



Facultad de Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos

UNIVERSIDAD DE MURCIA

TESIS DOCTORAL

Biodisponibilidad de diferentes compuestos de hierro
añadidos a un néctar de frutas funcional.
Interacción con las vitaminas y
fructo-oligosacáridos

Juan Francisco Haro Vicente
Murcia 2006

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	13
II. OBJETIVOS	16
III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	17
1. IMPORTANCIA NUTRICIONAL DEL HIERRO	17
1.1. Almacenamiento y distribución del hierro.....	18
1.1.1. Intercambio de hierro.....	18
1.1.2. Distribución del hierro.....	20
2. ABSORCIÓN DEL HIERRO	22
3. REGULACIÓN DE LA ABSORCIÓN DEL HIERRO	26
4. REQUERIMIENTOS FISIOLÓGICOS DEL HIERRO	27
4.1. Pérdidas de hierro basal.....	27
4.2. Pérdidas de hierro menstrual.....	27
4.3. Requerimientos durante el crecimiento.....	28
4.4. Requerimientos de hierro durante el embarazo y la lactancia.....	29
4.5. Valores de la ingesta diaria recomendada.....	31
5. ANEMIA, DEFICIENCIA EN HIERRO Y ANEMIA DEFICIENTE EN HIERRO	33
5.1. Anemia, un problema de salud pública.....	33
5.2. Deficiencia en hierro y anemia deficiente en hierro.....	34
5.3. Etiología de la deficiencia en hierro.....	35
5.4. Consecuencias de la deficiencia en hierro.....	38
5.4.1. Infancia y niñez.....	39
5.4.2. Adolescencia.....	39
5.4.3. Embarazo.....	40
6. ESTRATEGIAS DE INTERVENCIÓN PARA PREVENIR LA DEFICIENCIA EN HIERRO	41
6.1. Suplementación.....	41
6.2. Diversificación de la dieta.....	42
6.3. Enriquecimiento.....	44
6.3.1. Compuestos de hierro inorgánico.....	46
6.3.1.1. Solubles en agua.....	46
6.3.1.2. Poco solubles en agua/solubles en soluciones ácidas.....	47
6.3.1.3. Insolubles en agua / poco solubles en soluciones ácidas.....	48
6.3.1.3.1. Compuestos de fosfatos de hierro.....	48
6.3.1.3.2. Compuestos de hierro elemental.....	49
6.3.2. Compuestos de hierro protegidos.....	50
6.3.2.1. Compuestos quelados.....	50
6.3.2.1.1. NaFeEDTA (Etilendiaminotetraacetato – sódico-férrico).....	50
6.3.2.1.2. Bis-glicinato ferroso (Hierro aminoquelado).....	52
6.3.2.2. Compuestos encapsulados.....	53
7. EL CONCEPTO DE LA BIODISPONIBILIDAD DEL HIERRO Y SU VALORACIÓN	57
7.1. Incorporación a la hemoglobina.....	58
7.2. Monitorización fecal.....	59
7.3. Recuento corporal.....	59
7.4. Aparición/Desaparición en el plasma.....	59
7.5. Repleción de la hemoglobina.....	60
8. EL PAPEL DE LAS VITAMINAS EN LA PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA ANEMIA	61
8.1. Vitamina A.....	63
8.2. Ácido fólico.....	63
8.3. Vitamina B ₁₂	64
8.4. Vitamina B ₆	65
8.5. Vitamina C.....	65
9. ALIMENTOS FUNCIONALES	66
9.1. Concepto de alimento funcional.....	66
9.2. Prebióticos.....	68
9.2.1. Oligosacáridos (OS) y Oligosacáridos no digeribles (OND).....	69
9.2.2. Efecto de los OND en la absorción mineral.....	70
9.2.2.1. Estudios en ratas.....	70

9.2.2.2. Estudios en humanos.....	71
10. EI HIERRO COMO PRO-OXIDANTE.....	72
IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....	76
1. MATERIALES.....	76
1.1. Néctar de frutas.....	76
1.2. Dietas AIN- 93G modificadas.....	79
2. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	80
3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL Y ANALÍTICA.....	83
3.1. Animales.....	83
3.2. Pauta de recogida de datos y toma de muestras.....	85
3.2.1. Ingestión de alimento, anotación de peso en vivo, recogida de heces y orina.....	85
3.2.2. Anestesia y disección.....	86
3.2.3. Preparación de las muestras.....	87
3.2.4. Obtención de cenizas y determinación del contenido mineral.....	88
3.2.5. Determinación de parámetros hematológicos.....	90
3.2.6. Determinación de parámetros bioquímicos.....	90
3.2.7. Cálculos realizados para la evaluación del balance mineral.....	92
3.2.8. Índices de la biodisponibilidad del hierro.....	92
3.2.8.1. Porcentaje de la biodisponibilidad.....	92
3.2.8.2. Utilización del hierro.....	93
3.2.8.3. Valor de la biodisponibilidad relativa (VBR).....	93
3.2.8.4. Medida de la curva de la concentración de hierro sérico (CHS).....	93
3.3. Detección y cuantificación de radicales hidroxilo en muestras fecales.....	94
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	98
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	99
1^{er} ESTUDIO	
1. Biodisponibilidad del pirofosfato férrico micronizado (PFM) empleado en el enriquecimiento del néctar de frutas. Método de la Eficacia de Regeneración de la Hemoglobina (ERH).....	99
1.1. Crecimiento y consumo de alimento.....	99
1.2. Balance mineral del hierro.....	101
1.3. Biodisponibilidad y utilización del hierro.....	103
1.3.1. Eficacia de la regeneración de la hemoglobina (ERH).....	103
1.3.2. Relación entre las modificaciones en la hemoglobina y la ingesta de hierro.....	107
1.4. Índices hematológicos y bioquímicos.....	109
1.5. Almacenamiento del hierro.....	1113
1.6. Efecto pro-oxidante de los diferentes compuestos de hierro añadidos al néctar.....	114
2^o ESTUDIO	
2. Efecto del ácido ascórbico sobre la biodisponibilidad del pirofosfato férrico micronizado (PFM) en un néctar de frutas enriquecido. Método de la Eficacia de Regeneración de la Hemoglobina (ERH).....	117
2.1. Crecimiento y consumo de alimento.....	117
2.2. Balance mineral del hierro.....	119
2.3. Biodisponibilidad y utilización del hierro.....	123
2.3.1. Eficiencia de la regeneración de la hemoglobina (ERH).....	124
2.3.2. Relación entre las modificaciones en la hemoglobina y la ingesta de hierro.....	128
2.4. Índices hematológicos y bioquímicos.....	129
2.4.1. Efecto de la vitamina C en los índices hematológicos y bioquímicos.....	133
2.5. Almacenamiento del hierro.....	133
2.6. Efecto pro-oxidante del SF + Vit C y PFM + Vit C añadidos al néctar.....	135
3^{er} ESTUDIO	
3. Efecto de las vitaminas B ₆ , B ₁₂ y ácido fólico sobre la biodisponibilidad del pirofosfato férrico micronizado (PFM) en el néctar de frutas enriquecido. Método de la Eficacia de Regeneración de la Hemoglobina (ERH).....	137
3.1. Crecimiento y consumo de alimento.....	137
3.2. Balance mineral del hierro.....	139
3.2.1. Comparación entre los grupos SF y PFM con la mezcla de vitaminas B en el balance mineral del hierro.....	139
3.2.2. Efecto de las vitaminas B ₆ , B ₁₂ y ácido fólico sobre el balance mineral del hierro.....	140
3.3. Biodisponibilidad y utilización del hierro.....	144

3.3.1. Comparación entre los grupos PFM y SF con la mezcla de vitaminas B.....	144
3.3.2. Efecto de las vitaminas B ₆ , B ₁₂ y ácido fólico en la biodisponibilidad y utilización del hierro.....	148
3.3.3. Relación entre las modificaciones en la hemoglobina y la ingesta de hierro.....	150
3.4. Índices hematológicos y bioquímicos.....	151
3.4.1. Efecto de la mezcla de vitaminas B en los índices hematológicos y bioquímicos.....	155
3.5. Almacenamiento del hierro.....	155
3.6. Efecto pro-oxidante del SF + mezcla Vits B y PFM + mezcla Vits B añadidos al néctar.....	157

4º ESTUDIO

4. Efecto de la vitamina C y mezcla de vitaminas B (B ₆ , B ₁₂ y ácido fólico) sobre la biodisponibilidad del pirofosfato férrico micronizado (PFM) en el néctar de frutas enriquecido. Método de la Eficacia de Regeneración de la Hemoglobina (ERH).....	159
4.1. Crecimiento y consumo de alimento.....	159
4.2. Balance mineral del hierro.....	161
4.2.1. Balance mineral de los grupos SF + Vits B + C y PFM + Vits B + C.....	161
4.2.2. Efecto de las vitaminas C, B ₆ , B ₁₂ y ácido fólico sobre el balance mineral del hierro.....	162
4.2.3. ¿Cuál es el efecto relativo de cada una de las vitaminas en la absorción y balance del hierro?	165
4.3. Biodisponibilidad y utilización del hierro.....	167
4.3.1. Biodisponibilidad y utilización del hierro entre los grupos PFM y SF + Vits B + C.....	168
4.3.2. Efecto de las vitaminas B y C en la biodisponibilidad y utilización del hierro.....	170
4.3.3. ¿Cuál es el efecto relativo de cada una de las vitaminas sobre la biodisponibilidad y utilización del hierro?	174
4.3.4. Relación entre las modificaciones en la hemoglobina y la ingesta de hierro.....	175
4.4. Índices hematológicos y bioquímicos.....	176
4.4.1. Efecto de la adición de las vitaminas B y C en los índices hematológicos y bioquímicos.....	180
4.4.2. ¿Hay interacción entre el mezcla de vitaminas B y la vitamina C en los índices hematológicos y bioquímicos?.....	180
4.5. Almacenamiento del hierro.....	182
4.5.1. ¿Afecta la vitamina C ó la mezcla de vitaminas B al almacenamiento del hierro en los órganos?.....	184
4.6. Efecto pro-oxidante del SF + Vits B + C y PFM + Vits B + C añadidos al néctar	185
4.6.1. ¿Afecta la adición de la vitamina C ó la mezcla de vitaminas B en la producción de radicales hidroxilo?	186

5º ESTUDIO

5. Efecto de la vitamina C, mezcla de vitaminas B (B ₆ , B ₁₂ y ácido fólico) y fructo-oligosacáridos (FOS) sobre la biodisponibilidad del pirofosfato férrico micronizado (PFM) en el néctar de frutas enriquecido. Método de la Eficacia de Regeneración de la Hemoglobina (ERH).....	188
5.1. Crecimiento y consumo de alimento.....	188
5.1.1. Efecto de la adición de la mezcla de vitaminas B, vitamina C y FOS en el crecimiento y el consumo de alimento.....	189
5.1.2. Efecto de los FOS en el crecimiento y consumo de alimento.....	190
5.2. Balance mineral.....	191
5.2.1. Efecto de la adición de la mezcla de vitaminas B, vitamina C y FOS en el balance mineral del hierro.....	196
5.2.2. Efecto de los FOS en el balance mineral del hierro.....	198
5.3. Biodisponibilidad y utilización del hierro.....	200
5.3.1. Comparación entre los grupos PFM, BF y SF con vitaminas B, C y FOS.....	200
5.3.2. Efecto de las vitaminas B, C y FOS en la biodisponibilidad y utilización del hierro.....	203
5.3.3. Efecto de los FOS en la Biodisponibilidad y utilización del hierro.....	208
5.3.4. Relación entre las modificaciones en la hemoglobina y la ingesta de hierro.....	209
5.4. Índices hematológicos y bioquímicos.	210
5.4.1. Efecto de la adición de las vitaminas B, C y FOS en los índices hematológicos y bioquímicos.....	214
5.4.2. Efecto de los FOS en los índices hematológicos y bioquímicos.....	215
5.5. Almacenamiento del hierro.....	216
5.5.1. Efecto de las vitaminas B, C y FOS en el almacenamiento del hierro.....	219
5.5.2. Efecto de los FOS en el almacenamiento del hierro.....	219

5.6. Efecto pro-oxidante del SF, PFM Y BF en combinación con las Vits B, C y FOS añadidos al néctar.....	220
5.6.1. Efecto de las vitaminas B, C y FOS en la producción de radicales libres.....	221
5.6.2. Efecto de los FOS en la generación de radicales hidroxilo.....	222
5.7. Biodisponibilidad del hierro. Método de la curva de la concentración del hierro sérico.....	223
VI. DISCUSIÓN GENERAL.....	226
VII. CONCLUSIONES.....	232
VIII. RESUMEN.....	234
IX. SUMMARY.....	236
X. BIBLIOGRAFÍA.....	238

Índices de Tablas

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
Tabla 1. Requerimientos de hierro durante el embarazo.....	31
Tabla 2. Definiciones y usos de las DRI.....	32
Tabla 3. Ingesta dietéticas de referencia (DRI) en las distintas etapas de la vida.....	33
Tabla 4. Límites de hemoglobina utilizados para definir la anemia, basados en las recomendaciones de OMS/UNICEF/UNU.....	34
Tabla 5. Condiciones que deben cumplir los alimentos para ser enriquecidos con un nutriente.....	45
Tabla 6. Compuestos de hierro utilizados para enriquecer los alimentos. Biodisponibilidad relativa y cambios organolépticos.....	56
Tabla 7. Definiciones propuestas para la biodisponibilidad del hierro.....	57
Tabla 8. Métodos para valorar la biodisponibilidad del hierro.....	57
Tabla 9. Relación entre las vitaminas y el desarrollo de la anemia.....	62
Tabla 10. Criterios consensuados para la comprobación científica de la declaraciones nutricionales en el ámbito de la Unión Europea (PASSCLAIM).....	68
MATERIAL Y MÉTODOS	
Tabla 11. Composición del néctar según estudio.....	78
Tabla 12. Composición de las diferentes dietas utilizadas en los cinco estudios.....	79
Tabla 13. Condiciones instrumentales establecidas para la determinación del hierro.....	89
Tabla 14. Concentraciones de los patrones utilizados, ecuación de la recta de calibrado y coeficiente de linealidad (R^2) para la recta patrón.....	90
Tabla 15. Ecuación de la recta de calibrado y coeficiente de linealidad (R^2) para la estudio y periodo de balance.....	97
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
1^{er} ESTUDIO	
Tabla 1.1. Análisis de varianza del peso corporal inicial y final, ganancia de peso e ingesta total de alimento tras la administración del SF y PFM añadidos a un néctar de frutas, durante los tres periodos de balance.....	99
Tabla 1.2. Crecimiento e ingesta total de alimento en ratas, tras la administración del SF o PFM añadidos a un néctar durante el periodo de depleción – repleción.....	100
Tabla 1.3. Eficiencia de la absorción y retención del hierro, tras la administración del SF o PFM a un néctar de frutas durante los tres periodos de repleción.....	102
Tabla 1.4. Eficiencia de regeneración de la hemoglobina (ERH), utilización del hierro y valor biológico relativo (VBR) en ratas anémicas alimentadas con un néctar de frutas enriquecido con diferentes compuestos de hierro (SF o PFM) durante los tres periodos de repleción.....	106
Tabla 1.5. Diagnóstico de la anemia deficiente en hierro en ratas.....	109
Tabla 1.6. Concentración de hierro en los distintos órganos de las ratas alimentadas con sulfato ferroso (SF) o pirofosfato férrico micronizado (PFM) añadidos a un néctar de frutas. Los resultados se expresan en mg / g peso seco.....	114
2^o ESTUDIO	
Tabla 2.1. Análisis de varianza del peso corporal inicial y final, ganancia de peso e ingesta total de alimento tras la administración del SF + Vit C y PFM + Vit C añadidos a un néctar de frutas, durante los tres periodos de balance.....	117
Tabla 2.2. Crecimiento e ingesta total de alimento en ratas, tras la administración del SF o PFM junto con la vitamina C añadidos a un néctar de frutas durante el periodo de depleción – repleción.....	118
Tabla 2.3. Análisis de varianza de los parámetros relacionados con el balance mineral del hierro, tras la administración del SF + Vit C y PFM + Vit C añadidos a un néctar de frutas, durante el periodo de repleción.....	120
Tabla 2.4. Eficiencia de la absorción y retención del hierro, tras la administración del SF o PFM con/sin la vitamina C en un néctar de frutas, durante los tres periodos de repleción.....	122
Tabla 2.5. Análisis de varianza de los parámetros relacionados con los índices de biodisponibilidad y la utilización del hierro, en los grupos alimentados con SF + Vit C y PFM + Vit C, durante los tres periodos de balance.....	124
Tabla 2.6. Eficiencia de regeneración de la hemoglobina (ERH), utilización del hierro y valor biológico relativo (VBR) en ratas anémicas, tras la administración del SF o PFM con/sin la Vitamina C, en un néctar de frutas, durante los tres periodos de repleción.....	127
Tabla 2.7. Análisis de varianza de las distintas piezas anatómicas en los grupos alimentados con el néctar SF ó PFM + Vit C, durante el 1 ^{er} y 3 ^{er} periodo de balance.....	134
Tabla 2.8. Concentración de hierro en los distintos órganos de las ratas alimentadas con SF o PFM con/sin Vit C, añadidos a un néctar de frutas. Los resultados se expresan en mg / g peso seco (p.s).....	134

3^{er} ESTUDIO

Tabla 3.1. Análisis de varianza del peso corporal inicial y final, ganancia de peso e ingesta total de alimento tras la administración del SF o PFM + mezcla Vits B añadidos a un néctar de frutas, durante los tres periodos de balance.....	137
Tabla 3.2. Crecimiento e ingesta total de alimento en ratas, tras la administración del SF o PFM junto con la mezcla de vitaminas B añadidos a un néctar de frutas durante el periodo de depleción – repleción.....	138
Tabla 3.3. Análisis de varianza de los parámetros relacionados con el balance mineral del hierro, tras la administración del SF o PFM + mezcla de vitaminas B añadidos a un néctar de frutas, durante el periodo de repleción.....	139
Tabla 3.4. Eficiencia de la absorción y retención del hierro, tras la administración del SF o PFM con/sin la mezcla de vitaminas B en un néctar de frutas, durante los tres periodos de repleción.....	142
Tabla 3.5. Análisis de varianza de los parámetros relacionados con los índices de biodisponibilidad y la utilización del hierro, en los grupos alimentados con SF + mezcla Vits B y PFM + mezcla Vits B, durante los tres periodos de balance.....	144
Tabla 3.6. Eficiencia de regeneración de la hemoglobina (ERH), utilización del hierro y valor biológico relativo (VBR) en ratas anémicas, tras la administración del SF o PFM con/sin la mezcla de vitaminas B en un néctar de frutas, durante los tres periodos de repleción.....	147
Tabla 3.7. Análisis de varianza de las distintas piezas anatómicas en los grupos alimentados con el néctar SF ó PFM + mezcla Vits B, durante el 1 ^{er} y 3 ^{er} periodo de balance.....	156
Tabla 3.8. Concentración de hierro en los distintos órganos de las ratas alimentadas con SF o PFM con/sin mezcla Vits B, añadidos a un néctar de frutas. Los resultados se expresan en mg / g peso seco (p.s).....	156

4^o ESTUDIO

Tabla 4.1. Análisis de varianza del peso corporal inicial y final, ganancia de peso e ingesta total de alimento tras la administración del SF o PFM + Vits B + C añadidos a un néctar de frutas, durante los tres periodos de balance.....	159
Tabla 4.2. Crecimiento e ingesta total de alimento en ratas, tras la administración del SF o PFM junto con las vitaminas B y C añadidos a un néctar de frutas durante el periodo de depleción – repleción.....	160
Tabla 4.3. Análisis de varianza de los parámetros relacionados con el balance mineral del hierro, tras la administración del SF o PFM + Vits B + C añadidos a un néctar de frutas, durante el periodo de repleción.....	161
Tabla 4.4. Eficiencia de la absorción y retención del hierro, tras la administración del SF o PFM con/sin Vits B + C en un néctar de frutas, durante los tres periodos de repleción.....	164
Tabla 4.5. Análisis de varianza de los parámetros relacionados con los índices de biodisponibilidad y la utilización del hierro, en los grupos alimentados con SF o PFM + Vits B + C, durante los tres periodos de balance.....	168
Tabla 4.6. Eficiencia de regeneración de la hemoglobina (ERH), utilización del hierro y valor biológico relativo (VBR) en ratas anémicas, tras la administración del SF o PFM con/sin Vits B + C en un néctar de frutas, durante los tres periodos de repleción.....	171
Tabla 4.7. Análisis de varianza de las distintas piezas anatómicas en los grupos alimentados con el néctar SF ó PFM + Vits B + C, durante el 1 ^{er} y 3 ^{er} periodo de balance.....	182
Tabla 4.8. Concentración de hierro en los distintos órganos de las ratas alimentadas con SF o PFM con/sin Vits B + C, añadidos a un néctar de frutas. Los resultados se expresan en mg / g peso seco (p.s).....	183

5^o ESTUDIO

Tabla 5.1. Crecimiento e ingesta total de alimento en ratas, tras la administración del SF, PFM o BF junto con las vitaminas B, C y FOS añadidos a un néctar de frutas durante el periodo de depleción – repleción.....	188
Tabla 5.2. Crecimiento e ingesta total de alimento en ratas, tras la administración del SF o PFM con/sin Vits B, C y FOS añadidos a un néctar de frutas durante el periodo de depleción – repleción.....	189
Tabla 5.3. Eficiencia de la absorción y retención del hierro, tras la administración del SF, PFM o BF junto con las Vitaminas B, C y FOS en un néctar de frutas, durante los tres periodos de repleción.....	193
Tabla 5.4. Eficiencia de la absorción y retención del hierro, tras la administración del SF o PFM con/sin Vits B, C y FOS en un néctar de frutas, durante los tres periodos de repleción.....	197
Tabla 5.5. Eficiencia de regeneración de la hemoglobina (ERH), utilización del hierro y valor biológico relativo (VBR) en ratas anémicas, tras la administración del SF, PFM o BF junto con las Vitaminas B, C y FOS en un néctar de frutas, durante los tres periodos de repleción.....	201

Tabla 5.6. Eficiencia de regeneración de la hemoglobina (ERH), utilización del hierro y valor biológico relativo (VBR) en ratas anémicas, tras la administración del SF o PFM con/sin Vits B, C y FOS en un néctar de frutas, durante los tres periodos de repleción.....	207
Tabla 5.7. Concentración de hierro en los distintos órganos de las ratas alimentadas con SF, PFM o BF + Vits B, C + FOS, añadidos a un néctar de frutas. Los resultados se expresan en mg / g peso seco (p.s).....	217
Tabla 5.8. Concentración de hierro en los distintos órganos de las ratas alimentadas con SF o PFM con/sin Vits B, C + FOS añadidos a un néctar de frutas. Los resultados se expresan en mg / g peso seco.....	219
Tabla 5.9. Valor biológico relativo (VBR) de los tres compuestos de hierro medidos por el método de la curva de la concentración del hierro sérico.....	224
DISCUSIÓN GENERAL	
Tabla 6.1. Centros de los conglomerados finales en los tres periodos de repleción.....	227

Índices de Figuras

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
Figura 1. Distribución e intercambio cuantitativo del hierro en el organismo.....	19
Figura 2. Diagrama de la <i>transferrina</i> con sus dos lóbulos (lóbulo N, parte superior y lóbulo C, parte inferior) y sus dominios (N1, N2, C1 y C2).....	20
Figura 3. Distribución del hierro en el cuerpo humano.....	21
Figura 4. Estructura de la ferritina.....	22
Figura 5. Transporte del hierro a través del epitelio intestinal.....	25
Figura 6. Factores que contribuyen a la deficiencia en hierro en niños y mujeres.....	37
Figura 7. Estructura del bis-glicinato ferroso.....	52
Figura 8. Funciones de las vitaminas en el metabolismo del hierro y la eritropoyesis.....	62
MATERIAL Y MÉTODOS	
Figura 9. Representación gráfica del diseño experimental del presente estudio de investigación.....	82
Figura 10. Esquema del periodo de depleción durante el estudio <i>in vivo</i> en ratas.....	83
Figura 11. Esquema del periodo de repleción durante el estudio <i>in vivo</i> en ratas.....	84
Figura 12. Etapas cronológicas durante el periodo de repleción.....	86
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
1^{er} ESTUDIO	
Figura 1.1. Análisis de regresión lineal entre la ganancia de Fe en la hemoglobina y la ingesta de hierro del SF y PFM añadidos al néctar, durante el periodo de repleción.....	107
Figura 1.2. Análisis de regresión lineal entre el cambio en la hemoglobina y la ingesta de hierro del SF y PFM añadidos al néctar, durante el periodo de repleción.....	107
Figura 1.3. Cambio en la concentración del VCM en ratas anémicas durante la administración del SF y PFM, añadidos al néctar.....	110
Figura 1.4. Cambio en la concentración del HCM en ratas anémicas durante la administración del SF y PFM, añadidos al néctar.....	110
Figura 1.5. Cambio en la concentración del CHCM en ratas anémicas durante la administración del SF y PFM, añadidos al néctar.....	110
Figura 1.6. Cambio en la concentración del HS en ratas anémicas durante la administración del SF y PFM, añadidos al néctar.....	112
Figura 1.7. Cambio en la concentración del CTFH en ratas anémicas durante la administración del SF y PFM, añadidos al néctar.....	112
Figura 1.8. Cambio en la concentración del %ST en ratas anémicas durante la administración del SF y PFM, añadidos al néctar.....	112
Figura 1.9. Efecto de la administración del SF y PFM en la producción de radicales libres en heces determinadas por la cuantificación del Ácido bencenosulfínico (ABS) como producto final en un ensayo <i>in vitro</i>	115
2^o ESTUDIO	
Figura 2.1. Análisis de regresión lineal entre la ganancia de Fe en la hemoglobina y la ingesta de hierro del SF + Vit C y PFM + Vit C añadidos al néctar, durante el periodo de repleción.....	128
Figura 2.2. Análisis de regresión lineal entre el cambio en la hemoglobina y la ingesta de hierro del SF + Vit C y PFM + Vit C añadidos al néctar, durante el periodo de repleción.....	128
Figura 2.3. Cambio en la concentración del VCM en ratas anémicas durante la administración del SF + Vit C y PFM + Vit C, añadidos al néctar.....	130
Figura 2.4. Cambio en la concentración del HCM en ratas anémicas durante la administración del SF + Vit C y PFM + Vit C, añadidos al néctar.....	130
Figura 2.5. Cambio en la concentración del CHCM en ratas anémicas durante la administración del SF + Vit C y PFM + Vit C, añadidos al néctar.....	130
Figura 2.6. Cambio en la concentración del HS en ratas anémicas durante la administración del SF + Vit C y PFM + Vit C, añadidos al néctar.....	131
Figura 2.7. Cambio en la concentración del CTFH en ratas anémicas durante la administración del SF + Vit C y PFM + Vit C, añadidos al néctar.....	131
Figura 2.8. Cambio en la concentración del %ST en ratas anémicas durante la administración del SF + Vit C y PFM + Vit C, añadidos al néctar.....	131

