la cascada de reguladores inflamatorios (Nicolas y col., 2002). La hepcidina también controla los niveles de Fe directamente actuando recíprocamente con la FPN1 (ferroportina 1), conduciendo a la internalización y degradación de la misma cuando los niveles de Fe son altos y por consiguiente bloqueando la liberación de Fe en los sitios de almacén; hepatocitos, enterocitos y macrófagos (Nemeth y Ganz, 2006b).

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

Por otra parte, el grado de ferrodeficiencia producido por la dieta restrictiva en Fe es lo suficientemente severo como para afectar al peso corporal, lo cual coincide con los resultados de otros autores (Strube y col., 2002) y se puede atribuir a los menores niveles de hormonas tiroideas encontrados en esta patología (Beard y col., 1998). Por otra parte, puesto que en situación de ferrodeficiencia la hemoglobina y recuento de



hematíes se reducen, el suministro de oxígeno a las células se limita, incidiendo de manera negativa en la síntesis de ATP y en el incremento de peso. Estos hallazgos coinciden con los descritos por Schneider y col. (2008), quienes indicaban que en niños de entre 12 y 36 meses, los bajos niveles de hemoglobina perjudicaban significativamente la ganancia de peso, explicando por tanto la asociación encontrada en el presente estudio entre el menor peso y la ferropenia.

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

#### **4.3. MECANISMOS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE Y PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN SITUACIÓN DE ANEMIA FERROPÉNICA NUTRICIONAL (PPE)**

Los mecanismos enzimáticos de defensa antioxidante estudiados (GPx, CAT, SOD), así como el indicador de peroxidación lipídica estudiado (TBARS) se muestran en las Tablas 14 y 15:

**Tabla 14.** CAT y GPx en citosol de hígado, cerebro y eritrocito de ratas controles y anémicas en el día 40 del PPE (datos expresados como media  $\pm$  error estándar de la media).

Enzima antioxidante	Grupo experimental	cerebro	hígado	eritrocito
CAT (U/mL citosol)	Controles	0.130 $\pm$ 0.025	0.330 $\pm$ 0.032	0.313 $\pm$ 0.058
	Anémicas	0.117 $\pm$ 0.036	0.265 $\pm$ 0.036	0.296 $\pm$ 0.034
GPx (mmol/mg proteína/mL)	Controles	0.135 $\pm$ 0.023	0.256 $\pm$ 0.017	0.255 $\pm$ 0.012
	Anémicas	0.157 $\pm$ 0.022	0.278 $\pm$ 0.020	0.304 $\pm$ 0.026

**Tabla 15.** SOD y TBARS en plasma de ratas controles y anémicas en el día 40 del PPE (datos expresados como media  $\pm$  error estándar de la media).

Grupo experimental	SOD (U/mg proteína)	TBARS (nmol/mg proteína)
Controles	2.62 $\pm$ 0.23	3.12 $\pm$ 0.53
Anémicas	2.36 $\pm$ 0.25	3.20 $\pm$ 0.45

Bajo nuestras condiciones experimentales, no se han encontrado diferencias significativas en los mecanismos enzimáticos de defensa antioxidante, ni en los procesos de peroxidación lipídica por efecto de la ferredesiciencia (final del PPE).

Las funciones fisiológicas y la integridad de las estructuras celulares pueden verse alteradas a través de la reactividad de los radicales libres. El organismo posee una maquinaria enzimática que trabaja eliminando y neutralizando estas especies dañinas. El balance entre prooxidantes y antioxidantes puede verse alterado en diversas condiciones patológicas, dependiendo del estrés oxidativo producido así como de la integridad del

sistema de defensa antioxidante (Vives Corrons y col., 1995; Kumerova y Col., 1998; Aslan y col., 2006). Además los metales de transición, particularmente el Fe, reaccionan con peróxido de hidrógeno en el núcleo celular generando radicales libres del oxígeno y el consiguiente daño de las biomoléculas (Aust y Eveleigh, 1999).

Varios autores, defienden que la actividad de la GPx en situación de anemia es similar a la de células normales (Acharya y col., 1991; Isler y col., 2002; Díaz-Castro y col., 2008), lo cual coincide con los datos obtenidos en el presente estudio. El Fe no es la única causa que puede provocar un cambio en la actividad de la GPx en situación de anemia ferropénica; otros minerales como Se, Cu, Zn y Mn que participan como cofactores en las actividades de esta enzima también pueden jugar un papel importante en la alteración de su función. Las actividades de las enzimas que participan en la ruta de las pentosas fosfato, la mayor fuente de producción de NADPH, se ha observado que se encontraban incrementadas en pacientes con anemia ferropénica (Macdougall, 1968). Puesto que la actividad de la GPx depende de los niveles de NADPH producidos por la ruta de las pentosas fosfato, esto puede explicar por que la actividad de la GPx se encuentra dentro de los límites normales en ratas con anemia ferropénica.

Por otra parte, la drástica disminución del Fe sérico encontrada en ratas ferrodeficientes (final del PPE), se traduce en un menor tráfico de dicho elemento en el organismo, disminuyendo por tanto la producción de radicales libres a través de las rutas de Fenton y Haber-Weiss (Tanaka y Kiyosawa, 2004), lo cual puede explicar que la SOD se mantenga dentro de los niveles normales en el compartimento plasmático de los animales ferrodeficientes.

La CAT es una enzima férrica que contiene el grupo hemo. La ferropdeficiencia puede reducir la actividad de enzimas Fe-dependientes (Hess y col., 2002), sin embargo, bajo nuestras condiciones experimentales, la actividad de la CAT en ratas ferropdeficientes no se modifica con respecto a sus controles, probablemente como resultado de un mecanismo compensatorio, en el que, a pesar de que hay menos Fe disponible para actuar como cofactor en la molécula enzimática, también existen menos radicales libres que neutralizar, por lo que la actividad enzimática neta resultante no sufre modificaciones.

Por otra parte, la ferropdeficiencia induce a cambios en la homeostasis celular de Fe. Un aporte insuficiente de Fe en la dieta produce un incremento en la actividad de la proteína IRP1 hepática, lo cual incrementa la síntesis del receptor de transferrina (TfR) y disminuye la actividad aconitasa mitocondrial (Chen y col., 1997). La disminución de la actividad aconitasa mitocondrial puede prevenir la liberación de oxidantes procedentes de la mitocondria por disminución del suministro de equivalentes reductores a la cadena de transporte electrónico. El flujo electrónico reducido puede ser uno de los mecanismos por los cuales la célula se protege del estrés oxidativo en situación de anemia (Chen y col., 1997), por tanto la ferropdeficiencia podría ejercer un efecto protector, evitando al menos en parte, la generación de radicales libres y los mecanismos de defensa antioxidante no se veían alterados en el transcurso de esta patología. Además, Cragg y col. (1998) examinaron los efectos del peróxido de hidrógeno en células HepG2, demostrando que la sobrecarga de Fe incrementaba enormemente el daño oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno y que un quelante de Fe (desferritiocina) ejercía un efecto protector en las células, hechos que apoyan

nuestros hallazgos en relación a la defensa enzimática antioxidante en situación de ferropénica.

La GPx, CAT y SOD están implicadas en la reducción de peróxidos que pueden dañar los ácidos grasos poliinsaturados, por tanto previenen la peroxidación lipídica así como la degradación de los fosfolípidos de membrana y la consiguiente formación de TBARS (Meister y Anderson, 1983). Nuestros resultados acerca de los fenómenos de peroxidación lipídica coinciden con los de Díaz-Castro y col. (2008) quienes también encontraron que la producción de TBARS era similar en citosoles hepáticos de ratas controles y ferropénicas, sugiriendo que la capacidad antioxidante hepática es normal, probablemente debido al estado adecuado de la defensa enzimática antioxidante. Un estado antioxidante adecuado, junto con una insuficiente cantidad de Fe disponible, puede ejercer un efecto protector en el animal, evitando la generación de radicales libres catalizados por Fe a través de las rutas de Fenton y Haber-Weiss.

#### **4.4. CONTENIDO HEPÁTICO DE HIERRO EN LA RECUPERACIÓN DE LA ANEMIA FERROPÉNICA NUTRICIONAL CON DIETAS BASADAS EN LECHE CON CONTENIDO NORMAL O SOBRECARGA DE HIERRO (PE)**

En el día 70 del estudio (30 días de suministro de dietas basadas en leche) se aprecian diferencias significativas en el contenido de Fe hepático ( $P < 0.001$ ) (Tabla 16), siendo mayor en animales controles que en anémicos, debido a la severa ferropénica inducida en las ratas durante el desarrollo de la anemia ferropénica nutricional (PPE). El contenido de Fe hepático es mayor en ratas controles ya que los depósitos estaban deplecionados en ratas anémicas, lo que coincide con los resultados

de Muñoz y col. (2009). El menor contenido de Fe en hígado, observado en situación de anemia ferropénica puede deberse, como se ha mencionado anteriormente, a la disminución de la hepcidina hepática (Theurl y col., 2009), lo cual se traducirá en una menor interacción con la FPN1 (Tselepis y col., 2010), evitando su internalización y degradación, de manera que aumenta el flujo de salida de  $\text{Fe}^{2+}$  desde los hepatocitos, reduciéndose su depósito en dicho órgano.

**Tabla 16.** Contenido de Fe en hígado ( $\mu\text{g/g}$  sustancia seca) de ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche de vaca o cabra, con un contenido normal o sobrecarga de Fe en el día 70 y 90 del estudio (datos expresados como valor medio  $\pm$  error estándar de la media).

Día del estudio y contenido de Fe en la dieta	Dieta basada en leche de vaca		Dieta basada en leche de cabra		Valor de <i>P</i> (ONE way ANOVA)		
	Grupo Control	Grupo Anémico	Grupo Control	Grupo Anémico	Dieta	Anemia	Sobrecarga de Fe
<b>Día 70</b> (Fe normal) (sobrecarga)	558.95 $\pm$ 27.15b	416.92 $\pm$ 28.15cA	618.35 $\pm$ 34.12a	455.12 $\pm$ 24.15cA	<0.05	<0.001	<0.001
	1000.35 $\pm$ 36.12Ca	714.26 $\pm$ 41.22cCA	1086.85 $\pm$ 35.62Ca	788.15 $\pm$ 23.02cCA	<0.05	<0.01	
<b>Día 90</b> (Fe normal) (sobrecarga)	618.25 $\pm$ 32.12a	564.22 $\pm$ 23.19cA	625.34 $\pm$ 32.56a	575.05 $\pm$ 32.15A	NS <sup>1</sup>	<0.01	<0.001
	946.12 $\pm$ 32.45Ca	936.12 $\pm$ 27.85BC	929.35 $\pm$ 31.24Ca	947.22 $\pm$ 32.05CA	<0.05	<0.05	

a, b Valores entre grupos de animales controles con diferente superíndice minúscula en la misma fila, fueron estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ , mediante el test de Tukey).

A, B Valores entre grupos de animales anémicos con distinto superíndice mayúscula en la misma fila, fueron estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ , mediante el test de Tukey).

c Valores estadísticamente diferentes del correspondiente grupo de animales controles ( $P < 0.05$ , el test de la “*t de Student*”).

C Valores estadísticamente diferentes del correspondiente grupos de animales alimentados con dietas con contenido normal en Fe ( $P < 0.05$ , el test de la “*t de Student*”).

<sup>1</sup>No significativo.

Los efectos de la sobrecarga a nivel hepático se aprecian en ambos periodos 70 y 90 días ( $P < 0.001$ ) (Tabla 16), hecho que pone de manifiesto que se había alcanzado la sobrecarga, si bien, las diferencias en general se hacen más acusadas al final del estudio (día 90), debido a la sobrecarga crónica (Feder y col., 1998; Breuer y col., 2000; Hider, 2002; Esposito y col., 2003), la cual produce una alta expresión de la hepcidina y hace que el Fe se acumule a nivel hepático (Weinstein y col., 2002, Ben-Assa y col., 2009).

Por último y dado que los animales han recibido dietas con contenido normal o sobrecarga de Fe, las diferencias entre los grupos controles y anémicos desaparecen al final del estudio (día 90), debido a que los depósitos han sido completamente replecionados y la sobrecarga de Fe se ha alcanzado, por lo que los valores de Fe hepático son superiores a los de los normales encontrados por Campos y col. en 1998.

#### **4.5. MECANISMOS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE Y PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN LA RECUPERACIÓN DE LA ANEMIA FERROPÉNICA NUTRICIONAL CON DIETAS BASADAS EN LECHE, CON CONTENIDO NORMAL O SOBRECARGA DE HIERRO (PE)**

Los datos relativos a los mecanismos de defensa antioxidante y proceso de peroxidación lipídica en el PE se muestran en las Tablas 17 (CAT), 18 (GPx), 19 (SOD) y 20 (TBARS).



**Tabla 17.** CAT (U/mL de citosol) en hígado, cerebro y eritrocito de ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche de vaca o cabra, con contenido normal o sobrecarga de Fe en el día 70 y 90 del estudio (valor medio  $\pm$  error estándar de la media).

Día del estudio y contenido de Fe en la dieta	Dieta basada en leche de vaca		Dieta basada en leche de cabra		Valor de <i>P</i> (ONE way ANOVA)		
	Grupo Control	Grupo Anémico	Grupo Control	Grupo Anémico	Dieta	Anemia	Sobrecarga de Fe
<b>HÍGADO</b>							
Día 70 (Fe normal)	0.216 $\pm$ 0.036a	0.220 $\pm$ 0.030A	0.178 $\pm$ 0.034a	0.182 $\pm$ 0.040A	NS <sup>1</sup>	NS	
(sobrecarga)	0.314 $\pm$ 0.086a	0.254 $\pm$ 0.087A	0.206 $\pm$ 0.021a	0.216 $\pm$ 0.053A	NS	NS	NS
Día 90 (Fe normal)	0.257 $\pm$ 0.027a	0.260 $\pm$ 0.035A	0.273 $\pm$ 0.050a	0.278 $\pm$ 0.040A	NS	NS	
(sobrecarga)	0.320 $\pm$ 0.033a	0.337 $\pm$ 0.037A	0.337 $\pm$ 0.066a	0.329 $\pm$ 0.024A	NS	NS	NS
<b>CEREBRO</b>							
Día 70 (Fe normal)	0.097 $\pm$ 0.010a	0.092 $\pm$ 0.019A	0.091 $\pm$ 0.032a	0.089 $\pm$ 0.019A	NS	NS	
(sobrecarga)	0.125 $\pm$ 0.012a	0.130 $\pm$ 0.025A	0.129 $\pm$ 0.026a	0.123 $\pm$ 0.032A	NS	NS	NS
Día 90 (Fe normal)	0.099 $\pm$ 0.012a	0.101 $\pm$ 0.021A	0.101 $\pm$ 0.025a	0.102 $\pm$ 0.021A	NS	NS	
(sobrecarga)	0.122 $\pm$ 0.017a	0.118 $\pm$ 0.010A	0.119 $\pm$ 0.022a	0.125 $\pm$ 0.051A	NS	NS	NS
<b>ERITROCITO</b>							
Día 70 (Fe normal)	0.850 $\pm$ 0.026a	0.868 $\pm$ 0.036A	0.681 $\pm$ 0.036b	0.620 $\pm$ 0.040B	<0.001	NS	
(sobrecarga)	1.083 $\pm$ 0.015Ca	0.962 $\pm$ 0.023CA	1.075 $\pm$ 0.032Ca	0.986 $\pm$ 0.026CA	NS	NS	<0.001
Día 90 (Fe normal)	0.622 $\pm$ 0.018a	0.595 $\pm$ 0.017A	0.739 $\pm$ 0.034b	0.778 $\pm$ 0.029B	<0.001	NS	
(sobrecarga)	0.977 $\pm$ 0.020Ca	0.918 $\pm$ 0.027CA	0.928 $\pm$ 0.022Ca	0.869 $\pm$ 0.015CA	NS	NS	<0.001

a, b Valores entre grupos de animales controles con diferente superíndice minúscula en la misma fila, fueron estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ , mediante el test de Tukey).

A, B Valores entre grupos de animales anémicos con distinto superíndice mayúscula en la misma fila, fueron estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ , mediante el test de Tukey).

C Valores estadísticamente diferentes del correspondiente grupos de animales alimentados con dietas con contenido normal en Fe ( $P < 0.05$ , el test de la “*t de Student*”).

<sup>1</sup>No significativo.

**Tabla 18.** GPx (mmol/mg proteína/mL) en citosol de hígado, cerebro y eritrocito de ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche de vaca o cabra, con contenido normal o sobrecarga de Fe en el día 70 y 90 del estudio (valor medio  $\pm$  error estándar).

Día del estudio y contenido de Fe en la dieta	Dieta basada en leche de vaca		Dieta basada en leche de cabra		Valor de <i>P</i> (ONE way ANOVA)		
	Grupo Control	Grupo Anémico	Grupo Control	Grupo Anémico	Dieta	Anemia	Sobrecarga de Fe
<b>HÍGADO</b>							
Día 70 (Fe normal)	0.857 $\pm$ 0.039a	0.822 $\pm$ 0.037A	0.885 $\pm$ 0.032a	0.862 $\pm$ 0.042A	NS <sup>1</sup>	NS	
(sobrecarga)	0.315 $\pm$ 0.024Ca	0.343 $\pm$ 0.032Ca	0.485 $\pm$ 0.064Cb	0.453 $\pm$ 0.045Cb	<0.01	NS	<0.001
Día 90 (Fe normal)	0.390 $\pm$ 0.025a	0.397 $\pm$ 0.025A	0.369 $\pm$ 0.015a	0.380 $\pm$ 0.014A	NS	NS	NS
(sobrecarga)	0.341 $\pm$ 0.024a	0.416 $\pm$ 0.023A	0.350 $\pm$ 0.012a	0.396 $\pm$ 0.018B	NS	NS	
<b>CEREBRO</b>							
Día 70 (Fe normal)	0.261 $\pm$ 0.012a	0.242 $\pm$ 0.017A	0.336 $\pm$ 0.020b	0.345 $\pm$ 0.007B	<0.01	NS	
(sobrecarga)	0.271 $\pm$ 0.025a	0.259 $\pm$ 0.039A	0.335 $\pm$ 0.029b	0.333 $\pm$ 0.070B	<0.01	NS	NS
Día 90 (Fe normal)	0.371 $\pm$ 0.026a	0.334 $\pm$ 0.023A	0.321 $\pm$ 0.019a	0.389 $\pm$ 0.028A	NS	NS	
(sobrecarga)	0.342 $\pm$ 0.023a	0.350 $\pm$ 0.027A	0.315 $\pm$ 0.020a	0.349 $\pm$ 0.014A	NS	NS	NS
<b>ERITROCITO</b>							
Día 70 (Fe normal)	1.088 $\pm$ 0.023a	1.175 $\pm$ 0.023A	1.135 $\pm$ 0.042a	1.189 $\pm$ 0.024A	NS	NS	
(sobrecarga)	0.645 $\pm$ 0.028Ca	0.860 $\pm$ 0.020CA	1.070 $\pm$ 0.030b	1.085 $\pm$ 0.029B	<0.001	NS	<0.01
Día 90 (Fe normal)	0.685 $\pm$ 0.040a	0.720 $\pm$ 0.045A	0.722 $\pm$ 0.022a	0.715 $\pm$ 0.024A	NS	NS	
(sobrecarga)	0.614 $\pm$ 0.026a	0.650 $\pm$ 0.020A	0.745 $\pm$ 0.019b	0.740 $\pm$ 0.033B	<0.001	NS	NS

a, b Valores entre grupos de animales controles con diferente superíndice minúscula en la misma fila, fueron estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ , mediante el test de Tukey).

A, B Valores entre grupos de animales anémicos con distinto superíndice mayúscula en la misma fila, fueron estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ , mediante el test de Tukey).

C Valores estadísticamente diferentes del correspondiente grupos de animales alimentados con dietas con contenido normal en Fe ( $P < 0.05$ , el test de la “*t de Student*”).

<sup>1</sup>No significativo.

**Tabla 19.** SOD (U/mg proteína) en citosol de hígado, cerebro y eritrocito de ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche de vaca o cabra, con un contenido normal o sobrecarga de Fe en el día 70 y 90 del estudio (valor medio  $\pm$  error estándar de la media).

Día del estudio y contenido de Fe en la dieta	Dieta basada en leche de vaca		Dieta basada en leche de cabra		Valor de <i>P</i> (ONE way ANOVA)		
	Grupo Control	Grupo Anémico	Grupo Control	Grupo Anémico	Dieta	Anemia	Sobrecarga de Fe
<b>HÍGADO</b>							
Día 70 (Fe normal)	14.009 $\pm$ 0.450a	13.013 $\pm$ 0.863A	2.227 $\pm$ 0.936b	2.810 $\pm$ 0.292B	<0.001	NS <sup>1</sup>	
(sobrecarga)	15.430 $\pm$ 0.576a	15.366 $\pm$ 0.335CA	3.285 $\pm$ 0.421b	3.162 $\pm$ 0.398B	<0.001	NS	<0.05
Día 90 (Fe normal)	14.864 $\pm$ 0.671a	13.509 $\pm$ 0.390A	4.439 $\pm$ 0.536b	4.334 $\pm$ 0.385B	<0.001	NS	<0.001
(sobrecarga)	15.997 $\pm$ 0.331a	15.566 $\pm$ 0.506A	8.527 $\pm$ 0.507Cb	8.545 $\pm$ 0.472CB	<0.001	NS	
<b>CEREBRO</b>							
Día 70 (Fe normal)	9.320 $\pm$ 0.418a	9.311 $\pm$ 0.536A	2.914 $\pm$ 0.313b	2.870 $\pm$ 0.492B	<0.001	NS	
(sobrecarga)	10.534 $\pm$ 1.248a	10.544 $\pm$ 1.142A	3.061 $\pm$ 0.543a	3.156 $\pm$ 0.385B	<0.001	NS	NS
Día 90 (Fe normal)	12.357 $\pm$ 0.866a	12.264 $\pm$ 0.519A	8.767 $\pm$ 0.810b	8.539 $\pm$ 0.525B	<0.001	NS	
(sobrecarga)	11.595 $\pm$ 0.404a	12.745 $\pm$ 1.086A	8.203 $\pm$ 0.308b	8.765 $\pm$ 0.570B	<0.001	NS	NS
<b>ERITROCITO</b>							
Día 70 (Fe normal)	12.094 $\pm$ 0.589a	10.356 $\pm$ 0.462cA	2.823 $\pm$ 0.484b	2.972 $\pm$ 0.396B	<0.001	<0.05	
(sobrecarga)	13.497 $\pm$ 0.352a	12.836 $\pm$ 0.452CA	3.677 $\pm$ 0.323b	3.725 $\pm$ 0.239B	<0.001	NS	NS
Día 90 (Fe normal)	12.843 $\pm$ 0.443a	12.035 $\pm$ 0.675A	8.042 $\pm$ 0.441b	8.636 $\pm$ 0.331B	<0.001	NS	
(sobrecarga)	17.860 $\pm$ 0.656Ca	13.716 $\pm$ 0.609A	8.876 $\pm$ 0.516b	8.718 $\pm$ 0.390B	<0.001	NS	<0.05

a, b Valores entre grupos de animales controles con diferente superíndice minúscula en la misma fila, fueron estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ , mediante el test de Tukey).

A, B Valores entre grupos de animales anémicos con distinto superíndice mayúscula en la misma fila, fueron estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ , mediante el test de Tukey).

c Valores estadísticamente diferentes del correspondiente grupo de animales controles ( $P < 0.05$ , el test de la “*t de Student*”).

C Valores estadísticamente diferentes del correspondiente grupos de animales alimentados con dietas con contenido normal en Fe ( $P < 0.05$ , el test de la “*t de Student*”).

<sup>1</sup>No significativo.

**Tabla 20.** TBARS (nmol/mg proteína) en plasma de ratas controles y anémicas alimentadas con dietas basadas en leche de vaca o cabra, con un contenido normal o sobrecarga de Fe en el día 70 y 90 del estudio (datos expresados como valor medio  $\pm$  error estándar de la media).

Día del estudio y contenido de Fe en la dieta		Dieta basada en leche de vaca		Dieta basada en leche de cabra		Valor de <i>P</i> (ONE way ANOVA)		
		Grupo Control	Grupo Anémico	Grupo Control	Grupo Anémico	Dieta	Anemia	Sobrecarga de Fe
<b>Día 70</b>	<b>(Fe normal)</b>	3.23 $\pm$ 0.15a	2.95 $\pm$ 0.23A	2.96 $\pm$ 0.28a	3.04 $\pm$ 0.20A	NS <sup>1</sup>	NS	<0.01
	<b>(sobrecarga)</b>	5.72 $\pm$ 0.59aC	5.25 $\pm$ 0.16BC	3.77 $\pm$ 0.25bC	3.95 $\pm$ 0.39AC	<0.001	NS	
<b>Día 90</b>	<b>(Fe normal)</b>	5.30 $\pm$ 0.47a	4.99 $\pm$ 0.31A	4.67 $\pm$ 0.21a	4.59 $\pm$ 0.18A	NS	NS	<0.01
	<b>(sobrecarga)</b>	7.95 $\pm$ 0.53aC	7.85 $\pm$ 0.55AC	6.01 $\pm$ 0.50bC	6.11 $\pm$ 0.41BC	<0.01	NS	

a, b Valores entre grupos de animales controles con diferente superíndice minúscula en la misma fila, fueron estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ , mediante el test de Tukey).

A, B Valores entre grupos de animales anémicos con distinto superíndice mayúscula en la misma fila, fueron estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ , mediante el test de Tukey).

C Valores estadísticamente diferentes del correspondiente grupos de animales alimentados con dietas con contenido normal en Fe ( $P < 0.05$ , el test de la “*t de Student*”).

<sup>1</sup>No significativo.

Como resultado del metabolismo del animal, el anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) es convertido en  $H_2O_2$  por la ubicua enzima SOD. Posteriormente, el  $H_2O_2$  producida en esta reacción es convertida en compuestos inofensivos por la acción enzimática de la CAT y GPx, por tanto la SOD es la primera línea de defensa enzimática frente a los radicales libres (Ghone y col., 2008). La actividad aumentada de la SOD en todos los animales alimentados con dieta basada en leche de vaca, revela que éstos muestran una tasa de formación de radicales superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) más elevada que los alimentados con dieta basada en leche de cabra tanto con contenido normal ( $P < 0.001$ ), como con sobrecarga de Fe ( $P < 0.001$ ) en todos los tejidos estudiados, lo cual indica un incremento en la producción de  $H_2O_2$ , proporcional a la tasa de neutralización de radicales  $O_2^{\bullet-}$  (Sahin E y Gümüşlü, 2007). Alférez y col. (2003) y Díaz-Castro y col. (2009) han demostrado que el consumo de leche de cabra incrementa la biodisponibilidad de Zn, un mineral con capacidad antioxidante (Zago y Onteiza, 2001) y que la leche de cabra tiene una mejor calidad lipídica que la de vaca (Alférez y col., 2001), por tanto se puede deducir la razón por la cual la producción de radicales libres es más elevada cuando los animales consumen dieta basada en leche de vaca en comparación con la leche de cabra, hecho que se puede relacionar con la mayor tasa de producción de productos de peroxidación lipídica en los animales que consumen esta dieta, como se comentará mas adelante. También es de destacar que la anemia no tiene efecto en la actividad de la SOD, ya que como se ha indicado en el PPE, la ferredficiencia produce modificaciones en la homeostasis celular de Fe, incrementando la actividad de la IRP1 hepática y la síntesis del receptor de transferrina (TfR), lo cual disminuye la actividad aconitasa mitocondrial (Chen y col., 1997), previniendo la liberación de oxidantes de la mitocondria por disminución del suministro de

equivalentes reductores en la cadena de transporte de electrones, como ya indicaron Chen y col. en 1997.

Las actividades prácticamente inalteradas de la CAT y de la GPx en los animales que consumen dieta basada en leche de vaca, indican que el incremento observado en la SOD conduce a un aumento de la formación de hidroperóxidos y que ambas enzimas pueden resultar insuficientes para neutralizar y retirar esta elevada producción de productos intermediarios altamente perjudiciales para la célula (Ghone y col., 2008). La sobrecarga de Fe incrementa la producción de especies reactivas del oxígeno, lo cual se asocia de manera directa con los mayores niveles de SOD para contrarrestar la excesiva producción de  $O_2^{\cdot-}$ . Los menores niveles de GPx ( $P < 0.001$ ) encontrados en situación de sobrecarga pueden atribuirse a la utilización de esta enzima en la neutralización de la alta tasa de radicales libres producidos en los animales alimentados con dieta basada en leche de vaca.

El hígado es un tejido particularmente susceptible al estrés oxidativo, hecho que se refleja en el incremento de la actividad de la SOD, ya que el consumo de dietas con elevado contenido de Fe produce sobrecarga crónica (Feder y col., 1998; Breuer y col., 2000; Hider, 2002; Esposito y col., 2003), que se traduce en una alta expresión de la hepcidina y hace que el Fe se acumule a nivel hepático (Weinstein y col., 2002, Ben-Assa y col., 2009). Esta acumulación hepática de Fe promueve la generación de radicales libres, de manera que la sobreexpresión de la SOD estaría encaminada a contrarrestar esta alta tasa de generación de especies reactivas del oxígeno.

El organismo no posee ningún medio totalmente eficaz de excretar Fe y así la regulación de la absorción de este mineral en el duodeno juega un papel crítico en su homeostasis (Siah y col., 2006). El Fe liberado a la circulación se une a la transferrina y es transportado a los sitios en los que es empleado (principalmente sistema eritroide) y de depósito (hígado). Bajo nuestras condiciones experimentales, el eritrocito es un tipo celular que dadas sus especiales características parece afectarse por la sobrecarga de Fe. Un incremento en la SOD es observado en el grupo control alimentado con dieta basada en leche de vaca ( $P < 0.001$ ) y una disminución de la GPx ( $P < 0.001$ ) en animales controles y anémicos. Una vez más, este hecho indica que el incremento observado en la SOD induce a un aumento en la formación de hidroperóxidos y que la CAT resulta insuficiente para eliminar el exceso de productos intermediarios altamente perjudiciales para la célula (Ghone y col., 2008). Los menores niveles de GPx en hígado y eritrocito pueden atribuirse a la utilización de esta enzima en la neutralización de radicales libres, producidos en los animales alimentados con dieta basada en leche de vaca, como se ha mencionado anteriormente. Las beneficiosas características nutricionales de la leche de cabra, comentadas anteriormente, pueden explicar la menor afectación eritrocitaria por causa de la sobrecarga de Fe en animales alimentados con esta dieta.

El Fe es un cofactor necesario en multitud de procesos metabólicos para el sistema nervioso central, incluyendo la fosforilación oxidativa, síntesis de mielina, transporte de oxígeno y es un cofactor esencial para un gran número de enzimas (Crichton 2008) incluyendo enzimas claves de la biosíntesis de neurotransmisores en el cerebro. Se han realizado importantes avances en la década pasada para comprender el metabolismo de hierro y su homeostasis tanto a nivel celular como sistémico. Sin embargo, el cerebro es un órgano con una constitución única y particular en el

organismo, situado detrás de la relativamente poco permeable barrera hematoencefálica, que limita el acceso de nutrientes plasmáticos, tales como el Fe (Chrichton y col., 2010). El transporte de Fe al cerebro implica receptores de transferrina de las células epiteliales de la barrera, aunque el mecanismo preciso aún permanece sin dilucidar completamente. Las células endoteliales de la barrera hematoencefálica expresan receptores de transferrina (TfR1) en la zona luminal de los capilares. Se ha comprobado que estos receptores no tienden a incrementar su expresión en situación de deficiencia o sobrecarga de Fe (Moos et al. 2007), razón por la cual podemos concluir que el tejido nervioso se afecta relativamente poco por las variaciones de Fe en el organismo, al menos durante el tiempo de nuestro estudio, ya que como hemos podido comprobar, está poco afectado tanto por la sobrecarga como por la anemia a la vista de la actividad prácticamente inalterada de las enzimas antioxidantes por estos factores en los días 70 y 90 del estudio.

Se ha encontrado un incremento en los niveles de TBARS en los animales alimentados con sobrecarga de Fe (Tabla 20) los días 70 y 90 del estudio, respecto a los que reciben una dieta con un contenido normal de Fe. La generación de iones superóxido (uno de los principales y más dañinos radicales libres) es 8 veces mayor en situación de sobrecarga de Fe que cuando no existe esta condición (Scott y col., 1993). Además Linpisarn y col. (1991) encontraron niveles muy elevados de TBARS en plasma y tejidos de ratas tras una dosis única de Fe por vía intravenosa. Posteriormente otros autores (Vives Corrons y col., 1995) revelaron un incremento en la producción de TBARS después del estímulo provocado por peróxido de hidrógeno. Si se considera el efecto del Fe como catalizador de las vías de Fenton y Haber-Weiss y su influencia en la peroxidación lipídica, éste es un resultado que cabía esperar. Sin embargo, el



incremento es más significativo en los animales que reciben la dieta basada en leche de vaca que en los alimentados con leche de cabra ( $P < 0.05$  para los animales alimentados con dieta basada en leche de cabra y  $P < 0.001$  para los alimentados con dieta basada en leche de vaca). Esta menor tendencia a la peroxidación lipídica en los animales alimentados con dieta basada en leche de cabra puede atribuirse a las beneficiosas características nutricionales de este tipo de leche.

Como se ha mencionado anteriormente, Alférez y col. (2003) y Díaz-Castro y col. (2009) han mostrado que el consumo de leche de cabra incrementa la biodisponibilidad de Zn en relación a la de vaca. Esta mejora en el metabolismo del Zn puede contribuir al efecto protector de la leche de cabra contra los fenómenos de peroxidación lipídica. Varios metales pueden interaccionar con Zn en los sistemas biológicos y esta interacción puede tener efectos beneficiosos, previniendo el daño oxidativo mediado por Fe, de particular importancia es la interacción entre Fe y Zn ya que éste, tiene capacidad para competir con el Fe por múltiples sitios de unión a nivel celular. El reemplazo de Fe por Zn puede prevenir el ciclo redox del Fe, por tanto minimiza la tasa de oxidación en las cercanías de los lugares de unión del metal, reduciendo la oxidación lipídica, proteica y el daño oxidativo causado por Fe. Además, Girotti y col. (1985) mostraron que el Zn puede prevenir la oxidación lipídica mediada por Fe en los hematíes y Zago y Oteiza (2001) que el Zn actuaba en parte compitiendo con el Fe en estado ferroso por los sitios de unión cargados negativamente en la membrana celular. La acción competitiva del Zn por el Fe en los sitios de unión celulares es particularmente importante, teniendo en cuenta que una consecuencia de la deficiencia de Zn es un marcado incremento en la concentración de Fe intracelular y en

la propia membrana, lo cual puede incrementar la generación de radicales libres a esos niveles, con la consiguiente inducción de la formación de TBARS.

Por otra parte, la buena calidad lipídica de la leche de cabra puede contribuir al efecto positivo del consumo de este tipo de leche con respecto a los fenómenos de peroxidación. Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) son oxidados rápidamente generando hidroperóxidos y especies reactivas del oxígeno. Estos productos de peroxidación lipídica pueden reaccionar con las biomoléculas para formar productos derivados de eteno o malondialdehído (Fang y col., 1996; Nair y col., 1997). Además, resultados de estudios animales indican que el nivel de grasa en la dieta puede tener influencia en el daño oxidativo del tejido hepático y en la glándula mamaria de ratas después de 2 semanas de modificación de la dieta (Djuric y col., 1992). Posteriores estudios han demostrado que el incremento de la ingesta de PUFA tiene como resultado un claro incremento en la peroxidación lipídica (Fang y col., 1996). En este sentido, como nuestro Grupo de Investigación ha mostrado (Alfárez y col., 2001) la calidad lipídica de la leche de cabra es mejor que la de vaca, por ser más rica en triglicéridos de cadena media (MCT) y tener un mayor contenido en carnitina (Penn y col., 1987), ya que ésta a nivel mitocondrial favorece la tasa de  $\beta$ -oxidación (Bach y Babayan, 1985), incrementando la producción de energía derivada de los ácidos grasos (Fushiki y col., 1995; Van Zyl y col., 1996) y por tanto disminuye la disponibilidad de sustratos para la peroxidación lipídica y se reduce la producción de radicales libres, hecho que una vez más puede explicar la disminución de la formación de TBARS en los animales que consumen dietas basadas en leche de cabra.

Por otra parte, podemos observar que la peroxidación lipídica se incrementa en el día 90 con respecto al 70, ya que todos los procesos de peroxidación lipídica están íntimamente relacionados con la edad. La producción de radicales libres, y de manera concomitante, los procesos de peroxidación lipídica relacionados se incrementan conforme avanza la vida del animal (Jacob y col., 2010), hecho que explica por qué los valores de productos de peroxidación lipídica son más elevados al final del PE (día 90), ya que en esta etapa el animal ha pasado de un estado juvenil, donde el crecimiento es muy activo y se encuentra en fase de desarrollo físico y mental a la etapa adulta de madurez, donde ha cesado el desarrollo (Sisk y Zehr, 2005; McCutcheon y Marinelli, 2009). Además, como era de esperar, los procesos de peroxidación son más acusados en situación de sobrecarga crónica de Fe, debido al incremento en la producción de radicales libres y el consiguiente ataque a los ácidos grasos, generando productos de peroxidación (Aust y Eveleigh, 1999).





# RESUMEN Y CONCLUSIONES



La investigación llevada a cabo estudia los mecanismos de defensa enzimática antioxidante y procesos de peroxidación lipídica, durante el establecimiento y recuperación de la anemia ferropénica nutricional, tras el consumo de dietas basadas en leche de vaca o cabra, con un contenido normal o con sobrecarga crónica de Fe.

Los animales se sometieron a un PPE de 40 días, en los que un grupo se alimenta con dieta estándar, con un contenido normal de Fe (45 mg/Kg dieta) en el caso de los animales controles o con bajo contenido en Fe (5 mg/Kg dieta) en los animales anémicos. Las dietas empleadas en el PPE se han preparado con igual contenido de grasa (procedente de aceite de oliva, 10%) y proteína (aportada por caseína, 20%). Las diferencias entre las dietas empleadas en el PPE están determinadas por el corrector mineral, que en el caso de la dieta que reciben los animales anémicos, se prepara omitiendo el Fe, para inducir la ferrodeficiencia. Tras suministrar las dietas con contenido normal o bajo contenido en Fe, se sacrifican 10 animales por grupo para la extracción del hígado, determinación de índices hepatosomáticos, contenido de Fe hepático y determinación en plasma de la enzima SOD, junto con las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) como marcador de peroxidación. Además se determinan las enzimas CAT y GPx en citosol de hígado, cerebro y eritrocito, realizando también un estudio hematológico en ambos grupos.

Posteriormente, los animales se someten a un PE, en los que son alimentados con dietas basadas en leche de vaca o cabra (elaboradas con un 10% de grasa y un 20% de proteína, aportada por cada tipo de leche), con un contenido normal (45 mg/kg dieta) o sobrecarga de Fe (450 mg/Kg dieta). Tras 30 y 50 días del consumo de las dietas basadas en leche (días 50 y 90 del estudio), se determinan los mecanismos de defensa enzimática

antioxidante (SOD, CAT y GPx en citosol hepático, cerebral y eritrocitario) y productos de peroxidación lipídica en plasma para todos los grupos, además del contenido de Fe hepático.

Tras la discusión de los resultados obtenidos se ha llegado a las siguientes CONCLUSIONES:

### **CONCLUSIÓN PRIMERA**

El consumo de una dieta con bajo contenido en Fe durante 40 días, altera el proceso hematopoyético, afectando a todos los parámetros hematológicos estudiados, de manera que la Hb, recuento de hematíes, VCM, hematocrito, Fe sérico, ferritina sérica y porcentaje de saturación de transferrina eran bajos, mientras que las plaquetas y TIBC se incrementaron marcadamente, hallazgos esperados y consistentes con un severo grado de ferropenia.

### **CONCLUSIÓN SEGUNDA**

La anemia ferropénica nutricional no afecta al estado antioxidante, ni a los procesos de peroxidación lipídica, por existir suficiente capacidad compensatoria en el organismo para mantener las defensas antioxidantes elevadas.



### **CONCLUSIÓN TERCERA**

La actividad de la enzima SOD es más elevada en los animales que consumen la dieta basada en leche de vaca en comparación con los que ingieren dieta basada en leche de cabra, debido a la intensa producción de radicales  $O_2^{\bullet-}$  en el primer grupo de animales, incremento enzimático compensatorio encaminado a retirar y neutralizar el exceso de estos radicales producidos en todos los tejidos estudiados.

### **CONCLUSIÓN CUARTA**

El cerebro es un tejido con una constitución única y particular situado tras la barrera hematoencefálica, que limita el acceso de nutrientes, por tanto la tasa de producción de especies reactivas del oxígeno se afecta relativamente poco debido a las variaciones de Fe en el organismo, mientras que el hígado, por su tendencia a acumular Fe durante la sobrecarga, es especialmente susceptible a la producción de radicales libres, como revelan las enzimas antioxidantes estudiadas.

### **CONCLUSIÓN QUINTA**

La leve modificación de la actividad de CAT y de la GPx en los animales que consumen dieta basada en leche de vaca, indica que ambas enzimas resultan insuficientes para neutralizar y retirar la excesiva producción de radicales libres en la mayoría de tejidos estudiados. En situación de sobrecarga de Fe los menores niveles de GPx en hepatocito y eritrocito pueden atribuirse a la utilización de esta enzima en la neutralización de productos intermediarios altamente perjudiciales para dichas células.

## **CONCLUSIÓN SEXTA**

Los animales alimentados con dieta basada en leche de vaca presentan una mayor formación de productos de peroxidación lipídica en comparación a los que reciben dieta basada en leche de cabra, lo cual se relaciona con el aumento de la actividad de la SOD encontrada en el presente estudio. Además, la sobrecarga de Fe y el avance de la edad del animal son factores que influyen de manera directa incrementando los procesos de peroxidación.

## **CONCLUSIÓN GENERAL**

El consumo habitual de leche de cabra, alimento natural con unas excelentes características nutricionales, tiene efectos positivos sobre la defensa enzimática antioxidante, incluso en situación de sobrecarga de Fe, hecho que incide de manera positiva, limitando los procesos de peroxidación lipídica. Por tanto, sería aconsejable la inclusión en la dieta de este tipo de leche, en la población general y en la afectada por anemia ferropénica nutricional, especialmente en aquellos grupos sometidos a tratamiento oral de Fe.



# BIBLIOGRAFÍA



- Abboud S., Haile, D.J. "A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism". *J. Biol. Chem.*, 2000; 275:19906-19912.
- Acharya J., Panchard N.A., Taylor I.A., Tompson R.P.H., Peason T.C. "Red Cell peroxidation and antioxidant enzymes in iron deficiency". *Eur. J. Haematol.*, 1991; 47:287-291.
- Aebi H. "Catalase in vitro". *Methods Enzymol.*, 1984; 150:121-127.
- Agte V., Jahagirdar M., Chiplonkar S. "Apparent absorption of eight micronutrients and phytic acid from vegetarian meals in ileostomized human volunteers". *Nutrition*, 2005; 21(6):678-685.
- Alfárez M.J.M., Barrionuevo M., López-Aliaga I., Sanz-Sampelayo M.R., Lisbona F., Robles J.C., Campos M.S. "Digestive utilization of goat and cow milk fat in malabsorption syndrome". *J. Dairy Res.*, 2001; 68: 451-461.
- Alfárez M.J.M., López-Aliaga I., Barrionuevo M., Campos, M.S. "Effect of dietary inclusion of goat milk on the bioavailability of zinc and selenium in rats". *J. Dairy Res.*, 2003; 70:181-187.
- Alfárez M.J.M., López-Aliaga I., Barrionuevo M., Lisbona F., Hartiti S., Pallarés I., Campos M.S. "Calcium absorption in rats with distal intestinal resection: influence of dietary fat, cholecalciferol and nature of the adaptive response". *Int. J. Vit. Nutr. Res.*, 1996; 66: 59-65.
- Alfárez M.J.M., López-Aliaga I., Nestares T, Díaz-Castro J., Barrionuevo M, Ros P.B., Campos M.S. "Dietary goat milk improves iron bioavailability in rats with induced nutritional ferropenic anaemia in comparison with cow milk". *Int. Dairy J.*, 2006; 16:813-821.