Figura 2.9. Efecto de la administración del néctar con SF con/sin vitamina C y PFM con/sin vitamina C, en la producción de radicales libres en heces, determinadas por la cuantificación del ácido bencenosulfínico (ABS) como producto final en un ensayo <i>in vitro</i>	136
---	------------

3^{er} ESTUDIO

Figura 3.1. Análisis de regresión lineal entre el cambio en la hemoglobina y la ingesta de hierro del SF + mezcla Vits B y PFM + mezcla Vits B añadidos al néctar, durante el periodo de repleción.....	151
Figura 3.2. Análisis de regresión lineal entre la ganancia de Fe en la hemoglobina y la ingesta de hierro del SF + mezcla Vits B y PFM + mezcla Vits B añadidos al néctar, durante el periodo de repleción.....	151
Figura 3.3. Cambio en la concentración del VCM en ratas anémicas durante la administración del SF + mezcla Vits B y PFM + mezcla Vits B, añadidos al néctar.....	152
Figura 3.4. Cambio en la concentración del HCM en ratas anémicas durante la administración del SF + mezcla Vits B y PFM + mezcla Vits B, añadidos al néctar.....	152
Figura 3.5. Cambio en la concentración del CHCM en ratas anémicas durante la administración del SF + mezcla Vits B y PFM + mezcla Vits B, añadidos al néctar.....	152
Figura 3.6. Cambio en la concentración del HS en ratas anémicas durante la administración del SF + mezcla Vits B y PFM + mezcla Vits B, añadidos al néctar.....	153
Figura 3.7. Cambio en la concentración del CTFH en ratas anémicas durante la administración del SF + mezcla Vits B y PFM + mezcla Vits B, añadidos al néctar.....	153
Figura 3.8. Cambio en la concentración del %ST en ratas anémicas durante la administración del SF + mezcla Vits B y PFM + mezcla Vits B, añadidos al néctar.....	153
Figura 3.9. Efecto de la administración del néctar con SF con/sin mezcla vitaminas B y PFM con/sin mezcla vitaminas B, en la producción de radicales libres en heces, determinadas por la cuantificación del ácido bencenosulfínico (ABS) como producto final en un ensayo <i>in vitro</i>	157

4^o ESTUDIO

Figura 4.1. Análisis de regresión lineal entre el cambio en la hemoglobina y la ingesta de hierro del SF + Vits B + C y PFM + Vits B + C añadidos al néctar, durante el periodo de repleción.....	176
Figura 4.2. Análisis de regresión lineal entre la ganancia de Fe en la hemoglobina y la ingesta de hierro del SF + Vits B + C y PFM + Vits B + C añadidos al néctar, durante el periodo de repleción.....	176
Figura 4.3. Cambio en la concentración del VCM en ratas anémicas durante la administración del SF + Vits B + C y PFM + Vits B + C, añadidos al néctar.....	177
Figura 4.4. Cambio en la concentración del HCM en ratas anémicas durante la administración del SF + Vits B + C y PFM + Vits B + C, añadidos al néctar.....	177
Figura 4.5. Cambio en la concentración del CHCM en ratas anémicas durante la administración del SF + Vits B + C y PFM + Vits B + C, añadidos al néctar.....	177
Figura 4.6. Cambio en la concentración del HS en ratas anémicas durante la administración del SF + Vits B + C y PFM + Vits B + C, añadidos al néctar.....	179
Figura 4.7. Cambio en la concentración del CTFH en ratas anémicas durante la administración del SF + Vits B + C y PFM + Vits B + C, añadidos al néctar.....	179
Figura 4.8. Cambio en la concentración del %ST en ratas anémicas durante la administración del SF + Vits B + C y PFM + Vits B + C, añadidos al néctar.....	179
Figura 4.9. Efecto de la administración del néctar con SF con/sin vitaminas B y C, y PFM con/sin vitaminas B y C, en la producción de radicales libres en heces, determinadas por la cuantificación del ácido bencenosulfínico (ABS) como producto final en un ensayo <i>in vitro</i>	186

5^o ESTUDIO

Figura 5.1. Análisis de regresión lineal entre el cambio en la hemoglobina y la ingesta de hierro del SF + Vits B + C + FOS, PFM + Vits B + C + FOS y BF + Vits B + C + FOS añadidos al néctar, durante el periodo de repleción.....	210
Figura 5.2. Análisis de regresión lineal entre la ganancia de Fe en la hemoglobina y la ingesta de hierro del SF + Vits B + C + FOS, PFM + Vits B + C + FOS y BF + Vits B + C + FOS añadidos al néctar, durante el periodo de repleción.....	210
Figura 5.3. Cambio en la concentración del VCM en ratas anémicas durante la administración del SF + Vits B + C + FOS, PFM + Vits B + C + FOS y BF + Vits B + C + FOS, añadidos al néctar.....	211

Figura 5.4. Cambio en la concentración del HCM en ratas anémicas durante la administración del SF + Vits B + C + FOS, PFM + Vits B + C + FOS y BF + Vits B + C + FOS, añadidos al néctar.....	211
Figura 5.5. Cambio en la concentración del CHCM en ratas anémicas durante la administración del SF + Vits B + C + FOS, PFM + Vits B + C + FOS y BF + Vits B + C + FOS, añadidos al néctar.....	211
Figura 5.6. Cambio en la concentración del HS en ratas anémicas durante la administración del SF + Vits B + C + FOS, PFM + Vits B + C + FOS y BF + Vits B + C + FOS, añadidos al néctar.....	213
Figura 5.7. Cambio en la concentración del CTFH en ratas anémicas durante la administración del SF + Vits B + C + FOS, PFM + Vits B + C + FOS y BF + Vits B + C + FOS, añadidos al néctar.....	213
Figura 5.8. Cambio en la concentración del %ST en ratas anémicas durante la administración del SF + Vits B + C + FOS, PFM + Vits B + C + FOS y BF + Vits B + C + FOS, añadidos al néctar.....	213
Figura 5.9. Efecto de la administración del néctar con SF + Vits B + C + FOS, PFM + Vits B + C + FOS y BF + Vits B + C + FOS, en la producción de radicales libres en heces, determinadas por la cuantificación del ácido bencenosulfínico (ABS) como producto final en un ensayo <i>in vitro</i>	220
Figura 5.10. Efecto de la administración del néctar con SF con/sin Vits B + C + FOS y PFM con/sin Vits B + C + FOS en la producción de radicales libres en heces, determinadas por la cuantificación del ácido bencenosulfínico (ABS) como producto final en un ensayo <i>in vitro</i>	221
Figura 5.11. Concentración de hierro sérico después de la administración oral de 2 mg Fe/Kg como SF, PFM y BF junto con las vitaminas B, C y FOS en ratas anémicas (n = 3).....	223
DISCUSIÓN GENERAL	
Figura 6.1. Representación gráfica de los diferentes tipos de néctar, según el %AA, % R y %ERH, en cada periodo de repleción.....	228

ABREVIATURAS

%.....	Porcentaje	ERH	Eficiencia de la Regeneración de la Hemoglobina
(CH₃)₂ SO	Dimetil sulfóxido	ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
(CH₃CH₂)₂O	Éter etílico	Fe⁺²	Hierro ferroso
~.....	Aproximadamente	Fe⁺³	Hierro férrico
±.....	Más menos	FeSO₄ * 7H₂O ...	Sulfato ferroso heptahidratado
µg	Microgramos	FOS	Fructooligosacáridos
µm	Micrómetros	FOScc	Fructooligosacáridos de cadena corta
µm³	Micrómetros cúbicos	FUFOSE	Functional Food Science in Europe
AA	Absorción Aparente	g	Gramos
ABC	Área Bajo la Curva	GABA	Gamma-amino butyric acid
Abs	Absorbancia	GOS	Galactooligosacáridos
ABS	Ácido Bencenosulfínico	GP	Grado de Polimerización
ADN	Ácido Desoxirribonucleico	h	Hora
AGCC	Ácidos grasos de cadena corta	H₂O₂	Peróxido de Hidrógeno
AI	Adequate Intake	H₂SO₄	Ácido sulfúrico
AIN	American Institute of Nutrition	Hb	Hemoglobina
ALAS	ácido δ-aminolevulínico sintetasa	HCl	Ácido clorhídrico
AMS	Ácido Metanosulfínico	HCM	Hemoglobina Corpuscular Media
AOAC	Association of Oficial Analytical Chemistry	HCP1	Heme Carrier Protein 1
ARN	Ácido Ribonucleico	Hct	Hematocrito
BF	Bisglicinato ferroso	HNO₃	Ácido nítrico
BNF	British Nutrition Foundation	HS	Hierro Sérico
C₁₇H₁₈N₃O₃Cl x		IDR	Ingestas Diarias de Referencia
½ ZnCl₂	Sal Fast Blue BB		
C₆ H₁₄	n-Hexano	ILSI	Internacional Life Sciences Institute
C₆H₅SO₂Na	Ácido benzenosulfínico, sal sódica	INACG	International Nutritional Anemia Consultative Group
Ca	Calcio	IOM	Institute of Medicine
cc	Centímetros cúbicos	IREG-1	Iron Regulated Transporter 1
Cd⁺²	Cadmio	KDa	KiloDaltons
CDR	Cantidad Diaria Recomendada	Kg	Kilogramos
CH₃CO₂Na	Acetato sódico	l	Litros
CH₃COOH	Ácido acético glacial	mg	Miligramos
CH₃SO₂Na	Ácido metanosulfínico, sal sódica	MI	Micronutrient Initiative
CHCM	Concentración de la Hemoglobina Corpuscular Media	min	Minutos
Co⁺²	Cobalto	ml	Mililitros
CRH	Corticotropin Releasig Hormone	mm	Milímetros
CTFH	Capacidad Total de Fijación del Hierro	Mn⁺²	Manganeso
Cu⁺²	Cobre	MTP 1	Metal Transporter Protein 1
DCT1	Divalent Cation Transporter 1	Na	Sodio
Dcytb	Duodenal cytochrome b	NaFeEDTA	Etilendiaminotetraacetato –sódico-férrico
DIU	Dispositivo Intrauterino	NaOH	Hidróxido sódico
DMT1	Divalent Metal Transporter 1	Ni⁺²	Níquel
DRI	Dietary Reference Intake	nm	Nanómetros
EAA	Espectrofotometría de Absorción Atómica	Nramp2	Natural Resistance Associated Macrophage Protein 2
EAR	Estimated Average Requirements	O₂⁻	Anión superóxido
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	°C	Grados centígrados

OH⁻	Radical hidroxilo
OMS	Organización Mundial de la Salud
OND	Oligosacáridos no digeribles
OS	Oligosacáridos
p	Nivel de significación estadístico
PASSCLAIM	Process for the Assessment of Scientific Support for Claims of Foods
Pb⁺²	Plomo
PFM	Pirofosfato férrico micronizado
pg	Picogramos
ppm	Partes por millón
ps	Peso seco
PS	Polisacáridos
r	Coefficiente de correlación
R	Retención
r²	Coefficiente de regresión lineal
RBV	Relative Bioavailability Value
RDA	Recommended Dietary Allowances
ROS	Reactive Oxygen Species
rpm	Revoluciones por minuto
SD	Sprague-Dawley
SF	Sulfato ferroso
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SOS	Sojaoligosacáridos
ST	Saturación de la Transferrina
T^a	Temperatura
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
UL	Tolerable Upper Intake Level
UNICEF	United Nations Children's Fund
UNU	United Nations University
VBR	Valor de la Biodisponibilidad Relativa
VCM	Volumen Corpuscular Medio
Vits	Vitaminas
WHO	World Health Organization
XOS	Xilooligosacáridos
Zn⁺²	Zinc

I. INTRODUCCIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la deficiencia en hierro es el desorden nutricional más común en el mundo, afectando aproximadamente a 2 billones de personas. Considerada como uno de los diez factores de riesgo de enfermedad, discapacidad y muerte, tiene un impacto mucho mayor que la deficiencia de vitamina A o cinc (OMS, 2002). Alrededor de la mitad de estos individuos desarrollan *anemia*, la forma más avanzada de la enfermedad, que tiene graves efectos negativos sobre la salud y contribuye a aumentar el riesgo de muerte durante el embarazo, mortalidad infantil, retraso físico y desarrollo mental, afectando también al desarrollo escolar. La debilidad y la pérdida de energía asociada con la deficiencia en hierro afectan a la capacidad física en el trabajo y causan una disminución en los niveles de productividad a nivel individual y colectivo.

Se han recomendado tres estrategias para la corrección de la deficiencia de hierro nutricional: a) la *diversificación o modificación de la dieta* para mejorar el valor nutricional y la biodisponibilidad del hierro, mediante el consumo de alimentos ricos en hierro, b) la *suplementación*, eficaz en los grupos de población con elevado riesgo, principalmente mujeres embarazadas y niños jóvenes, aunque presenta una limitación en la eficacia de los programas de intervención, relacionados con la logística y la distribución de las dosis semanales o diarias, las cuales son a menudo insuficientes (Mora, 2002), y c) el *enriquecimiento*, generalmente considerado como la solución más práctica y rentable a largo plazo, abarcando una amplia gama de alimentos y alcanzando a la mayoría de los segmentos de la población (Yip y Ramakrishnan, 2002; WHO, 2004).

Sin embargo, debido a que el hierro es un mineral difícil de añadir a los alimentos en una forma suficientemente biodisponible sin causar cambios sensoriales adversos, no todos los alimentos enriquecidos proporcionan el suficiente hierro como para mejorar el estado nutricional de este mineral (Hurrell, 2002). Por tanto, un alimento enriquecido debe superar dos barreras técnicas: a) seleccionar un compuesto de hierro que sea suficientemente biodisponible y a su vez que no cause cambios sensoriales en el alimento, y b) superar el efecto inhibitorio de los componentes de la dieta, tales como el ácido fítico, compuestos fenólicos y calcio, los cuales están a menudo presentes en el alimento.

En general, la anemia puede ser el resultado de factores tanto nutricionales como no nutricionales. Obviamente la carencia de hierro en la dieta de manera continuada es la más importante, aunque las deficiencias de otros micronutrientes tales como las vitaminas A, C, B₁₂, B₆ y B₉ pueden contribuir al desarrollo de esta enfermedad (Allen y Casterline-Sabel., 2001). Estos nutrientes pueden modificar la síntesis de la hemoglobina directa o indirectamente

afectando su absorción y/o movilización. Sin embargo, debido a que la deficiencia en hierro raramente ocurre de manera aislada y a menudo está acompañada por la deficiencia de otros micronutrientes (Van den Broek y Letsky., 2000), el uso de suplementos múltiples de micronutrientes en vez de suplementos individuales de hierro está siendo cada vez más tenido en cuenta (Huffman y col., 1998; Lapidó, 2000).

Como una medida preventiva contra la deficiencia de hierro, la mayoría de los alimentos procesados son frecuentemente enriquecidos en este mineral (Fairweather-Tait, 1997). Pero si tan peligroso es el déficit de hierro en la dieta, el exceso puede llegar a ser nocivo, llegando a relacionarse con la elevada incidencia de cáncer de colon en los países desarrollados, por lo que se ha cuestionado la conveniencia de proporcionar a la población alimentos enriquecidos con hierro de manera indiscriminada (Knekt y col., 1994; Nelson y col., 1994). La causa de este efecto negativo sobre la salud se fundamenta en su naturaleza pro-oxidante (Babbs, 1989; Blakeborough y col., 1989; Graf y Eaton, 1993). No obstante, son necesarias investigaciones en las que se evalúen el tipo de compuesto de hierro y las dosis de los mismos que puedan afectar al estrés oxidativo de las células de la mucosa del colon, ya que este lugar a sido el sugerido por los estudios epidemiológicos como el más vulnerable a un exceso en la ingesta de hierro.

En Europa ha aumentado considerablemente en la última década el interés de los consumidores por conocer la relación que existe entre la dieta y la salud. Existen una gran variedad de alimentos a disposición del consumidor, pero en estos momentos la prioridad es identificar qué alimentos pueden mejorar la salud y el bienestar, y reducir el riesgo o retrasar la aparición de importantes enfermedades. Dentro de esta amplia gama de alimentos y debido a su aceptabilidad, los zumos de frutas y similares enriquecidos con micronutrientes pueden ser útiles en la reducción de las deficiencias de micronutrientes. Estos productos enriquecidos se engloban dentro del concepto de "alimentos funcionales". No obstante, uno de los mayores retos para los científicos consiste en investigar la relación existente entre un alimento o uno de sus componentes y la mejora del estado de salud y bienestar o la disminución de enfermedades. La composición del néctar de frutas empleado en el desarrollo de la presente tesis, está diseñado para mejorar el estado nutricional del hierro con el fin de ser utilizado como complemento de una dieta equilibrada en individuos con deficiencia en hierro. Este trabajo constituye una continuación a los estudios iniciados en la Tesis de Licenciatura titulada "Cinética de la disponibilidad del hierro en néctares de frutas enriquecidos y sus atributos sensoriales" sobre la bioaccesibilidad de diferentes compuestos de hierro añadidos a un néctar de frutas utilizando un método *in vitro* de digestión y diálisis del mineral (Haro-Vicente y col., 2006). Los resultados de la Tesis de Licenciatura mostraban un claro efecto favorecedor de las vitaminas adicionadas al néctar sobre la dialización de los compuestos de hierro. No obstante, resulta

necesario contrastar estos resultados con los estudios *in vivo*. Por este motivo, en la presente Tesis doctoral se ha investigado la biodisponibilidad de los mismos compuestos de hierro (sulfato ferroso, pirofosfato férrico micronizado y bis-glicinato ferroso) añadidos al néctar de frutas junto a las vitaminas C, B₆, B₁₂ y ácido fólico, y fructo-oligosacáridos, utilizando un ensayo de repleción de la hemoglobina en ratas.

II. OBJETIVOS

- 1.-** Evaluar y comparar el efecto de la adición por separado y conjunta de diferentes vitaminas (C, B₆, B₁₂, ácido fólico) con/sin fructo-oligosacáridos (FOS) en la absorción de hierro, en ratas, del pirofosfato férrico micronizado y bis-glicinato ferroso añadido a un néctar de frutas, comparándolo con una fuente de hierro estándar, el sulfato ferroso (SF).
- 2.-** Determinar si la adición de las diferentes vitaminas con/sin FOS junto al pirofosfato férrico micronizado (PFM), sulfato ferroso (SF) y bis-glicinato ferroso (BF) en un néctar de frutas, modifica los parámetros hematológicos y bioquímicos relacionados con el estado nutricional del hierro en ratas. Estudiar la biodisponibilidad de este compuesto, en relación al SF, utilizando como medida la regeneración de la hemoglobina en ratas.
- 3.-** Comparar el depósito del mineral en los órganos diana (bazo, hígado, riñón, corazón duodeno) en función del tipo de compuesto de hierro añadido al néctar y determinar si la adición de vitaminas y/o FOS produce un efecto adicional sobre la concentración del mineral en dichos órganos.
- 4.-** Determinar si la administración del néctar enriquecido con PFM, BF y SF en la dosis del estudio, en combinación con las diferentes vitaminas y/o FOS, está asociada a un aumento en la concentración de hierro y a la capacidad de generación de radicales libres en heces de ratas.
- 5.-** Seleccionar la combinación de vitaminas y compuesto de hierro que proporcione una mayor absorción y biodisponibilidad del mineral cuando se añade a un néctar de frutas.

III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. IMPORTANCIA NUTRICIONAL DEL HIERRO

El hierro, es el segundo metal más abundante (después del aluminio) y el cuarto elemento más abundante de la corteza terrestre. Es un nutriente esencial y al mismo tiempo un potente tóxico para las células, por ello, requiere de un sofisticado complejo de regulación para alcanzar las demandas de las células y al mismo tiempo prevenir su excesiva acumulación (Pietrangelo, 2002).

Siendo uno de los metales más abundantes en el cuerpo humano, el hierro participa en numerosos procesos celulares tales como la síntesis de ADN, ARN y proteínas, transporte de electrones, respiración celular, diferenciación y proliferación celular, y en la regulación de la expresión de los genes (Gerlach y col., 1994; Andrews y col., 1999; Boldt, 1999; Conrad y col., 1999; Wessling-Resnick, 1999). Elevados niveles de hierro se encuentran en el hígado, cerebro, células rojas sanguíneas, y macrófagos (Youdim, 1988; Yehuda y Youdim, 1989; Andrews y col., 1999). Además, el hierro participa en la formación de la mielina y en el desarrollo de las dendritas neuronales (Youdim y col., 1990, 1991; Ben-Shachar y col., 1991), siendo crítica la homeostasis del hierro en la función normal del cerebro, especialmente en el aprendizaje y la memoria (Youdim y col., 1989, 1990; Gerlach y col., 1994).

El hierro es un componente clave de muchas enzimas celulares, como *oxidasas*, *catalasas*, *peroxidasas*, *citocromos*, *ribonucleótido reductasas*, *aconitasas*, y *óxido nítrico sintetasa* (Boldt, 1999; Conrad y col., 1999; Ponka, 1999). Estas enzimas no solamente son críticas en muchos procesos celulares básicos, como la síntesis de ADN y ARN, transporte de electrones, y proliferación celular, sino que además contribuyen al desarrollo de un amplio número de enfermedades, como desórdenes metabólicos del hierro, diversos tipos de cáncer, enfermedades neurodegenerativas, y envejecimiento.

La importancia biológica del hierro está en su capacidad de aceptar o donar electrones al existir tanto en el estado ferroso (Fe^{+2}) como férrico (Fe^{+3}). El hierro participa en reacciones de oxidación-reducción conocidas como *reacción Fenton* (Wessling-Resnick, 1999):



Estas reacciones redox son esenciales para las funciones bioquímicas del hierro que participan en diversos procesos metabólicos celulares. No obstante los niveles de hierro deben mantenerse adecuadamente dentro de las células, porque el exceso de hierro es altamente

tóxico. El efecto perjudicial del hierro está relacionado con su capacidad de generar especies reactivas de oxígeno (ROS) por la *vía Fenton* (McCord, 1998), tales como radicales hidroxilo (OH^\cdot) y superóxido (O_2^\cdot), altamente tóxicas para el organismo debido a su capacidad para reaccionar rápidamente con una elevada afinidad con la mayoría de las moléculas que se encuentran en las células vivas (McCord, 1998). Los efectos globales que producen son daños en el ADN, en la síntesis de proteínas, en las membranas lipídicas y carbohidratos, producen inducción de las proteasas, y alteración en la proliferación celular (Halliwell, 1992; Halliwell and Gutteridge, 1992; Schaich, 1992; Smith y col., 1992; McCord, 1998). Además, el hierro libre puede reaccionar directamente con los ácidos grasos insaturados y producir hidroperóxidos lipídicos para formar radicales alcóxilos y/o peróxilos, dañando seriamente la integridad de la membrana y causando la muerte celular (Gerlach y col., 1994; McCord, 1998). Este destructivo potencial del hierro ha conducido a la sugerencia de que el hierro puede jugar un papel en los múltiples procesos de la carcinogénesis, patogénesis de la arteriosclerosis, o desordenes neurodegenerativos, tales como las enfermedades del Parkinson y Alzheimer (Sofic y col., 1988; Youdim, 1988; Dexter y col., 1991; Jenner, 1991; Connor y col., 1992).

1.1. Almacenamiento y distribución del hierro

1.1.1. Intercambio de hierro

Teniendo en cuenta que el hierro se requiere en diversas funciones celulares, un balance adecuado entre la ingesta, almacenamiento, y la utilización del hierro es necesario para mantener su homeostasis (Smith y col., 1992; Sussman, 1992). Por este motivo, la absorción, la concentración de hierro en los órganos, y el estado redox del hierro, se encuentran cuidadosamente reguladas por nuestro organismo (Figura 1).

El hierro almacenado en forma de *ferritina* es utilizado para alcanzar los requerimientos diarios no proporcionados por la dieta. El hierro movilizado desde los tejidos es transportado por el transportador del hierro, *transferrina*. Esta molécula (Figura 2) es una de las principales proteínas séricas en los eucariotas y juega un papel crítico en la fijación y transporte del mineral (Hoefkens y col., 1996). Su peso molecular de 80 KDa (Parkkinen y col., 2002), está formado por una cadena polipeptídica de 679 aminoácidos organizados en dos lóbulos homogéneos conocidos como lóbulo N y lóbulo C. Cada lóbulo está formado por dos dominios. Los dominios interaccionan para formar un profundo hueco para la fijación del hierro (III). Además, para estabilizar la molécula de hierro requiere dos moléculas de oxígeno donadas por una molécula de carbonato o bicarbonato (Hiroshi, 2000).

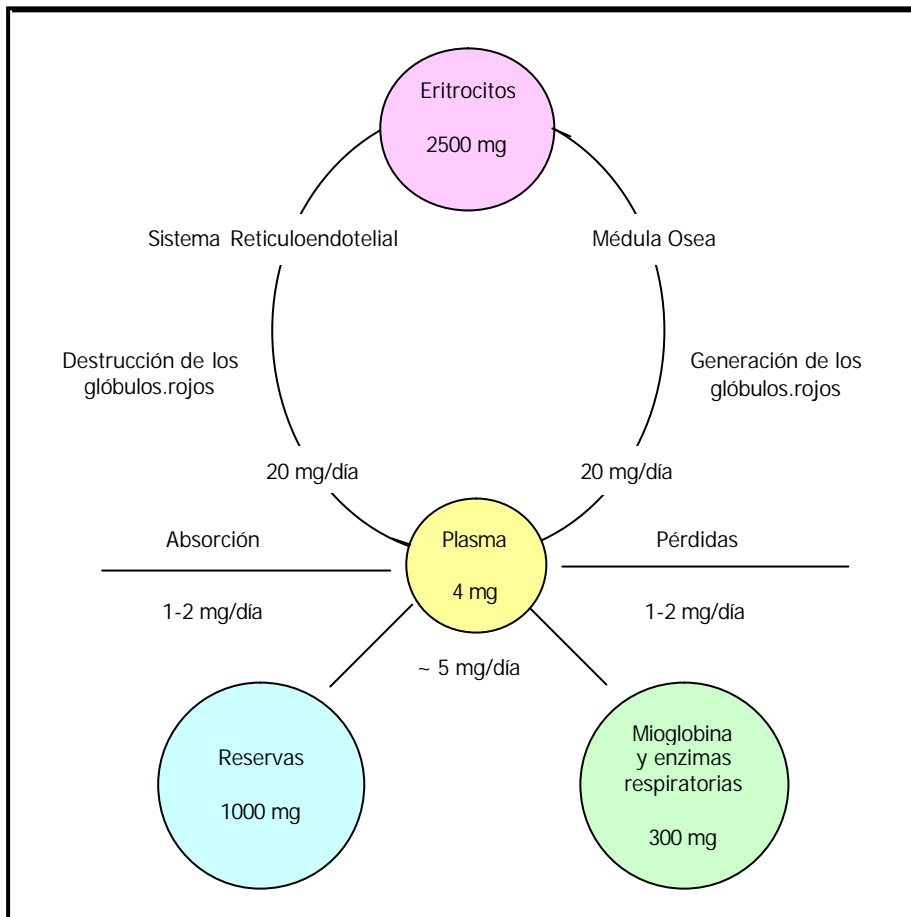


Figura 1. Distribución e intercambio cuantitativo del hierro en el organismo (Conrad, 2000).

La afinidad de la transferrina por el hierro es dependiente del pH, siendo este elemento liberado de la transferrina cuando el pH se encuentra por debajo de 6.5. Además del hierro, la transferrina podría estar implicada en el transporte de una serie de metales, tales como el aluminio, manganeso (Davidsson y col., 1989a,b), cobre, y cadmio (Moos y col., 2000). Sin embargo, el hierro tiene una mayor afinidad por la transferrina y desplaza a otros metales (Lieu y col., 2001).

La *transferrina* es sintetizada principalmente en el hígado (Morgan, 1983), pero es además producida en cantidad significativa en el cerebro, testículos, glándulas mamarias y en algunos tejidos durante el desarrollo fetal (Dickson y col., 1985; Takeda y col., 1998). La *transferrina* existe como apotransferrina (proteína sin hierro), *transferrina monoférrica* (unida a una molécula de hierro), y *transferrina diférrica* (con dos moléculas de hierro). La presencia de cada una de las formas depende de la concentración de hierro y de la *transferrina* presente en el plasma sanguíneo.

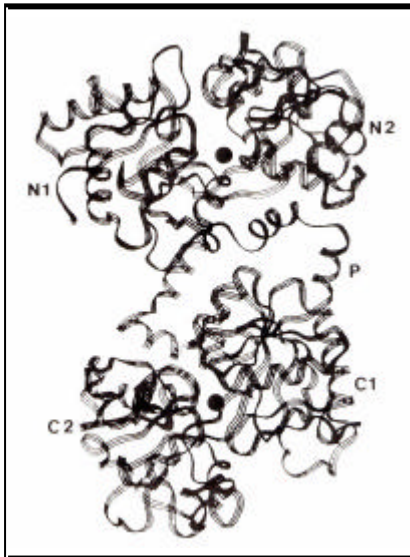


Figura 2. Diagrama de la *transferrina* con sus dos lóbulos (lóbulo N, parte superior y lóbulo C, parte inferior) y sus dominios (N1, N2, C1 y C2). Los átomos de hierro se representan como círculos negros ●. El péptido interlobular (P) es el encargado de unir los lóbulos N y C (Baker y Lindley, 1992).

1.1.2. Distribución del hierro

El cuerpo humano contiene aproximadamente de 3 a 5 g de hierro (45-55 mg/Kg de peso corporal en una mujer y hombre adulto, respectivamente), distribuido según se presenta en la Figura 3. La mayoría del hierro corporal (~ 60-70%) es utilizado por la hemoglobina en la circulación de las células rojas sanguíneas (Andrews, 1999; Ponka, 1997). Otros órganos con una elevada concentración de hierro son el hígado y los músculos. Aproximadamente el 20-30% del hierro corporal es almacenado en los hepatocitos y en los macrófagos del sistema reticuloendotelial, en forma de *ferritina* y en su producto de degradación, la *hemosiderina*. El resto del hierro corporal está localizado en la mioglobina, citocromos, y enzimas que contienen hierro.

Un individuo sano absorbe diariamente 1-2 mg de hierro de la dieta, cantidad que compensa tras las pérdidas de hierro por la descamación de las células de la piel y del intestino. Además, las mujeres menstruantes fisiológicamente pierden hierro a través de la sangre. La eritropoyesis requiere aproximadamente 30 mg de hierro al día, cantidad que es principalmente proporcionada por el reciclaje del hierro a través de los macrófagos del sistema reticuloendotelial. En este caso, los macrófagos destruyen las células rojas sanguíneas senescentes y liberan el hierro a la circulación unido a la transferrina. Este hierro (~ 3 mg) es muy dinámico y sufre más de diez veces al día un proceso de reciclaje (Figura 3) (Papanikolaou y Pantopoulos, 2005).

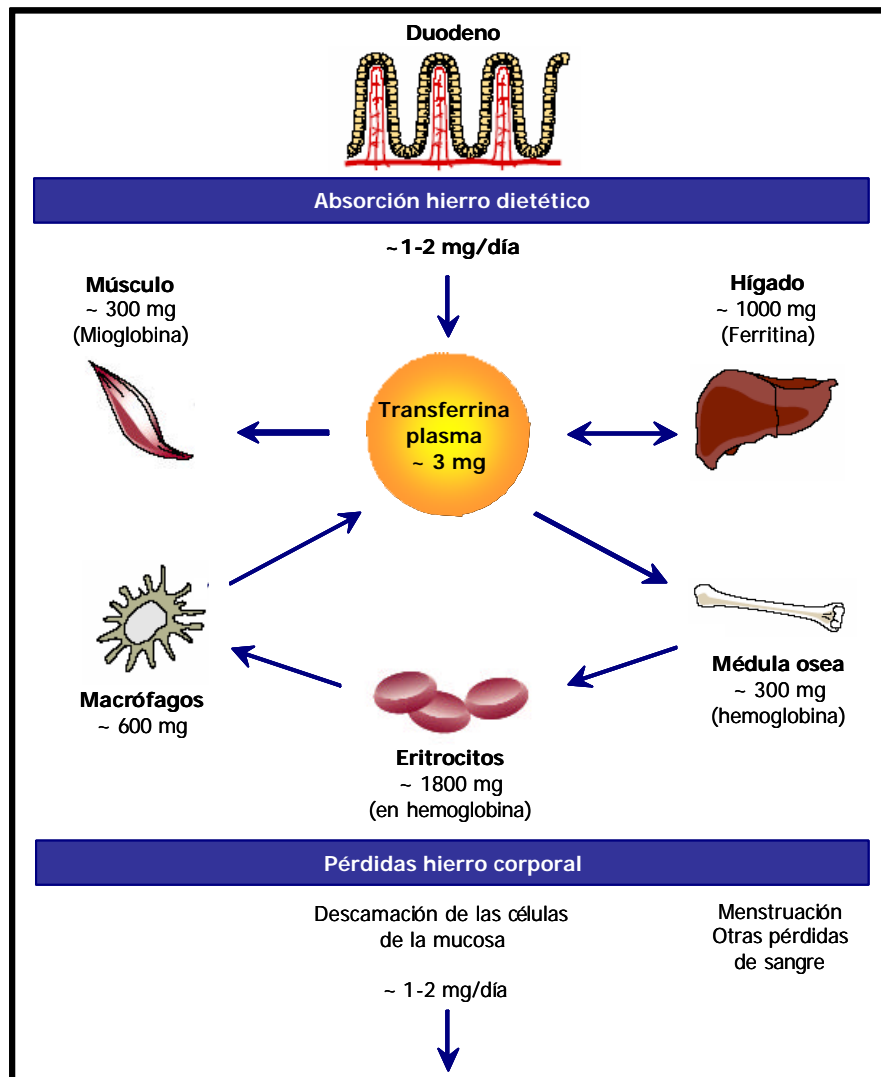


Figura 3. Distribución del hierro en el cuerpo humano

Normalmente, el 95% del hierro almacenado en el hígado se encuentra en los hepatocitos en forma de *ferritina*. La *hemosiderina* constituye el 5% restante y se encuentra predominantemente en las células lisosomales de Kupffer. Esta molécula de reserva, es un aglomerado amorfo de la degradación de la ferritina entremezclado con polímeros de hidróxido férrico (O'Connell y col., 1988; Ward y col., 1988, 1989). En un hígado normal, la *ferritina* es la principal proteína con hierro que se detecta, pero en condiciones de sobrecarga de hierro, la *hemosiderina* se muestra predominante (Halliday y col., 1995).

La *apoferritina* humana (molécula desprovista de hierro) tiene un peso molecular de 480 kDa y está formada por 24 subunidades cuyo peso molecular es de aproximadamente 19 kDa. La *ferritina* humana (Figura 4) está constituida por dos tipos de subunidades, la *H-ferritina*, proteína de 22 kDa compuesta por 182 aminoácidos y presente en el corazón (Powell y col., 1974 y 1975), células rojas sanguíneas (Peters y col., 1983), linfocitos y monocitos (Jones y col., 1983); y la *L-ferritina*, proteína con un peso molecular de 19 kDa compuesta de 174

aminoácidos. La *L-ferritina* se encuentra predominantemente en el hígado, bazo y placenta (Arosio y col., 1976). Las dos subunidades son más o menos redondeadas y ambas forman una carcasa casi esférica que engloba un núcleo central que contiene cerca de 4500 átomos de hierro en la forma de hidroxifosfato férrico. Generalmente la *ferritina* en el hígado, bazo, corazón y riñón contienen alrededor de 1500 átomos de hierro por molécula (Wagstaff y col., 1982).

La molécula de ferritina tiene un importante papel en la fisiología del metabolismo del hierro (Halliday y col., 1995): mantener el hierro en una forma soluble no tóxica y biológicamente disponible, y secuestrar cantidades extensas de hierro. De esta manera, la ferritina puede ser vista no solamente como parte de un grupo de proteínas reguladoras del balance de hierro que incluyen a la transferrina y al receptor de la transferrina, sino además como un miembro de la familia de proteínas que intervienen en la defensa celular contra el estrés y la inflamación (Torti y col., 1988).

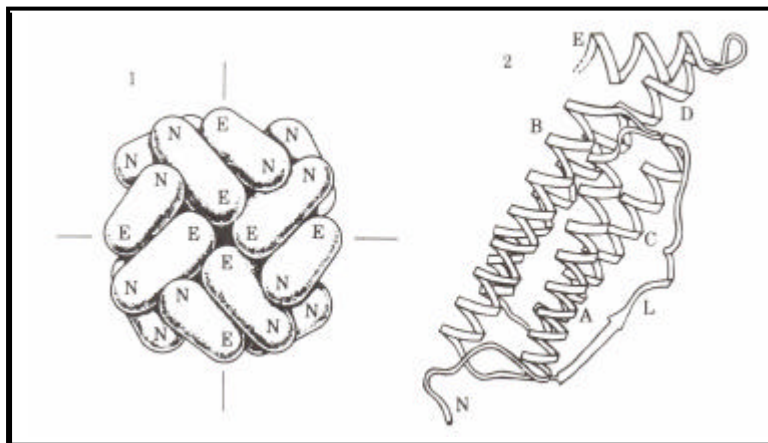


Figura 4. Estructura de la ferritina. En (1) se muestra un esquema completo de las 24 subunidades de la ferritina. La orientación de las subunidades en la molécula completa está indicada por las posiciones N y E. En (2) se muestra un diagrama de una subunidad con sus 4 hélices (A, B, C y D) y una hélice corta (E) acostada en un ángulo agudo al bucle axial. La parte terminal de la molécula (N) yace enfrente de la hélice E. El bucle L es el encargado de unir a las hélices B y C (Ford y col. 1984)

2. ABSORCIÓN DEL HIERRO

La absorción nutricional tanto del *hierro hemo* como *no hemo* tiene lugar principalmente en el intestino delgado, concretamente en el duodeno y yeyuno proximal (Conrad y col., 1987; Wood y Han, 1998). No obstante recientemente se ha descubierto que en ratas existe absorción del *hierro no hemo* a nivel del colon proximal. Los mecanismos por los cuales se produce este transporte no se conocen (Johnston y col., 2006). Los enterocitos localizados en las vellosidades del intestino delgado son células absorbentes, altamente especializadas y polarizadas, que controlan el paso del hierro dietético al lumen del intestino y la transferencia del hierro hacia la circulación sanguínea (Wood y Han., 1998).

La disponibilidad del hierro ingerido para la absorción y la cantidad absorbida dependen de la naturaleza química y la cantidad de hierro en la dieta, a presencia de otros factores en el alimento ingerido, los efectos de las secreciones gastrointestinales y la capacidad absorbente de la mucosa intestinal (Morgan y Oates, 2002). En el alimento el hierro está presente en dos formas: *hierro hemo* y *hierro no hemo* (Martínez y col., 2000). El *hierro no hemo* (o inorgánico) lo encontramos en los alimentos en la forma reducida (Fe^{+2}) o en la forma oxidada (Fe^{+3}). Debido a que el hierro férrico es insoluble a un pH > 3, éste debe ser reducido o quelado en el estómago para estar disponible durante la absorción en el duodeno. Mientras, la mayor parte del hierro ferroso permanece soluble a un pH 7, por lo que la absorción del hierro ferroso es más eficiente que la del hierro férrico (Conrad y col., 1999).

Otros constituyentes dietéticos (fitatos, carbonatos, fosfatos, oxalatos, y taninos) precipitan el hierro férrico formando macromoléculas que no son disponibles para la absorción. No obstante, es posible que una proporción de hierro férrico dietético sea reducido por constituyentes dietéticos y secreciones intestinales a hierro ferroso, el cual sí es soluble a pH neutro. Para que el hierro ferroso permanezca en este estado reducido requiere la presencia continua de sustancias reductoras para mantenerse quelado, de manera que no sea posible la exposición del hierro al oxígeno. Los principales favorecedores de la absorción del *hierro no hemo* son la carne y los ácidos orgánicos, principalmente el ácido ascórbico. Éste actúa reduciendo el hierro férrico a un estado ferroso más soluble, pero además podría quelar el hierro férrico en el medio ácido del estómago. Este complejo no permanecería estable, pero sí soluble en el pH alcalino del tracto gastrointestinal. Dentro de los inhibidores de la absorción del hierro no hemo se incluyen los polifenoles presentes en los vegetales, legumbres y condimentos; los fitatos, que constituyen entre el 1-2 % de muchos cereales, nueces y legumbres; la fibra dietética, el calcio y el fósforo, y algunas proteínas como las lácteas (Crichton, 2001).

El primer paso en la absorción del hierro es la transferencia del hierro a través de la membrana apical de los enterocitos que en el caso del hierro ferroso está mediada por un "*transportador de cationes divalentes*" DCT1 (Divalent cation transporter 1), o Nramp2 (Natural Resistance Associated Macrophage Protein 2) o "*transportador de metales divalentes*" DMT1 (Divalent metal transporter 1) (Fleming y col., 1997; Gunshin y col., 1997). Estos autores observaron que el DMT 1 es capaz de transportar protones con una estequiometría de un protón por cada catión divalente, estableciendo que el gradiente de protones asociado con el pH ligeramente ácido del duodeno proximal es la fuerza motriz para la entrada del metal, es decir que el transporte de hierro esté acoplado a una bomba de protones y requiere un gradiente de pH (Tandy y col., 2000). El DMT1 es capaz de transportar no solamente el Fe^{+2} , sino también un

amplio rango de cationes divalentes: Zn^{+2} , Mn^{+2} , Co^{+2} , Cd^{+2} , Cu^{+2} , Ni^{+2} , y Pb^{+2} . Además, la función del DMT1 es dependiente del pH, siendo su pH óptimo inferior a 6 (Gunshin y col., 1997). Este transportador de cationes divalentes está implicado también en la recapturación del Fe^{+2} en el riñón (Ferguson y col., 2001; Hubert y Entes, 2002) y en el transporte del hierro en el cerebro (Jeong y David, 2003). Como la mayoría del *hierro no hemo* está en la forma de Fe^{+3} , ésta debe ser primero reducida a su forma ferrosa (Fe^{+2}) para poder ser absorbida. La enzima responsable parece ser una hemoproteína asociada con los enterocitos de la membrana apical, denominada Dcytb (Duodenal cytochrome b), la cual tiene actividad ferrireductasa parecida al citocromo b (McKie y col., 2001). La actividad reductasa está fuertemente estimulada en estados de hipoxia y deficiencia en hierro, incrementando la absorción del hierro dietético. Además, esta actividad enzimática es más elevada en el duodeno y más baja en el íleon, situación que coincide con el perfil de la absorción del hierro a lo largo del intestino (McKie y col., 2002).

Una vez en el interior del enterocito, el hierro tiene dos posibles destinos. La porción que no es necesaria para su uso inmediato es almacenada en la ferritina dentro del enterocito; para posteriormente ser eliminada del organismo vía fecal al final de la vida media de estas células. La otra porción del hierro es transferido a través de la membrana basolateral a la transferrina plasmática (Andrews, 2005). El transporte del hierro desde los enterocitos hacia el torrente sanguíneo, es llevada a cabo por la acción coordinada del gen transportador regulador de hierro 1 (IREG-1), también conocido como "*proteína transportadora de metal-1*" (MTP 1) o *ferroportina 1* (Abboud y Haile, 2000; Donovan y col., 2000; McKie y col., 2000) y una ferroxidasa denominada *hefaestina*, presente en la membrana celular (Vulpe y col., 1999).

La *ferroportina1* se expresa principalmente en la membrana basolateral de los enterocitos (McKie y col., 2000), placenta, hígado, bazo, macrófagos y riñones (Donovan y col., 2000). Además de su papel en la transferencia de hierro desde el intestino a la circulación, también interviene en el transporte del hierro a otros órganos, principalmente la placenta, donde el hierro se transfiere entre la circulación materna y fetal (McKie y col., 2000). La *hefaestina* es un homólogo de la *ceruloplasmina*, la cual es una proteína que contiene cobre con actividad ferroxidasa que es requerida para la liberación del hierro a la circulación sanguínea y para la fijación a la transferrina (Harris y col., 1998). Como la *ceruloplasmina*, la *hefaestina* no es un transportador, pero facilita el transporte del hierro desde el enterocito a la circulación (Harris y col., 1998; McKie y col., 2000). La importancia de la *hefaestina* en la absorción del hierro se ha podido observar en los ratones con anemia ligada al sexo, los cuales presentan un defecto en la *hefaestina*. En estos ratones la salida del hierro desde los enterocitos a la circulación sanguínea está afectada, dando lugar al desarrollo de una anemia microcítica (Vulpe y col., 1999).

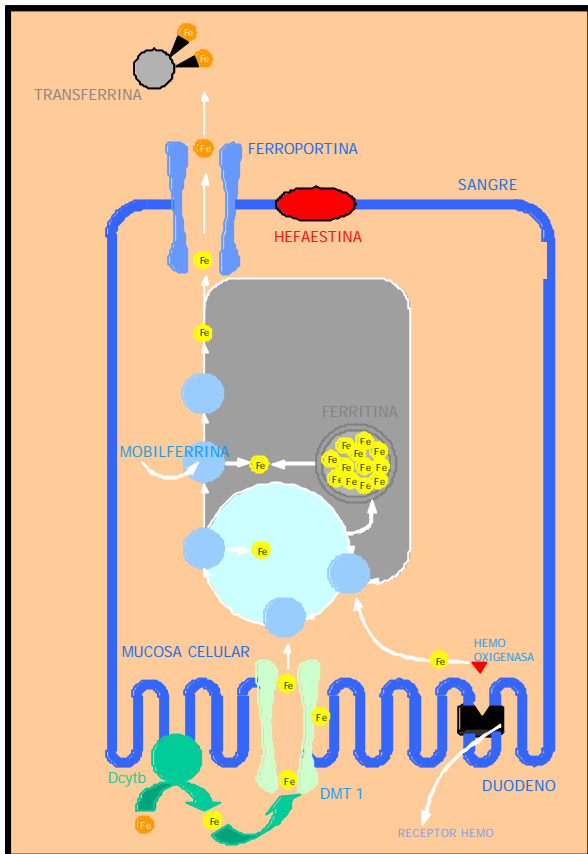


Figura 5. Transporte del hierro a través del epitelio intestinal. La ferrirreductasa (Dcytb) reduce el Fe^{+3} a Fe^{+2} . La DMT 1 bombea el hierro hacia la mucosa de la célula donde es almacenado en la forma de ferritina o transportado por la mobilferrina. En la zona basolateral el hierro es re-oxidado y liberado a la circulación sanguínea por el complejo ferroportina / hefaestina. En la sangre el hierro se une inmediatamente a la transferrina. DMT 1, "Transportador de metales divalentes" Dcytb, "Duodenal cytochromo b"
 ● Hierro férrico; ● Hierro ferroso

En cuanto a la absorción del *hierro hemo*, se sabe que es soluble a pH del duodeno y su entrada a los enterocitos no está influida por los constituyentes dietéticos que afectan al hierro inorgánico, a excepción del calcio, el cual es el único factor dietético encontrado que inhibe a absorción tanto del *hierro hemo* como la del *hierro no hemo* (Deehr y col., 1990; Cook y col., 1991; Hallberg y col., 1991a; Hallberg y col., 1992). Además, la absorción del *hierro hemo* es más eficaz que la del *hierro no hemo* (5-35% vs 2-10%) (Hurrell, 1997a). Es la principal fuente de hierro en Europa y América del Norte, y en países donde el consumo de carne es bajo hay una elevada incidencia de anemia deficiente en hierro (Conrad y Umbreit., 2000). Según los primeros estudios sobre la absorción del *hierro hemo*, el *hierro hemo* se unía a la membrana en borde de cepillo de los enterocitos del duodeno y se internaba de manera intacta al interior a través de la membrana, para posteriormente unirse a unas vesículas dentro del citoplasma (Weintraub y col., 1965; Conrad y col., 1966; Wheby y col., 1970; Parmley y col., 1981a; Wyllie y Kaufman., 1982). El *hierro hemo* es entonces degradado por la *hemo oxigenasa* liberando el hierro ferroso y el pigmento biliar biliverdina, posteriormente éste hierro entra a formar parte en los mecanismos de transporte relacionados con el *hierro no hemo*, saliendo del enterocito a través del transportador de la membrana basolateral, *ferroportina 1* (McKie y col., 2000; Donovan y col., 2000; Abboud y Haile, 2000). Aunque se ha demostrado que el *hierro hemo* puede difundirse a través de las membranas lipídicas debido a su naturaleza hidrofóbica (Light y

Olson, 1990), estudios en hepatocitos (Noyer y col., 1998) y en la línea celular Caco-2 (Worthington y col., 2001) han demostrado que la entrada del *hierro hemo* tiene lugar por un proceso mediado por un transportador. Este transportador ha sido descrito por Shayeghi y col. (2005) y es expresado en la región apical de las células epiteliales del duodeno, denominándose "proteína transportadora del hierro hemo 1" (HCP1).