- Anderson G.J. "Mechanisms of iron loading and toxicity". *Am. J. Hematol.*, 2007; 82:1128-1131.
- Anderson G.J., Vulpe, C.D. "Regulation of intestinal iron transport". In: "Molecular and Cellular Iron Transport". New York: Marcel Dekker; 2002, pp: 559-596.
- Anderson L.J., Holden S., Davis B., Prescott E., Charrier C.C., Bunce N.H., Firmin D.N., Wonke B., Porter J., Walker J.M., Pennell D.J. "Cardiovascular T2-star (T2\*) magnetic resonance for the early diagnosis of myocardial iron overload". *Eur. Heart J.*, 2001; 22:2171-2179.
- Andrews N.C. "Disorders of iron metabolism". *New Engl. J. Med.*, 1999a; 341:1986-1995.
- Andrews N.C. "Forging a field: the golden age of iron biology". *Blood*, 2008; 112:219-230.
- Andrews N.C. "The iron transporter DMT1". *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 1999b; 31:991-994.
- Andrews N.C., Schmidt P.J. "Iron homeostasis". *Ann. Rev. Physiol.*, 2007; 69:69-85.
- Ania B.J., Suman V.J., Fairbanks V.F. "Incidence of anemia in older people: an epidemiologic study in a well defined population". *J. Am. Geriatr. Soc.*, 1997; 45:825-831.
- Annunziato, L., Amoroso, S., Pannaccione, A., Cataldi, M., Pignataro, G., D'Alessio, A., Sirabella, R., Secondo, A., Sibaud, L., Di Renzo, G.F. "Apoptosis induced in neuronal cells by oxidative stress: role played by caspases and intracellular calcium ions". *Toxicol. Lett.*, 2003; 139(2-3):125-133.

- Arbiza S.F. "Producción de caprino". México: AGT Editores., 1986; pp: 105-128.
- Arredondo M., Martinez R., Nunez M.T., Ruz M., Olivares M. "Inhibition of iron and copper uptake by iron, copper and zinc". *Biol. Res.*, 2006; 39:95-102.
- Arredondo M., Nunez M.T. "Iron and copper metabolism". *Mol. Aspects Med.*, 2005; 26(4-5):313-327.
- Aslan M., Horoz M., Kocyigit A., Ozgonul S., Celik H., Celik M., Erel O. "Lymphocyte DNA damage and oxidative stress in patients with iron deficiency anemia". *Mutat. Res.*, 2006; 601:144-149.
- Asmus, K.D. "Sulphur centered free radicals". *Methods Enzymol.*, 1990; 186:168-180.
- Auroma, O.I., Halliwell, B., Gajewski, E., Dizdaroglu, M. "Cooper ion dependent damage to the bases in DNA in the presense of hydrogen peroxide". *Biochem. J.*, 1991; 273:601-604.
- Aust A.E., Eveleigh J.F. "Mechanisms of DNA oxidation". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1999; 222:246-252.
- Aust, S.D., Morehouse, L.A., Thomas, C.E. "Role of metals in oxygen radical reactions". *J. Free Rad. Biol. Med.*, 1985; 1:3-29.
- Babit J., Huang F.W., Xia Y., Sidis Y., Andrews N.C., Lin H. "Modulation of bone morphogenetic protein signaling in vivo regulates systemic iron balance". *J. Clin. Invest.*, 2007; 117:1933-1939.
- Bach A.C., Babayan U.K. "Medium-chain triglycerides: an uptake". *Am. J. Clin. Nutr.*, 1985; 4:67-71.

- Baech S.B., Hansen M., Bukhave K., Jensen M., Sorensen S.S., Kristensen L., Purslow P.P., Skibsted L.H., Sandström B. “Nonheme-iron absorption from a phytate-rich meal is increased by the addition of small amounts of pork meat”. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2003; 77(1):173-179.
- Baltussen R., Knai C., Sharan M. “Iron fortification and iron supplementation are cost-effective interventions to reduce iron deficiency in four subregions of the world”. *J. Nutr.*, 2004; 134: 2678-2684.
- Barbi de Moura M., Santana dos Santos L., Van Houten B. “Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases and cancer”. *Envirom. Mol. Mut.*, 2010; 51:391-405.
- Beard J.L. “Iron biology in immune function, muscle, metabolism, and neuronal functioning”. *J. Nutr.*, 2001; 131:568S-579S.
- Beard J.L., Brigham D.E., Kelley S.K., Green M.H. “Plasma thyroid hormone kinetics are altered in iron-deficient rats”. *J. Nutr.*, 1998; 128: 1401–1408.
- Beckman K.B., Ames B.N. “The free radicals theories of aging matures”. *Physiol. Rev.*, 1998; 547-581.
- Belewu M.A., Aiyegbusi O.F. “Comparison of the mineral content and apparent biological value of milk from human, cow and goat”. *J. Food Tech. Africa.*, 2002; 7: 9-11.
- Belitz H.D., Grosch W. “Química de los alimentos”. 2ª ed. Zaragoza: Acribia., 1997; pp: 813.



- Ben-Assa E., Youngster I., Kozer E., Abu-Kishk I., Bar-Haim A., Bar-Oz B., Berkovitch M. "Changes in serum hepcidin levels in acute iron intoxication in a rat model". *Toxicol. Lett.*, 2009; 189:242-247.
- Bertsche V. "Induction and repair of x-ray damage in mammalian cell cultures treated with membrane-active drugs". *Br. J. Cancer.*, 1984; 49: 121-130.
- Beutler E., Hoffbrand V.A., Cook J.D. "Iron deficiency and overload". *Hematology*, 2003; 40-61.
- Bevilacqua C., Martin P., Candalh C., Fauquant J., Piot M., Roucayrol A.M., Pilla F., Heyman M. "Goats' milk of defective  $\alpha$ S1-casein genotype decreases intestinal and systemic sensitization to  $\beta$ -lactoglobulin in guinea pigs". *J Dairy Sci*, 2001; 68: 217-222.
- Bianca-María E., Ravilacqua C., Martin P., Chandal C. "Goat's milk of defective  $\alpha$ S1-casein genotype decreases intestinal and systemic sensibilization to  $\beta$ -lactoglobulin in guinea pigs". *J. Dairy Res.*, 2001; 68: 217-227.
- Bloem M.W. "Interdependence of vitamin A and iron: an important association for programmes of anaemia control". *Proc. Nutr. Soc.*, 1995; 54(2):501-508.
- Bomford A. "Genetics of haemochromatosis". *Lancet*, 2002; 360:1673-1681.
- Borrás A. "Cómo comer y beber leche". *Comité Nacional Lechero.*, 1968; 8: 7-130.
- Bothwell T.H. "Overview and mechanism of iron regulation". *Nutr. Rev.*, 1995; 53:237-245.

- Boza J. "Obtención de hidrolizados enzimáticos de proteínas lácteas. Estudio del valor nutritivo y de la capacidad antigénica". Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada, 1992.
- Boza J., Sanz Sampelayo M.R. "Antecedentes históricos de la cabra en Andalucía". *Jábega*. 1984; 45: 69-75.
- Boza J., Sanz-Sampelayo M.R. "Nutritional aspects of goat milk". *An. Acad. Cienc. Vet. Andalucía Oriental.*, 1997; 10: 109-139.
- Branda R.F. "Anemia Ferropriva". In: Wood M.E. "Secretos de Hematología y Oncología". 2ª Ed. McGraw-Hill interamericana, 2000; pp: 37-41.
- Breuer W., Hershko C., Cabantchik Z.I. "The importance of non-transferrin bound iron in disorders of iron metabolism". *Transfus. Sci.*, 2000; 23:185-192.
- Brody T. "Nutritional Biochemistry". 1999; 2ª Ed. San Diego: Acad. Press.
- Brownlie T., Utermohlen I.V., Hinton P.S., Giordano C., Haas J.D. "Marginal iron deficiency without anemia impairs aerobic adaptation among previously untrained women". *Am. J. Clin. Nutr.*, 2002; 75:734-742.
- Bügel S.H., Sandström B., Larsen E.H. Absorption and retention of selenium from shrimps in man. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2001;14:198-204.
- Cadenas, E., Davies, K.J.A. "Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging". *Free Rad. Biol. Med.*, 2000; 29(3-4):222-230.
- Camaschella C., Roetto A., De Cobbi M. "Genetic hemochromatosis: genes and mutations associated with ironoverloading". *Best Pract. Res. Clin. Hematol.*, 2002; 15:261-276.

- Camougrand, N., Rigoulet, M. "Aging and oxidative stress: studies of some genes involved both in aging and in response to oxidative stress". *Resp. Phys.*, 2001; 128:393-401.
- Campos M.S., Barrionuevo M., Alférez M.J.M., Gómez-Ayala A.E., Rodríguez- Matas, M.C., López-Aliaga I., Lisbona, F. "Interactions among iron, calcium, phosphorus and magnesium in nutritionally iron-deficient rats". *Exp. Physiol.*, 1998; 83:771-781.
- Campos M.S., Barrionuevo M., Alférez M.J.M., Nestares T., Díaz-Castro J., Ros P.B., Ortega E., Lopez-Aliaga I. "Consumption of caprine milk improves metabolism of calcium and phosphorus in rats with nutritional ferropenic anaemia". In. *Dairy J.*, 2007; 17:412-419.
- Campos M.S., López-Aliaga I., Alférez M.J.M., Nestares T., Barrionuevo M. "Effects of goats' or cows' milk on nutritive utilization of calcium and phosphorus in rats with intestinal resection". *Br. J. Nutr.*, 2003; 90:61-67.
- Cavalli-Sforza T., Berger J., Smitasiri S., Viteri, F. "Weekly iron-folic acid supplementation of women of reproductive age: impact overview, lessons learned, expansion plans, and contributions toward achievement of the millennium development goals ". *Nutr. Rev.*, 2005; 63: S152-S158.
- Chacón A. "Aspectos nutricionales de la leche de cabra (*Capra hircus*) y sus variaciones en el proceso agroindustrial". *Agronomía Mesoamericana.*, 2005; 16: 239-225.
- Chacón A. "Comparación de la titulación de la acidez de leche caprina y bovina con hidróxido de sodio y cal común saturada". *Agronomía Mesoamericana.*, 2006; 17: 55-61.

- Chandan R.C., Attaie R., Sahani K.M “Nutritional aspects of goat milk and its products”. In: Recent advances in goat production. Pre-Conference Proceedings, Vol. I, part II., 1992; pp: 399-420.
- Cheeseman, K.H., Slater, T.F. “Free radical in medicine”. British Council Bulletin, 1993.
- Chen O.S., Schalinske K.L, Eisenstein, R.S. “Dietary iron intake modulates the activity of iron regulatory proteins and the abundance of ferritin and mitochondrial aconitase in rat liver”. J. Nutr., 1997; 127:238–248.
- Chilliard Y. “Caractéristiques biochimies des lipids du lait de chèvre. Comparison avec les laits de vache et humain”. In: Intérêts nutritionnel et diététique du lait de chèvre. INRA editions., 1996; pp: 51-65.
- Cogswell M.E., Parvanta I., Ickes L., Yip R., Brittenham G.M. “Iron supplementation during pregnancy, anemia, and birth weight: a randomized controlled trial “. Am. J. Clin. Nutr., 2003; 78:773-781.
- Conrad M.E., Umbreit J.N. “A concise review: iron absorptionthe mucin-mobliferrin-integrin pathway: a competitive pathway for metal absorption”. Am. J. Hematol., 1993; 42:67-73.
- Conrad M.E., Umbreit J.N. “Iron absorption and transport”. Am. J. Hematol., 2000; 64:287-298.
- Conrad M.E., Umbreit J.N. “Pathways of iron absorption”. Blood Cell Mol. Dis., 2002; 29:336-355.

- Cook J.D. "Diagnosis and management of iron-deficiency anaemia". *Best Pract. Res. Clin. Haematol.*, 2005; 18:319-332.
- Cragg L., Hebel R.P., Miller W., Solovey A., Selbey S., Enright H. "The iron chelator L1 potentiates oxidative DNA damage in iron-loaded liver cells". *Blood*, 1998; 92:632-638.
- Crapo J.D., McCord J.M., Fridovich I. "Preparation and assay of superoxide dismutases". *Methods Enzymol.*, 1978; 53:382-393.
- Craven C.M., Alexander J., Eldridge M., Kushner J.P., Bernstein S., Kaplan J. "Tissue distribution and clearance kinetics of non-transferrin-bound iron in the hypotransferrinemic mouse: A rodent model for hemochromatosis". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987; 84:3457-3461.
- Crichton R.R., Danielsson B.G., Geisser P. "Iron metabolism: biologic and molecular aspects". In: Crichton R.R., Danielsson B.G., Geisser P. "Iron therapy with special emphasis on intravenous administration". 4<sup>a</sup> Ed. Bremen: UNI-Med Verlag AG, 2008; pp: 14-24.
- Crichton R.R., Dexter D.T., Ward R.J. "Brain iron metabolism and its perturbation in neurological diseases". *J Neural Transm.*, 2010; DOI: 10.1007/s00702-010-0470-z.
- Crichton R.R., Wilmet S., Legssyer R., Ward R.J. "Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cell". *J. Inorg. Biochem.*, 2002; 9:9-18.
- Czajka-Narins D.M. "Minerals". In: Krause's Food, Nutrition and Diet Therapy. 9<sup>a</sup> ed. México D.F: Mc-Graw-Hill Interamericana., 1998; pp: 123-167.

- Dael P., Shen L., Renterghem R., Deelstra H. "Selenium content of goat milk and its distribution in protein fractions". *Zeitschrift fuer Lebensmittel Untersuchung und Forschung.*, 1992; 195: 3-7.
- Dallman P.R., Yip R., Oski F.A. "Iron deficiency and related nutritional anemias". In: Natham P., Oski F.A. "Hematology of infancy and childhood". 4<sup>a</sup> Ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1993; pp: 413-450.
- Dandrifosse G., Peulen O., El Kheffif N., Deloyer P., Dandrifosse A.C., Grandfils C. "Are milk polyamines preventive agents against food allergy?" *Proc. Nutr. Soc.*, 2000; 59: 81-86.
- Darnton I., Coveney J., Davey G.R. "Goat milk, nutritional and public health aspects: a review". *Food Tech. Australia.*, 1987; 39: 572-688.
- De la Fuente, M. "Effects of antioxidants on immune system ageing". *Eur .J. Clin. Nutr.*, 2002; 56(3):5-8.
- Delea T.E., Sofrygin O., Thomas S.K., Baladi J.F., Phatak P.D., Coates T. "Cost effectiveness of once-daily oral chelation therapy with Deferasirox versus infusional Deferoxamine in transfusiondependent thalassaemia patients". *Pharmacoeconomics*, 2007; 25:329–342.
- DeSandro V., Chevri er M., Boddaert A., Melcion C., Cordier A., Richiert L. "Comparison of the effects of propylthiouracil, diphenyl hydantoin, phenobarbital and 3 methylcholanthrene on hepatic and renal T4 metabolism and thyroid gland function in rats". *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1991; 111:263–278.
- Díaz-Castro J. "Efecto de la leche de cabra o vaca enriquecida o no en Ca sobre la biodisponibilidad de Fe, Ca, P y Mg en situación de anemia ferropénica

nutricional”, 2007; Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.

Díaz-Castro J., Alférez M.J.M., López-Aliaga I., Nestares T., Campos M.S. “Effect of calcium-supplemented goat or cow milk on zinc status in rats with nutritional ferropenic anaemia”. *Int. Dairy J.*, 2009; 19:116-121.

Díaz-Castro J., Alférez M.J.M., López-Aliaga I., Nestares T., Granados S., Barrionuevo M., Campos M.S. “Influence of nutritional iron deficiency anemia on DNA stability and lipid peroxidation in rats”. *Nutrition*, 2008; 24:1167-1173.

Djuric Z., Lu M.H., Lewis, S.M. “Oxidative DNA damage levels in rats fed low-fat, high-fat, or calorie-restricted diets”. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1992; 115:156-160.

Domellöf M., Hernell O., Abrams S.A., Chen Z., Lönnerdal B. (2009) “Iron supplementation does not affect copper and zinc absorption in breastfed infants”. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2009; 89:185–190.

Domenico I.D., Ward D.M., Kaplan J. “Regulation of iron acquisition and storage: consequences for iron-linked disorders”. *Nat. Rev.*, 2008; 9:72-81.

Donovan A., Brownlie A., Zhou Y., Shepard J., Pratt S.J, Moynihan J., Paw B.H., Drejer A., Baruti B., Zapata Z., Lawt C., Brugnara C., Lux S.E., Pinkus G.S., Pinkus J.L., Kingsley P.D., Palis J., Fleming M.D., Andrews N.C., Zon L.I. “Positional cloning of zebrafish ferroportin 1 identifies a conserved vertebrate iron exporter”. *Nature*, 2000; 403:776-781.

Donovan A., Lima C.A., Pinkus J.L., Pinkus G.S., Zon L.I., Robine S., Andrews N.C. “The iron exporter ferroportin/slca40a1 is essential for iron homeostasis”. *Cell Metab.*, 2005; 1:191-200.

- Drakesmith H., Schimanski L.M., Ormerod E., Merryweather-Clarke A.T., Viprakasit V., Edwards, J.P., Sweetland E., Bastin J.M., Cowley D., Chinthammitr Y., Robson, K.J., Townsend A.R.. "Resistance to hepcidin is conferred by haemochromatosis-associated mutations of ferroportin". *Blood*, 2005; 106:1092-1097.
- Elgendy F.M., Abou-Seif M.A. "Photolysis and membrane lipid peroxidation of human erythrocytes by m-chloroperbenzoic acid". *Photochem. Photobiol.*, 1998; 277(1): 1-11.
- Emerit J., Beaumont C., Trivin F. "Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury". *Biomed. Pharmacol.*, 2001; 55:333-339.
- Emery T. "Iron oxidation by casein". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1992; 182(3):1047-1052.
- Espie W.H., Mullan W.M.A. "Compositional aspects of goat milk in northern Ireland". *Milchwissenschaft.*, 1990; 145: 361-362.
- Esposito B.P., Breuer W., Sirankapracha P., Pootrakul P., Hershko C., Cabantchik Z.I. "Labile plasma iron in iron overload: Redox activity and susceptibility to chelation". *Blood*, 2003; 102:2670-2677.
- Fairbanks V.F. "Iron in medicine and Nutrition". In: Shils M., Olson J.A., Shike M., Ross A.C. "Nutrition in health and disease". 9<sup>th</sup>Ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1999; pp: 223-239.
- Fairweather-Tait S.J. "Bioavailability of nutrients and other bioactive components from dietary supplements: iron". *J. Nutr.*, 2001; 131:S1383-S1386.



- Fang J.L., Vaca C.E., Valsta L.M., Mutanen M. "Determination of DNA adducts of malonaldehyde in humans: effects of dietary fatty acid composition". *Carcinogenesis*, 1996; 17:1035-1040.
- Faria R.J.F., García A., Allara M., García A., Olivares Y., Ríos G. "Some physico-chemical and microbiological characteristics of goat milk produced in Quisiro". *Rev. Fac. Agron.*, 1999; 16: 99-106.
- Feder J.N., Gnirke A., Thomas W., Tsuchihashi Z., Ruddy D.A., Basava A., Dormishian F., Domingo R. JR., Ellis M.C., Fullan A., Hinton L.M., Jones N.L., Kimmel B.E., Kronmal G.S., Lauer P., Lee V.K., Loeb D.B., Mapa F.A., McClelland E., Meyer N.C., Mintier G.A., Moeller N., Moore T., Morikang E., Prass C.E., Quintana L., Starnes S.M., Schatzman R.C., Brunke K.J., Drayna D.T., Risch N.J., Bacon B.R., Wolff R.K. "A novel MHC class 1-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis". *Nat. Genet.*, 1996; 13:399-408.
- Feder J.N., Penny D.M., Irrinki A., Lee V.K., Lebron J.A., Watson N., Tsuchihashi Z., Sigal E., Bjorkman P.J., Schatzman R.C. "The haemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95:1472-1477.
- Feder J.N., Tsuchihashi Z., Irrinki A., Lee V.K., Mapa F.A., Morikang E., Prass C.E., Starnes S.M., Wolff R.K., Parkkila S., Sly W.S, Schatzman R.C."The haemochromatosis founder mutation in HLA-H disrupts  $\alpha$ -2-microglobulin interaction and cell surface expression". *J. Biol. Chem.*, 1997; 272:14025-14028.
- Fehr P., Chilliard Y., Sauvant D. "Goat milk and its components". *Proc. Int. Conf. Goat. Production and Disease.*, 1982; pp: 113-121.

- Feming M.D., Romano M.A., Su M.A., Garrick L.M., Garrick M.D., Andrews N.C. "Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95:1148-1153.
- Fiers W., Beyaert R., Declercq W., Vandenabeele P. "More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage". *Oncogene*. 1999; 18:7719-7730.
- Finkel, T., Holbrook, N.J. "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing". *Nature*, 2000; 408(6809):239-247.
- Flohé L., Gunzler W.A. "Assays of glutathione peroxidase". *Method. Enzymol.*, 1984; 105: 114-121.
- Flohé, L., Schlepel, W. *Physiol. Chem.* 1971; 352:10.
- Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. "Dietary reference intakes for Arsenic, Boron, Calcium, Chromium, Copper, Fluoride, Iodine, Iron, Magnesium, Manganese, Molybdenum, Nickel, Phosphorus, Selenium, Silicon, Vanadium and Zinc". Washington, D.C.: Nat. Ac. Press, 2004; pp: 290-393.
- Franchini M. "Hereditary iron overload: Update on pathophysiology, diagnosis and treatment". *Am. J. Hematol.*, 2006; 81:202-209.
- Frazer D.M., Wilkins S.J., Beckee E.M., Murphy T.L., Vulpe C.D., McKie A.T, Anderson G. J. "A rapid decrease in the expression of DMT1 and Dcytb but not Ireg1 or hephaestin explains the mucosal block phenomenon of iron absorption". *Gut*, 2003; 52:340-346.