Como con el *hierro no hemo*, el duodeno es el principal lugar de absorción del *hierro hemo* y se ha comprobado la existencia de un gradiente en la entrada del *hierro hemo* en la mucosa a lo largo del intestino similar al que ocurre con el *hierro no hemo* (duodeno > yeyuno > íleon) (Wheby y col., 1970).

3. REGULACIÓN DE LA ABSORCIÓN DEL HIERRO

En los mamíferos al no poseer ninguna vía fisiológica para la excreción del hierro, la homeostasis del hierro está regulada a nivel de su absorción. Existen tres vías reguladoras que contribuyen al mantenimiento de la homeostasis del hierro (Andrews, 1999a; Finch, 1994):

✓ Primero, la absorción del hierro puede estar modulada por la cantidad de hierro recientemente consumida en la dieta, un mecanismo referido como el "*regulador dietético*" (Andrews y col., 1999a,b). Durante varios días después de la ingesta de hierro presente en la dieta, los enterocitos se hacen resistentes a adquirir más hierro. Este fenómeno es llamado "bloqueo de la mucosa" (Andrews y col., 1999a,b), y probablemente resulte de la acumulación de hierro a nivel intracelular, por lo que el enterocito cree que los requerimientos para el hierro han sido alcanzados.

✓ Un segundo mecanismo de regulación denominado "*regulador de reservas*", controla la entrada de hierro en función de las reservas de hierro presentes en el organismo. El "*regulador de reservas*" es capaz de cambiar la cantidad de hierro absorbido a un límite relativamente más modesto; es decir en estados de deficiencia de hierro la absorción de hierro se ve aumentada dos o tres veces, y cuando las reservas de hierro son replecionadas, la absorción de hierro vuelve a su nivel basal. Esta función es crítica para la homeostasis del hierro. El *regulador de reservas* probablemente actúe sobre las células progenitoras en la cripta de Lieberkühn, controlando la cantidad de hierro captado, por lo tanto programándolas para una adecuada actividad absorbente cuando maduren (Conrad y col., 1963). Ha sido postulado que los componentes solubles pueden servir como reguladores de las reservas: ferritina sérica, transferrina, o el receptor soluble de la transferrina (Finch, 1994). Actualmente, un nuevo candidato ha sido incluido como regulador de las reservas: la *Hepcidina* (Ganz, 2003).

✓ El tercer mecanismo de regulación es conocido como el "*regulador eritropoyético*", y tiene mayor capacidad para incrementar la absorción del hierro que el "*regulador de reservas*". El "*regulador eritropoyético*" no responde a los niveles de hierro celular en general (Finch, 1994), sino que modula la absorción del hierro en respuesta a los requerimientos para la eritropoyesis, es decir, ajusta la absorción del hierro intestinal en respuesta a las demandas de la eritropoyesis, independientemente de las reservas de hierro corporal (Finch, 1994; Andrews, 1999a). Es posible que el *regulador eritropoyético* requiera de una señal soluble que sea transportada por el plasma desde la médula ósea al intestino, pero esta señal aún no ha sido identificada.

4. REQUERIMIENTOS FISIOLÓGICOS DEL HIERRO

Las pérdidas de hierro basal desde las superficies externas e internas del cuerpo, las pérdidas de hierro menstrual en la mujer, y además, las necesidades del hierro para el crecimiento y durante el embarazo, determinan los requerimientos del hierro, los cuales varían según la edad y el sexo (Hallberg, 2001).

4.1. Pérdidas de hierro basal

Las pérdidas de hierro desde las superficies externas e internas del organismo constituyen las pérdidas de hierro basal (Hallberg, 2001). Estas pérdidas se producen entre el tracto gastrointestinal, piel y tracto urinario en una proporción aproximada de 6:3:1 (Baynes, 1994). En los niños, las pérdidas de hierro están relacionadas con la superficie corporal. Una mujer no menstruante de 55 Kg de peso pierde alrededor de 0.8 mg hierro/día, y un hombre de 70 Kg de peso pierde alrededor de 1 mg/día. El rango de variación individual ha sido estimado en $\pm 15\%$ (FAO/WHO, 1988). Estudios realizados sobre el contenido de hierro en el sudor bajo condiciones controladas han demostrado que la pérdida de hierro a través de la piel es despreciable (Brune y col., 1986). Las pérdidas endógenas de hierro a través de las heces resultan de los enterocitos desprendidos de la mucosa del intestino, células rojas sanguíneas extravasadas y productos de la ruptura del grupo hemo por la bilis que son pobremente absorbidos.

4.2. Pérdidas de hierro menstrual

Las pérdidas de sangre menstrual son muy constantes de mes a mes pero varía sensiblemente de una mujer a otra (Hallberg y col., 1966). La principal parte de esta variación está genéticamente controlada por el contenido de los activadores fibrinolíticos en la mucosa uterina (Rybo y Hallberg., 1966; Rybo, 1966). La pérdida media de sangre en cada ciclo menstrual ha sido estimada en 30,9 ml (Hallberg y Hulthén, 2002). Basándonos en una concentración media de hemoglobina en mujeres no anémicas de 135 g/l (Beaton y col., 1989)

y una concentración media de hierro en la hemoglobina de 3.39 mg/g (Smith y Rios, 1974), la pérdida de hierro menstrual ha sido calculada en 0.51 mg/día. Sin embargo es importante enfatizar que las pérdidas de hierro menstrual pueden ser considerablemente más altas; por ejemplo en un 10% de todas las mujeres se ha estimado en 1.38 mg/día (Hallberg y Hulthén, 2002).

Las causas exógenas que influyen en la variación de las pérdidas menstruales incluyen los anticonceptivos orales, los cuales reducen las pérdidas aproximadamente en un 50% (Nilsson y Solvell, 1967; Frassinelli-Gunderson y col., 1985) y por el contrario los dispositivos intrauterinos que las incrementan (Guillebaund y col., 1976; Kivijarvi y col., 1986).

Varios estudios desarrollados en países separados geográficamente, sugieren que las pérdidas de hierro menstrual son semejantes entre las mujeres de diferentes países, por lo que las diferencias en la prevalencia de la deficiencia en hierro esta principalmente relacionada con las diferencias en la absorción del hierro dietético.

4.3. Requerimientos durante el crecimiento

En el recién nacido el contenido de hierro es de 250 a 300 mg (75 mg/kg peso corporal). Durante los primeros dos meses de vida, la concentración de hemoglobina desciende debido al mayor aporte de oxígeno en el recién nacido comparado con la del feto. Esto conduce a una considerable redistribución del hierro desde los eritrocitos catabolizados a las reservas de hierro. Este hierro, por lo tanto, cubriría las necesidades del recién nacido durante los primeros 4-6 meses de vida (FAO/WHO, 2002). Este hecho, es debido a que la hemoglobina fetal tiene una mayor afinidad al oxígeno que la hemoglobina adulta, facilitando la transferencia del oxígeno al feto a través de la superficie de la placenta. Al nacer, el recién nacido empieza a producir hemoglobina adulta, por lo que la concentración de hemoglobina necesaria será más baja. Por tanto habrá un exceso de hierro en el cuerpo que servirá de colchón durante los primeros 4-6 meses de vida (Hallberg, 2002). Debido al marcado suministro de hierro al feto durante el último trimestre del embarazo, la situación del hierro es mucho menos favorable en los prematuros y en los recién nacidos con bajo peso que en los recién nacidos a término. Un suministro extra de hierro es por lo tanto necesario en estos niños incluso durante los primeros seis meses de edad (FAO/WHO, 2002).

En el primer año de vida, el recién nacido dobla sus reservas de hierro y triplica su peso corporal. Entre la edad de 1 a 6 años, el contenido de hierro corporal se duplica de nuevo. Los requerimientos para el hierro en los recién nacidos y niños son por tanto muy elevados en relación a sus requerimientos energéticos (FAO/WHO, 2002).

En la adolescencia, los requerimientos de hierro vuelven a elevarse, especialmente durante el periodo de rápido crecimiento "estirón puberal", éstos son calculados a partir de los requerimientos necesarios para la expansión del volumen sanguíneo total (de media 0,18 mg/día en varones y 0,14 mg/día en chicas) y del incremento en el comportamiento de hierro corporal esencial debido al incremento de la masa magra (0,55 mg/día en varones, y 0,33 mg/día en chicas, de requerimientos adicionales medios). En el aumento de los requerimientos de hierro por el incremento de la masa eritrocitaria se incluyen el incremento de hemoglobina media desde los años escolares hasta el estirón puberal de la adolescencia (Beard, 2000). A las necesidades por crecimiento corporal hay que añadir en las chicas la cantidad de hierro perdido en la menstruación, que no difiere de las pérdidas de mujeres en edad reproductiva (Hallberg, 1996). Por ello, los requerimientos diarios de hierro se situarían en 2,1 mg/día en chicas con unas pérdidas de menstruales en el percentil 75 (Beard, 2000).

4.4. Requerimientos de hierro durante el embarazo y la lactancia.

Durante el embarazo, los requerimientos para el hierro son significativamente más elevados que en las mujeres no embarazadas a pesar del cese temporal en las pérdidas de hierro presentes en la menstruación (Bothwell, 2000). La mayoría del hierro requerido durante el embarazo se utiliza para incrementar la cantidad de hemoglobina si se tiene suficientes reservas de hierro o si tienen un aporte de hierro dietético adecuado. El aumento de la hemoglobina está directamente relacionado con el aumento de la necesidad en el transporte de oxígeno durante el embarazo, siendo una de las adaptaciones fisiológicas más importantes que tienen lugar durante este periodo (Hallberg, 1988, 1992).

Las necesidades para el hierro, sin embargo, varían durante cada trimestre del embarazo. Los requerimientos del hierro descienden durante el primer trimestre de embarazo debido a la ausencia de la menstruación, que representa un ahorro medio de 0.56 mg hierro/día (160 mg hierro/embarazo) (Hallberg y col., 1991). Las únicas pérdidas de hierro que deben ser compensadas durante este periodo (1^{er} trimestre) son las que tienen lugar vía intestinal, piel, y orina (~ 0.8 mg hierro/día, para una mujer de 55 Kg de peso; 14 g/Kg /día ó 230 mg/embarazo) (Green y col., 1968).

Durante el segundo trimestre, los requerimientos del hierro empiezan a aumentar y continúan haciéndolo durante el resto del embarazo. El aumento en el consumo de oxígeno tanto por la madre como por el feto está asociado con importantes cambios hematológicos. Durante el embarazo hay un incremento en el volumen sanguíneo de ≈ 35-40%, que resulta del aumento en el volumen del plasma de ≈ 45-50% y de la masa eritrocitaria en ≈ 15-20%. Ya que la expansión de la masa eritrocitaria es proporcionalmente menor que el aumento en el volumen

del plasma, la concentración de la hemoglobina y el hematocrito descienden en paralelo con el volumen sanguíneo. Los valores de hemoglobina y hematocrito alcanzan sus valores más bajos en el 2º trimestre de embarazo y aumentan otra vez en el 3º trimestre. Por estas razones, los valores específicos para la hemoglobina y hematocrito en cada trimestre son propuestos para valorar la anemia en las mujeres embarazadas (Picciano, 2003). A medida que el embarazo progresa, los requerimientos para el desarrollo fetal aumentan constantemente en proporción al peso del feto. El contenido medio de hierro de un feto que pesa >3 Kg es ~270 mg (Widdowson y Spray., 1951).

Para la determinación de los requerimientos del hierro durante el embarazo, se deben tener en cuenta las pérdidas provocadas durante el parto. Esto implica una pérdida media de sangre materna equivalente a 150 mg hierro, más 90 mg de hierro procedentes de la placenta y cordón umbilical (Bothwell y col., 1979). Después del parto, hay una pequeña pérdida de hierro adicional de $\approx 0,3$ mg/día durante la lactación (Fransson y Lönnerdal, 1980), pero estas pérdidas son compensadas por la ausencia de la menstruación, excepto cuando la alimentación con pecho continúa después de la menstruación. En general, el requerimiento total de hierro durante el embarazo para una mujer de 55 Kg de peso es ~ 1040 mg (Tabla 1). En el parto, hay más pérdidas de sangre en la madre, las cuales aumentan el coste total en el embarazo a ≈ 1190 mg de hierro. El coste neto, sin embargo, es solamente de 580 mg debido a que el hierro empleado para incrementar la masa eritrocitaria es devuelto a las reservas y las pérdidas totales son además compensadas por la presencia de la menstruación durante el embarazo (Bothwell, 2000).

Como hemos comentado anteriormente, durante el embarazo los requerimientos de hierro no están igualmente distribuidos. El crecimiento exponencial del feto, implica que las necesidades del hierro sean casi despreciables en el primer trimestre, mientras que en el último trimestre, las necesidades aumentan hasta un 80%. Los requerimientos diarios totales para el hierro, incluyendo las pérdidas de hierro basal (0.8 mg hierro), aumentan durante el embarazo de 0.8 mg a casi 10 mg/día durante las últimas seis semanas del embarazo (Hallberg 1992).

Tabla 1. Requerimientos de hierro durante el embarazo (FAO/OMS, 2001)

	Requerimientos de hierro (mg)
REQUERIMIENTOS DE HIERRO DURANTE EL EMBARAZO	
Feto	270
Placenta	90
Aumento de la concentración de los eritrocitos en la madre	450
Perdidas de hierro basal	230
Suma	1040
Pérdida de sangre maternal en el parto	150
<i>Balance total de hierro</i>	1190
BALANCE NETO DE HIERRO DESPUÉS DEL PARTO	
Contracción de la masa eritrocitaria maternal	-450
Ausencia de menstruación en el parto	-160
<i>Balance neto de hierro</i>	-610
Los requerimientos totales para el hierro durante el embarazo si las reservas de hierro maternas son suficientes son de $1190 - 610 =$ 580 mg	580

También se producen cambios en la cantidad de hierro absorbido. En el primer trimestre hay un marcado descenso en la absorción del hierro, coincidiendo con la reducción en los requerimientos del hierro durante este periodo. En el segundo trimestre, la absorción del hierro aumenta en casi un 50%, y en el último trimestre puede incrementarse casi cuatro veces (Hallberg 1992). Curiosamente las necesidades nutritivas durante la lactación son considerablemente más elevadas que durante el embarazo. En los primeros 4 – 6 meses después del parto, los recién nacidos doblan su peso al nacer. La leche secretada en los 4 meses representa una cantidad de energía aproximadamente equivalente al coste total de energía durante el embarazo. Sin embargo, algo de la energía y muchos de los nutrientes almacenados durante el embarazo están disponibles para mantener la producción de leche. Durante la lactación, la pérdida de hierro diaria a través de la leche es alrededor de 0.3 mg. Junto con las pérdidas de hierro basal de 0.8 mg, los requerimientos totales de hierro durante el periodo de lactancia equivale 1.1 mg/día (Picciano, 2003).

4.5. Valores de la ingesta diaria recomendada

Las ingestas dietéticas de referencia (IDR), en inglés (DRI, Dietary Reference Intake) están constituidas por cuatro valores de referencia (IOM, 2000) (Tabla 2):

- ❖ “Requerimiento medio diario” o EAR (Estimated Average Requirements),
- ❖ “Recomendaciones dietéticas” o RDA (Recommended Dietary Allowances),
- ❖ “Ingestas adecuadas” o AI (Adequate Intake), y
- ❖ “Nivel de ingesta máxima tolerable” o UL (Tolerable Upper Intake Level)

Tabla 2. Definiciones y usos de las DRI.

DRI	Definición	Utilización de los valores de ingestas	
		Individual	En grupos
Requerimiento medio estimado (EAR)	<ul style="list-style-type: none"> - la media diaria del nivel de ingesta de un nutriente estimado para cubrir las necesidades de la mitad de los individuos sanos de un grupo de edad y género determinados - la ingesta en la que el riesgo de deficiencia es el 50% para un individuo 	- examinar la probabilidad en la que la ingesta normal de un individuo es insuficiente.	- estimar la prevalencia de un aporte insuficiente dentro de un grupo de población.
Recomendaciones dietéticas (RDA)	<ul style="list-style-type: none"> - ingesta dietética diaria suficiente para cubrir las necesidades de casi todos (97% al 98%) los individuos sanos de un grupo de edad y género determinados - la ingesta en la cual el riesgo de deficiencia para un individuo es muy pequeño (solamente del 2% al 3%) 	<ul style="list-style-type: none"> - un objetivo para ingestas normales de individuos - $RDA = EAR + 2 DT$ (Desviación típica) - * 	- no puede ser usada para valorar ingestas de grupos
Ingesta adecuada (AI)	- media recomendada del nivel de ingesta diaria de un nutriente basado en aproximaciones o estimaciones observadas o determinadas experimentalmente, de la ingesta de un nutriente por parte de un grupo/s de personas sanas, que se asume es adecuada	- cuando una RDA no está disponible para un nutriente, la AI puede ser usada como un objetivo para la ingesta de un individuo	- una ingesta media normal ó por encima de este nivel implica un bajo predominio de inadecuadas ingestas entre un grupo
Nivel de ingesta superior tolerable (UL)	<ul style="list-style-type: none"> - la media más alta del nivel de ingesta diaria de un nutriente sin que existan riesgos en la salud en todos los individuos de la población general a largo plazo - una ingesta elevada por encima del UL, aumenta el riesgo en los efectos adversos - si la ingesta se sitúa entre la RDA y el UL, los riesgos para el individuo de deficiencia y de exceso están cerca de cero 	- una ingesta normal por encima de este nivel puede colocar a un individuo en riesgo de padecer efectos adversos por la ingesta excesiva de un nutriente	- estima el porcentaje de una población de padecer un riesgo potencial en la salud por una ingesta excesiva de un nutriente

(IOM, 2000)

Para calcular la RDA para el hierro se utilizó un modelo factorial. Este método utiliza la distribución de los requerimientos del hierro de un individuo para un grupo de edad y género determinados. Por ejemplo, los requerimientos del hierro para los recién nacidos, niños, y mujeres embarazadas incluyen los requerimientos para las pérdidas de hierro basal así como la cantidad necesaria para el mantenimiento en el crecimiento y desarrollo fetal.

En la Tabla 3 se representan la ingesta dietética de referencia (IDR) del hierro en las distintas etapas de la vida.

Tabla 3. Ingesta dietéticas de referencia (DRI) en las distintas etapas de la vida.

Grupos de edad	RDA/AI (mg/día)	EAR (mg/día)	UL (mg/día)
<i>Recién nacidos</i>			
0 a 6 meses	0.27	-	40
7 a 12 meses	11	6.9	40
<i>Niños</i>			
1 a 3 años	7	3	40
4 a 8 años	10	4.1	40
<i>Hombres</i>			
9 a 13 años	8	5.9	40
14 a 18 años	11	7.7	45
19 a > 70 años	8	6	45
<i>Mujeres</i>			
9 a 13 años	8	5.7	40
14 a 18 años	15	7.9	45
19 a 50 años	18	8.1	45
51 a > 70 años	8	5	45
<i>Embarazadas</i>			
= 18 años	27	23	45
19 a 50 años	27	22	45
<i>Mujeres lactantes</i>			
= 18 años	10	7	45
19 a 50 años	9	6.5	45

(IOM, 2000).

5. ANEMIA, DEFICIENCIA EN HIERRO Y ANEMIA DEFICIENTE EN HIERRO

5.1. Anemia, un problema de salud pública

La *anemia* se define como el estado patológico en el que la concentración de hemoglobina se encuentra por debajo de los niveles normales establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS). En la Tabla 4 se representa los valores límites de hemoglobina establecidos para definir la anemia. Además del sexo, edad, y embarazo existen otros factores como la altitud, raza y hábitos, que influyen en los valores límites para la concentración de la hemoglobina (WHO/UNICEF/UNU, 2001).

La anemia es un problema de salud pública generalizado con principales consecuencias para la salud humana y para el desarrollo social y económico. A pesar de que los cálculos de la prevalencia de la anemia varían mucho según las fuentes consultadas, y a menudo no hay datos exactos, podemos suponer que en regiones de pocos recursos una proporción considerable de niños de corta edad y de mujeres en edad fértil padecen anemia (WHO, 2004). La OMS calcula que en el mundo hay aproximadamente un total de 2 billones de personas anémicas, y que cerca del 50% de los casos pueden atribuirse a la deficiencia en hierro (WHO/UNICEF/UNU, 2001).

Tabla 4. Límites de hemoglobina utilizados para definir la anemia, basados en las recomendaciones de WHO/UNICEF/UNU (2001).

Grupo de edad o género	Hemoglobina (g/L)	Hematocrito (%)
Niños de 6 meses a 5 años	110	33
Niños de 5-11 años	115	34
Niños de 12-13 años	120	36
Mujeres no embarazadas	120	36
Mujeres embarazadas	110	33
Hombres	130	39

5.2. Deficiencia en hierro y anemia deficiente en hierro

La deficiencia de hierro ocurre en tres estados secuencialmente desarrollados:

a) El primer estado es la *depleción de las reservas de hierro*. Esta circunstancia tiene lugar cuando el cuerpo no tiene reservas de hierro pero la concentración de la hemoglobina permanece por encima de los niveles límites establecidos por la OMS. La depleción de las reservas de hierro se define como una disminución en la concentración de la ferritina sérica ($<12 \mu\text{g/l}$), la cual proporciona una estimación del tamaño de las reservas de hierro en hígado, médula ósea, y bazo (Cook y Finch., 1979; Lynch y Green., 2001). Cada $\mu\text{g/l}$ de ferritina sérica equivale a 8 mg de hierro almacenado en adultos (Bothwell y col., 1979) y a 0.14 mg en niños (Finch y Huebers., 1982). No hay evidencias concluyentes de que una disminución de las reservas de hierro por debajo de dicho límite tenga consecuencias negativas para la salud, pero en caso de un descenso acusado en el balance del hierro, puede conducir a un rápido descenso en el desarrollo de los componentes funcionales (Herberg y col., 2001).

b) El segundo estado es conocido como *eritropoyesis deficiente en hierro*. Durante este periodo la cantidad de hierro suministrada a la médula ósea y a otros órganos es inadecuada como consecuencia de un insuficiente transporte de este mineral (Lynch y Green., 2001). La concentración de hemoglobina no desciende por debajo de los niveles considerados indicativos de anemia, sin embargo se puede diagnosticar mediante la medición de la saturación de la transferrina sérica, la principal proteína fijadora de hierro responsable del transporte del hierro en el plasma (Brody, 1999), la cual desciende desde un 30-35% hasta menos de un 16%. Además, una concentración en la protoporfirina libre eritrocitaria $> 70 \mu\text{g/dl}$ indica que la formación del *grupo hemo* desde la protoporfirina IX está alterada debido al insuficiente suministro de hierro. Finalmente, la ausencia de hierro conduce a un incremento en los receptores de la transferrina en la superficie de todos los órganos teniendo por resultado una concentración por encima de 8.5 mg/l (IOM, 2002).

c) El tercer y más severo estado de la deficiencia en hierro es la *anemia deficiente en hierro*, que es diagnosticada según las concentraciones de hemoglobina antes citadas. La

anemia deficiente en hierro solamente ocurre en asociación con valores anormales para los indicadores de la deficiencia en hierro, ya que los niveles de hemoglobina bajos no son un indicador específico para la anemia deficiente en hierro. Los niveles de hemoglobina pueden descender por otra serie de razones, por ejemplo las deficiencias nutricionales como la vitamina A, ácido fólico, riboflavina, o deficiencia de vitamina B₁₂ (Allen y Casterline-Sabel, 2001), infecciones como la malaria (Fleming, 1981), y desordenes inflamatorios crónicos (Yip y Dallman, 1988).

5.3. Etiología de la deficiencia en hierro.

La deficiencia en hierro es el resultado de la interacción de múltiples factores etiológicos que conducen a un desequilibrio entre los requerimientos del hierro para el organismo y la cantidad de hierro absorbido (Figura 6). Por lo tanto, los grupos de población con mayor riesgo son aquellos cuyos requerimientos de hierro son los más elevados, como son los recién nacidos, niños, adolescentes, mujeres embarazadas y en lactación y las mujeres en edad fértil (UNICEF/WHO/UNU/MI, 1998).