- Fridovich, I. "Superoxide dismutase". *Ann. Rev. Biochem.*, 1974; 44: 47-159.
- Fridovich, I. "Superoxide radical: and endogenous toxicant". *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1983; 239-257.
- Fushiki T., Matsumoto K., Inoue K., Kawada T., Sugimoto, E. "Swimming endurance capacity of mice is increased by chronic consumption of medium-chain triglycerides". *J. Nutr.*, 1995; 125:531-539.
- Gabrilove J. "Overview: erythropoiesis, anemia and the impact of erythropoietin". *Semin. Hematol.*, 2000; 37:1-13.
- Gabutti V., Borgna-Pignatti C. "Clinical manifestations and therapy of transfusional haemosiderosis". *Baillieres Clin. Haematol.*, 1994; 7:919-940.
- Gaitán D.C., Olivares M.G., Arredondo M.O., Pizarro A. "Iron bioavailability in humans". *Rev. Chil. Nutr.*, 2006; 33(2):142-148.
- Galy B., Ferring D., Minana B., Bell O., Janser H.G., Muckenthaler M., Schümann K., Hentze M.W. "Altered body iron distribution and microcytosis in mice deficient in iron regulatory protein 2 (IRP2)". *Blood*, 2005; 106:2580-2589.
- Ganong W.F. "Fisiología médica". 19ª ed. Editorial Manual Moderno., 2004;. pp: 513-514.
- Ganz T. "Molecular control of iron transport". *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2007; 18:394-400.
- Ganz T., Nemeth E. "Iron imports. IV. Hepcidin and regulation of body iron metabolism". *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.*, 2006; 290:G199-G203.
- García Ara M.C., Boyano Martínez M.T., Díaz Peña J.M., Martín Muñoz F., Pascual Marcos C., García Sánchez C., Martín Esteban M. "Incidence of allergy to cow's

- milk protein in the first year of life and its effect on consumption of hydrolyzed formulae". *An. Pediatr.*, 2003; 58: 100-105.
- Garcia-Casal M.N., Layrisse M., Solano L., Baron M.A., Arguello F., Llovera D., Ramírez J., Leets I., Tropper E. "Vitamin A and beta-carotene can improve nonheme iron absorption from rice, wheat and corn by humans". *J. Nutr.*, 1998; 128(3):646-650.
- Gera T., Sachdev H.P. "Effect of iron supplementation on incidence of infectious illness in children: Systematic review". *Br. Med. J.*, 2002; 325:1142.
- Ghone R.A., Kumbar K.M., Suryakar\* A.N., Katkam R.V., Joshi N.G. "Oxidative stress and disturbance in antioxidant balance in beta thalassemia major". *Indian J. Clin. Biochem.*, 2008; 23:337-340.
- Gibson R.S., Yeudall F., Drost N., Mtitimuni B.M., Cullinan T.R. "Experiences of a community-based dietary intervention to enhance micronutrient adequacy of diets low in animal source foods and high in phytate: a case study in rural Malawian children". *J. Nutr.*, 2003; 133(2):3992S-3999S.
- Girotti A.W., Thomas J.P., Jordan J.E. "Inhibitory effect of Zn (II) on free radical lipid peroxidation in erythrocyte membranes". *Free Radic. Biol. Med.*, 1985; 1:395-401.
- Girotti, A.W. "Mechanism of lipid peroxidation". *Free. Radic. Biol. Med.*, 1985; 1:87-95.
- Gnan S.O., Erabti H.A., Rana M.S. "The composition of libyan goat milk". *Aust. J. Dairy Technol.*, 1985; 40: 165-166.

- Grantham-McGregor S., Ani C. “A review of studies on the effect of iron deficiency on cognitive development in children”. *J. Nutr.*, 2001; 131:649S-68S.
- Griffiths H.R., Moller L., Bartosz G., Bast A., Bertoni-Freddari C., Collins A., Cooke M., Coolen S., Haenen G., Hoberg A.M., Loft S., Lunec J., Olinski R., Parry J., Pompella A., Poulsen H., Verhagen H., Astley S.B. “Biomarkers”. *Mol. Asp. Med.*, 2002; 23: 101-208.
- Griffiths, R.H., Unsworthj, Blake, D.R., Lunec, J. *Free Rad. Chem. Path. Med.* Richelieu Press, London, 1989; 439-454.
- Grinder-Pedersen L., Bukhave K., Jensen M., Hojgaard L., Hansen M. “Calcium from milk or calcium-fortified foods does not inhibit nonheme-iron absorption from a whole diet consumed over a 4-d period”. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2004; 80:404-409.
- Gueguen L. “Le valeur nutritionnelle minérale du lait du chèvre”. In: “Intérêts nutritionnel er diététique du lait de chèvre”. INRA editions, 1996; pp: 67-80.
- Gunshin H., Fujiwara Y., Custodio A.O., Dizenzo C., Robine S., Andrews N.C. “Slc11a2 is required for intestinal iron absorption and erythropoiesis but dispensable in placenta and liver”. *J. Clin. Invest.*, 2005; 115:1258-1266.
- Gutteridge J.M. “Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage”. *Clin. Chem.*, 1995; 41:1819-1828.
- Gutteridge, J.M.C., Halliwell, B. “Antioxidants in nutrition, health, and disease”. Oxford University Press, 1994; 4:63-81.
- Haas J.D., Brownlie T. “Iron deficiency and reduced work capacity: a critical review of the research to determine a causal relationship”. *J. Nutr.*, 2001; 131:676S-690S.

Haenlein G.F.W. "Goat milk in human nutrition". *Small Rumin. Res.*, 2004; 51: 155-163.

Haenlein G.F.W. "Past, present, and future perspectives of small ruminant dairy research".  
*J. Dairy Sci.*, 2001; 84: 2097-2115.

Haenlein G.F.W. "About the evolution of goat and sheep milk production". *Small Rumin. Res.*, 2007; 68:3-6.

Hahn P.F., Bale W.F., Ross J.F., Balfour W.M., Whipple G.H. "Radioactive iron absorption by gastrointestinal tract: influence of anemia, anoxia and antecedent feeding distribution in growing dogs". *J. Exp. Med.*, 1943; 78:169-88.

Hallberg L. "Bioavailability of dietary iron in man". *Annu. Rev. Nutr.*, 1981; 1:123-147.

Hallberg L. "Iron balance in pregnancy". In: Berger H. "Vitamins and minerals in pregnancy and lactation". Nestle Nutrition Workshop Series. New York: Raven Press, 1988; pp: 115-127.

Hallberg L., Brune M., Erlandsson M., Sandberg A.S., Rossander-Hulten L. "Calcium: effect of different amounts on nonheme- and heme-iron absorption in humans". *Am. J. Clin. Nutr.*, 1991; 53(1):112-119.

Hallberg L., Hulthen L. "Prediction of dietary iron absorption: an algorithm for calculating absorption and bioavailability of dietary iron". *Am. J. Clin. Nutr.*, 2000; 71(5):1147-1160.

Halliwell B., Gutteridge J.M. "The definition and measurement of antioxidants in biological systems". *Free Radic. Biol. Med.*, 1995; 18:125-126.

- Halliwell, B. "Role of free radicals in neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment". *Drugs Aging*, 2001;18:685-716.
- Halliwell, B., Chirico, S. "Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance". *Am. J. Clin. Nutr.*, 1993; 57(S):715-722.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M., Cross, C.E. "Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now?". *J. Lab. Clin. Med.*, 1992; 119(6):598-620.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. "Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy". *Lancet*, 1984; 1:1396-1398.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. "Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts." *Arch. Biochem. Biophys.*, 1986; 286:501-514.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. "Protection against oxidants in biological systems; the superoxide theory of oxygen toxicity". En: Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. Eds. *Free Rad. Biol. Med.* (2<sup>nd</sup> ed) Clarendon Press, 1989; 152-156.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. "Free Radicals in Biology and Medicine", (3<sup>rd</sup> ed) Oxford Science Publications, New York, 1999.
- Hallterman J.S., Kaczorowski J.M., Aligne C.A, Auinger P., Szilagyi P.G. "Iron deficiency and cognitive achievement among schoolaged children and adolescents in the United States". *Pediatrics*, 2001; 107(6): 1381-1386.
- Hanahan D.J., Ekholm J.E. "The preparation of red cell ghost (membranes)". *Methods Enzymol.*, 1974; 31:168-172 .

- Hartiti S., López-Aliaga I., Barrionuevo M., Lisbona F., Pallarés I., Alférez M.J.M., Gómez-Ayala A.E., Campos M.S. “Zinc metabolism in rats: effects of intestinal resection, cholecalciferol and ascorbic acid”. *Nutr. Res.*, 1994; 14:1523-1534.
- Hatch, G.M., Vance, D.E., Wilton, D.C. “Rat liver mitochondrial phospholipase A2 is an endotoxin-stimulated enzyme of kupffer cell which is released during liver perfusion”. *Biochem J.*, 1993; 143-150.
- Hentze M.W., Caughman S.W., Casey J.L., Koeller D.M., Rouault T.A., Harford J.B., Klausner R.D. “A model for the structure and functions of iron-responsive elements”. *Gene*, 1998; 72:201-208.
- Hentze M.W., Muckenthaler M.U., Andrews N.C. “Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism”. *Cell*, 2004; 117:285-297.
- Herberg S., Galan P. “Nutritional anemias”. *Bailleres Clin. Haematol.*, 1992; 5:143-168.
- Hess S.Y., Zimmermann M.B., Arnold M., Langhans W., Hurrell R.F. “Iron-deficiency anemia reduces thyroid peroxidase activity in rats”. *J. Nutr.*, 2002; 132:1951–1955.
- Hider R.C. “Nature of nontransferrin-bound iron”. *Eur. J. Clin. Invest.*, 2002; 32:50-54.
- Hillman R.S., Ault K.A. “Iron deficiency Anemia”. In: Hillman R.S., Ault K.A., Rinder H.M. “Hematology in Clinical Practice. A guide to diagnosis and management”. McGraw-Hill, inc., 1995; pp: 72-85.
- Hurrell R.F. “Influence of vegetable protein sources on trace element and mineral bioavailability”. *J. Nutr.*, 2003; 133(9):2973S-2977S.



Hurrell R.F., Lynch S.R., Trinidad T.P., Dassenko, S.A., Cook, J.D. “Iron absorption in humans: bovine serum albumin compared with beef muscle and egg white”. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1998; 47(1):102-107.

Hurrell R.F., Reddy M.B., Juillerat, M.A., Cook, J.D. “Degradation of phytic acid in cereal porridges improves iron absorption by human subjects”. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2003; 77(5):1213-1219.

Hurrell RF. “How to ensure adequate iron absorption from iron-fortified food”. *Nutr. Rev.*, 2002; 60: S7-S15.

Iannotti L.L., Tielsch J.M., Black M.M., Black, R.E. “Iron supplementation in early childhood: health benefits and risks”. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006; 84:1261–1276.

Infante D., Tormo R. y Martín B. “¿Ha pasado de moda el agua? Los hábitos de bebida de la edad pediátrica: su repercusión nutricional”. *Premios nutrición infantil 2001*. Espulgues de Llobregat: Nestlé España, 2001.

Infante D., Tormo R., Zanduetta M. “Empleo de leche de cabra en pacientes con alergia a las proteínas de la leche de vaca” *An. Pediatr.*, 2003; 59: 138-142.

Iolascon A, De Falco L., Beaumont C. “Molecular basis of inherited microcytic anemia due to defects in iron acquisition or heme synthesis”. *Haematologica*, 2009; 94:395-408.

Ip C., Banni S., Angioni E., Carta G., Mcginley J., Thompson H.J., Barbano D., Bauman D.E. “Conjugated linoleic acid-enriched butter fat alters mammary gland morphogenesis and reduces cancer risk in rats”. *J. Nutr.*, 1999; 129: 2135-2142.

- Isler M., Delibas N., Guclu M., Gultekin F., Sutcu R., Bahceci M., Kosar A. "Superoxide dismutase and glutathione peroxidase in erythrocytes of patients with iron deficiency anemia: effects of different treatment modalities". *Coat. Med. J.*, 2002; 43:16-19.
- Ivan M., Kondo K., Yang H., Kim W., Valiando J., Ohh M., Salic A., Asara J.M., Lane W.S., Kaelin W.G. JR. "HIF $\alpha$  targeted for VHL-mediated destruction by proline hidroxilation: implications for oxigen sensing". *Science*, 2001; 292:464-468.
- Jaakkola P., Mole D.R., Tian Y.M., Wilson M.I., Gielbert J., Gaskell S.J., Kriegsheim A.V., Hebestreit H.F., Mukherji M., Schofield C.J., Maxwell P.H., Pugh C.W., Ratcliffe P.J. "Targeting of HIF-alpha to the Von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by oxygen regulated prolin hidroxilation". *Science*, 2001; 292:468-472.
- Jacob M.H., Janner D.R., Jahn M.P., Kucharski L.C., Belló-Klein A., Ribeiro M.F. "Age-related effects of DHEA on peripheral markers of oxidative stress". *Cell Biochem. Funct.*, 2010; 28:52-57.
- Jandal J.M. "Comparative aspects of goat and sheep milk". *Small Rumin. Res.*, 1996; 22: 177-185.
- Jauber O., Kalantzopoulos O. "Quality of goat milk for cheese and other products". *VI Int. Conf. Goats Int.*, 1996; 1: 274-284.
- Kearney SL., Nemeth E., Neufeld E.J., Thapa D., Ganz T., Weinstein D.A., Cunningham M.J. "Urinary hepcidin in congenital chronic anemias". *Pediat. Blood Cancer*, 2007; 48:57-63.

- Kelso, G.F., Porteous, C.M., Hughes, G., Ledgerwood, E.C., Gane, A.M., Smith, R.A., Murphy, M.P. "Prevention of mitochondrial oxidative damage using targeted antioxidants". *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2002; 959:263-274.
- Kester M.I., Scheltens P. "Dementia: The bare essentials". *Pract. Neurol.*, 2009; 9:241–251.
- Kim Ha J., Lindsay R. "Contributions of cow, sheep and goat milk to characterizing branched-chain fatty acid and phenolic flavors in varietal cheeses". *J. Dairy Sci.*, 1991; 74: 3267-3274.
- Kjeldahl J. Z. "Neue Methode zur Bestimmung des stickstoffs in organischen Körpern". *Z. Anal. Chem.*, 1983; 22:366-382.
- Knuston M.D., Vafa M.R., Haile D.J., Wessling-Resnick M. "Iron overloading and erythrophagocytosis increase ferroportin 1 (FPN1) expression in J774 macrophages". *Blood*, 2003; 102:4191-419.
- Kong W.N., Zhao S.E., Duan X.L., Yang Z., Qian Z.M., Chang Y.Z. "Decreased DMT1 and increased ferroportin 1 expression is the mechanisms of reduced iron retention in macrophages by erythropoietin in rats". *J. Cell Biochem.*, 2008; 104:629-641.
- Koorts A.M., Viljoen M. "Ferritin and ferritin isoforms I: Structure-function relationships, synthesis, degradation and secretion". *Arch. Physiol. Biochem.*, 2007; 113:30-54.
- Kozyraki R., Fyfe J., Verroust P.J., Jacobsen C., Dautry-Varsat A., Gburek J. Willnow T.E., Christensen E.I., Moestrup S.K. " Megalin-dependent cubilin-mediated

- endocytosis is a major pathway for the apical uptake of transferrin in polarized epithelia”. *Proc. Nat. Ac. Sci., U.S.A.*, 2001; 98:12491-12496.
- Krishnamurthy P., Xie T., Schuetz J.D. “The role of transporters in cellular heme and porphyrin homeostasis”. *Pharmacol. Ther.*, 2007; 114:345-358.
- Kumerova A., Lece, A., Skesters A., Silova A., Petuhovs V. “Anaemia and antioxidant defence of the red blood cells”. *Mater. Med. Pol.*, 1998; 30:2-5.
- Lara-Villoslada F., Olivares M., Jiménez J., Boza J., Xaus J. ”Goat milk is less immunogenic than cow milk in a murine model of atopy”. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 2004; 39: 354-360.
- Lawrence, R.A., Burk, R.F. “ Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver”. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1976; 71(4):952-958.
- Laxminarayan R., Mills A.J., Breman J.G., Measham a.R., Alleyne G., Claeson M., Jha P., Musgrove P., Chow J., Shahid-Salles S., Jamison D.T. “Advancement of global health: key messages from the Disease Control Priorities Project”. *Lancet*, 2006; 367:1193-1208.
- Layrisse M., Martinez-Torres C., Roche M. “Effect of interaction of various foods on iron absorption”. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1968; 21(10):1175-1183.
- Lee G.R. “Iron deficiency and iron deficiency anemia”. In: Lea and Febiger. “Clinical Hematology”. Wintrobe`s. 9<sup>a</sup> Ed. Philadelphia-London, 1993; pp: 808-839.
- Lenaz, G. “Role of mobility of redox components in the inner mitochondria membrane”. *J. Membrane Biol.*, 1988; 104:193-209.

Lenaz, G., Bovina, C., D'Aurelio, M., Fato, R., Formiggini, G., Genova, M.L., Giuliano, G., Pich, M.M., Paolucci, U., Castelli, G.P., Ventura, B. "Role of mitochondria in oxidative stress and aging". *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2002; 959:199-213.

Lindsay D.G., Astley S.B. "European research on the functional effects of dietary antioxidants- EUROFEDA". *Mol. Aspects Med.*, 2002; 23:1-38.

Linpisarn S., Satoh K., Maikami T., Orimo H., Shinjo S., Yoshino Y. "Effects of iron on lipid peroxidation". *Int. J. Hematol.*, 1991; 54:181-188.

Littarru, G.P., Battino, M. "Natural antioxidants and sports medicine". *Int. J. Sports. Cardiol.*, 1994; 2:127-130.

Liu, J., Atamna H., Kuratsune, H., Ames, B.N. "Delaying brain mitochondrial decay and aging with mitochondrial antioxidants and metabolites". *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2002; 959:133-166.

Lönnerdal B., Dewey K.G. "Epidemiología de la deficiencia de hierro en lactantes y niños". *An. Nestlé*, 1995; 53:12-19.

López-Aliaga I., Alférez M.J., Barrionuevo M., Lisbona F., Campos MS. "Influence of goat and cow milk on the digestive and metabolic utilization of calcium and iron". *J. Physiol. Biochem.*, 2000; 56:201-208.

López-Aliaga I., Alférez M.J.M., Barrionuevo M., Nestares T., Sanz Sampelayo M.R., Campos M.S. "Study of nutritive utilization of protein and magnesium in rats with resection of the distal small intestine: beneficial effect of goat milk". *J. Dairy Sci.*, 2003; 86: 2958-2966.

- López-Aliaga I., Alférez M.J.M., Lisbona F., Barrionuevo M., Hartiti S., Gómez-Ayala A.E., Campos M.S. "Influence of vitamin D<sub>3</sub> and type of dietary fat on phosphorus absorption in rats with intestinal resection". *Nutr. Res.*, 1994; 14: 47-57.
- López-Aliaga I., Alférez M.J.M., Nestares T., Ros P.B., Barrionuevo M., Campos M.S. "Goat milk feeding causes an increase in biliary secretion of cholesterol and a decrease in plasma cholesterol levels in rats". *J. Dairy Sci.*, 2005; 88: 1024-1030.
- Lou D.Q., Nicolas G., Lesbordes J.C., Viatte L., Grimber G., Szajnert M.F., Kahn A., Vaulont S. "Functional differences between hepcidin 1 and 2 in transgenic mice". *Blood*, 2004; 103:2816-2821.
- Lowry O.H., Rosenburgh N.J., Farr A.L., Randall R.J. "Protein measurement with folin phenol reagent". *J. Biol. Chem.*, 1951; 193:265–270.
- Ludwiczek S., Aigner E., Theurl I., Weiss G. "Cytokine mediated regulation of iron transport in human monocytic cells". *Blood*, 2003; 101:4148-4154.
- Lunec, J. "Free radicals: their involvement in disease processes." *Biochem. Clin.* 1992; 16(2):99-108.
- Maddougall L.G. "Red cell metabolism in iron deficiency anemia". *J. Pediatr.*, 1968; 72:303-328.
- Malus, C.D., Weber, P.C., Leaf, A. Bonventre, J.V. "Incorporation of marine lipids into mitochondrial membranes increase susceptibility to damage by calcium and reactive oxygen species. Evidence for enhanced activation of phospholipase A2 in mitochondria enriched with n-3 fatty acids". *Proc. Nutr. Acad. Sci. USA*, 1999; 87:8845-8849.

- Martin P.”La composition protéique du lait de chèvre: ses particularités. In: Interêts nutritionnel et diététique du latí de chèvre”. INRA Editions., 1996 ; pp: 27-49.
- Martínez-Férez A. “Obtención de oligosacáridos de la leche de diferentes especies por tecnología de membranas”. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada, 2004.
- Martínez-Ferez A., Rudloff S., Guadix A., Henkel C.A., Pohlentz G., Boza J.J., Guadix E.M., Kunz C. “Goat’s milk as a natural source of lactose-derived oligosaccharides: isolation by membrane technology”. *Int. Dairy J.*, 2006; 16: 173-181.
- Marx, G., Chevion, M. “Site-specific modification of albumin by free radicals. Reaction with copper (II) and ascorbate”. *Biochem. J.*, 1986; 234:236-297.
- Massey A.C. “Microcytic anemia: Differential diagnosis and management of iron deficiency anemia”. *Med. Clin. North. Am.*, 1992; 76:549-566.
- McCord J.M. “The evolution of free radicals and oxidative stress”. *Am. J Med.*, 2000; 108: 652-659.
- McCord, J.M., Fridovich, I. “Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte (Hemocuprein)”. *J. Biol. Chem.*, 1968; 244:6049-6055.
- McCutcheon J.E., Marinelli M. “Age matters”. *Eur. J. Neurosci.*, 2009; 29: 997-1014.
- Mcguire M.A., Mcguire M.K. “Conjugated linoleic acid (CLA): A ruminant fatty acid with beneficial effects on human health”. *Proc. Am. Soc. Anim. Sci .Annu.*, 2000; 1: 1-8.

- Mckie A.T., Barrow D., Latunde-Dada G.O., Rolfs A., Sager G., Mudaly E., Mudaly M., Richardson C., Barlow D., Bomford A., Peters T.J., Raja K.B., Sgirali S., Hediger M.A., Farzaneh F., Simpson R.J. "An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron". *Science*, 2001; 291:1755-1759.
- Mckie A.T., Marciani P., Rolfs A., Brennan K., Wehr K., Barrow D., Miret S., Bomford A., Peters T., Farzaneh F. "A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation". *Mol. Cell*, 2000; 5:299-309.
- McPhail A.P., Bothwell, T.H. "The prevalence and causes of nutritional iron deficiency anemia". In: Fomon, S.J. and Zlotkin, S. "Nutritional anemias". Nestlé Nutrition Workshop Series, vol.30, Nestec Ltd., Vevey/Raven Press, Ltd., New York, 1992; 1-12.
- Meister A., Anderson M.E. "Glutathione". *Ann. Rev. Biochem.* 1983; 52:711-760.
- Melov, S. "Therapeutics against mitochondrial oxidative stress in animal models of aging". *Ann N. Y. Acad. Sci.*, 2002; 959:330-340.
- Minotti, G., Aust, D. "The role of iron in the initiation of lipid peroxidation". *Chem. Phys. Lipids.*, 1987; 44:191-208.
- Miret S., Simpson R.J., McKie A.T. "Physiology and molecular biology of dietary iron absorption". *Annu Rev. Nutr.*, 2003; 23: 283-301.
- Miyadera, H., Kano, K., Miyoshi, H., Ishii, N., Hekimi, S., Kita, K. "Quinones in long-lived *clk-1* mutants of *Caenorhabditis elegans*". *FEBS Lett.*, 2002; 512(1-3):33-37.



- Monsen E.R. "Iron nutrition and absorption: dietary factors which impact iron bioavailability". *J. Am. Diet. Assoc.*, 1998; 88:786-7890.
- Moos T., Rosengren Nielsen T., Skjørringe T., Morgan E.H. "Iron trafficking inside the brain". *J. Neurochem.*, 2007; 103:1730–1740.
- Muggli, R. "Free radicals tissue damage: the protective role of antioxidant nutrients." En: *Free radicals and antioxidants in nutrition*. Coringiu, F., Banm. S., Dessi, M.A. Eds. The Richelieu Press. Londres, 1993; 189-194.
- Multhaup, G., Rupper, T. "Reactive oxygen species and Alzheimer disease". *Biochem. Pharmacol.*, 1997; 54(5):533-559.
- Mulvihill B., Kirwan F.M., Morrissey P.A., Flynn A. "Effect of myofibrillar muscle proteins on the in vitro bioavailability of non-haem iron". *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 1998; 49(3):187-192.
- Muñoz M., Campos A., García J.A., Ramírez G. "Physiopathology of iron metabolism: diagnostic and therapeutic implications" *Nefrologia*, 2005; 25:9-19.
- Muñoz M., Villar I., Garcia-Erce J.A. "An update on iron physiology". *World J. Gastroenterol.*, 2009; 15:4617-4626.
- Murphy MP. "How mitochondria produce reactive oxygen species". *Biochem. J.*, 2009; 417:1–13.
- Nadadur S.S., Srirama K., Mudipalli A. "Iron transport & homeostasis mechanisms: Their role in health & disease" *Indian J. Med. Res.*, 2008; 128:533-544.
- Nair J., Vaca C.E., Velic I., Mutanen M., Valsta L.M., Bartsch H. "High dietary  $\omega$ -6 polyunsaturated fatty acids drastically increase the formation of etheno-DNA base

- adducts in white blood cells of female subjects”. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 1997; 6:597-601.
- Navarro, A., López-Cepero, J.M., Sanchez del Pino, M.J. “Skeletal muscle and aging”. *Frontiers in Bioscience*, 2001; 6:26-44.
- Nemeth E., Ganz T. “Hepcidin and iron-loading anemias”. *Haematologica*, 2006a; 91:727-732.
- Nemeth E., Ganz T. “Regulation of iron metabolism by hepcidin”. *Annu. Rev. Nutr.*, 2006b; 26:323-342.
- Nemeth E., Tuttle M.S., Powelson J., Vaughn M.B., Donovan A., Ward D.M., Ganz T., Kaplan J. “Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization”. *Science*, 2004; 306:2090-2093.
- Nestares T., Díaz-Castro J., Alférez M.J.M., López-Aliaga I., Barrionuevo M., Campos M.S. “Calcium-enriched goat milk, in comparison with similarly enriched cow milk, favours magnesium bioavailability in rats with nutritional ferropenic anaemia”. *J. Sci. Food Agric.*, 2008, 88:319-327.
- Nicolas G., Bennoun M., Devaux I., Beaumont C., Grandchamp B., Kahn A., Vaulont S. “Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice”. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2001; 98:8780-8785.
- Nicolas G., Chauvet, C, Viatte, L, Danaan J.L. , Bigard X., Devaux I., Beaumont C. , Kahn A.,Vaulont S. “The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia and inflammation”. *J. Clin. Invest.*, 2002; 110:1037-1044.

- Niki, E. "Antioxidants in relation to lipid peroxidation". *Chem. Phys. Lipids*, 1987; 44:227-253.
- Nissenson A.R., Berns J.S., Sakiewicz P., Ghaddar S., Moore G.M., Schleicher R.B., Seligman P.A. "Clinical evaluation of heme iron polypeptide: sustaining a response to rHuEPO in hemodialysis patients". *Am. J. Kidney Dis.*, 2003; 42:325-330.
- Norberg E., Orren S., Zhivotovsky B. "Mitochondrial regulation of cell death: processing of apoptosis-inducing factor (AIF)". *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2010; 396(1):95-100.
- O'Connor D.L. "Folate in goat milk products with reference to other vitamins and minerals: a review". *Small Rumin. Res.*, 1994; 14: 143-149.
- O'Neil J., Powell L. "Clinical aspects of hemochromatosis". *Semin. Liver Dis.*, 2005; 25:381-391.
- Odle J. "New insights into the utilization of medium-chain triglycerides by the neonate: observations from a piglet model". *J. Nutr.*, 1997; 127: 1061-1067.
- Ohgami R.S., Campagana D.R., Antichos B., Wood E.B., Shartp J.J. "nm 1054: a spontaneous, recessive, hypochromatic, microcytic anemia mutation in the mouse". *Blood*, 2005a; 106:3625-3631.
- Ohgami R.S., Campagana D.R., Greer E.L., Antiochos B., McDonald A., Chen J, Sharp J.J, Fujiwara Y., Barker J.E., Fleming M. D. "Identification of a ferredoxin required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells". *Nat. Genet.*, 2005b; 37:1264-1269.

- Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. "Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction". *Anal Biochem.*, 1979; 95:351–358.
- Oppenheimer S.J. "Iron and its relation to immunity and infectious disease". *J. Nutr.*, 2001; 131: 616S-633S.
- Orino K., Lehman L., Tsuji Y., Ayaki H., Torti S.V., Torti F.M. "Ferritin and the response to oxidative stress". *Biochem. J.*, 2001; 357:241-247.
- Oski F.A. "Iron deficiency in infancy and childhood". *New Engl. J. Med.*, 1993; 329:190-198.
- Ott M., Gogvadze V., Orrenius S., Zhivotovsky B. "Mitochondria, oxidative stress and cell death". *Apoptosis*, 2007; 12:913–922.
- Pallarés I., Lisbona F., López-Aliaga I., Barrionuevo M., Alférez M.J.M., Campos M.S. "Effects of iron deficiency on the digestive utilization of iron, phosphorus, calcium and magnesium in rats". *Br. J. Nutr.*, 1993; 70, 609-620.
- Papanikolaou G., Tzilianos M., Christakis J.I., Bogdanos D., Simirika K., Macxfarlane J., Goldberg Y.P., Sakellaropoulos N., Ganz T., Nemeth E."Hepcidin in iron overload disorders". *Blood*, 2005; 105:4103-4105.
- Papanikolaou G., Pantopoulos K. "Iron metabolism and toxicity". *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2004; 202:199-211.
- Pariza M.W., Park Y., Cook ME. "The biologically active isomers of conjugated linoleic acid". *Progr. Lipid Res.*, 2001; 40: 283-298.

Park Y.W. "Goat milk. Chemistry and nutrition. In: Park YW y Haenlein G.F.W. Handbook of milk of non-bovine mammals. Oxford: Blackwell Publishing., 2006 pp: 34-58.

Park Y.W. "Hypo-allergenic and therapeutic significance of goat milk". Small Rumin. Res., 1994; 14: 151-155.

Park Y.W., Storkson J.M., Albright K.J., Liu W., Pariza M.W. "Evidence that the trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice". Lipids., 1999; 34: 235-241.

Patterson A.J. "Dietary treatment of iron deficiency in women of child-bearing age". Am. J. Clin. Nutr., 2001; 74:650-656.

Pauline L., Lee L., Beutler E. "Regulation of Heparin and Iron-Overload Disease". Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis., 2009 4:489-515.

Penn D., Dolderer M., Schmidt-Sommerfeld E. "Carnitine concentrations in the milk of different species and infant formulas". Biol. Neonate, 1987; 52:70-79.

Peyssonaux C., Zinkernagel A.S., Schuepbach R.A., Rankin E., Vaulont S., Hasse V.H., Nizet V., Johnson R.S. "Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs)". J. Clin. Invest., 2007; 117:1926-1932.

Pietrangelo A. "Hereditary hemochromatosis". Biochim. Biophys. Acta, 2006; 1763:700-710.

Pietrangelo A. "Physiology of iron transport and the hemochromatosis gene". Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol., 2002; 282:G403-G414.

- Ploszaj T., Ryniewicz Z., Motyl T. "Polyamines in goat's colostrum and milk". *Comp. Biochem. Physiol.*, 1997; 118B: 45-52.
- Punnonen K., Irjala K., Rajamaki A. "Serum transferrin receptor and its ratio to serum ferritin in the diagnosis of iron deficiency". *Blood*, 1997; 9:1052-1057.
- Quidt G.Y., Triveri M.G., Khaper N., Liu P.P., Blackx P.H. "Role of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in iron transport and iron-overload cardiomyopathy". *J. Mol. Med.*, 2006, 84:349-364.
- Radi, R., Bush, M., Freeman, B.A. "The role of cytochrome c and mitochondrial catalase in hydroperoxide-induced heart mitochondrial lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1993; 300(1):409-415.
- Raja K.B., Simpson R.J., Peters T.J. "Intestinal iron absorption studies in mouse models of iron-overload". *Br. J. Haematol.*, 1994; 86:156-162.
- Raja K.B., Simpson R.J., Pippard M.J., Peters T.J. "In vivo studies on the relationship between intestinal iron ( $\text{Fe}^{3+}$ ) absorption, hypoxia and erythropoiesis in the mouse". *Br. J. Haematol.*, 1988; 68(3):373-378.
- Ramm G.A., Ruddell R.G. "Hepatotoxicity of iron overload: Mechanisms of iron induced hepatic fibrogenesis". *Semin. Liver Dis.*, 2005; 25:433-449.
- Rayman, M.P. The importance of selenium to human health. *Lancet*, 2000; 356:233-241.
- Reddy M.B., Cook J.D. "Effect of calcium intake on nonheme iron absorption from a complete diet". *Am. J. Clin. Nutr.*, 1997; 65:1820-1825.

- Reeves P., Nielsen F., Fahey G. "AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet". *J. Nutr.*, 1993; 123:1939-1951.
- Remmen, H.V., Richardson, A. "Oxidative damage to mitochondria and aging". *Exp. Gerontol.*, 2001; 36:957-968.
- Roberfroid, M., Buc-Calderon, P. "Free radical and oxidation phenomena in a biological system". Marce Dekker Inc., New York, USA, 1995.
- Rossander-Hulten L., Brune M., Sandstrom B., Lonnerdal B., Hallberg L. "Competitive inhibition of iron absorption by manganese and zinc in humans". *Am. J. Clin. Nutr.*, 1991; 54(1):152-156.
- Rouault T.A. "The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease". *Nat. Chem. Biol.*, 2006; 2:406-414.
- Roughead Z.K., Zito C.A., Hunt J.R. "Inhibitory effects of dietary calcium on the initial uptake and subsequent retention of heme and nonheme iron in humans: comparisons using an intestinal lavage method". *Am. J. Clin. Nutr.*, 2005; 82(3):589-597.
- Ryder J.W., Portocarrero C.P., Song X.M., Cui L., Yu M., Combatsiaris T., Galuska D., Bauman D.E., Barbano D.M., Charron M.J., Zierath J.R., Houseknecht K.L. "Isomer-specific antidiabetic properties of conjugated linoleic acid". *Diabetes.*, 2001; 50: 1149-1157.
- Sahin E., Gümüşlü S. "Stress-dependent induction of protein oxidation, lipid peroxidation and anti-oxidants in peripheral tissues of rats: comparison of three stress models

- (immobilization, cold and immobilization-cold)". *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 2007; 34:425-431.
- Saini A.L., Gill R.S. "Goat milk: An attractive alternate". *Indian Dairyman*, 1991; 42: 562-564.
- Samarzija D., Havranec J.L., Pavic V., Mioc B. "Effects of stage of lactation on the chemical composition of goat milk". *Czech J. Anim. Sci.*, 2001; 46: 548-553.
- Sánchez M. "Especies menores para pequeños productores: cabras lecheras". In: *Memoria de la XIX Reunión Nacional sobre Caprinocultura*. Acapulco Gro. 2004; pp: 219-223.
- Sandberg A.S., Brune M., Carlsson N.G., Hallberg L., Skoglund E., Rossander-Hulthen L. "Inositol phosphates with different numbers of phosphate groups influence iron absorption in humans". *Am. J. Clin. Nutr.*, 1999; 70(2):240-246.
- Sanderson P. "A New method of analysis of feeding stuffs for the determination of crude oils and fat". En: Haresing W., Cole D.J.A. "Recent advances in animal nutrition". London: Butter Worths, 1986; pp: 77-86.
- Sandström B. "Micronutrient interactions: effects on absorption and bioavailability". *Br. J. Nutr.*, 2001; 85(2):S181-S185.
- Santana M.A., Pihakaski-Maunsbach K., Sandal N., Marcker K.A., Smith A.G. "Evidence that the plant host synthesizes the heme moiety of leghemoglobin in root nodules". *Plant. Physiol.*, 1998; 116(4):1259-1269.



Sanz Ceballos L. “Caracterización de la leche de cabra frente a la de vaca. Estudio de su valor nutritivo e inmunológico”. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, 2007.

Sanz Ceballos L., Ramos Morales E., De la Torre Adarve G., Díaz Castro J., Pérez Martínez L., Sanz Sampelayo M.R. “Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology”. *J. Food Comp. Anal.*, 2009; 22: 322-329.

Sanz Sampelayo M.R., Martín A.J., Pérez L., Gil Extremera F., Boza J. “Dietary supplements for lactating goats by polyunsaturated fatty acid-rich protected fat. Effects after supplement withdrawal”. *J. Dairy Sci.*, 2004; 87: 1796-1802.

Saran, M., Michael, C. Bors, W. “Reaction of NO with O<sub>2</sub> implications for the action of endothelium-derived relaxing factor”. *Free Radic. Res. Com.* 1988; 83:1705-1715. En Cheeseman, K.H. Slater, T. “Free Radicals in Medicine”. *British Council Bulletin*, 1993; 49(3):485.

Scherz-Shouval R., Elazar Z. “ROS, mitochondria and the regulation of autophagy”. *Trends Cell Biol.*, 2007; 17:422–427.

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.

Scott M.D., VanDer Berg J.J.M., Repka T. “Effect of excess  $\alpha$ -hemoglobin chains on cellular and membrane oxidation in model beta-thalassemic erythrocytes”. *J. Clin. Invest.*, 1993; 91:1706-1712.

- Sharp P. "The molecular basis of copper and iron interactions". *Proc. Nutr. Soc.*, 2004; 63(4):563-569.
- Siah C.W., Ombiga J., Adams L.A., Trinder D., Olynyk J.K. "Normal iron metabolism and the pathophysiology of iron overload disorders". *Clin. Biochem. Rev.*, 2006; 27: 5-16.
- Siega-Riz A.M., Hartzema A.G., Turnbull C., Thorp J., McDonald T., Cogswell M.E. "The effects of prophylactic iron given in prenatal supplements on iron status and birth outcomes: a randomized controlled trial". *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2006; 194: 512-519.
- Sipe D.M., Murphy R.F. "Binding to cellular receptors results in increased iron release from transferrin at mildly acidic pH". *J. Biol. Chem.*, 1991; 266:8002-8007.
- Sisk C.L., Zehr J.L. "Pubertal hormones organize the adolescent brain and behaviour". *Front. Neuroendocrinol.*, 2005; 26: 163-174.
- Smith S.R., Cooperman S., Lavaute T., Tresser N., Ghosh M., Meyron-Holtz E., Land W., Ollivierre H., Jortner B., Switzer R.D., Messing A., Rouault T.A. "Severity of neurodegeneration correlates with compromise of iron metabolism in mice with iron regulatory protein deficiencies". *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2004; 1012: 65-83.
- Soule B. P., Hyodo F., Matsumoto K., Simone N. L., Cook J. A., Krishna M. C., Mitchell JB. "The chemistry and biology of nitroxide compounds". *Free Radic. Biol. Med.*, 2007; 42:1632-1650.
- Stephenson L.S., Lathan M.C., Ottesen E.A. "Global malnutrition". *Parasitology*, 2000; 121:S15-S22.

- Stewart W.B., Yule C.L., Claiborne H.A., Snowman R.T., Whipple G.H. "Radioiron absorption in anemic dogs: fluctuations in the mucosal block and evidence for a gradient of absorption in the gastrointestinal tract". *J. Exp. Med.*, 1950; 92:75-82.
- Stoltzfus R.J. "Iron-deficiency anemia: reexamining the nature and magnitude of the public health problem". *J. Nutr.*, 2001; 131(2):697S-701S.
- St-Onge M.P., Jones P. "Physiological effects of medium chain triglycerides: potential agents in the prevention of obesity". *J. Nutr.*, 2002; 132: 329-332.
- Strube Y.N.J., Beard J.L., Ross A.C. "Iron deficiency and marginal vitamin A deficiency affect growth hematological indices and the regulation of iron metabolism genes in rats". *J. Nutr.*, 2002; 132:3607–3615.
- Sullivan L.W., Luhby L.A., Streiff L.W. "Studies on the daily requirement for folic acid in infants and the etiology of folate deficiency in goat's milk megaloblastic anemia". *Am. J. Clin. Nutr.*, 1966; 18: 311-317.
- Swain J.H., Johnson L.K., Hunt J.R. "Electrolytic iron or ferrous sulphate increase body iron in women with moderate to low iron stores". *J. Nutr.*, 2007; 137:620-627.
- Swain R.A., Kaplan B., Montgomery E. "Iron deficiency anemia: When is parenteral therapy warranted?". *J. Postgrad. Med.*, 1996; 100:181-193.
- Tanaka N., Kiyosawa K. "Phlebotomy: a promising treatment for chronic hepatitis C". *J. Gastroenterol.*, 2004; 39:601–603.

- Tappenden K.A, Thomson A.B., Wild G.E., Mc Burney M.I. “Short-chain fatty acid-supplemented total parenteral nutrition enhances functional adaptation to intestinal resection in rats”. *Gastroenterology*, 1997; 112: 792-802.
- Teucher B., Olivares M., Cori H. “Enhancers of iron absorption: ascorbic acid and other organic acids”. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 2004; 74(6):403-419.
- Theil E.C. “Iron, ferritin and nutrition”. *Ann. Rev. Nutr.*, 2004; 24:327-343.
- Theurl I., Aigner E., Theurl M., Nairz M., Seifert M., Schroll A., Sonnweber T., Eberwein L., Witcher D.R., Murphy A.T., Wroblewski V.J., Wurz E., Datz C., Weiss G. “Regulation of iron homeostasis in anemia of chronic disease and iron deficiency anemia: diagnostic and therapeutic implications”. *Blood*, 2009; 113:5277-5286.
- Torti F.M., Torti S.V. “Regulation of ferritin genes and protein”. *Blood*, 2002; 99:3505-3516.
- Tselepis C., Ford S.J., McKie A.T., Vogel W., Zoller H., Simpson R.J., Diaz Castro J., Iqbal T.H., Ward D.G. “Characterization of the transition-metal-binding properties of hepcidin”. *Biochem. J.*, 2010; 427:289-296.
- U.S.D.A. Department of Agriculture, Agricultural Research Service; Nutrient Data Laboratory. *USDA National Nutrient Database for Standard Reference*. 17<sup>a</sup> ed., 2004; pp: 106.
- Uchida T., Akitsuki T., Kimura H., Tanak T., Matsuda S., Kariyone S. “Relationship among plasma iron, plasma iron turnover, and reticuloendothelial iron release”. *Blood*, 1983; 61:799-802.

- Ursini, F., Bindoli, A. "The risk of selenium peroxidases in the protection against microsomal lipid peroxidation". *Chem. Phys. Lipid*, 1987; 44:255-276.
- Uzel C., Conrad M.E. "Absorption of heme iron". *Semin. Hematol.*, 1998; 35:27-34.
- Vaghefi N., Nedjaoum F, Guillochon D., Bureau F., Arhan, P., Bouglé D. "Iron absorption from concentrated haemoglobin hydrolysate by rat". *J. Nutr. Biochem.*, 2005; 16:347-352.
- Valerie, K., Povirk, L. "Regulation and mechanisms of mammalian double-strand breakrepair". *Oncogene*, 2003; 22(37):5792-5812.
- Valls-Bellés V., Muñoz P., González P., González-Sanjosé M.L., Beltrán S. "Mechanism of protection by epicatechin against tert-butylhydroperoxide induced oxidative cell injury in isolated rat hepatocytes and calf thymus DNA". *Process Biochem.*, 2002; 37: 659-667.
- Van Campen D.R. "Enhancement of iron absorption from ligated segments of rat intestine by histidine, cysteine and lysine. Effects of removing ionizing groups and of stereoisomerism". *J. Nutr.*, 1973; 103: 139-142.
- Van Den Broek N.R., Letsky E.A. "Etiology of anemia in pregnancy in south Malawi". *Am. J. Clin. Nutr.*, 2000; 72:247S-256S.
- Van der Berg, J.J., Op Den Kamp, J.A., Lubin, B.H., Kuypers, F.A. "Conformational changes in oxidized phospholipids and their preferential hydrolysis by phospholipase A2: a monolayer study". *Biochemistry*, 1993; 32:4962-4967.

- Van Zyl C.G., Lambert E.V., Hawley J.A., Noakes T.D., Dennis S.C. "Effects of medium-chain triglyceride ingestion on fuel metabolism and cycling performance". *J. Appl. Physiol.*, 1996; 80:2217-2225.
- Viña, J., Sastre, J., Anton, V., Rivelles, M., Bruseghini, L., Esteras, A., Asensi, M. "Role of antioxidants in aging prevention". *J. Clin. Nutr. Gastroent.*, 1993; 8(S):S30-S33.
- Vives Corrons J.L., Miguel-Garcia A., Pujades M.A., Miguel-Sosa A., Cambiazzo S., Linares M., Dibarrart M., Calvo M.A. "Increased susceptibility of microcytic red blood cells to in vitro oxidative stress". *Eur. J. Haematol.*, 1995; 55:327-331.
- Vulpe C.D., Kuo Y.M., Murphy T.L., Cowley L., Askwith C., Libina N., Gitschier J., Anderson G.J. "Hepaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse". *Nat. Genet.*, 1999; 21(2):195-199.
- Weinstein D.A., Roy C.N., Fleming M.D., Loda M.F., Wolfsdorf J.I., Andrews N.C. "Inappropriate expression of hepcidin is associated with iron refractory anemia: implications for the anemia of chronic disease". *Blood*, 2002; 100:3776-3781.
- Wendel, A. "Glutathione peroxidase". En: Cheeseman, K.H., Slater, T.F. "Free Rad. Biol. Med"., British Council Bulletin, 1993.
- Whittaker P. "Iron and zinc interactions in humans". *Am. J. Clin. Nutr.*, 1998; 68(2):442S-446S.
- WHO. "Guidelines on Food Fortification with Micronutrients". Genova, 2006.
- WHO. "Iron deficiency anaemia: assessment, prevention, and control. A guide for programme managers". Geneva, World Health Organization, 2001.