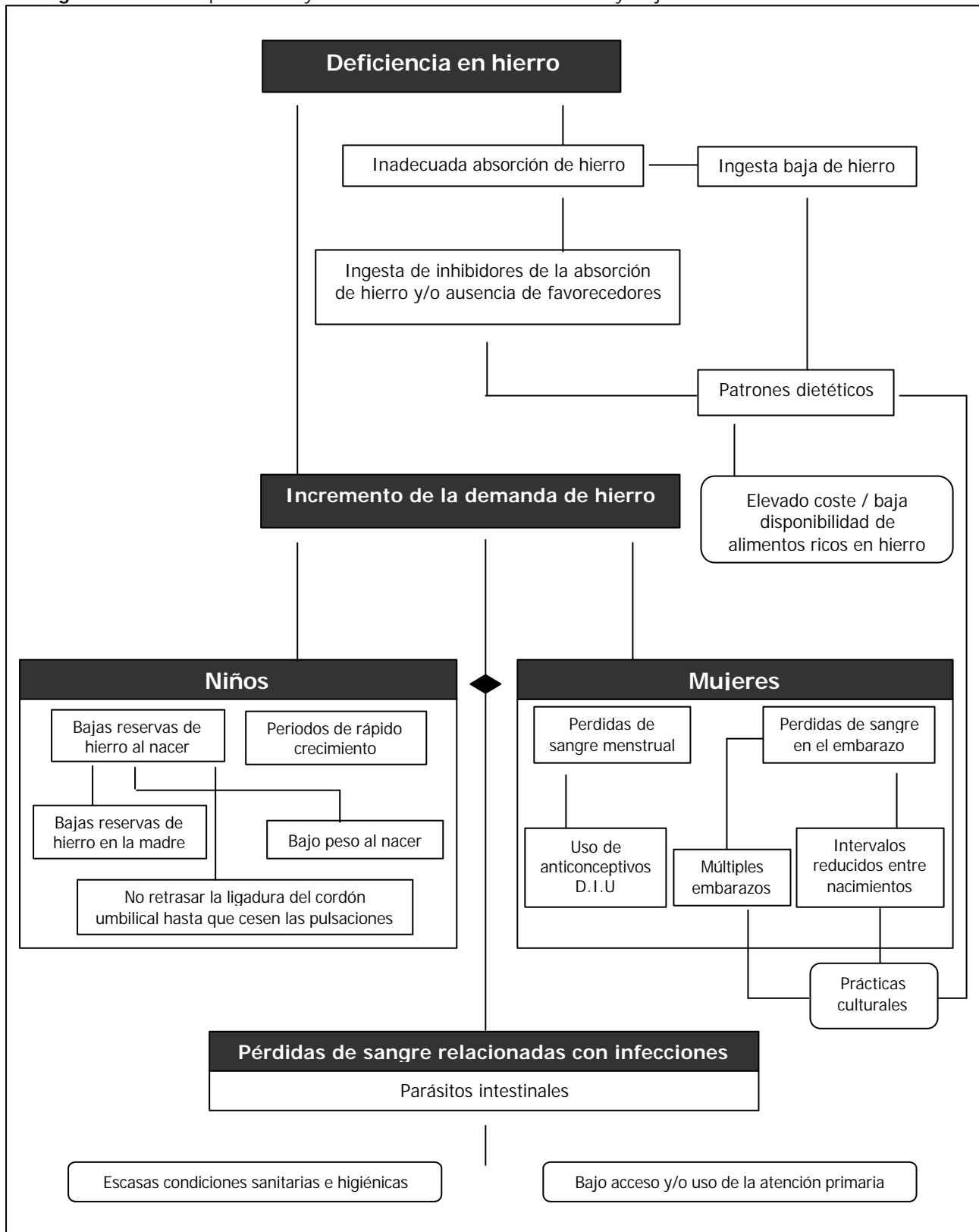
Una de las principales causas responsables de la deficiencia en hierro es la dieta. La baja ingesta de hierro dietético es una de las razones y puede por ejemplo resultar de una restricción de energía o una dieta baja en hierro. Mientras que en los países en vías de desarrollo la restricción energética en su mayoría es involuntaria, en los países desarrollados ésta es voluntaria, en particular en las mujeres jóvenes (Baynes, 1994, Hallberg, 2001). Por otra parte, una mala calidad de la dieta puede ser también responsable de una deficiente absorción de este mineral. La calidad dietética, basada en el contenido de los favorecedores e inhibidores de la absorción del hierro que consumimos, es a menudo dependiente de los factores socioeconómicos (Bothwell y col., 1989).

Numerosos estudios han demostrado que la ingesta total de hierro en los vegetarianos es similar que la de los no vegetarianos, mientras que muy pocos estudios han demostrado más bajas ingestas de hierro entre los vegetarianos (Reddy y Sanders, 1990; Alexander y col., 1994; Janelle y Barr, 1995; Shaw y col., 1995; Harman y Parnell, 1998; Ball y Bartlett, 1999; Haddad y col., 1999; Wilson y Ball, 1999; Barr y Broughton, 2000; Larsson y Johansson, 2002). Sin embargo, la ingesta total de hierro no es un buen indicativo de la cantidad de hierro absorbido, que varía inversamente a las reservas de hierro y está influenciada por la forma química del hierro y la presencia de otros factores dietéticos que pueden favorecer o inhibir la absorción (Hunt, 2003). Muchos estudios han indicado que la prevalencia de anemia deficiente en hierro es similar entre los vegetarianos y los omnívoros (Ball y Bartlett, 1999; Haddad y col., 1999; Larsson y Johansson, 2002; Harman y Parnell, 1998). Sin embargo, dada la reducida

biodisponibilidad del hierro de las dietas vegetarianas y que las ingestas de hierro en las dietas vegetarianas son similares o algo más elevadas que las dietas de los omnívoros, no es sorprendente que las reservas de hierro sean más bajas en los vegetarianos, demostrado por los bajos niveles de ferritina (Herman y Darnton-Hill, 1987; Snyder y col., 1989; Reddy y Sanders, 1990; Alexander y col., 1994; Donovan y Gibson, 1995; Harman y Parnell, 1998; Ball y Bartlett, 1999; Haddad y col., 1999; Wilson y Ball, 1999; Shaw y col., 1995; Hua y Stoohs, 2001). Muchos de estos estudios concluyen que los vegetarianos tienen más probabilidad de tener una deficiencia de hierro no anémica (las reservas de hierro $<12 \mu\text{g/l}$ pero con una concentración de hemoglobina normal) que los omnívoros (Snyder y col., 1989; Alexander y col., 1994; Donovan y Gibson, 1995; Shaw y col., 1995; Haddad y col., 1999; Wilson y Ball, 1999).

Otra de las causas de la deficiencia en hierro es el ciclo vital. Las mujeres presentan una mayor prevalencia de anemia que los hombres, ya que alrededor de la mitad de sus requerimientos de hierro se necesitan para reemplazar las pérdidas de este mineral durante la menstruación. Esto explica por qué la mayoría de las mujeres en los países en vías de desarrollo, y muchas en los países desarrollados, comienzan un embarazo con las reservas de hierro prácticamente agotadas. Sus elevados requerimientos de hierro en la síntesis de tejidos durante el embarazo y para la transferencia al feto, exacerban su deficiencia en hierro y pueden conducir a la anemia. La pérdida excesiva de sangre en el parto, cortos intervalos entre embarazos (<2 años), embarazos en la adolescencia, y partos múltiples, son algunas de las causas que favorecen la deficiencia en hierro (Allen, 2000).

Figura 6. Factores que contribuyen a la deficiencia en hierro en niños y mujeres



(UNICEF/WHO/UNU/MI, 1998)

Durante la lactación, el contenido de hierro en la leche materna es bajo, pero posee una elevada biodisponibilidad. Después de los seis meses de edad, la leche materna no puede cubrir las necesidades nutricionales del niño para su completo desarrollo.

Por lo tanto, una prolongada alimentación con leche materna, junto con inadecuadas cantidades de hierro absorbible en alimentos complementarios, explica la máxima prevalencia de anemia entre los 9 y 18 meses de edad. Alrededor de la mitad de estos niños llegan a ser anémicos a los 12 meses (Ross y Thomas, 1996).

La deficiencia en hierro puede estar también causada por un aumento de las pérdidas de sangre o un descenso en la absorción del hierro debido a causas patológicas. Por ejemplo, las infecciones por parásitos en los países en vías de desarrollo causan pérdidas de sangre a través de la mucosa intestinal. Las causas patológicas que provocan pérdida de sangre gastrointestinal y que afectan a las personas en los países desarrollados incluyen la esofagitis, gastritis, úlceras pépticas, enfermedad inflamatoria del intestino, y hemorroides (Beveridge y col., 1965; Skikne, 1988). Además, una deficiente absorción del hierro puede ocurrir debido a la aclorhidria y la cirugía gástrica (Hallberg y col., 1993).

Otros grupos de la población con elevado riesgo de una deficiencia en hierro debido a las elevadas pérdidas son los donantes de sangre y los atletas. Las donaciones de sangre resultan en una sustancial pérdida de hierro (200-250 mg hierro/donación) y han sido asociadas con un descenso en los niveles de ferritina sérica (Finch y col., 1977; Milman y Sondergaard, 1984). En los atletas, varios mecanismos relacionados con el ejercicio pueden contribuir al desarrollo de la deficiencia en hierro: a) pérdidas de sangre gastrointestinales debido a la carrera (Stewart y col., 1984), b) Hematuria por traumatismo, llamada también "hematuria deportiva" (Abarbanel y col., 1990), c) Elevada renovación de las células rojas en los atletas (Weight y col., 1991; Shaskey y Green, 2000) y d) desordenes en la absorción del hierro relacionadas con el ejercicio (Shaskey y Green, 2000). Sin embargo, las elevadas pérdidas de hierro a través del sudor y la elevada demanda para la mioglobina y las enzimas respiratorias que contienen hierro son suficientes razones para denominarla *anemia inducida por el ejercicio* (Weaver y Rajaram, 1992).

5.4. Consecuencias de la deficiencia en hierro

El hierro, se encuentra formando parte de numerosas biomoléculas con diferentes funciones bioquímicas y fisiológicas. Su deficiencia produce diferentes trastornos funcionales, que generalmente aumentan a medida que se produce la depleción de los compuestos esenciales del metal. Muchas de las manifestaciones clínicas son consecuencia de la anemia, sin embargo, otras pueden deberse a la disminución de hierro en los distintos tejidos o bien ser una combinación de ambos procesos (Dallman, 1990; Yip, 2002).

5.4.1. Infancia y niñez

La infancia es un periodo de rápido crecimiento físico, desarrollo fisiológico, inmunológico y mental. Durante el primer año de vida, los requerimientos nutricionales son más elevados que en cualquier otra etapa. La deficiencia en energía o algunos de los nutrientes esenciales pueden tener fatales consecuencias, pudiendo dejar secuelas que permanecen durante toda la vida. En los dos primeros años de vida, periodo donde los niños son especialmente vulnerables a los factores ambientales, tienen lugar muchos cambios coincidiendo con la máxima prevalencia de anemia. Numerosos estudios coinciden que la anemia deficiente en hierro en esta etapa está asociada a un retraso en el desarrollo, que puede ser corregido con un tratamiento a largo plazo con hierro oral, aunque los efectos a corto plazo no son totalmente concluyentes (Gordon, 2003). Las funciones neurofisiológicas y bioquímicas que desempeña el hierro en el sistema nervioso se basan en que el hierro interviene en importantes procesos, como la producción y mantenimiento de la mielina, la regulación del metabolismo de la dopamina, serotonina y GABA (Ácido gamma amino-butírico), además de formar parte de numerosas enzimas relacionadas con la síntesis de diversos neurotransmisores (Wauben y Wainwright, 1999).

Las deficiencias nutricionales más prevalentes en los recién nacidos y en la infancia son la deficiencia en hierro, vitamina A, yodo, la deficiencia energético-proteica, riboflavina, calcio, y vitamina D. Según la FAO/OMS (1992) millones de niños sufren deficiencias en hierro, yodo, y vitamina A. La incidencia de estos problemas es más elevada en los países en vías de desarrollo pero también se produce en los países industrializados (aproximadamente un 15% de los niños consumen cantidades insuficientes de hierro dietético) (Yip, 1998).

La alimentación con leche materna protege al niño de la deficiencia en hierro. El nivel de hierro en la leche materna es relativamente bajo, pero su biodisponibilidad está en el rango de 50 al 80%, probablemente debido a la presencia de la *lactoferrina*, la cual favorece la absorción del hierro. Los recién nacidos alimentados con leche materna reciben los requerimientos necesarios para mantener un estado nutricional normal hasta los 4-6 meses de edad (Saarinen y col., 1977). No es sorprendente que la prevalencia de la anemia deficiente en hierro en la niñez esté inversamente relacionada con la proporción de madres que alimentan a sus hijos con su propia leche, es decir, cuanto mayor es la incidencia de lactancia materna, menor es la prevalencia de la deficiencia en hierro.

5.4.2. Adolescencia

La adolescencia se define como la etapa de la vida que se sitúa entre la niñez y la madurez sexual, es decir, la pubertad. Es el periodo en el cual los órganos llegan a ser capaces de

ejercitar la función de la reproducción, y al mismo tiempo se produce un rápido crecimiento y desarrollo físico y psicológico. Durante este periodo, la anemia deficiente en hierro provoca un descenso de la capacidad física en el trabajo debido al descenso en la capacidad de transportar el oxígeno y al deterioro de los tejidos en el metabolismo oxidativo (Baynes y Bothwell, 1990). La capacidad oxidativa de los tejidos está afectada en todos los niveles de la deficiencia en hierro, mientras que la capacidad transportadora de oxígeno sólo se ve afectada en los estados más severos de deficiencia, cuando la concentración de hemoglobina es reducida. Sin embargo, estas dos consecuencias afectan de diferente manera al desarrollo físico, es decir, la reducción en la capacidad transportadora del oxígeno deteriora la capacidad aeróbica, mientras que la reducción en la capacidad oxidativa de los tejidos perjudica a la resistencia y eficacia energética (Davies y col., 1984).

Los adolescentes que son atletas o deportistas deben tener suficientes reservas de hierro para asegurar el máximo transporte de oxígeno a los órganos y tejidos y evitar los efectos adversos en los sistemas enzimáticos asociados a una elevada producción de energía en los músculos. Durante un ejercicio aeróbico intenso las reservas de hierro en el organismo descienden moderadamente, debido a su movilización para una mayor producción de glóbulos rojos y masa muscular. Así mismo, la deficiencia en hierro puede ser explicada por una acelerada pérdida de sangre por el tracto gastrointestinal (Cook, 1994).

5.4.3. Embarazo

La deficiencia de hierro afecta a la mayor parte de las mujeres embarazadas. Aquellas mujeres que afrontan un embarazo sin una adecuada cantidad de hierro en sus depósitos y /o aquéllas cuyo suministro de hierro es insuficiente, tienen un alto riesgo de sufrir deficiencia en hierro o anemia. Los datos existentes sugieren que la deficiencia de hierro durante el embarazo, afectan tanto a la salud de la madre como a la del recién nacido (Goyer, 1995).

La anemia durante el embarazo es un factor de riesgo tanto para la madre como para el feto. Las consecuencias en el feto son un elevado riesgo de retraso en el crecimiento, nacimientos prematuros, muerte intrauterina, ruptura de la placenta e infección (Breymann, 2005). Las consecuencias en la madre son síntomas cardiovasculares, reducción en el desarrollo mental y físico, reducción en la función inmune, cansancio, reducción en las reservas sanguíneas y finalmente un elevado riesgo de necesidad de transfusión de sangre en el periodo posparto (Baker, 2000). El estatus del hierro durante el embarazo ha sido relacionado con el desarrollo del feto y con enfermedades crónicas. Bajos niveles de hemoglobina en la madre están relacionados con el desarrollo de una placenta de gran tamaño y un elevado cociente entre los

pesos placenta:neonato. Este último parámetro se considera un valor predictivo en el desarrollo a largo plazo de hipertensión y enfermedades cardiovasculares (Luke, 2005). Allen (2001) sugirió tres mecanismos potenciales por los que la anemia materna podría aumentar el riesgo de partos prematuros: hipoxia, estrés oxidativo e infección. Una hipoxia crónica podría iniciar estrés como respuesta en la madre, seguido de la liberación de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) por la placenta, un aumento en la producción de cortisona por el feto, y por último el parto prematuro. Un aumento en el estrés oxidativo en las mujeres con deficiencia en hierro que no son compensados por antioxidantes dietéticos o endógenos podría dañar la placenta, resultando en un parto prematuro. Una reducida función inmune y un elevado riesgo de infección entre las mujeres deficientes en hierro, produciría un aumento de citoquinas, secreción de CRH, y producción de prostaglandinas, con el resultado de un elevado riesgo de parto prematuro (Scholl, 2005).

6. ESTRATEGIAS DE INTERVENCIÓN PARA PREVENIR LA DEFICIENCIA DE HIERRO.

Existen tres estrategias de intervención para prevenir la carencia de hierro y, por consiguiente la deficiencia en hierro: la administración de suplementos, la diversificación de la dieta y la fortificación o enriquecimiento de alimentos.

6.1. Suplementación

La suplementación con hierro es considerada como una importante estrategia en la prevención y tratamiento de la anemia deficiente en hierro, y puede producir importantes progresos en el desarrollo funcional de los individuos y poblaciones deficientes en hierro (Allen, 2002a). Los suplementos normalmente son proporcionados a un grupo de la población bien definido, no a una población entera, y por un periodo de tiempo limitado. Generalmente, embarazadas, mujeres lactantes y niños, representan los grupos de mayor riesgo cuyas necesidades de hierro son más elevadas. Incluso, aunque tradicionalmente la suplementación es considerada como una propuesta a corto plazo, en realidad puede ser una propuesta a largo plazo en muchas situaciones. En los países industrializados, entre un 10 y 30 % de la población toman suplementos dietéticos regularmente, con el resultado de que las ingestas dietéticas de nutrientes tales como el hierro y el ácido fólico sean favorables en este segmento de la población sin riesgos aparentes o efectos adversos (Dwyer y col., 2001; Kiely y col., 2001).

La anemia tiene su origen en factores tanto nutricionales como no nutricionales. En concreto, a parte del hierro, las deficiencias de micronutrientes tales como las vitaminas A, C, B₁₂ y ácido fólico pueden contribuir al desarrollo de la anemia (Allen y Casterline-Sabel., 2001). Estos nutrientes pueden afectar a la síntesis de la hemoglobina directa o indirectamente,

influyendo en la absorción y/o movilización del hierro (Ramakrishnan y col., 2004). En muchos países en vías de desarrollo, las dietas que son pobres en hierro lo son también en otros nutrientes, debido a las reducidas ingestas de alimentos de origen animal y a las elevadas ingestas de alimentos ricos en inhibidores de la absorción del hierro como son los fitatos. En general, las ingestas de hierro, zinc, ácido fólico, vitamina B₆, B₁₂, vitamina A, riboflavina y calcio están por debajo de los niveles recomendados (Allen, 1995; Huffman y col., 1998). Este hecho ha aumentado el interés de proporcionar nutrientes, además del hierro, para reducir la prevalencia de la anemia (Allen, 1993; Ramakrishnan y Huffman., 2001). Dos ensayos aleatorios realizados en Tanzania (Fawzie y col., 1998) y en Nepal (Christian y col., 2003a,b) evaluaron los beneficios de los suplementos múltiples de micronutrientes durante el embarazo. Fawzie y col. (1998) observaron que los suplementos con multinutrientes reducían la prevalencia de los nacimientos con bajo peso y los partos prematuros en mujeres embarazadas con SIDA. Sin embargo, en el otro ensayo, Christian y col. (2003b) observaron que los suplementos múltiples de micronutrientes no mejoraban los indicadores hematológicos cuando los comparaban con pacientes que recibían suplementos de hierro y ácido fólico. En ambos grupos se observaba una disminución modesta y similar del riesgo de nacimientos con bajo peso. Ramakrishnan y col. (2004) tampoco observaron que los suplementos múltiples de vitaminas y minerales durante el embarazo mejoraran los niveles hematológicos y el estado nutricional del hierro comparado con la suplementación con hierro de forma individual

Algunos autores han cuestionado la eficacia de los multinutrientes combinados dentro de un suplemento debido a las posibles interacciones entre los nutrientes o interferencias en los mecanismos de absorción (Argiratos y Samman., 1994; Sadstrom, 2001). Sin embargo, Untoro y col. (2005) y Smuts y col. (2005) concluyeron que la suplementación diaria con una adecuada concentración de múltiples micronutrientes es la mejor de las estrategias evaluadas para mejorar la anemia y el estado nutricional de micronutrientes de los niños en los países en vías de desarrollo. En cambio no se han observado diferencias significativas en el crecimiento y la mortalidad. Otro de las variables a tener en cuenta es la frecuencia y periodicidad de administración de dichos suplementos. En un estudio realizado en niños vietnamitas, se concluyó que la suplementación semanal con múltiples micronutrientes fue igualmente eficaz que la suplementación diaria para mejorar la concentración de hemoglobina, los niveles de zinc en suero y las concentraciones de retinol (Thu y col., 1999).

6.2. Diversificación de la dieta

El hierro en los alimentos se encuentra en dos formas químicas: *hierro hemo* (que forma parte de la hemoglobina y la mioglobina de la carne), y *hierro no hemo* (presente en los

cereales, verduras, también en la carne y en otros alimentos). Estas dos formas de hierro se absorben por diferentes rutas y con una eficacia distinta. El hierro *hemo* es utilizado de manera más eficiente por nuestro organismo (Martínez y col., 1998) mientras que el hierro *no hemo* se absorbe en menor proporción ya que su solubilidad es menor, y además se ve afectado por la presencia de otros constituyentes de la dieta (Van Moorsell, 1997). Así, encontramos promotores de la absorción del hierro en los alimentos, como el ácido cítrico y el ascórbico, la fructosa, la carne y el pescado, y la vitamina A y, por otra parte, inhibidores de la absorción de este mineral, como son el ácido fítico, los polifenoles y los oxalatos, que se unen al mineral formando complejos insolubles (Allen y Ahluvalia, 1997). El calcio y otros cationes como el cobre, el zinc, manganeso o cobalto, también disminuyen la absorción del hierro, puesto que comparten las mismas rutas de entrada en las células de la mucosa intestinal.

De lo anterior, podemos deducir que el *hierro hemo* está disponible más fácilmente para el organismo que el hierro *no hemo*. No obstante, existen factores relacionados con el consumidor que influyen en la absorción de ambos tipos de hierro. Así, cuando los niveles corporales de hierro se encuentran disminuidos aumenta la absorción de hierro de la dieta. La concentración de los ácidos del jugo gástrico también influye en la absorción de hierro inorgánico, por lo que individuos con aclorhidria o incluso los niños, absorben de manera menos eficiente este mineral (BNF, 1996).

Otra de las estrategias para prevenir la deficiencia en hierro es incrementar la ingesta de alimentos con hierro de elevada biodisponibilidad. La biodisponibilidad se refiere a la cantidad de hierro que se absorbe de los alimentos para ser utilizado en las funciones y los procesos metabólicos normales, y como hemos mencionado, se ve afectada tanto por factores de la dieta como por condiciones fisiológicas de las personas. De esta forma, podemos mejorar la cantidad de *hierro no hemo* absorbible mediante una apropiada combinación de alimentos. Las dietas pueden clasificarse en tres categorías: de "baja", "media" y "alta" biodisponibilidad en hierro, con una absorción media del mineral de 5, 10 y 15% respectivamente (FAO/WHO, 1988). Las dietas con "baja" biodisponibilidad se componen de cereales y tubérculos, ricos en inhibidores de la absorción del hierro como el ácido fítico, y pequeñas cantidades de carne, pescado o alimentos ricos en ácido ascórbico. Es la base de la alimentación en los países en vías de desarrollo y en sectores de población económicamente desfavorecidos. Las dietas de biodisponibilidad "media" están constituidas principalmente por cereales y tubérculos pero se incluyen en ella alimentos ricos en ácido ascórbico y carne en proporciones intermedias. Por último, las dietas de "alta" biodisponibilidad contienen importantes cantidades de carne y pescado, cítricos y verduras.

En el ámbito doméstico es posible preparar y/o procesar los alimentos para reducir el nivel de inhibidores o aumentar el contenido de promotores de la absorción mejorando la biodisponibilidad de este mineral. Estas prácticas tienen especial importancia en los países en vías de desarrollo, donde se consumen dietas de baja biodisponibilidad ricas en cereales, leguminosas y tubérculos (Tontisirin y col., 2002). La germinación, el malteado y la fermentación en los alimentos anteriormente mencionados pueden aumentar la absorción de hierro hasta 12 veces, probablemente debido a la reducción del contenido en ácido fítico (Tontisirin y col., 2002). También se ha demostrado que el mantenimiento de las legumbres y los cereales en remojo antes de su cocinado elimina antinutrientes como las saponinas y los polifenoles, que son potentes inhibidores de la absorción del *hierro no hemo* (Brune y col., 1989). Además se ha visto que en el caso de los tubérculos un calentamiento suave, aumenta la absorción de hierro no hemo (Marfo y col., 1990).

6.3. Enriquecimiento

El enriquecimiento de los alimentos con diversos micronutrientes es un método tecnológico, programado y económicamente eficaz para incrementar la ingesta de micronutrientes en la población (Nestlé, 1993; Lotfi y col, 1996; Darnton-Hill, 1998). Esta estrategia ha jugado un importante papel en la mejora de la salud nutricional y bienestar de las poblaciones en los países industrializados. Iniciado en el siglo XX, el enriquecimiento fue utilizado en situaciones específicas para prevenir ciertas enfermedades: el bocio con sal yodada; raquitismo con leche enriquecida con vitamina D; beriberi, pelagra y anemia con cereales enriquecidos con vitaminas del grupo B; y la aparición de defectos del tubo neural en embarazadas, con cereales enriquecidos con ácido fólico (Darnton-Hill y Nalubola, 2002).

Según el *Codex Alimentarius* el enriquecimiento se define como la adición de uno o más nutrientes esenciales a un alimento, esté presente o no de forma natural en dicho alimento, con el propósito de prevenir o corregir una demostrada deficiencia de uno o más nutrientes en la población o grupos de la población específica (FAO, 1996). Las pautas para enriquecer de forma adecuada un alimento están bien establecidas (Tabla 5) (FAO, 1996).

Tabla 5. Condiciones que deben cumplir los alimentos para ser enriquecidos con un nutriente (FAO, 1996).

-
- Que sea consumido de forma habitual por la población seleccionada
 - Que tenga un patrón de consumo constante con un bajo riesgo de excesivo consumo
 - Que presente una buena estabilidad durante el almacenamiento
 - Que tenga un coste relativamente bajo
 - Que el alimento pueda ser procesado de tal manera que el nutriente se encuentre repartido de forma homogénea
 - Que no existan interacciones entre el alimento y el nutriente a añadir
 - Que su disponibilidad no esté relacionada con el estatus socioeconómico
 - Que esté relacionado con la ingesta energética
-

El enriquecimiento, tiene la ventaja de requerir menos cambios en la conducta de los consumidores y hábitos alimentarios que las otras estrategias (suplementación y diversificación en la dieta) (Darnton-Hill y Nalubola, 2002). El enriquecimiento de los alimentos con compuestos de hierro está considerado como el mejor planteamiento a largo plazo para prevenir la deficiencia en hierro (Bothwell., 1999). Las ventajas que presenta incluyen, alcanzar a la mayoría de los segmentos de la población, y además no requerir la cooperación del individuo. Sin embargo, existen muchas dificultades que tienen que ser superadas cuando enriquecemos la dieta con hierro, principalmente la ausencia de una simple estrategia de enriquecimiento que sea viable para su uso a escala mundial. Por lo tanto, los programas de enriquecimiento con hierro tienen que ser desarrollados específicamente para cada país o región teniendo en cuenta los hábitos dietéticos de los grupos o poblaciones seleccionadas. La evaluación de los hábitos dietéticos es bastante importante para la selección de un apropiado alimento para su enriquecimiento. Después de que se haya sido seleccionado el alimento, tiene que ser determinado el tipo de compuesto de hierro más adecuado, teniendo en cuenta el almacenamiento del alimento y la preparación del mismo en la región o población seleccionada. Además, es importante evaluar su aceptabilidad dentro de la población seleccionada. Por último se debe determinar su absorción y su efecto sobre el estado nutricional en un estudio a largo plazo (Cook y Reusser, 1983; Walter y col, 2001).

Para optimizar el enriquecimiento de los alimentos con hierro se siguen tres etapas (Hurrell, 2002):

- **Selección del compuesto de hierro:** Identificar el compuesto de hierro que tenga el mayor potencial de absorción y que, al ser añadido al nivel apropiado, no produzca ningún cambio sensorial en el alimento enriquecido o en el producto final cocinado. Esto obliga a contar con información sobre la aceptabilidad del color, el sabor y el olor después del enriquecimiento, al final del periodo de vida comercial y después de procesar o cocinar el producto final.

- **Optimización de la absorción del compuesto de hierro para satisfacer las necesidades nutricionales:** mediante la adición de promotores de la absorción o la eliminación o disminución de los inhibidores.

- **Valoración del cambio en el nivel de hierro en la población destinada:** mediante la determinación previa de la prevalencia y el cambio, tras la administración del alimento enriquecido, en la deficiencia de hierro y la anemia deficiente en hierro de la población.

Los compuestos de hierro empleados en el enriquecimiento de los alimentos difieren tanto en su biodisponibilidad relativa (la cual depende en gran parte de su solubilidad en el jugo gástrico durante la digestión) como en su potencial para causar cambios sensoriales no deseados (Hurrell, 2002). Los compuestos de hierro para el enriquecimiento de los alimentos se pueden clasificar en dos categorías: compuestos de hierro inorgánico y compuestos de hierro protegido.

6.3.1. Compuestos de hierro inorgánico

Los compuestos de hierro inorgánico que pueden utilizarse para el enriquecimiento de los alimentos se clasifican en (Tabla 6):

6.3.1.1. Solubles en agua.

Son los compuestos de hierro más biodisponibles. De todos ellos, el *sulfato ferroso* ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) es el más utilizado para enriquecer los alimentos y tiene por definición una biodisponibilidad relativa del 100%. Su absorción puede variar entre el 1% al 50%, dependiendo del estado nutricional de hierro del individuo, la presencia de inhibidores y favorecedores de la absorción del hierro en la dieta y el contenido de hierro de la dieta (Hurrell, 1997). Se ha utilizado con éxito en el enriquecimiento de formulas infantiles, pan y pasta (Hurrell, 1999) y puede ser añadido a harinas de trigo blanco almacenadas durante periodos de tiempo cortos (Cook y Reusser, 1983). Sin embargo, provoca la oxidación de la grasa y el enranciamiento en harinas de cereales almacenadas durante largos periodos de tiempo (Hurrell, 1999) y causa cambios de color no deseables en productos con cacao (Douglas y col., 1981), cereales infantiles con frutas (Hurrell, 1984) y sal (Rao, 1985). A menudo causa un sabor metálico en productos líquidos y puede precipitar los péptidos de la salsa de soja y salsa de pescado. La forma deshidratada del *sulfato ferroso* ($\text{FeSO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$) es menos prooxidante en cereales que la forma hidratada (Hurrell y col., 1989).

Dentro de este grupo también están presentes compuestos como: *gluconato ferroso*, *lactato ferroso*, *citrate férrico amónico* y *sulfato ferroso amónico*. Estos compuestos causan

problemas organolépticos similares al *sulfato ferroso* y poseen un precio más elevado que éste (Hurrell, 2002). El gluconato ferroso ($\text{FeCH}_2\text{OH}(\text{CHOH})_4\text{-COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) se utiliza para sustituir al sulfato ferroso en los suplementos de hierro orales; sin embargo rara vez se emplea en el enriquecimiento de los alimentos (Hurrell, 1999). Estudios de repleción de hemoglobina hechos en ratas deficientes en hierro han demostrado que el *gluconato ferroso* tiene una biodisponibilidad relativa frente al sulfato ferroso entre 79% y 138% (Theuer y col., 1971, 1973). La biodisponibilidad relativa del *lactato ferroso* ($\text{Fe}(\text{CH}_3\text{-CHOH-COO}_2) \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) fue evaluada en la misma serie de estudios y mostró un valor entre 100% y 118% para las ratas. En humanos, la biodisponibilidad relativa del *lactato ferroso* es comparable a la del *sulfato ferroso* (Brise y Hallberg., 1962). El *cittrato férrico amónico* presenta una biodisponibilidad relativa similar al *sulfato ferroso* en ratas (Hurrell, 1999), sin embargo, en humanos presenta una baja absorción comparada con el *hierro elemental* y el *sulfato ferroso* (Grebe y col., 1975; Layrisse y col., 1976; Gonzalez y col., 2001). El *sulfato ferroso amónico* ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) no ha sido estudiado en humanos, sin embargo se asume que será tan disponible como el sulfato ferroso ya que estudios en ratas concluyen que su biodisponibilidad relativa está próxima al 100% (Hurrell, 1999).

6.3.1.2. Poco solubles en agua/solubles en soluciones ácidas.

Estos compuestos se disuelven lentamente en el medio ácido del estómago. Causan muy pocos problemas organolépticos comparados con los compuestos de hierro solubles en agua, pero tienen una biodisponibilidad relativa similar a la del sulfato ferroso (Hurrell, 2002).

El *fumarato ferroso* es el principal compuesto de esta categoría. Se emplea para enriquecer los cereales infantiles en Europa (Hurrell, 2002b), harinas de trigo y maíz en Venezuela (García-Casal y Layrisse., 2002) y bebidas de chocolate en polvo (Hurrell, 1999). Se absorbe tan bien como el *sulfato ferroso* en los adultos y en los adolescentes, pero los datos recientes indican que se absorbe menos en las personas con una concentración de ácido gástrico baja, y en particular, en los niños (Davidsson y col., 2001). Cuando se añade a bebidas de chocolate en polvo sin procesar, el *fumarato ferroso* se absorbe de manera similar al *sulfato ferroso* sin embargo, su absorción fue dos veces superior después del proceso de deshidratación del chocolate (Hurrell y col., 1991), lo cual indica que el tratamiento tecnológico puede influir en la biodisponibilidad de algunos compuestos de hierro.

Otros compuestos como el *succinato ferroso* y el *sacarato férrico* presentan una biodisponibilidad relativa en humanos muy similar o ligeramente más baja que la del *sulfato ferroso* (Hurrell y col., 1989). El *cittrato férrico* es otro de los compuestos de hierro que

pertenecen a este grupo, su biodisponibilidad relativa en ratas y en humanos es de un 75% con respecto a la del sulfato ferroso (Brise y Hallberg., 1962; Fritz y col., 1975).

6.3.1.3. Insolubles en agua / poco solubles en soluciones ácidas.

Estos compuestos son utilizados por la industria alimentaria en los países desarrollados porque son bastante inertes y tienen escasos efectos sobre las propiedades sensoriales de los alimentos. Sin embargo, la absorción del hierro es dudosa debido a sus muy bajos niveles de solubilidad. Hay dos tipos diferentes de compuestos de hierro insolubles en agua: *compuestos de fosfatos de hierro* y *polvos de hierro elemental* (Hurrell, 2002b).

6.3.1.3.1. Compuestos de fosfatos de hierro.

El *pirofosfato férrico* ($\text{Fe}_4 (\text{P}_2\text{O}_7)_3 \cdot x \text{H}_2\text{O}$) y el *ortofosfato férrico* ($\text{FePO}_4 \cdot x \text{H}_2\text{O}$) se emplean también para enriquecer los cereales infantiles y bebidas de chocolate en polvo, aunque en los cereales infantiles el *pirofosfato férrico* en cierta medida ha sido reemplazado por el *fumarato ferroso* (Hurrell, 1999). Ambos son pobremente solubles en soluciones ácidas, y su biodisponibilidad relativa es muy variable en humanos (Tabla 6) (Hurrell, 1999). En un estudio con isótopos estables realizado en niños (Davidsson y col., 2000), el *pirofosfato férrico* presentó valores inferiores al *fumarato ferroso* cuando se añadieron a cereales infantiles de trigo y de soja. En adultos, la absorción del hierro del *pirofosfato férrico* ha sido comparada a la del *sulfato ferroso* en cereales infantiles así como en bebidas de chocolate en polvo. En los cereales de trigo infantiles la biodisponibilidad relativa del *pirofosfato férrico* varió entre un 39% (Hurrell y col., 1989) y un 15% (Hurrell y col., 2000). En la bebida de chocolate en polvo fue del 75% comparada con el *sulfato ferroso* (Hurrell y col., 1991). Estas variaciones en la biodisponibilidad relativa podrían ser debidas a las diferencias en las propiedades de solubilidad de estos compuestos. La solubilidad del *pirofosfato férrico* depende de sus características físicas (tamaño, forma, y área de superficie de las partículas) (Hurrell, 2002b). Recientes estudios han sugerido que disminuyendo el tamaño de las partículas es posible aumentar la absorción de estos compuestos. Este hecho ha sido documentado en humanos, comprobándose que al disminuir el tamaño de las partículas de 8.5 a 6.7 μm aumentaba la biodisponibilidad del *pirofosfato férrico* comparada con la del *sulfato ferroso* desde un 36% a un 52%, aunque este aumento no fue estadísticamente significativo (Fidler y col., 2004a,b). En otro estudio llevado a cabo en Marruecos (Zimmermann y col., 2004), donde el tamaño medio de las partículas de hierro administradas fue de 2.5 μm se empleó el *pirofosfato férrico* en un doble enriquecimiento (hierro y yodo) añadidos a la sal para reducir la prevalencia de la anemia deficiente en hierro en

los niños escolares. Esta estrategia fue muy efectiva en la reducción de la anemia ferropénica, que disminuyó desde un 30% a un 5% en la población.

La absorción del hierro del *ortofosfato férrico* en humanos está entre un 25% y un 32% comparada con el *sulfato ferroso* (Cook y col., 1973; Rios y col., 1975; Forbes y col., 1989). Por otro lado, estudios de repleción de la hemoglobina en ratas determinaron que la biodisponibilidad relativa del *ortofosfato férrico* variaba entre un 7% y 32% (Fritz y col., 1970). En este caso también depende la biodisponibilidad del compuesto del tamaño de partícula ya que Harrison y col (1976) observaron que la biodisponibilidad relativa de cinco muestras comerciales de *ortofosfato férrico* variaba de un 6% a un 46%. Este aumento se debió a la reducción en el tamaño de la partícula de 15 μm a menos de 1 μm .

6.3.1.3.2. *Compuestos de hierro elemental.*

Los polvos de hierro elemental más utilizados en el enriquecimiento de cereales son el hierro electrolítico y el hierro reducido por hidrógeno. El hierro electrolítico es el único polvo de hierro elemental actualmente recomendado para el enriquecimiento de los cereales (Zimmermann y col., 2005) y es utilizado en cereales infantiles. Se obtiene por migración electrolítica del hierro desde un ánodo de hierro a través de una solución de sulfato ferroso. Las especificaciones del Código de Sustancias Químicas en los Alimentos (FCC) requiere que las partículas de hierro electrolítico pasen a través de una malla de 325 mesh (tamaño de partícula <44 μm) (Hurrell y col., 2002). La biodisponibilidad relativa (RBV) del hierro electrolítico comparada con la del sulfato ferroso se estima a ser del 16-70% en ratas y un 75% en humanos (Hurrell, 2002, 2002b; Hurrell y col., 2002). El hierro reducido por hidrógeno es también utilizado en el enriquecimiento de cereales (Hurrell y col., 2002). Se obtiene por reducción del óxido de hierro molido a su estado elemental con hidrógeno a una temperatura elevada y además presenta un grado de pureza más bajo (>96% hierro) que el hierro electrolítico (>99% hierro). La mayoría de los polvos de hierro reducido por hidrógeno utilizado en Europa y América del norte tienen un tamaño de partícula de 300 o 325 mesh, aunque los polvos con un tamaño de partícula más grande a menudo son utilizados en los países en vías de desarrollo (Hurrell y col., 2002). La biodisponibilidad relativa (RBV) del hierro reducido por hidrógeno es aproximadamente del 13-54% en ratas y 13-148% en humanos (Hurrell, 2002, 2002b; Hurrell y col., 2002).

Varios test de screening (solubilidad en ácido, método *in vitro* de diálisis, células Caco-2, estudios de repleción de la hemoglobina en ratas, perfil del hierro sérico) se han utilizado para evaluar el potencial de los compuestos de hierro elemental para el enriquecimiento de los

alimentos, y se han observado resultados poco convincentes (Hurrell y col., 2002). Swain y col. (2003) emplearon los polvos de hierro elemental en un estudio de repleción de la hemoglobina en ratas y observaron que la RBV del hierro electrolítico y del hierro reducido por hidrógeno comparado con la del sulfato ferroso fue del 54% y 42%, respectivamente. En otro estudio (Hoppe y col., 2006) donde se utilizó los perfiles de hierro sérico en hombres y mujeres replecionados, observaron que la RBV para el hierro electrolítico fue del 65% y de un 56% para el hierro reducido por hidrógeno, además observaron que la administración de 50 mg ácido ascórbico y 100 mg de hierro electrolítico fue tan bien absorbido cuando se comparó con el sulfato ferroso. Por tanto, una alternativa a mejorar el RBV de los polvos de hierro elemental podría ser la adición del ácido ascórbico. De acuerdo con los resultados obtenidos por Zimmermann y col. (2005), el hierro electrolítico es el más idóneo para el enriquecimiento de los cereales, coincidiendo con la guía de enriquecimiento propuesta por la WHO (WHO, in press). Además, esta guía sugiere que el hierro reducido por el hidrógeno, usando dos veces la concentración del sulfato ferroso podría ser un eficaz compuesto de hierro.

Por el contrario, el hierro carbonilo que se obtiene por calentamiento controlado del pentacarbonilo de hierro vaporizado y que conduce a la sedimentación del hierro elemental en forma de esferas microscópicas de $< 5 \mu\text{m}$ de diámetro (Sacks y Houchin, 1978) tiene un limitado valor en el enriquecimiento de los alimentos debido a su elevado coste. Estudios de repleción de hemoglobina en ratas con hierro carbonilo han mostrado una biodisponibilidad relativa de un 50% con respecto al sulfato ferroso. Su uso terapéutico en elevadas dosis ($> 1.5 \text{ g/día}$), da lugar a una baja absorción (0.5-2.0%) en humanos.

6.3.2. Compuestos de hierro protegidos.

6.3.2.1. Compuestos quelados.

6.3.2.1.1. NaFeEDTA (Etilendiaminotetraacetato – sódico-férrico)

El NaFeEDTA como compuesto de hierro utilizado para el enriquecimiento ha sido revisado por el International Nutritional Anemia Consultative Group (INACG) y recomendado como el fortificante de hierro más apropiado en los países en vías de desarrollo (INACG, 1983).

El EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) es un quelato que se une a través de sus cuatro grupos carboxilos cargados negativamente y por sus dos grupos aminos. Puede combinarse con cualquier metal presente en la tabla periódica. Su eficacia como quelante depende de su constante de estabilidad entre el EDTA y el metal a un pH determinado. De los metales más importantes, el Fe^{+3} tiene la más alta constante de estabilidad con 25.1, seguida del Cu con 18.4, Zn con 16.1, Fe^{+2} con 14.6, Ca con 10.7, Mg con 8.7, y Na con 1.7. (Hurrell, 1997a). El pH

óptimo para la formación del complejo entre el Fe^{+3} y el EDTA es de 1, para el Cu es de 3, Zn es 4, Fe^{+2} es 5, Ca es 7.5, y Mg es 10 (West y col., 1960). Por lo tanto, cuando el EDTA está presente en el estómago puede esperarse que forme complejos con el hierro férrico y así prevenir la precipitación del hierro férrico presente en el alimento cuando el pH aumente por encima de 3. Por consiguiente, cuando el hierro es consumido como NaFeEDTA, el hierro permanecería quelado al EDTA en el estómago sin precipitar (INACG, 1993). En las condiciones alcalinas del duodeno, la constante de estabilidad del hierro férrico es mucho más baja que la de otros metales, tales como el cobre, zinc, calcio, o el hierro ferroso, por lo tanto el hierro férrico puede ser desplazado por estos metales (Hurrell, 1997).

El uso del NaFeEDTA para enriquecer los alimentos tiene varias ventajas. En presencia de ácido fólico, el hierro es 2 o 3 veces mejor absorbido cuando se encuentra en forma de NaFeEDTA que a partir del sulfato ferroso (INACG, 1993; Hurrell y col., 2000). Además no provoca la oxidación de los lípidos durante el almacenamiento de las harinas de cereales (Hurrell, 1997; Garby y Areekul., 1974) y a diferencia de muchos otros compuestos solubles de hierro, no causa la precipitación de los péptidos cuando se adiciona a la salsa de pescado o salsa de soja. En ausencia de ácido fólico, el NaFeEDTA tiene una absorción similar a la del sulfato ferroso (INACG, 1993). Su eficacia ha sido demostrada, ya que ha mejorado el estado nutricional del hierro en poblaciones anémicas que consumieron salsa de pescado enriquecida con NaFeEDTA (Garby y Areekul., 1974; Thuy y col., 2001), curry en polvo (Ballot y col., 1989) y azúcar (Viteri y col., 1995).

En cuanto a los inconvenientes que presenta el NaFeEDTA, son su elevado coste (aproximadamente 6 veces más caro que el sulfato ferroso) y su tendencia a causar reacciones de color no deseadas similares a las producidas por el sulfato ferroso. El NaFeEDTA en el azúcar causa un color ligeramente amarillo y cuando éste es añadido al té, se decolora. Lo mismo ocurre cuando se añade a ciertos alimentos, tales como las bebidas de chocolate en polvo y cereales infantiles que contienen como ingredientes plátano y otras frutas (Hurrell, 1997).

El NaFeEDTA fue aprobado en 1999 por el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios para ser utilizado en programas supervisados en zonas con una alta prevalencia de carencia de hierro, con una ingesta máxima de 0.2 mg de Fe/Kg de peso corporal/día. El NaFeEDTA parece ser una buena opción para el enriquecimiento de las harinas de trigo y de maíz con un elevado contenido en inhibidores de la absorción del hierro (JECFA, 1999).

6.3.2.1.2. Bis-glicinato ferroso (Hierro aminoquelado).

El bis-glicinato ferroso está formado por una molécula de hierro ferroso acoplado a dos moléculas de glicina. El hierro está unido al grupo carboxilo de la glicina por un puente aniónico, y a un grupo amino por una unión covalente, para formar dos anillos heterocíclicos (Figura 7).

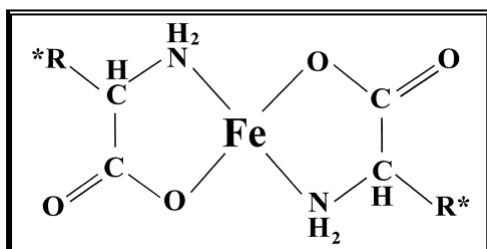


Figura 7. Estructura del bis-glicinato ferroso

Esta estructura puede proteger al hierro de las interacciones con los inhibidores dietéticos de la absorción del hierro, haciéndolo ideal para el enriquecimiento de los alimentos con un elevado contenido en antinutrientes tales como el ácido fítico (Allen, 2002b). Sin embargo, los estudios realizados demuestran contradicciones y la posibilidad de que diversos compuestos de la dieta puedan afectar a la absorción de este compuesto.

Olivares y col. (1997) compararon la absorción del hierro del bis-glicinato ferroso añadido al agua y a la leche, y concluyeron una absorción menor en la leche (11%) que cuando era añadido al agua (46%). Además, cuando el ácido ascórbico fue añadido a la leche la absorción del bis-glicinato ferroso incrementó en un 38%. Estos resultados sugieren que los inhibidores y favorecedores pueden afectar a la absorción del bis-glicinato ferroso. En otro estudio llevado a cabo por Fox y col. (1998) en niños alimentados con un puré de verduras o una papilla de cereales con un elevado contenido en ácido fítico y enriquecidas con bis-glicinato ferroso o sulfato ferroso marcados con isótopos estables, observaron que el ácido fítico disminuyó la absorción del hierro de igual manera en ambos compuestos de hierro. Bovell-Benjamin y col. (2000), compararon la absorción del hierro del bis-glicinato ferroso con la del sulfato ferroso añadidos a copos de maíz con un elevado contenido en ácido fítico en un grupo de individuos deficientes en hierro. La absorción del bis-glicinato ferroso fue de cinco a seis veces superior a la del sulfato ferroso (6-7% comparada con 1-2%, respectivamente). Cuando las dos fuentes de hierro fueron administradas conjuntamente en la misma comida los resultados fueron muy similares, indicando que no había un intercambio de los isótopos en el pool intestinal, y que la molécula de bis-glicinato ferroso probablemente se absorbía de una forma intacta.

En general, la ventaja de usar el bis-glicinato ferroso para enriquecer los alimentos es por su elevada absorción en alimentos con un elevado contenido en inhibidores de la absorción del

hierro. Aunque hay algunas evidencias sobre la absorción intacta del bis-glicinato ferroso cuando entra en las células intestinales, la eficacia de la absorción del hierro aparentemente está regulada por el estado nutricional de hierro en el individuo. Otra ventaja que presenta este compuesto de hierro es que puede ser utilizado para enriquecer productos lácteos y una amplia variedad de productos comerciales, tales como cereales, galletas, bizcochos, y bebidas de frutas. Sin embargo posee un elevado potencial redox y por consiguiente una elevada tendencia a causar oxidación lipídica. El bis-glicinato ferroso tiene un coste superior al sulfato ferroso, pero hay que tener en cuenta que debido a su elevada biodisponibilidad se podrían utilizar cantidades más pequeñas (Allen, 2002a).

6.3.2.2. Compuestos encapsulados.

La encapsulación del hierro tiene el potencial suficiente para vencer los principales inconvenientes del enriquecimiento del hierro en los alimentos. Los compuestos de hierro actualmente utilizados son: *sulfato ferroso*, *fumarato ferroso*, *pirofosfato férrico*, y el *hierro elemental*. Con respecto a los materiales empleados para la encapsulación, los solubles como la maltodextrina y la celulosa, no proporcionan una adecuada protección frente a la oxidación del hierro en ambientes húmedos. Como solución la mayoría de los compuestos de hierro encapsulados son cubiertos con aceites hidrogenados que proporcionan una buena barrera frente a un relativo bajo coste. Estos compuestos de hierro encapsulados son utilizados en el enriquecimiento de fórmulas infantiles y cereales, además de otros alimentos de primera necesidad. Una de las ventajas que presentan es la ausencia de cambios sensoriales debidos a los procesos de oxidación de los ácidos grasos, aminoácidos, y otros micronutrientes. Además, pueden reducir las interacciones del hierro con los inhibidores de la absorción del hierro, como el ácido fítico, taninos, y polifenoles. Sin embargo, otro de los factores que hay que tener en cuenta es el efecto de la encapsulación sobre la biodisponibilidad del hierro. El material de la cápsula, la proporción entre material de la cápsula y contenido en hierro, y el proceso industrial empleado en la encapsulación son algunos de los factores que pueden influir en la biodisponibilidad del hierro (Zimmermann, 2004). Además, las cápsulas poseen un bajo punto de fusión (45-65° C), por lo que si se destruyen durante la preparación del alimento, de nuevo pueden aparecer cambios sensoriales no deseados (Hurrell, 1985; Hurrell y col., 1989).