- WHO. “Iron supplementation of young children in regions where malaria transmission is intense and infectious disease highly prevalent”, 2007.
- WHO. “Surgical care at the district hospital”. Geneva, World Health Organization, 2003.
- WHO/FAO. “Requirements of vitamin A, iron, folate and vitamin B12”. Food and Nutrition Series, Rome: FAO. 2004; 23:33-50.
- Wienk K.J., Marx J.J., Beynen A.C. “The concept of iron bioavailability and its assessment”. *Eur. J. Nutr.*, 1999; 38(2):51-75.
- Wilcox C. S., Pearlman A. “Chemistry and antihypertensive effects of tempol and other nitroxides”. *Pharm. Rev.*, 2008; 60:418–469.
- Wolff, S.P., Dean, R.T. “Fragmentation of proteins by free radicals and its effect on their susceptibility to enzyme hydrolysis”. *Biochem. J.*, 1986; 234:399-403.
- Yagi K. “A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma”. *Biochem Med.* 1976; 15:212–216.
- Yip R. “Significance of an abnormality low or high haemoglobin concentration during pregnancy. Special consideration of iron nutrition”. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2000; 72:272S-279S.
- Zago M.P., Oteiza P.I. “The antioxidant properties of zinc: interactions with iron and antioxidants”. *Free Radic. Biol. Med.*, 2001; 31:266-274.
- Zhang A., Enns C. “Iron homeostasis: recently identified proteins provide insight into novel control mechanisms”. *J. Biol. Chem.*, 2009; 284:711–715.

Zlotkin S. "Treatment of anemia with microencapsulated ferrous fumarate plus ascorbic acid supplied as sprinkles to complementary (weaning) foods". *Am. J. Clin. Nutr.*, 2001; 74:791-795.

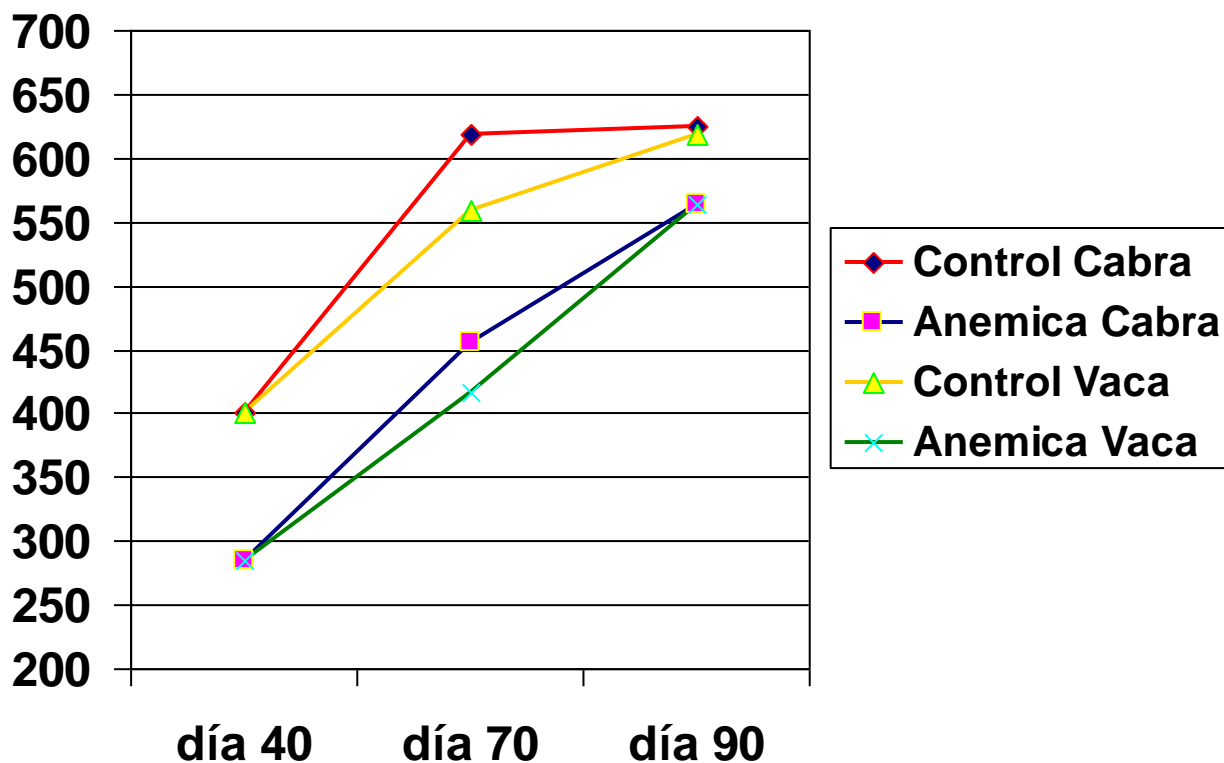




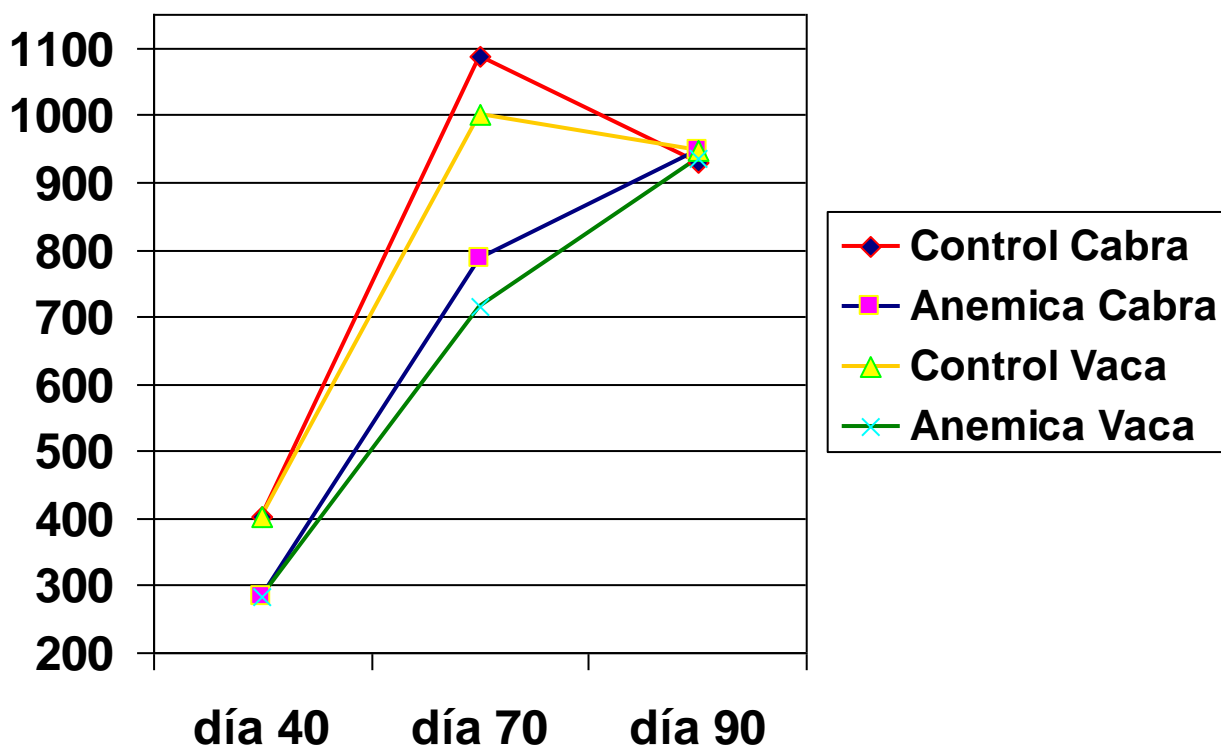
APÉNDICE  
DE FIGURAS



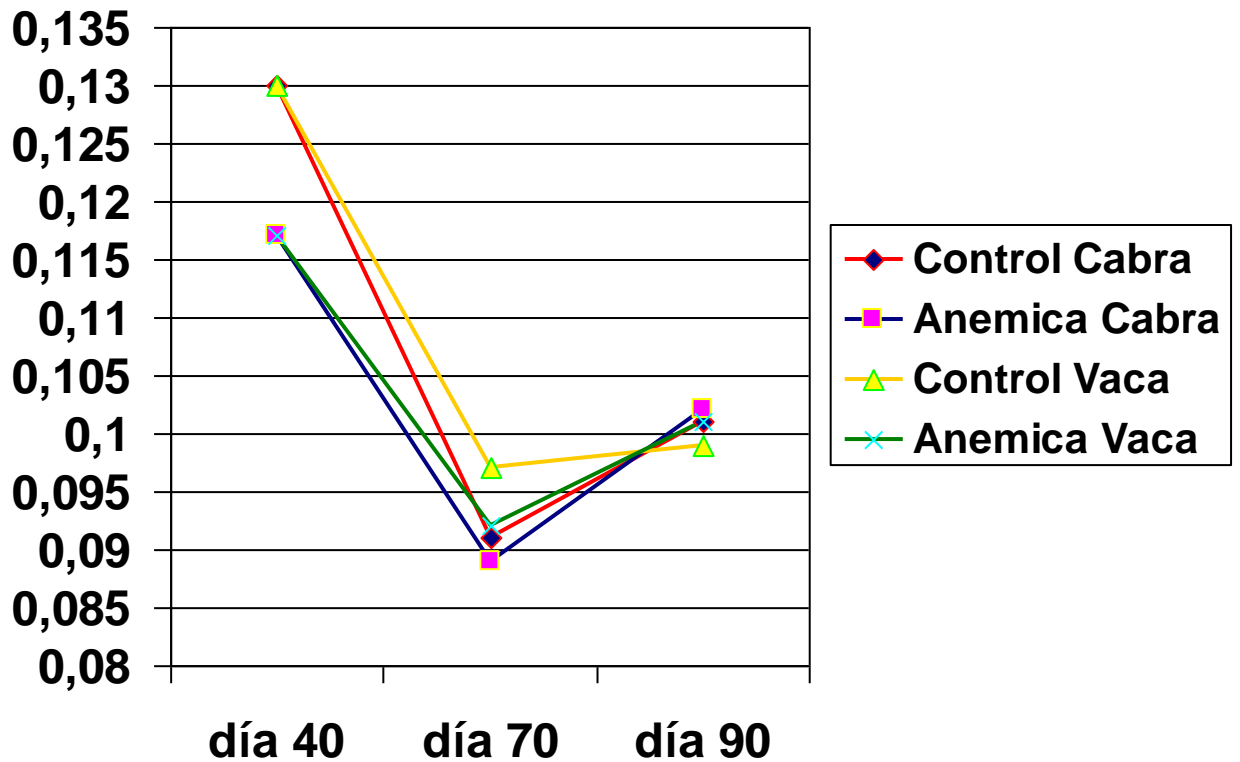
**Figura 11A.** Contenido de Fe hepático ( $\mu\text{g/g}$  sustancia seca) en los animales alimentados con dietas basadas en leche con contenido normal de Fe.



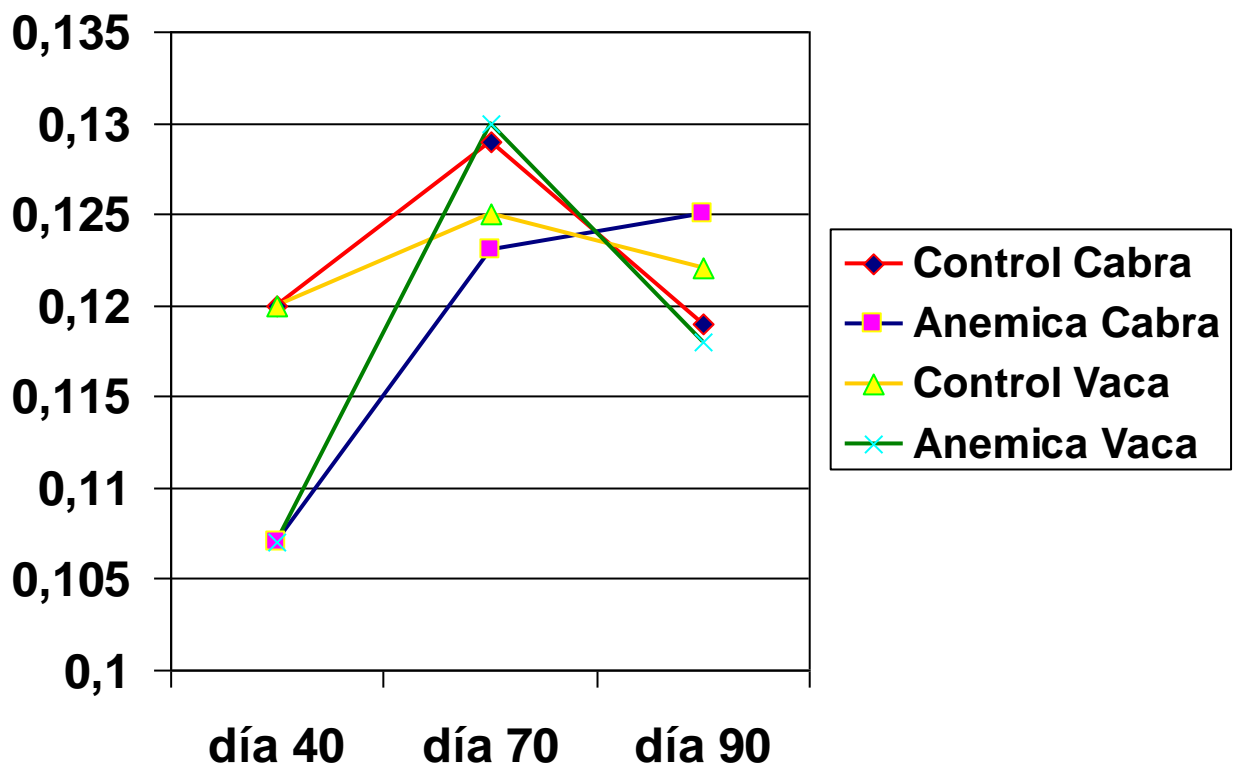
**Figura 11B.** Contenido de Fe hepático ( $\mu\text{g/g}$  sustancia seca) en los animales alimentados con dietas basadas en leche con sobrecarga de Fe.



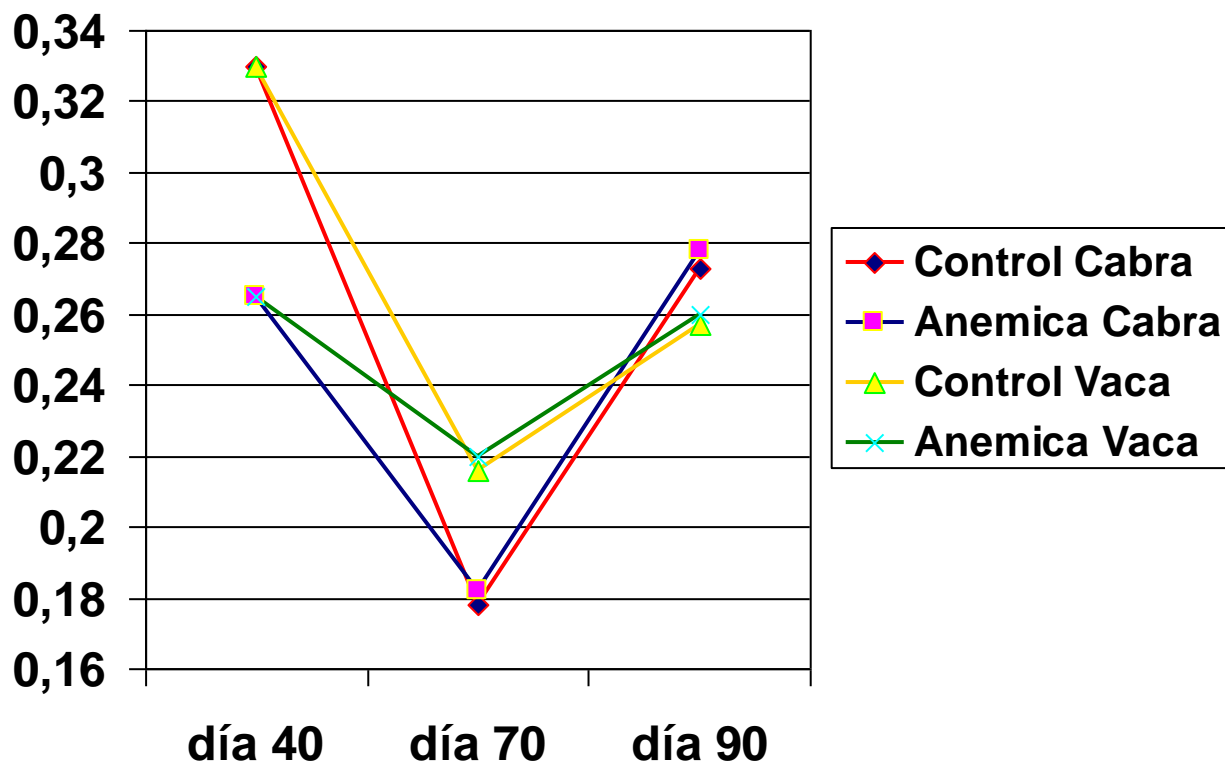
**Figura 12A.** CAT en citosol de cerebro (U/mL citosol) en los animales alimentados con dietas basadas en leche con contenido normal de Fe.



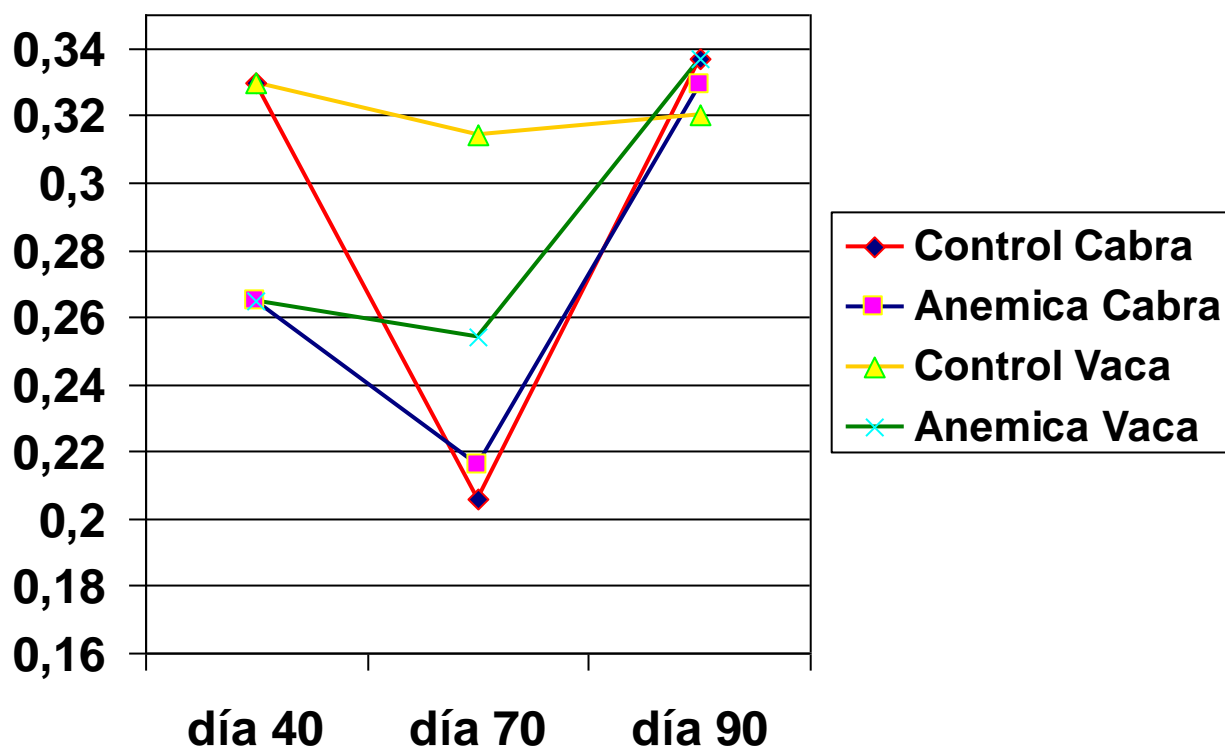
**Figura 12B.** CAT en citosol de cerebro (U/mL citosol) en los animales alimentados con dietas basadas en leche con sobrecarga de Fe.



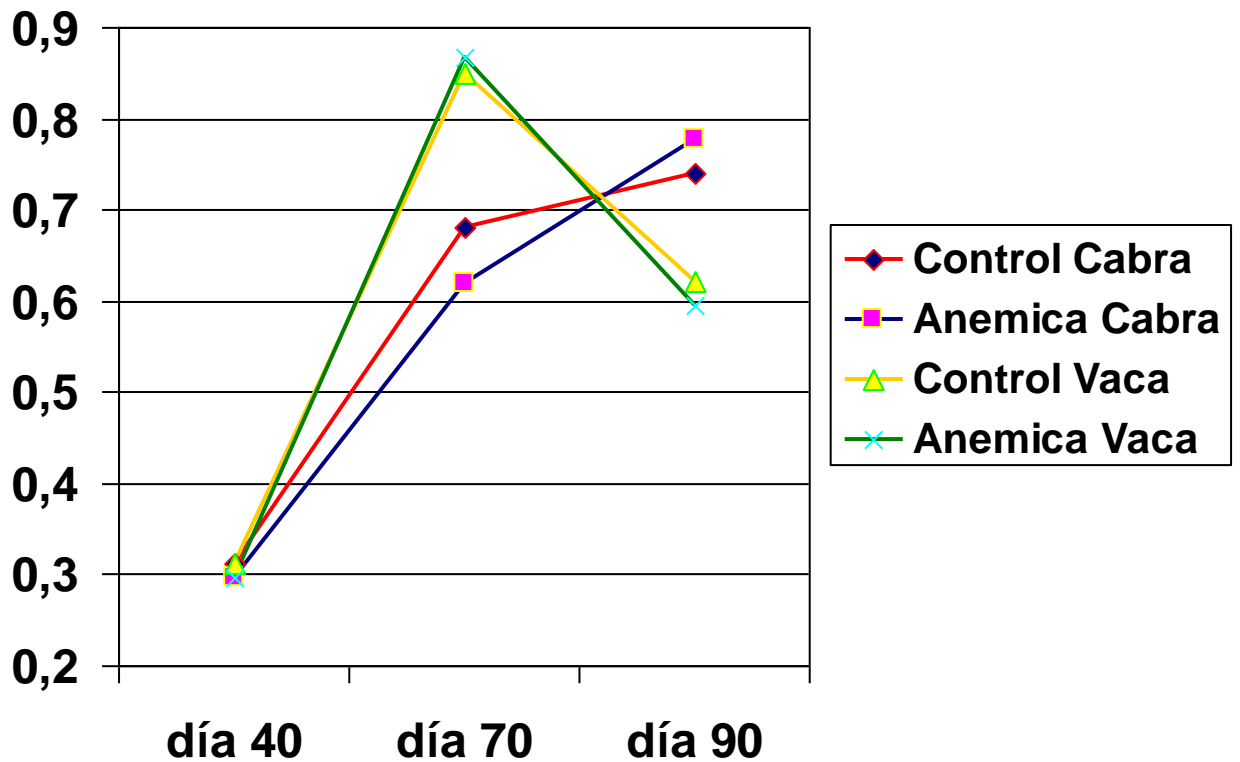
**Figura 13A.** CAT en citosol hepático (U/mL citosol) en los animales alimentados con dietas basadas en leche con contenido normal de Fe.