En ensayos de repleción de la hemoglobina realizados en ratas, se comparó la biodisponibilidad de diferentes compuestos de hierro encapsulados, sulfato ferroso, fumarato ferroso y citrato férrico de amonio frente a los compuestos no encapsulados y se observó que un ratio cápsula:hierro $\geq 60:40$ puede disminuir la biodisponibilidad relativa del hierro aproximadamente en un 20%. A un ratio de cápsula:hierro = 50:50, la biodisponibilidad del

sulfato ferroso encapsulado parece ser similar a la forma no encapsulada. Además, Barclay (2003) observó que pequeños cambios en la composición de la cápsula pueden influir en la biodisponibilidad del hierro. Además en otros estudios realizados en niños, el fumarato ferroso encapsulado añadido junto con el ácido ascórbico a alimentos infantiles (Zlotkin y col., 2001) y el sulfato ferroso encapsulado empleado en el enriquecimiento de la sal (Zimmermann y col., 2003) mostraron ser eficaces en la recuperación de la anemia.

Recientes investigaciones han demostrado que la micronización de los compuestos insolubles puede mejorar su biodisponibilidad. Este es el caso del pirofosfato férrico micronizado, un compuesto de hierro no reactivo e insoluble y dispersado dentro de pequeñas partículas de una emulsión. El gusto y el olor desagradable del mineral son enmascarados y además, una característica importante frente a los compuestos de hierro solubles (como el sulfato ferroso), es que no provoca irritación en el sistema gastrointestinal (Nanbu y col., 1998). El pirofosfato férrico micronizado se produce a partir del cloruro férrico y el pirofosfato sódico utilizando una nueva técnica de dispersión que produce como resultado un tamaño de partícula muy pequeña ($\cong 0.3 \mu\text{m}$), ~ 20 veces menor que el pirofosfato férrico convencional de $\cong 8 \mu\text{m}$ de tamaño. Con el fin de evitar la formación de aglomerados después de la producción, se añaden durante el proceso de producción emulsificadores, como la lecitina de soja hidrolizada enzimáticamente y el éster de ácido graso de poliglicerol (Fidler y col., 2004a,b)

Se ha comprobado la biodisponibilidad de este compuesto en ratas. En concreto Sakaguchi y col., (2004) en un estudio de repleción de la hemoglobina en ratas, concluyeron que la RBV del pirofosfato férrico comercial y el micronizado ($\sim 0.5 \mu\text{m}$) era de 56% y 104% comparada con la del sulfato ferroso. En un estudio de intervención doble-ciego en niños escolarizados de Marruecos, se demostró su eficacia al incorporarlo a la sal. En este caso, la sal fue doblemente enriquecida con el pirofosfato férrico micronizado (tamaño de partícula de $2.5 \mu\text{m}$) y con yodo (yodato potásico) reduciendo significativamente la prevalencia de anemia deficiente en hierro (Zimmermann y col., 2004). En otro estudio con isótopos estables realizado en humanos, la absorción del pirofosfato férrico micronizado incorporado a cereales infantiles enriquecidos y a un yogurt líquido fue similar a la del sulfato ferroso (Fidler y col., 2004). Sin embargo, no está claro si la elevada biodisponibilidad de este compuesto fue debida solamente al reducido tamaño de partícula o si los emulsificadores que envuelven al compuesto podrían jugar un papel importante.

Basado en estos resultados, este compuesto tiene un gran potencial de utilización, debido a que causa muy pocos problemas organolépticos comparados con los compuestos de hierro solubles en agua (sulfato ferroso). Alimentos como bebidas de chocolate, cereales, sal yodada, y

pastillas de caldo podrían ser enriquecidos con esta forma de hierro (Fidler y col., 2004). Actualmente, el pirofosfato férrico micronizado está siendo empleado en Japón para el enriquecimiento de la leche y productos lácteos, y en Corea para fórmulas infantiles destinadas a niños con deficiencia en hierro. Esta parece ser una solución en este tipo de productos en los que la utilización de compuestos solubles como el sulfato ferroso ha causado problemas organolépticos debido a las características de su matriz (Demott, 1971; Edmondson y col., 1971; Kurtz y col., 1973; Wang y King, 1973).

Tabla 6. Compuestos de hierro utilizados para enriquecer los alimentos. Biodisponibilidad relativa y cambios organolépticos (Hurrell, 1997)

Compuesto de hierro	~ % Fe	Biodisponibilidad Relativa Media		Cambios organolépticos no deseados
		Ratas	Humanos	
Alta solubilidad en agua				
Sulfato ferroso · 7 H ₂ O	20	100	100	
Sulfato ferroso desecado	33	100	100	
Gluconato ferroso	12	97	89	Alta
Lactato ferroso	19	—	106	
Citrato férrico de amonio	18	107	—	
Sulfato ferroso de amonio	14	99	—	
Baja solubilidad en agua / soluble en ácido diluido				
Fumarato ferroso	33	95	100	
Succinato ferroso	35	119	92	
Sacarato férrico	10	92	74	Baja
Glicerofosfato férrico	15	93	—	
Citrato ferroso	24	76	74	
Tartrato ferroso	22	77	62	
Insoluble en agua / baja solubilidad en ácido diluido				
Pirofosfato férrico	25	45 – 58	21 – 74	
Ortofosfato férrico	28	6 – 46	25 – 32	
Polvos de hierro elemental reducido por electrolisis	97	16 – 70	5 - 100	
Polvos de hierro elemental reducido por hidrógeno	97	13 – 54	13 – 148	Despreciable
Polvos de hierro elemental reducido por CO	97	12 – 32	SD	
Hierro atomización	97	SD	SD	
Hierro Carbonilo	98	27 - 66	5 - 20	
Compuestos encapsulados				
Sulfato ferroso	—	98	—	
Fumarato ferroso	—	—	—	Despreciable
Pirofosfato férrico	—	—	—	
Compuestos quelados				
NaFeEDTA	14	—	150-300	
Bis-glicinato ferroso	19	—	100-400	Despreciable

7. EL CONCEPTO DE LA BIODISPONIBILIDAD DEL HIERRO Y SU VALORACIÓN

La biodisponibilidad es una medida de la proporción total de hierro de un alimento o dieta que es digerido, absorbido, y metabolizado por las rutas metabólicas normales (Fairweather-Tait, 1987). Por lo tanto, la biodisponibilidad del hierro depende de la digestibilidad o mejor dicho, la *solubilidad* del hierro durante la digestión, la *absorción* del hierro y su liberación a la circulación, y la *metabolización* del hierro una vez que ha entrado en la circulación, y su incorporación a los componentes funcionales como la hemoglobina, citocromos, etc. Otras definiciones propuestas por otros autores se reflejan en la Tabla 7 (Wienk y col., 1999).

Tabla 7. Definiciones propuestas para la biodisponibilidad del hierro.

-
- ❖ Porción del hierro total que es metabolizado (Mahoney y Hendricks, 1982)
 - ❖ Medida de la proporción del hierro total en un alimento o dieta que es digerido, absorbido, y metabolizado por las rutas metabólicas normales (Fairweather-Tait, 1987)
 - ❖ Proporción del hierro total en un alimento, comida o dieta que es utilizado para las funciones normales del cuerpo (Fairweather-Tait, 1992)
 - ❖ Porcentaje del hierro ingerido que llega a ser disponible para el proceso metabólico (Van Dokkum, 1992)
 - ❖ Medida de la disponibilidad del hombre y animales, o la eficacia, por la que los nutrientes (hierro), en una forma química dada, son liberados del alimento en presencia de ciertos componentes del alimento. Además incluye la absorción y transporte del hierro a órganos y células, donde finalmente completa su función fisiológica (Schlemmer, 1995)
-

Actualmente, el hierro es el único micronutriente que presenta una medida directa de la biodisponibilidad ya que aproximadamente el 80 – 90% del hierro absorbido es utilizado para la síntesis de la hemoglobina en los reticulocitos. La biodisponibilidad puede ser medida como la proporción incorporada del compuesto de hierro a la hemoglobina, mediante isótopos marcadores. Sin embargo, debido a que no hay vías de excreción para el hierro, las medidas de la absorción son utilizadas para la predicción o estimación de la biodisponibilidad. Las técnicas de valoración de la biodisponibilidad del hierro se enumeran en la Tabla 8.

Tabla 8. Métodos para valorar la biodisponibilidad del hierro

-
- ❖ ***Incorporación a la hemoglobina*** (radioisótopos e isótopos estables)
 - ❖ ***Monitorización fecal hemoglobina*** (radioisótopos e isótopos estables)
 - ❖ ***Contador corporal*** (^{59}Fe)
 - ❖ ***Aparición/desaparición en plasma***
 - ❖ ***Repleción de la hemoglobina***
-

(Fairweather-Tait, 2001)

7.1. Incorporación a la hemoglobina

Este método se basa en marcar el compuesto de hierro en estudio con un radioisótopo (^{59}Fe o ^{55}Fe). El radioisótopo es administrado por vía oral a personas en ayunas en una o más ocasiones y 14 días después de la última dosis se calcula el porcentaje de la incorporación del hierro a la hemoglobina (Brise y Hallberg, 1962a). También se suele emplear el método del doble isótopo para la obtención de los valores absolutos en vez de los relativos para la absorción del hierro (Saylor y Finch, 1953). Este método consiste en la administración por vía oral de ^{59}Fe y la administración simultánea por vía intravenosa del ^{55}Fe , tras 9 días se toma una muestra de sangre. La relación entre el ^{55}Fe y ^{59}Fe en sangre es la medida de la verdadera absorción del ^{55}Fe , a condición de que las distribuciones internas de los isótopos oral e intravenosa sean similares. Puede ser calculado como:

$$\% \text{ Absorción } ^{55}\text{Fe} = \frac{\text{radioactividad en la sangre del } ^{55}\text{Fe} \times \text{dosis inyectada del } ^{59}\text{Fe}}{\text{dosis oral del } ^{55}\text{Fe} \times \text{radioactividad en la sangre del } ^{59}\text{Fe}} \times 100$$

Una variación de este método es la utilización de ambos radioisótopos administrados por vía oral en días consecutivos y en diferentes comidas, permitiendo estimar la absorción del hierro comparativamente dentro de la misma persona (Bothwell y col., 1958; Pirzio-Biroli y col., 1958). Transcurridos 14 días se toma una muestra de sangre para calcular la absorción del hierro mediante la fórmula anteriormente mencionada (Wienk y col., 1999). Sin embargo, aunque no se dispone de pruebas de que las radiaciones ionizantes a las dosis que se aplican en los ensayos provoquen efectos perjudiciales en el hombre, existe una comprensible cautela al uso de isótopos radioactivos en ciertos grupos de población como niños y mujeres embarazadas (Barberá y Farré, 1992).

Frente a los isótopos radioactivos, los isótopos estables no presentan ningún riesgo para la salud a consecuencia de las radiaciones ionizantes y además no sufren decaimiento, por lo que las muestras marcadas pueden ser almacenadas indefinidamente. Estudios con ^{57}Fe y ^{58}Fe han sido utilizados frecuentemente para el estudio de la biodisponibilidad de diferentes compuestos de hierro añadidos a alimentos infantiles (Martínez, y col. 1998; Fox y col., 1998) o para ensayos diseñados en mujeres (Fidler y col., 2003; Diaz y col., 2003). Sin embargo, estos estudios no se hallan exentos de inconvenientes. En primer lugar, los isótopos estables son más caros y además las dosis necesarias para obtener un adecuado enriquecimiento con un isótopo estable pueden ser demasiado elevadas para ser considerado un marcador, especialmente en estudios realizados en adultos (Bothwell y col., 1979; Weaver, 1998).

7.2. Monitorización fecal

Debido a que las pérdidas endógenas de hierro a través de las heces son despreciables y la cantidad de hierro excretado por la orina es muy pequeña, este método puede ser utilizado para medir la verdadera absorción del hierro. Generalmente se utilizan isótopos estables, donde las dosis son dependientes del sistema de detección y las cantidades necesarias para marcar los compuestos de hierro son menores comparadas con la técnica de la incorporación a la hemoglobina. Sin embargo, presentan una serie de inconvenientes, primero la incompleta recogida de las heces, especialmente en personas con largos periodos de tránsito intestinal; y segundo, la recogida de las heces en periodos cortos de tiempo conduce a una sobreestimación en la absorción debida a la incompleta recuperación del isótopo no absorbido presente en el contenido del lumen y/o por una incompleta recogida de células de la mucosa que contiene el isótopo y que no se ha transferido a la circulación sanguínea (Fairweather-Tait, 2001).

7.3. Recuento corporal

Este método se basa en marcar con ^{59}Fe un alimento o un compuesto de hierro y administrarlo por vía oral. Tras un periodo corto de tiempo (~ 1h) se realiza el recuento del isótopo emitido por el organismo. El resultado total es considerado como el 100%. La cantidad de ^{59}Fe presente en el cuerpo descenderá sucesivamente debido a la excreción fecal. Después de un tiempo (10 a 14 días en humanos y de 5 a 7 días en ratas) se alcanza un estado constante. La diferencia entre ambas medidas (a la hora y a los 10 a 14 días) se considera una medida de absorción del isótopo. Solamente el ^{59}Fe puede ser usado para el recuento corporal, ya que el ^{55}Fe no emite radiación gamma (Fairweather Tait, 2001).

7.4. Aparición/Desaparición en el plasma

Las amplias variaciones diurnas del hierro plasmático restringen el uso de este parámetro como un método para medir la absorción del hierro de compuestos no marcados, excepto para elevadas dosis. Se han establecido planteamientos alternativos usando isótopos estables, validados frente a los métodos con radioisótopos (Barrett y col., 1994). Para cuantificar la absorción del hierro, se debe conocer el ritmo de renovación del hierro en el plasma, para ello se administra una dosis intravenosa del isótopo de hierro. Al mismo tiempo se administra otro isótopo diferente por vía oral. Las concentraciones de los isótopos en el plasma se calculan midiendo el área bajo la curva (Fairweather-tait, 2001) según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Absorción oral} = [(ABC_{\text{oral}} / ABC_{\text{iv}}) \times (\text{dosis}_{\text{iv}} / \text{dosis}_{\text{oral}})] \times 100$$

donde ABC_{oral} es el área bajo la curva del isótopo administrado vía oral y ABC_{iv} el área bajo la curva del isótopo administrado vía intravenosa.

7.5. Repleción de la hemoglobina

Es uno de los métodos más empleados para estimar la biodisponibilidad del hierro en ratas, estando recomendado por la Asociación Oficial de Química Analítica (AOAC, 1990). Este método parte de un grupo de ratas jóvenes, machos, las cuales son deplecionadas de sus reservas de hierro mediante una dieta deficiente en este mineral hasta provocarles una anemia. Después de un mínimo de cuatro semanas en depleción, las ratas son divididas en grupos similares, según peso y niveles de hemoglobina, y cada grupo recibe una dieta que contiene el compuesto de hierro en estudio, en tres diferentes concentraciones. La repleción de la hemoglobina se mide en comparación a la de la fuente de hierro de referencia, el sulfato ferroso que se administra a otros tres grupos de ratas. Los niveles de hemoglobina son medidos después de 2 semanas de repleción y estos valores son representados frente a las diferentes concentraciones del hierro dietético para cada fuente de hierro. De esta manera, obtenemos dos rectas de regresión, una para el compuesto en estudio y otra para la sal de referencia (el sulfato ferroso). La relación entre las pendientes obtenidas refleja una medida cuantitativa de la biodisponibilidad del compuesto de hierro en estudio. El valor de la *biodisponibilidad relativa (VBR)* de la fuente de hierro se expresa relativo al efecto del sulfato ferroso (Wienk y col., 1999).

Mediante la repleción de la hemoglobina de ratas anémicas se puede determinar también la biodisponibilidad del hierro de diferentes compuestos calculando la *eficiencia de la regeneración de la hemoglobina* (Mahoney y Hendricks., 1982; Zhang y col., 1989)

El método de la eficiencia de la regeneración de la hemoglobina cuantifica la biodisponibilidad del hierro como la cantidad de hierro en la hemoglobina que se gana durante el periodo de repleción (Anderson y col., 1972; Mahoney y col., 1974), para ello utiliza un diseño semejante al escrito para la determinación de la VBR, pero emplea una sola dosis del compuesto de hierro en estudio. La cantidad de hierro en la hemoglobina se calcula usando la siguiente ecuación:

$$Fe-Hb \text{ (mg)} = Hb \text{ (mg/l)} \times \text{peso (Kg)} \times \text{contenido en hierro de la Hb (\%)} \times \text{Volumen de sangre (\% en peso)}$$

El volumen de sangre en ratas en crecimiento es alrededor del 7.5% de su peso corporal, tanto para animales anémicos como para animales recuperados de una anemia deficiencia en hierro (Whittaker y col., 1984). La hemoglobina contiene un 0.335% de hierro y este valor se

puede aplicar tanto para calcular la cantidad de hierro en la hemoglobina inicial como final durante el periodo de repleción. La *eficiencia de regeneración de la hemoglobina (ERH)* puede ser calculada para cada grupo de animales conociendo sus pesos iniciales y finales, sus concentraciones de hemoglobina iniciales y finales, la cantidad de alimento consumido, y la concentración de hierro del alimento (Mahoney y Hendricks, 1982).

$$ERH = [(Fe-Hb_{final} - Fe-Hb_{inicial}) / (Ingesta de hierro_{final - inicial})] \times 100$$

Otro de los métodos empleados para estimar la biodisponibilidad relativa del hierro, es el "Método del ratio de la pendiente". Relaciona mediante un análisis de regresión múltiple la dosis frente a la respuesta, siendo la dosis, diferentes concentraciones de hierro dietético para cada fuente de hierro o también la ingesta absoluta de hierro, mientras que la respuesta, puede ser el cambio en la concentración de la hemoglobina o la ganancia de hierro en la hemoglobina durante el periodo de repleción. El cálculo de la biodisponibilidad relativa (VBR) es la relación entre la pendiente del compuesto de hierro en estudio frente a la pendiente del sulfato ferroso. Para establecer este método se tiene que tener en cuenta tres suposiciones; primero, que exista una respuesta lineal para cada fuente de hierro; segundo, que las intersecciones con el eje y para todas las líneas sean iguales y tercero, la respuesta al nivel cero (llamado blanco) debe ser igual a un común valor en la intersección de todas las líneas.

8. EL PAPEL DE LAS VITAMINAS EN LA PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA ANEMIA

La anemia por una deficiencia en hierro está causada por un descenso en el suministro de hierro para la síntesis del grupo hemo y, por consiguiente, para la formación de la hemoglobina. Un descenso en la formación de la hemoglobina conduce a la producción de eritrocitos más pequeños que los normales (microcíticos) y con cantidades reducidas de hemoglobina (hipocrómicos) (Koury y Ponka, 2004).

El correcto mantenimiento de la función hematopoyética requiere adecuados niveles de muchos otros nutrientes que actúan en conjunto. Desgraciadamente, los papeles y mecanismos por los cuales muchos nutrientes influyen en la patogénesis o prevención de la anemia permanecen sin descubrir. En la Figura 8, se representa algunas de las características básicas del metabolismo del hierro y la eritropoyesis, poniendo atención en los procesos en los cuales ciertas vitaminas pueden influir en la deficiencia en hierro y la anemia.

Las vitaminas, como la vitamina A, ácido fólico, vitamina B₁₂, riboflavina y vitamina B₆, son necesarias para la producción normal de las células rojas sanguíneas, mientras que otras como

las vitaminas C y E protegen a los eritrocitos maduros de su destrucción prematura por la oxidación de los radicales libres (Tabla 9). La riboflavina, vitamina A y C además pueden prevenir la anemia mejorando la absorción intestinal del hierro, o facilitando su movilización a partir de sus reservas (Fishman y col., 2000).

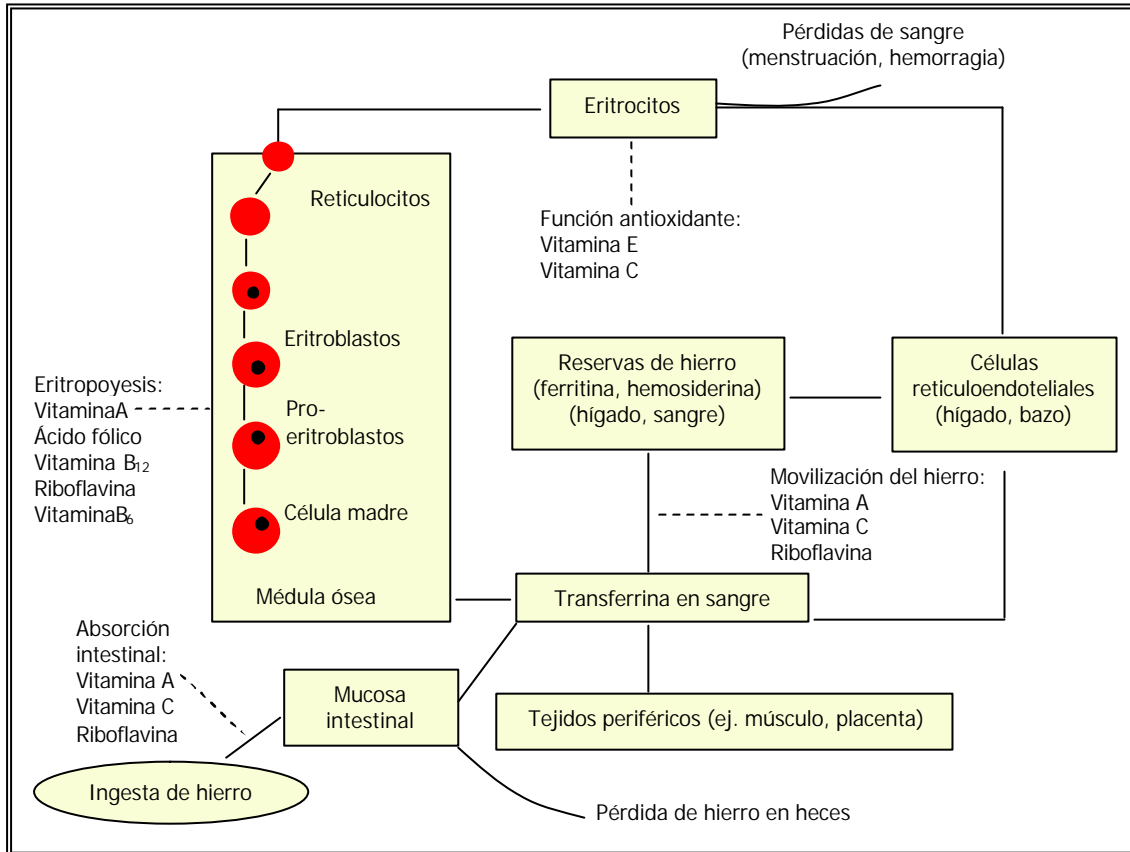


Figura 8. Funciones de las vitaminas en el metabolismo del hierro y la eritropoyesis. (Adaptado por Hughes-Jones & Wickramasinghe, 1996)

Tabla 9. Relación entre las vitaminas y el desarrollo de la anemia.

Deficiencia	Posible función en la anemia mediante:
Vitamina A	Movilización deficiente de las reservas de hierro Eritropoyesis alterada Susceptibilidad aumentada a las infecciones
Ácido fólico	Alteración en la síntesis del ADN, dando lugar a una ineficaz eritropoyesis
Vitamina B ₁₂	Alteración en el metabolismo del ácido fólico, dando lugar a una ineficaz eritropoyesis
Riboflavina	Fallo en la movilización del hierro Fallo en la producción de la globina, dando lugar a una eritropoyesis ineficaz Reducción de la capacidad de absorción del hierro
Vitamina C	Reducción de la absorción del hierro Reducida movilización del hierro desde sus reservas Alteración en el metabolismo del ácido fólico Daño oxidativo en los eritrocitos, produciendo hemólisis Hemorragia capilar, dando lugar a pérdida de sangre
Vitamina E	Daño oxidativo en los eritrocitos, produciendo hemólisis
Vitamina B ₆	Alteración en la síntesis del grupo hemo, produciendo eritropoyesis ineficaz

8.1. Vitamina A

La vitamina A es necesaria para la eritropoyesis. En aquellas personas que sufren de una deficiencia en vitamina A, la hemoglobina no se incorpora de manera correcta a las células rojas sanguíneas. Hodges y col. (1978) fueron los primeros que describieron una interacción entre la vitamina A y el metabolismo del hierro. Además se ha observado una correlación positiva entre el retinol sérico y la hemoglobina en niños de Guatemala (Mejia y col., 1977), India (Mohanram y col., 1977), Tailandia (Bloem y col., 1989), Indonesia (Semba y col., 1992), Etiopía (Wolde-Gabriel y col., 1993), Bangladesh (Ahmed y col., 1993, 1996), y Sudáfrica (Beynen y col., 1992), y también en mujeres embarazadas en Indonesia (Sijtsma y col., 1993). De hecho, en niños (Mohanram y col., 1977; Mejia y Chew., 1988) y en mujeres embarazadas (Panth y col., 1990; Suharno y col., 1993) la administración de vitamina A aumenta significativamente los niveles de hemoglobina, hematocrito, y ferritina en plasma. De igual manera, se produce un incremento significativo en la concentración de hemoglobina en mujeres embarazadas anémicas cuando se administra en conjunto hierro y vitamina A, en comparación a la administración individual del compuesto de hierro (Vijayalakshmi y Devadas, 1987; Panth y col., 1990; Suharno y col., 1993).