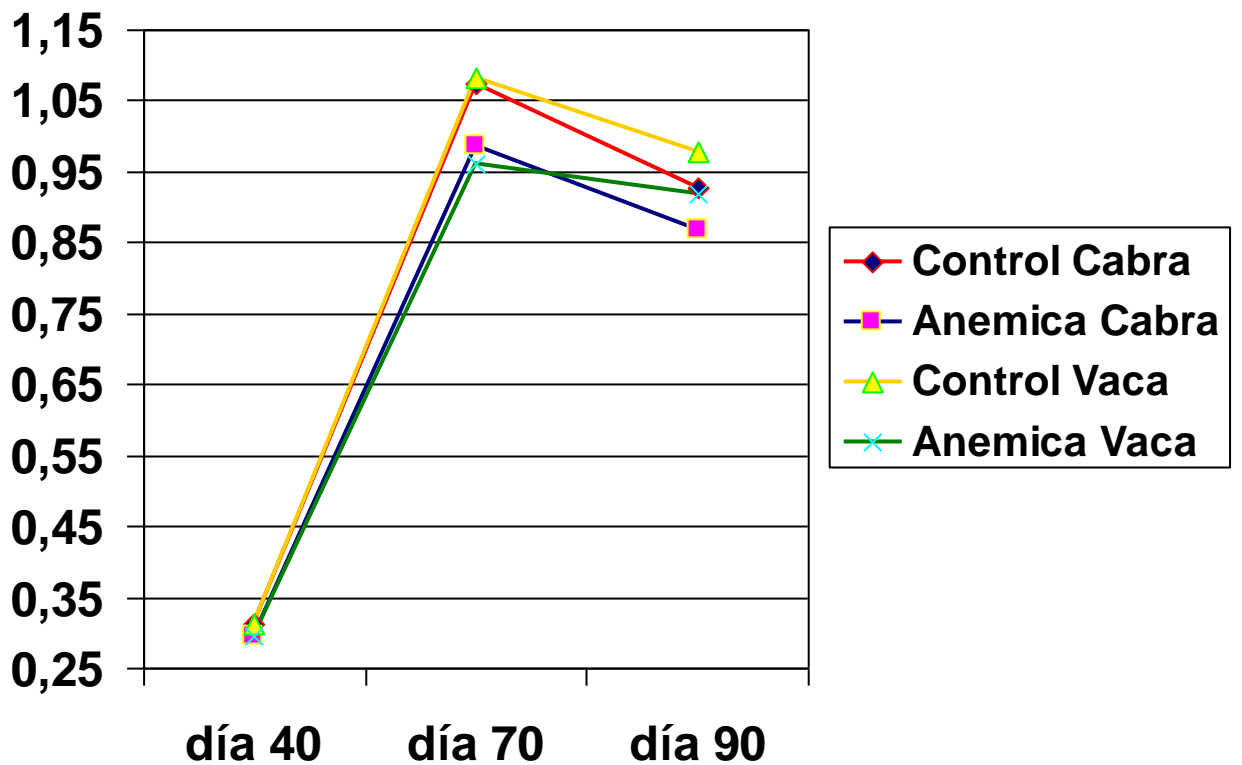
**Figura 13B.** CAT en citosol hepático (U/mL citosol) en los animales alimentados con dietas basadas en leche con sobrecarga de Fe.



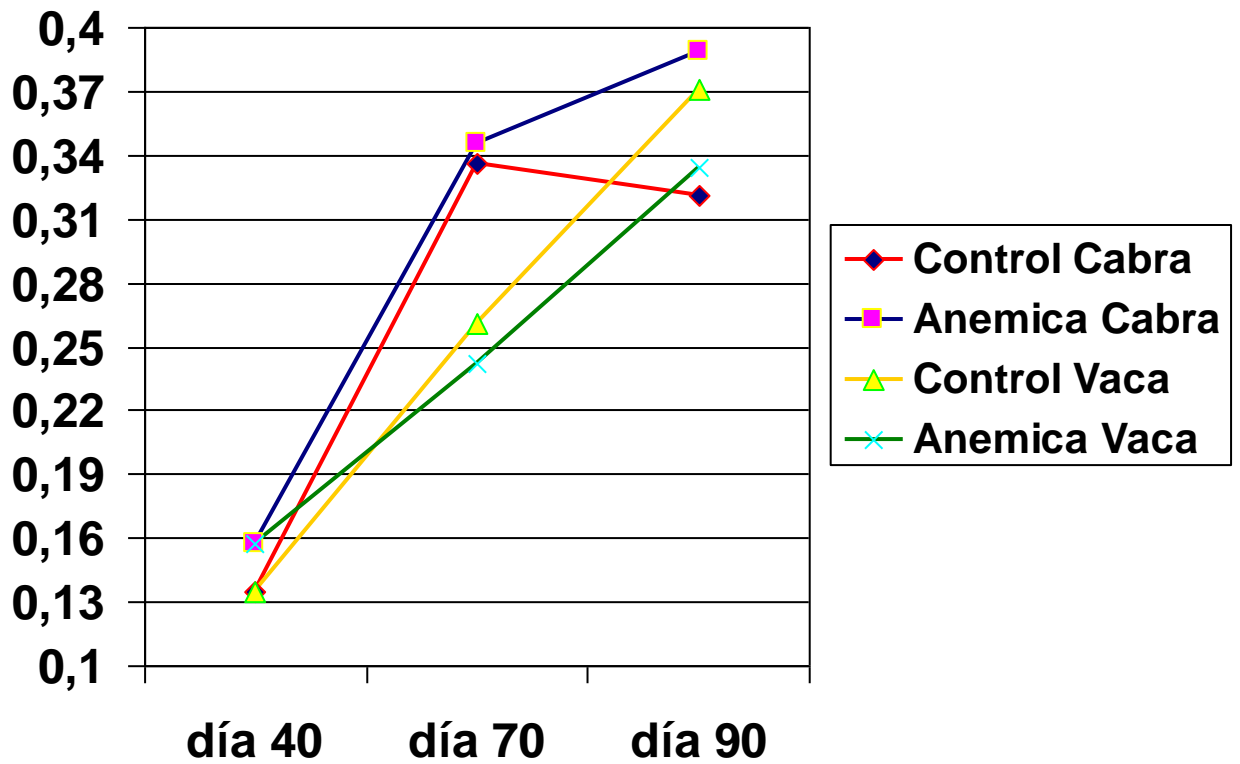
**Figura 14A.** CAT en citosol eritrocitario (U/mL citosol) en los animales alimentados con dietas basadas en leche con contenido normal de Fe.



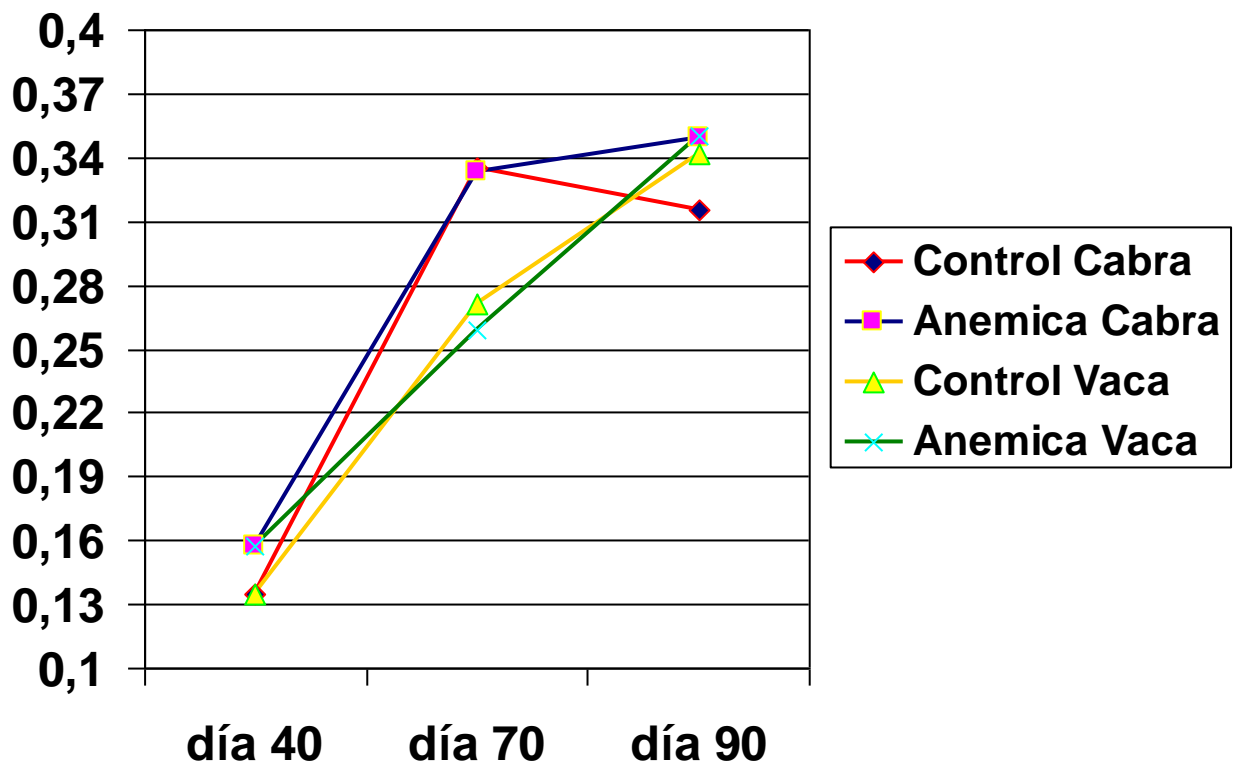
**Figura 14B.** CAT en citosol eritrocitario (U/mL citosol) en los animales alimentados con dietas basadas en leche con sobrecarga de Fe.



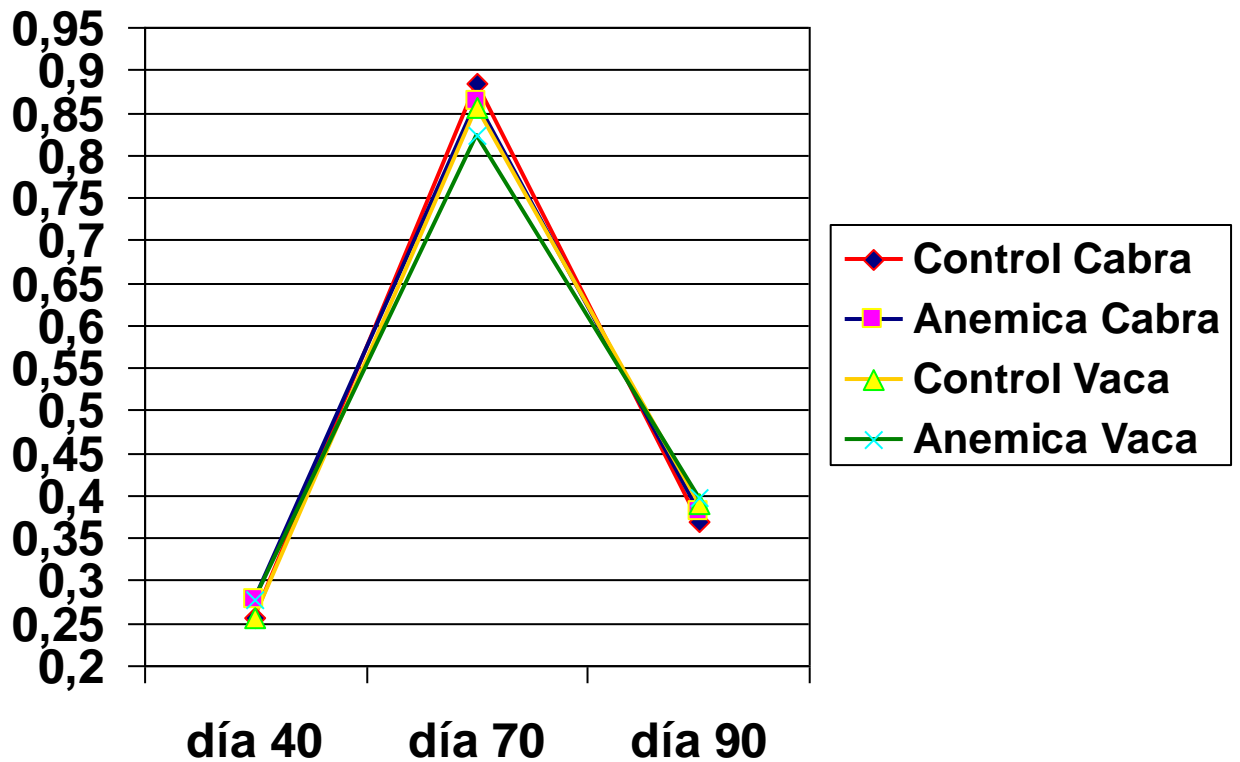
**Figura 15A.** GPx en citosol de cerebro (mmol/mg proteína/mL) en los animales alimentados con dietas basadas en leche con contenido normal de Fe.



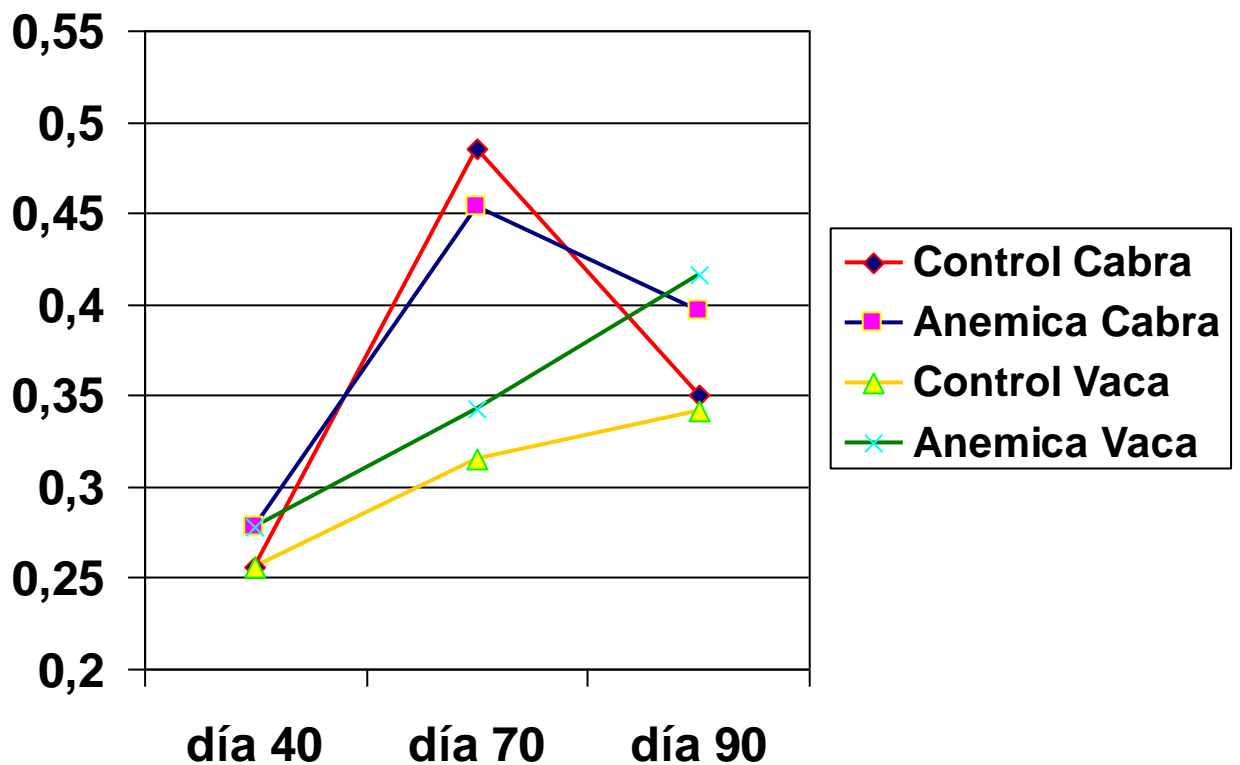
**Figura 15B.** GPx en citosol de cerebro (mmol/mg proteína/mL) en los animales alimentados con dietas basadas en leche con sobrecarga de Fe.



**Figura 16A.** GPx en citosol hepático (mmol/mg proteína/mL) en los animales alimentados con dietas basadas en leche con contenido normal de Fe.

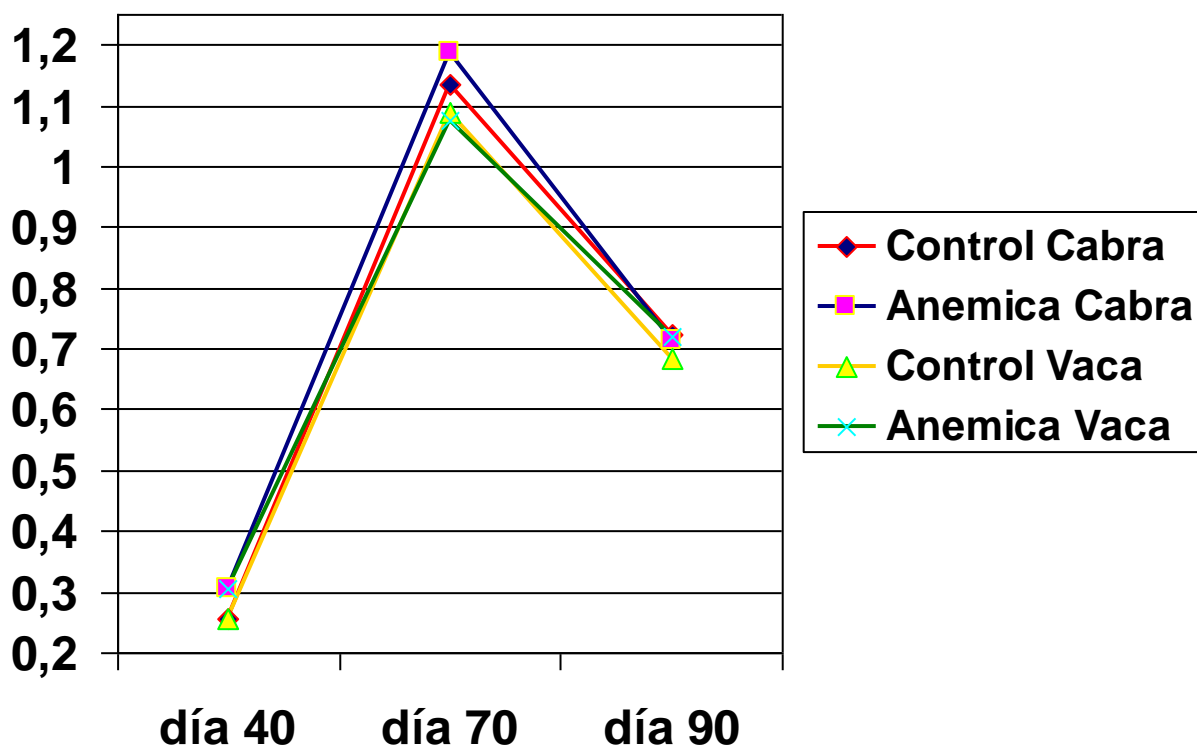


**Figura 16B.** GPx en citosol hepático (mmol/mg proteína/mL) en los animales alimentados con dietas basadas en leche con sobrecarga de Fe.

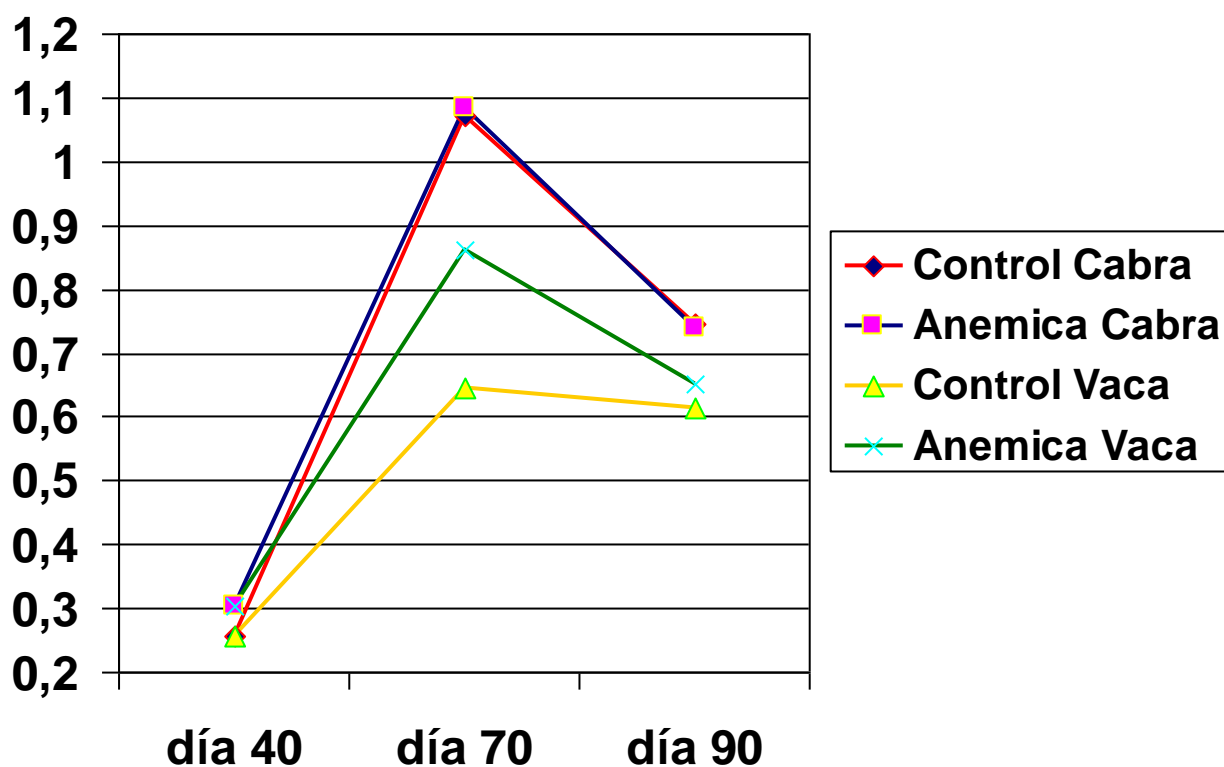




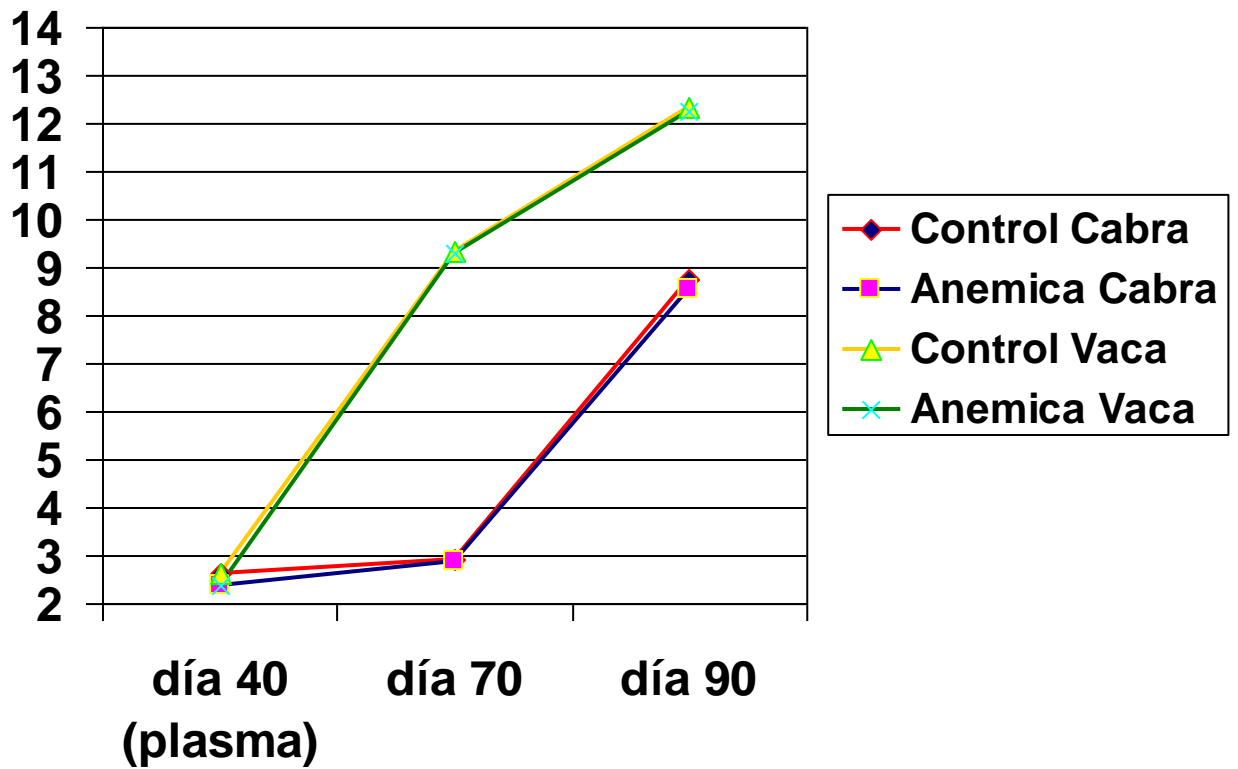
**Figura 17A.** GPx en citosol eritrocitario (mmol/mg proteína/mL) en los animales alimentados con dietas basadas en leche con contenido normal de Fe.



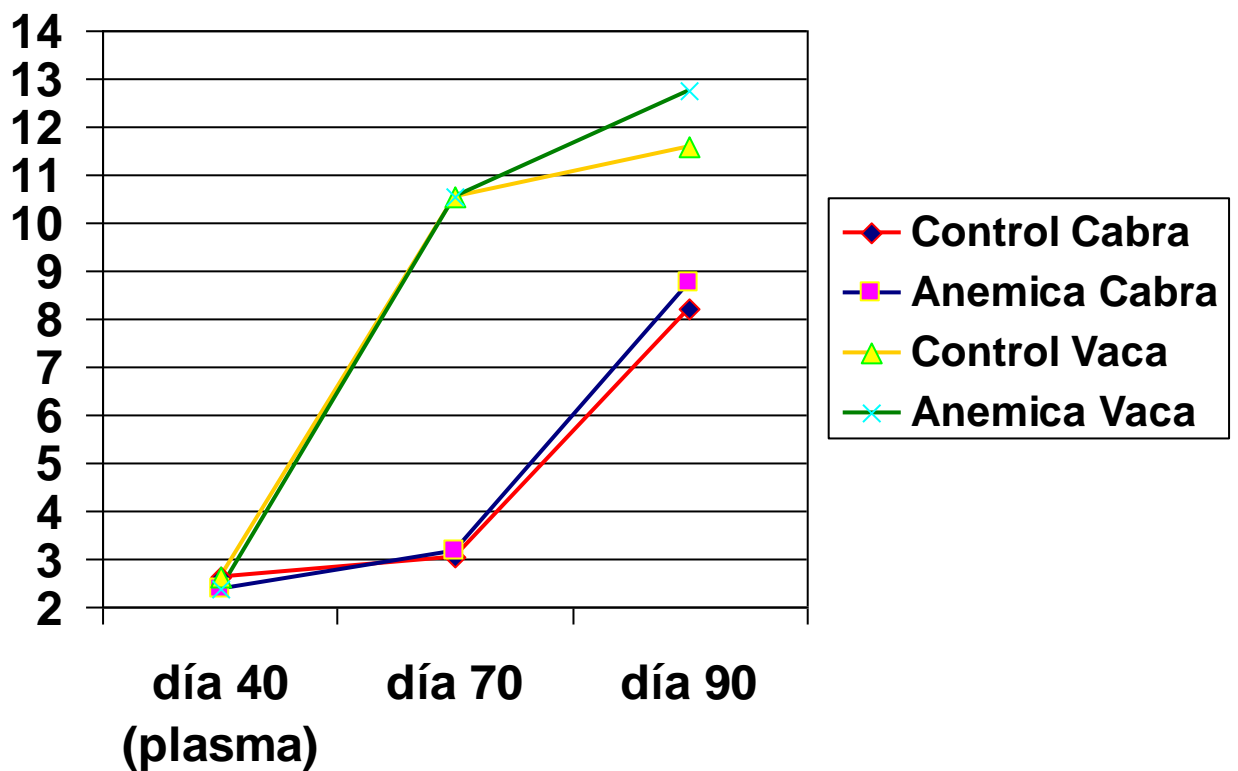
**Figura 17B.** GPx en citosol eritrocitario (mmol/mg proteína/mL) en los animales alimentados con dietas basadas en leche con sobrecarga de Fe.



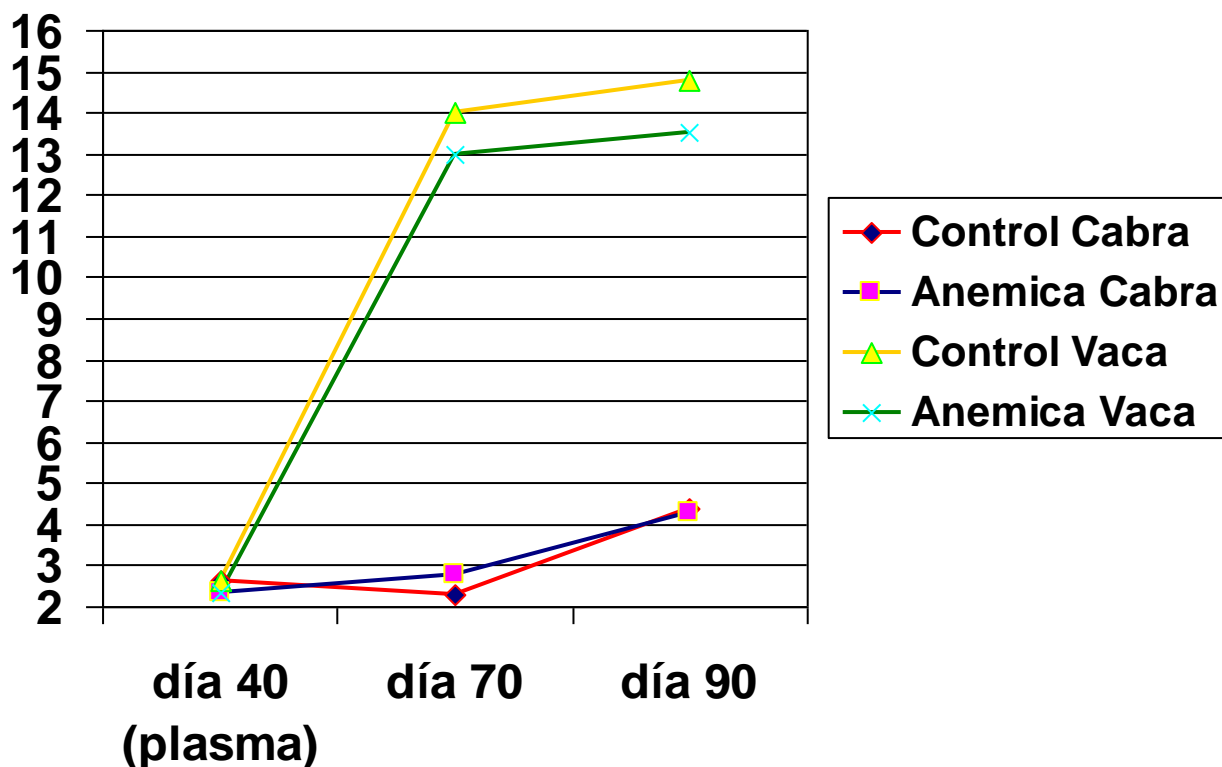
**Figura 18A.** SOD en citosol de cerebro (U/mg proteína) en los animales alimentados con dietas basadas en leche con contenido normal de Fe.



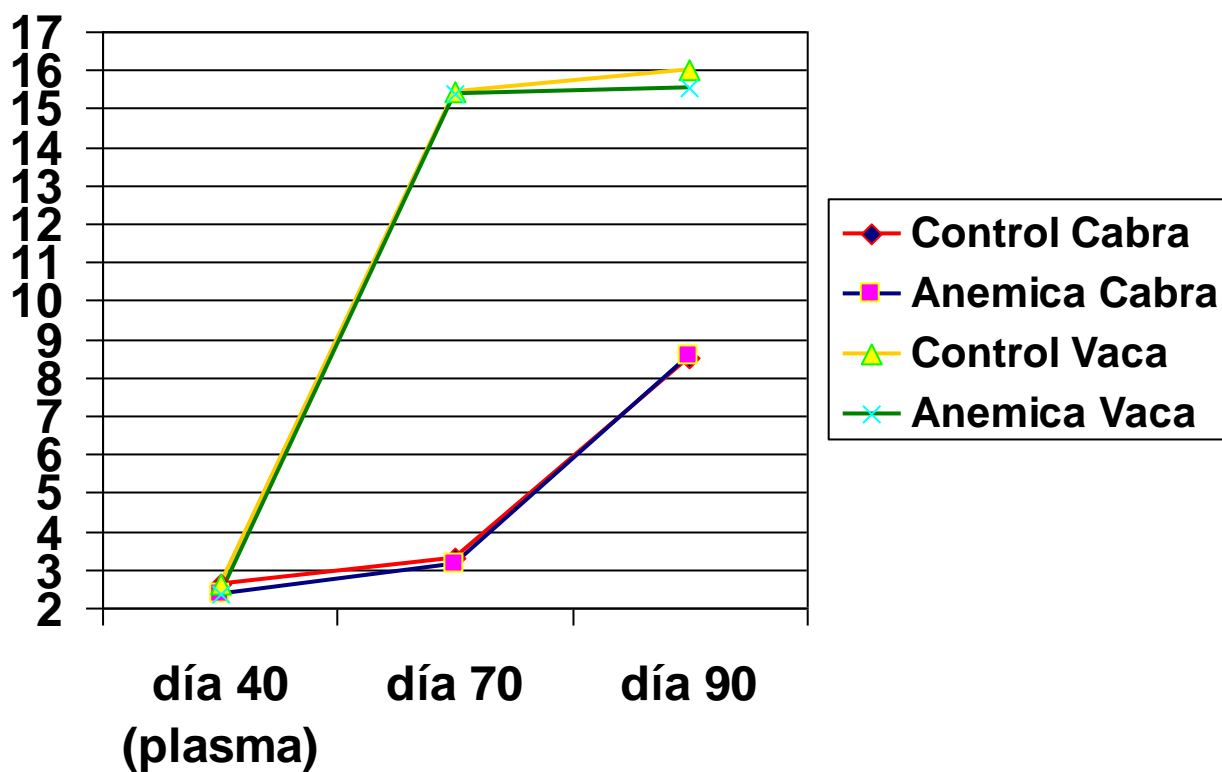
**Figura 18B.** SOD en citosol de cerebro (U/mg proteína) en los animales alimentados con dietas basadas en leche con sobrecarga de Fe.



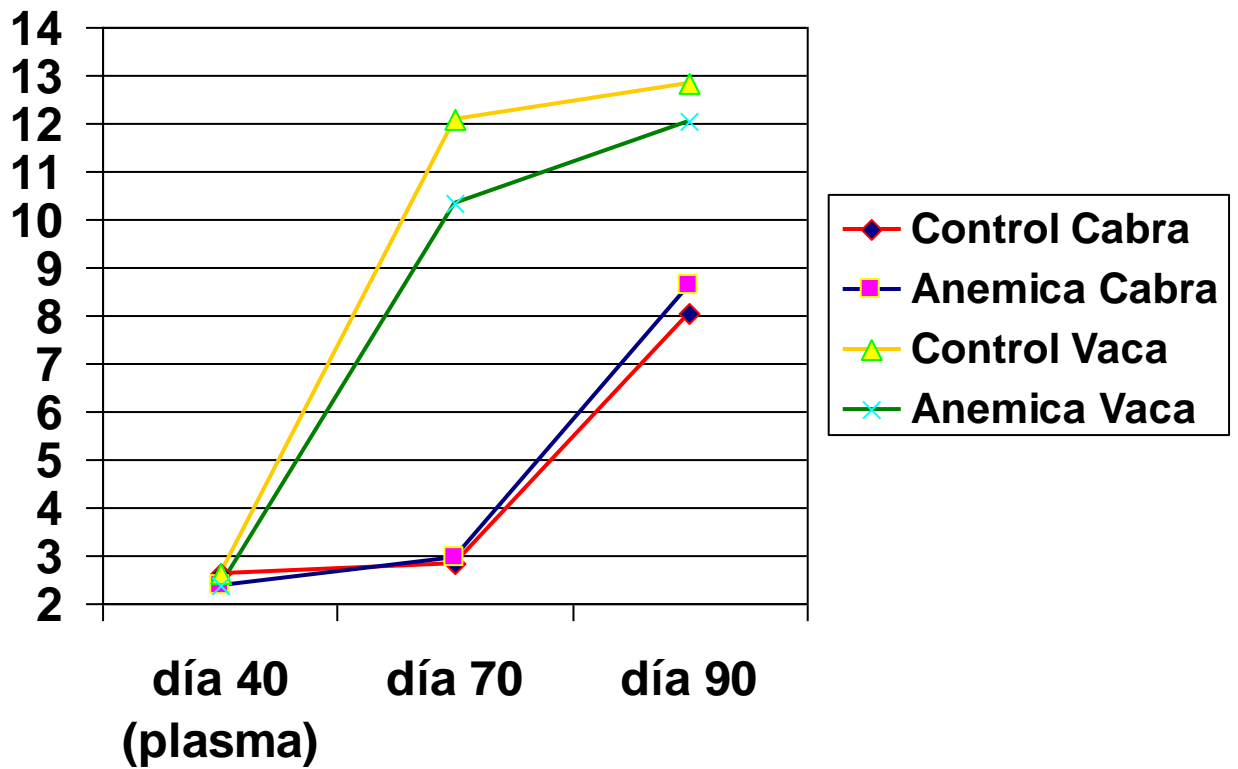
**Figura 19A.** SOD en citosol hepático (U/mg proteína) en los animales alimentados con dietas basadas en leche con contenido normal de Fe.



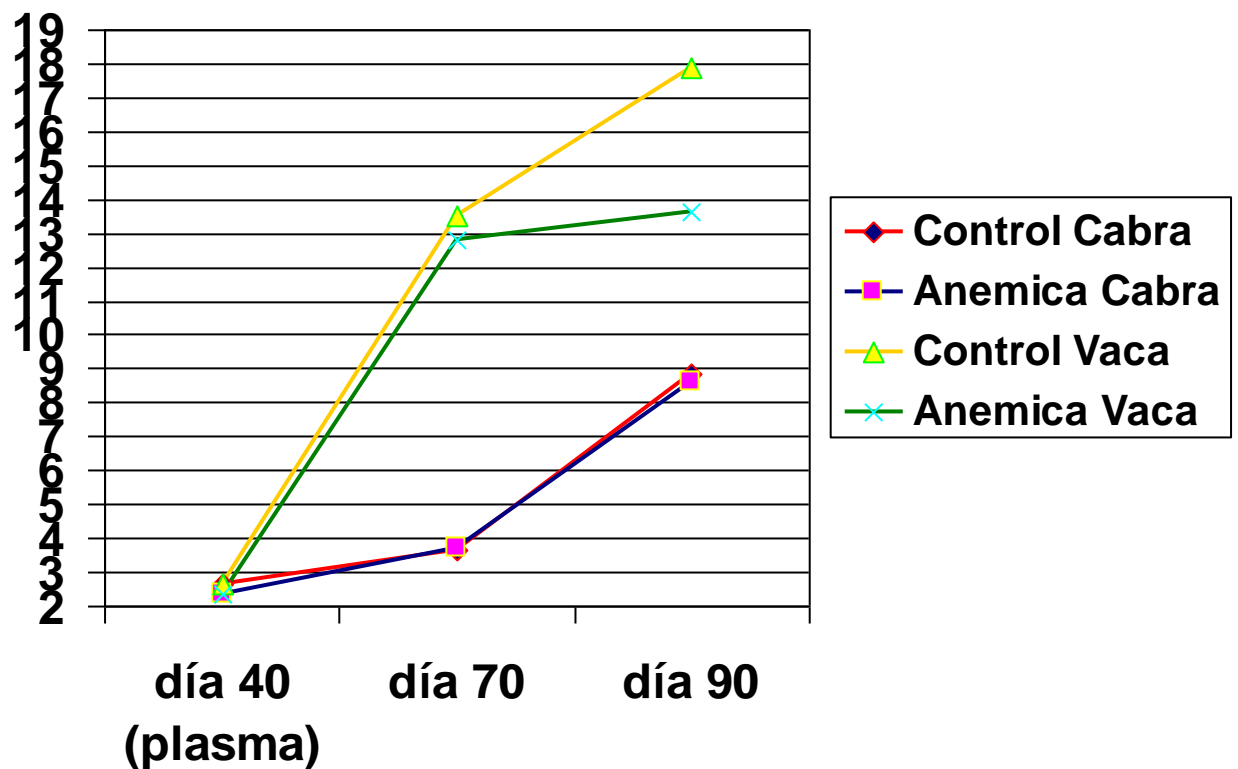
**Figura 19B.** SOD en citosol hepático (U/mg proteína) en los animales alimentados con dietas basadas en leche con sobrecarga de Fe.



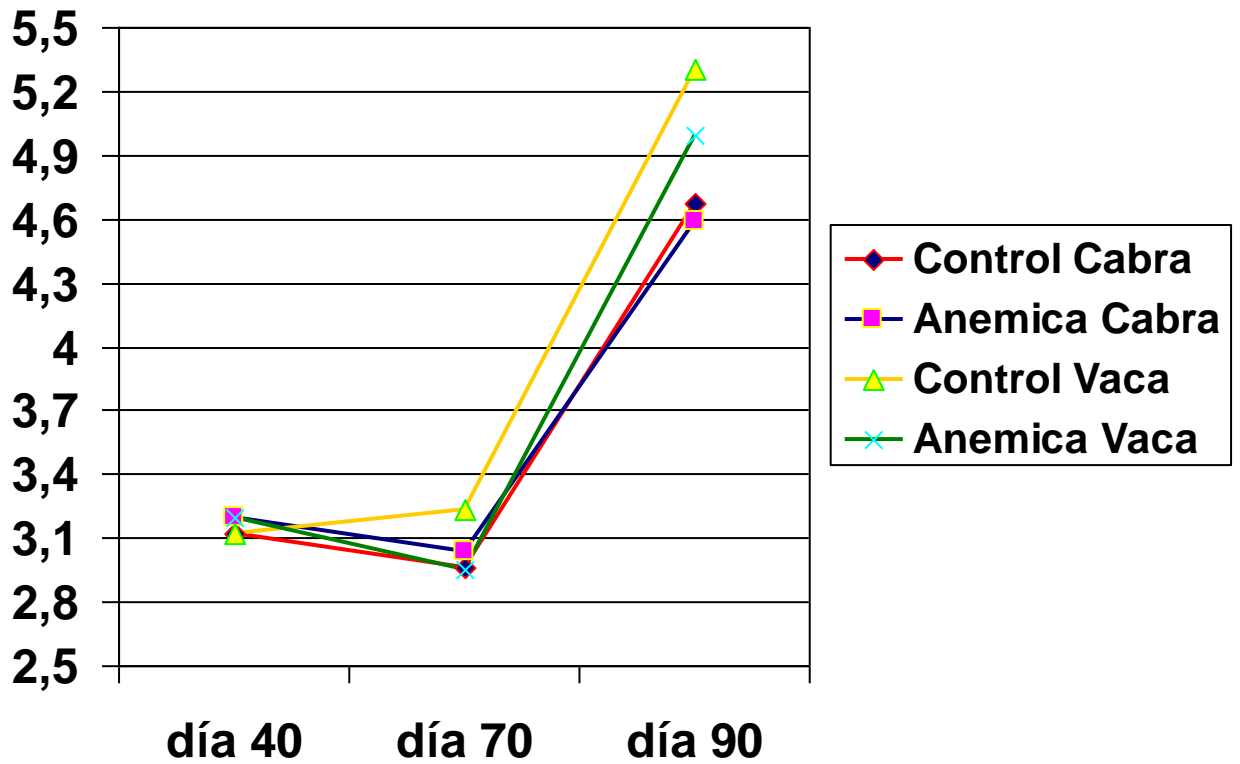
**Figura 20A.** SOD en citosol eritrocitario (U/mg proteína) en los animales alimentados con dietas basadas en leche con contenido normal de Fe.



**Figura 20B.** SOD en citosol eritrocitario (U/mg proteína) en los animales alimentados con dietas basadas en leche con sobrecarga de Fe.



**Figura 21A.** TBARS (nmol/mg proteína) en los animales alimentados con dietas basadas en leche con contenido normal de Fe.



**Figura 21B.** TBARS (nmol/mg proteína) en los animales alimentados con dietas basadas en leche con sobrecarga de Fe.