Existen varios mecanismos que pueden explicar esta interacción:

a) Por un lado, se ha sugerido que la deficiencia en vitamina A disminuye la síntesis de transferrina y por tanto reduce el transporte de hierro hacia la médula ósea (Bloem y col., 1989), altera la diferenciación de las células sanguíneas debido a la falta de ácido retinoico (Koeffler y Amatruda., 1985; Schroeder y col., 1992) y da lugar a una eritropoyesis insuficiente (Roodenburg y col., 1996). También puede disminuir la movilización del hierro desde las reservas de ferritina (Mejia y Arroyave., 1982).

b) Otro de los mecanismos propone que la elevada prevalencia de infecciones que se producen durante la deficiencia en vitamina A, dan lugar, indirectamente, al descenso de la concentración de la hemoglobina debido a que el organismo secuestra hierro durante la fase aguda de la infección (Thurnham, 1993). También se ha sugerido que la vitamina A tiene un efecto favorecedor en la absorción del hierro mediante la formación de complejos solubles con el hierro en el intestino (Layrisse y col., 1997; García-Casal y col., 1997; 2003).

8.2. Ácido fólico

Junto al hierro y la vitamina B₁₂, el ácido fólico es un componente esencial de la eritropoyesis humana, y aunque está ampliamente distribuido en los alimentos, especialmente en las hojas verdes (foliáceas), la deficiencia dietética del ácido fólico es la principal causa de la

anemia megaloblástica en el mundo (Gallagher y col., 1995). Cuando hay una deficiencia en ácido fólico, la fase de síntesis de la división celular se prolonga y la maduración de las células se retrasa, induciendo en el caso de la médula ósea, a precursores anormales de los eritrocitos (megaloblastos) que tienen un tamaño y diámetro nuclear mayor que en las células normales (Myhre, 1964; Roudanelli y col., 1964; Steinberg y col., 1983; Hughes-Jones y Wickramasinghe, 1996). Los megaloblastos sufren una proliferación celular desordenada, y aquellos que maduran son a menudo ingeridos y degradados por los macrófagos de la médula ósea. Como resultado, la eritropoyesis es ineficaz, el ritmo en la liberación de los nuevos eritrocitos a la circulación es muy bajo, desarrollándose de manera gradual una anemia macrocítica (Figura 6). Desde el punto de vista hematológico, se traduce en un volumen corpuscular medio elevado y una concentración de hemoglobina baja (Hughes-Jones y Wickramasinghe, 1996).

Las poblaciones que viven en regiones endémicas de malaria presentan un elevado riesgo de padecer deficiencia en ácido fólico. La frecuente hemólisis producida por la malaria estimula una hiperplasia eritroide y de manera drástica aumenta los requerimientos para el ácido fólico, siendo la malaria la causa más común de eritropoyesis megaloblástica durante el embarazo en el África occidental (Fleming, 1989). En general, la deficiencia en ácido fólico contribuye al desarrollo de la anemia principalmente por una alteración en la división celular que pone en peligro a la eritropoyesis. La suplementación con ácido fólico es eficaz en el tratamiento y prevención de la deficiencia severa de ácido fólico y la manifiesta anemia megaloblástica. Sin embargo, los ensayos realizados hasta la fecha indican que la suplementación con ácido fólico:

1. Tiene poco efecto en la concentración de la hemoglobina o hematocrito entre las mujeres embarazadas.
2. Podría reducir la gravedad de la anemia en niños, pero hasta ahora no se han realizado estudios que comprueben el efecto en los parámetros hematológicos tras la administración de folatos.

8.3. Vitamina B₁₂

Una segunda causa nutricional de anemia megaloblástica es la deficiencia de vitamina B₁₂ (cobalamina), que puede producir anemia macrocítica y un fallo neurológico severo. La vitamina B₁₂ es un cofactor esencial en al menos dos reacciones de transmetilación, una de las cuales se encuentra interrelacionada con el ácido fólico en la síntesis del ADN y la hematopoyesis. La conversión de la homocisteína a metionina requiere una enzima dependiente de la vitamina B₁₂ así como de un grupo metil donado por el 5-metiltetrahidrofólico (5-metilTHFA). Con una

deficiencia en la vitamina B₁₂ la función de la enzima es interrumpida, la formación de la metionina se altera, y tanto el 5-metilTHFA como la homocisteína se acumulan.

La deficiencia de la vitamina B₁₂ ocurre con menos frecuencia que la deficiencia de ácido fólico, debido a que tiene lugar como resultado de un defecto en la absorción más que de una ingesta insuficiente (Herbert, 1984). Las reservas corporales de vitamina B₁₂ entre adultos sanos y normales son cuantiosas y se necesitarían unos 3-4 años para agotarlas consumiendo una dieta sin vitamina B₁₂ o quizás unos 20 años con una dieta baja en vitamina B₁₂, esto se debe a la existencia de una eficaz circulación enterohepática que recicla la vitamina B₁₂ desde la bilis a otras secreciones intestinales (Antony, 1991). Sin embargo, varios estudios han observado que las mujeres embarazadas que son vegetarianas estrictas o consumen pequeñas cantidades de productos cárnicos presentan un elevado riesgo de llegar a ser deficientes en vitamina B₁₂ durante el embarazo y la lactación (Allen y col., 1992; Allen, 1994).

En general, el tratamiento de la anemia megaloblástica con ácido fólico sólo puede enmascarar la deficiencia de la vitamina B₁₂, la cual puede conducir a severas secuelas neurológicas. Por la tanto, esta enfermedad debería ser tratada tanto con ácido fólico como con vitamina B₁₂. Diversos estudios han sugerido que la suplementación con la vitamina B₁₂:

1. No tiene ningún efecto sobre la concentración de la hemoglobina en mujeres embarazadas.
2. Puede aumentar los niveles de hemoglobina y reducir la severidad de la anemia en los niños prematuros y con bajo peso al nacer.

8.4. Vitamina B₆

La deficiencia de vitamina B₆, aunque es poco común, puede alterar la síntesis del grupo hemo y dar lugar a una anemia normocítica, microcítica o sideroblástica (Figura 6). El tratamiento de la anemia sideroblástica con vitamina B₆ restablece la actividad del ácido δ -aminolevulínico sintetasa (ALAS), la enzima limitante en la síntesis del grupo hemo, corrigiendo las anormalidades hematológicas (Ofori-Nkansah y col., 1975; Meier y col., 1981). La vitamina B₆ puede además inhibir la formación de los eritrocitos en forma de hoz presentes en la anemia falciforme (Natta y Reynolds., 1984).

8.5. Vitamina C

La deficiencia de vitamina C se asocia con varias formas de anemia, pero no está claro si esta vitamina (ascorbato) está directamente implicada en la hematopoyesis o si la anemia aumenta indirectamente las interacciones de la vitamina C con el ácido fólico y el metabolismo

del hierro (Oski, 1995). En su papel como agente reductor, la vitamina C puede facilitar la absorción del hierro desde el tracto gastrointestinal y permitir su movilización desde las reservas (Figura 6). El hierro y el ácido ascórbico forman un complejo quelante-hierro que es más soluble en el medio alcalino del intestino delgado y, por lo tanto, más fácil es su absorción (Bothwell y col., 1964; Lynch y Cook, 1980; Hallberg y col., 1987; Clark y col., 1992). La suplementación con vitamina C puede aumentar la absorción del hierro de la dieta. Sin embargo, el ácido ascórbico debe ser consumido casi a la misma vez que el hierro para ser eficaz (Cook y Monsen, 1977). Además, la vitamina C puede contrarrestar la inhibición de la absorción del hierro producida por los fitatos y taninos de la dieta (Hallberg y col., 1987).

El ácido ascórbico puede, al mismo tiempo, activar la enzima ácido fólico reductasa, para formar el ácido tetrahidrofólico, la forma activa del ácido fólico que previene la anemia megaloblástica (Oski, 1995; Stokes y col., 1975). También puede prevenir la pérdida de hierro debido a hemorragias asociadas con la deficiencia en vitamina C, y posiblemente, previene la hemólisis resultante de los mecanismos de defensa antioxidante de las células (Oski, 1995; Chow, 1979).

En general, la vitamina C mejora la absorción del hierro no hemo, protege a las células frente al daño oxidativo y contrarresta los efectos de los inhibidores de la absorción del hierro. También, incrementa los niveles de hierro en suero, las concentraciones de ferritina y hemoglobina en los niños y mujeres no embarazadas (Fishman y col., 2000).

9. ALIMENTOS FUNCIONALES

9.1. Concepto de alimento funcional

En Europa, ha aumentado considerablemente el interés de los consumidores por conocer la relación que existe entre la dieta y la salud. Hoy en día, la población reconoce en mayor medida, que llevar un estilo de vida sano, incluida la dieta, puede contribuir a reducir el riesgo de padecer enfermedades y dolencias, y a mantener el estado de salud y bienestar. Existen una gran variedad de alimentos funcionales a disposición del consumidor, pero en estos momentos la prioridad es identificar cuáles de ellos tienen un efecto real sobre la salud. No obstante, es necesario aclarar el concepto de "alimento funcional". El término alimento funcional hace referencia a aquellos alimentos obtenidos por diversos procedimientos, con la característica particular de que alguno de sus componentes, sea o no nutriente, afecta a las funciones diana del organismo, de manera específica y positiva, y promueve un efecto fisiológico o psicológico más allá de su valor nutritivo tradicional. El efecto positivo de un alimento funcional puede ser tanto su contribución al mantenimiento del estado de la salud y bienestar como la reducción del

riesgo de padecer una determinada enfermedad (Diplock y col., 1999). Un alimento funcional puede ser un alimento natural o modificado (alterado, añadiendo o eliminando uno o varios de sus componentes) o una combinación de ambos. Además, puede ser funcional para la población en general o para grupos particulares de la población, definidos por sus características genéticas, sexo, edad u otros factores. Así se obtienen siguiendo alguna de las siguientes estrategias o sus combinaciones (Roberfroid 2000; 2002):

1. Eliminando componentes perjudiciales presentes en el alimento (ej. alérgenos)
2. Incrementando la concentración de un componente presente de forma natural en el alimento hasta unos niveles en que pueda inducir los beneficios esperados (ej. enriquecimiento con micronutrientes como el hierro) o incrementando la concentración de una sustancia no nutritiva hasta niveles en que se conoce su efecto beneficioso.
3. Añadiendo un componente que no está presente de forma natural en el alimento y que no es necesariamente un macronutriente o un micronutriente, pero cuyos efectos beneficiosos son reconocidos (ej. prebióticos, antioxidantes no vitamínicos).
4. Sustituyendo un componente, generalmente un macronutriente (ej. grasas), cuyo consumo excesivo tenga efectos perjudiciales por un componente de reconocido efecto beneficioso (ej. inulina).
5. Incrementando la biodisponibilidad o estabilidad de un componente que se sepa que es capaz de producir un efecto funcional o reducir un potencial riesgo de enfermedad del propio alimento (ej. añadiendo vitamina C para mejorar la biodisponibilidad del hierro).

Debido al creciente interés en el concepto de "Alimentos Funcionales" y en las "Alegaciones de Salud", la Unión Europea ha creado una Comisión Europea de Acción Concertada sobre Bromatología Funcional en Europa (Functional Food Science in Europe, FUFUSE). El programa ha sido coordinado por el Instituto Internacional de Ciencias Biológicas (International Life Sciences Institute (ILSI) Europe), y su objetivo es desarrollar y establecer un enfoque científico sobre las pruebas que se necesitan para respaldar el desarrollo de productos alimenticios que puedan tener un efecto beneficioso sobre una función fisiológica del cuerpo y mejorar el estado de salud y bienestar de un individuo y/o reducir el riesgo de que desarrolle enfermedades. La posición que defiende el informe es que los alimentos funcionales deberían presentarse en forma de alimentos de consumo habitual y que se deben demostrar sus efectos en las cantidades que normalmente se consumirían en la dieta. Por tanto, es necesario poner en práctica las conclusiones y principios del programa FUFUSE. Por ello, se creó un nuevo programa de Acción Concertada de la Comisión Europea, el Proceso para la Valoración de Soporte Científico de las Alegaciones con respecto a los Alimentos (Process for the Assessment of Scientific Support for Claims of Foods, PASSCLAIM), que tiene como objetivo resolver los

temas relativos a validación y verificación científica de alegaciones y la información al consumidor (Aggett y col., 2005), las cuales aparecen recogidas en la Tabla 10.

Tabla 10. Criterios consensuados para la comprobación científica de la declaraciones nutricionales en el ámbito de la Unión Europea (PASSCLAIM)

1. El alimento o componente del alimento al cual se atribuye un efecto beneficioso debe ser caracterizado
2. La comprobación de una declaración nutricional debe estar basada principalmente en datos obtenidos en estudios de intervención en humanos. El diseño de los estudios de intervención debe incluir las siguientes consideraciones: <ol style="list-style-type: none"> a. Los grupos de estudio deben ser representativos de la población a la cual va destinado el alimento funcional b. Deben establecerse unos grupos control adecuados c. La duración de la intervención y el seguimiento deben ser adecuados para demostrar el efecto propuesto d. Debe caracterizarse la dieta habitual de los participantes así como los aspectos más relevantes de sus hábitos de vida. e. La cantidad de alimento o componente activo debe ser consecuente con el modo propuesto de consumo. f. Ha de tenerse en cuenta el efecto de la matriz del alimento así como el contexto dietético del efecto funcional del componente activo g. Comprobación de la conformidad con la ingesta del alimento o componente activo bajo examen. h. Ha de considerarse el poder estadístico para el contraste de la hipótesis
3. Cuando un efecto beneficioso no puede evaluarse de forma directa, los estudios de intervención deben emplear (bio) marcadores. Estos deben ser: <ul style="list-style-type: none"> - Biológicamente válidos. Para ello, su relación con el efecto final y su variabilidad dentro de la población deben ser conocidas. - Deben ser metodológicamente válidos en cuanto a sus características analíticas
4. En un estudio de intervención, la variable estudiada debe cambiar de un modo estadísticamente significativo y el cambio observado debe ser biológicamente relevante de acuerdo a la declaración nutricional que se pretende apoyar.
5. Una declaración nutricional debe ser comprobada científicamente considerando la totalidad de los datos obtenidos.

9.2. Prebióticos

Un prebiótico es un ingrediente alimenticio no digerible que afecta beneficiosamente al individuo que lo ingiere mediante la estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de uno o un número limitado de bacterias en el colon, mejorando así la salud del hospedador (Gibson y Roberfroid., 1995). Para que un ingrediente alimenticio sea clasificado como prebiótico debe cumplir según Gibson (1999) los siguientes requisitos:

1. No ser hidrolizado ni absorbido en la parte anterior del tracto gastrointestinal.
2. Ser un sustrato selectivo para una o un número limitado de bacterias comensales beneficiosas del colon, estimulando su crecimiento y/o metabolismo.
3. Modificar la composición de la flora del colon, facilitando el desarrollo de especies beneficiosas.

4. Inducir efectos en el lumen o sistémicos que son beneficiosos para la salud del hospedador.

Los hidratos de carbono no digeribles (oligosacáridos y polisacáridos), algunos péptidos y proteínas, y ciertos lípidos (ésteres y éteres) son considerados como prebióticos. Debido a su estructura química, estos compuestos no son absorbidos en la parte anterior del tracto gastrointestinal o no son hidrolizados por enzimas digestivas humanas (Gibson y Roberfroid., 1995).

9.2.1. Oligosacáridos (OS) y Oligosacáridos no digeribles (OND)

Los hidratos de carbono no son simplemente fuente de energía, sino que debido a la estructura física de la pared celular de la que forman parte tienen efecto sobre la saciedad (blundell y col., 1994) y la proporción y extensión de la digestión del almidón, que es el principal factor de control sanguíneo de glucosa e insulina (Jenkins y col., 1981; Englyst y col., 1996). Los hidratos de carbono se pueden clasificar en relación al grado de polimerización (GP) como OS (GP entre 2 y 10 unidades de monosacáridos) y polisacáridos, PS (GP más de 10 monosacáridos) (Cummings y col., 1997). Al mismo tiempo, según sus propiedades fisiológicas se pueden clasificar como digeribles o no digeribles (o no disponibles). Los no digeribles que están representados por el almidón resistente, PS no almidón (PS de las paredes celulares de las plantas, hemicelulosa, pectinas, gomas) y OND (Delzenne y Roberfroid, 1994), muestran varios efectos fisiológicos y nutricionales.

Los OND se encuentran en diferentes alimentos de forma natural, sin embargo también pueden ser producidos mediante diferentes reacciones químicas en el laboratorio. Principalmente existen tres métodos para elaborar los OND:

1. Mediante la extracción directa en agua caliente de diferentes raíces, como la achicoria, alcachofa de Jerusalén para extraer la inulina, o de semillas para la obtención de los SOS (sajooligosacáridos).
2. Hidrólisis enzimática parcial de OND, como en la obtención de oligofruktosa a partir de hidrolizado de la inulina (De Bruyn y col., 1992), o de polisacáridos para obtener los XOS (Xilooligosacáridos) por la acción de xilanasas sobre los xilanopolisacáridos (Yamaguchi y col., 1994).
3. Síntesis enzimática de un disacárido o de una mezcla de disacáridos usando osiltransferasa, como la obtención de FOS de cadena corta a partir de la sacarosa (Spiegel y col., 1994), los GOS (galactooligosacáridos) a partir de la lactosa y la lactosucrosa a partir de una mezcla de sacarosa y lactosa (Yamaguchi y col., 1994).

El organismo humano carece de los enzimas digestivos necesarios (α -glucosidasa, maltasa-isomaltasa y sucrasa) para poder hidrolizar los OND. Debido a que estas enzimas no pueden romper el enlace β -glucosídico, los OND a nivel nutritivo se comportan como fibras alimentarias solubles, ya que llegan íntegros al intestino grueso donde son fermentados por la flora del colon (Tsuji y col., 1986; Tokunaga y col., 1989; Molis y col., 1996).

Los OND más extensamente estudiados y que pueden proporcionar la mejor evidencia de los efectos prebióticos en humanos, son: FOS, GOS y SOS (Crittenden y Playne, 1996).

9.2.2. Efecto de los OND en la absorción mineral

Se ha demostrado que los oligosacáridos no digeribles (OND) estimulan la absorción de varios minerales y mejora la mineralización ósea. Por lo tanto, estas sustancias son ingredientes potenciales para los alimentos funcionales. La mayoría de las evidencias científicas sobre los OND se basan en experimentos realizados en los animales en los que aumentan la disponibilidad mineral del calcio, magnesio, zinc y hierro (Scholz-Ahrens y col., 2001)

El balance mineral es el método más comúnmente usado para evaluar el efecto que tiene el aporte de una determinada cantidad de OND a la dieta sobre la absorción mineral. A continuación se describen los efectos encontrados en la bibliografía científica para el hierro, que es el mineral en el que se centra este estudio.

9.2.2.1. Estudios en ratas.

En un estudio realizado con ratas en crecimiento Delzenne y col (1995) observaron que la retención del hierro incrementaba por la adición de oligofruktosa al 10%. Este compuesto también mejoró la recuperación de anemia inducida en ratas (Ohta y col., 1995). En otro ensayo, la oligofruktosa logró prevenir de manera eficiente la anemia producida tras una gastrectomía siendo elevada la absorción aparente del hierro fue después de la primera y segunda semana de la administración de los oligosacáridos. Ohta y col (1998) observaron un momentáneo pero significativo aumento en el hematocrito, en la concentración de la hemoglobina, y en la eficacia de regeneración de la hemoglobina tras la administración de oligofruktosa, sin embargo, no se observaron efectos en la concentración del hierro sérico, y en la capacidad de fijación del hierro total, o hierro absorbido (Ohta y col., 1998). De igual modo Ohta y col (1999) descubrieron que la administración de fructo-oligosacáridos de cadena corta (FOScc) a ratas gastrectomizadas previno la anemia por un incremento de la absorción tanto de hierro no-hemo como de hierro hemo.

El ciego juega un importante papel en el mecanismo por el que los FOScc previenen la anemia postgastrectomía (Ohta y col., 1998, 1999), aunque al parecer la absorción de hierro no sólo tiene lugar en el ciego sino también en el colon y recto (Sakai y col., 2000). Por lo tanto, el intestino grueso se absorbe el hierro suficiente para que las ratas se recuperen de una anemia (Ebihara y Okano, 1995). Al igual que ocurre con otros minerales, la solubilización del hierro es esencial para que pueda ser absorbido en el lumen intestinal (Monsen y Cook, 1976). Ohta y col. (1995) observaron en ratas anémicas que el aumento de la absorción del hierro se debe al efecto de los ácidos orgánicos (lactato) y los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) producidos por las bacterias del lumen a partir de la fermentación de los FOScc, ya que el lactato forma un pequeño complejo molecular absorbible con el hierro férrico (Derman y col., 1980).

Se ha demostrado un efecto estimulante de los FOScc en la absorción del hierro hemo, en ratas anémicas postgastrectomías, ya que estos probióticos producen el descenso del pH en los contenidos cecales y un incremento en la concentración de hierro en la fracción soluble de los mismos. Sin embargo, este efecto estimulante fue más débil que en el caso del hierro no hemo no se observándose ninguna mejora en ratas normales (Ohta y col., 1999).

9.2.2.2. Estudios en humanos

Los estudios sobre el efecto de los prebióticos en la absorción mineral no son tan concluyentes como los obtenidos en ratas. Van Dokkum y col. (1995) mediante una técnica de isótopos estables, no observaron ningún efecto de los OND sobre la absorción mineral en adultos jóvenes tras la toma de 15 g de inulina, oligofructosa o GOS al día durante 3 semanas, debido, según los autores al corto periodo de tiempo (24 h) en la recogida de las muestras. En un estudio posterior, las muestras fueron recogidas a las 36 h de la administración del isótopo, observándose un incremento significativo ($p < 0.05$) en la absorción del calcio con el empleo de oligofructosa (Van Den Heuvel y col., 1999). En otro estudio, Coudray y col. (1997) encontraron un incremento significativo ($p < 0.01$) en la absorción del calcio en voluntarios que tomaron inulina durante 4 semanas, en cambio no observaron ningún efecto en la absorción del hierro, magnesio y zinc.

Al igual que en las ratas, el mecanismo por el cual los OND estimulan la absorción mineral está probablemente relacionada con el incremento de la solubilidad de estos minerales en el ciego y colon como consecuencia del aumento de la fermentación microbiana y descenso de pH del lumen (Gibson y Roberfroid, 1995; Roberfroid y col., 1998). Sin embargo, debido a que la fisiología del aparato digestivo de la rata es diferente a la humana, el segmento del ciego

(ausente en los humanos), juega un papel importante en la absorción mineral en los roedores (Rayssiguier y Rémésy, 1998).

Varios estudios han demostrado que los OND (oligofructosa, inulina, y GOS) alcanzan el colon intactos (Alles y col., 1997; Bouhnik y col., 1997) y allí son fermentados de forma específica por las bifidobacterias del colon, aumentando su número en las muestras fecales, sin modificar el pH fecal y el recuento de otros géneros bacterianos como las enterobacterias (Bouhnik y col., 1997; Kleessen y col., 1997; Djouzi y Adrieux, 1997). Sin embargo, otros autores (Scholz-Ahrens y col., 2001) consideran aún escasas las evidencias de esta especificidad, y proponen que el principal efecto de los prebióticos responsables de la mayor absorción mineral en humanos está relacionado con su efecto como sustrato para la flora intestinal de una forma inespecífica pero que podría estimular la tasa de fermentación, producción de AGCC y acidificación luminal. En cambio, como no se ha encontrado un claro efecto de los OND sobre el pH fecal y la concentración o proporción de los AGCC, esta falta de relación podría explicar parcialmente la menor estimulación de la absorción mineral por estas sustancias en los humanos con respecto a los animales.

Otro aspecto que tampoco está claro en el hombre es si la relación entre la dosis de los prebióticos y la absorción de algunos minerales pueda estar asociada a la capacidad estimulante sobre las bifidobacterias del sustrato. Así, Roberfroid y col. (1998) concluyeron que aunque no había relación dosis-efecto en el rango de 4 a 20 g/día de inulina y oligofructosa, esta cantidad era suficiente para estimular el crecimiento de estas bacterias.

10. EL HIERRO COMO PRO-OXIDANTE

Los alimentos procesados son frecuentemente enriquecidos con hierro como una medida preventiva contra la deficiencia en este mineral (Fairweather-Tait, 1997). Sin embargo, recientemente se ha relacionado el exceso de hierro con la elevada incidencia de cáncer de colon en los países desarrollados, por lo que han aumentado las dudas sobre la conveniencia de proporcionar a la población una elevada gama de alimentos enriquecidos con hierro (Knekt y col., 1994; Nelson y col., 1994). Se ha sugerido que el hierro puede incrementar el riesgo de cáncer debido a su naturaleza pro-oxidante según describen Babbs (1989), Blakeborough y col. (1989) y Graf y Eaton (1993). Además, los estudios epidemiológicos han proporcionado evidencias de que tanto la ingesta de elevadas proporciones de carne en la dieta, como un elevado nivel de hierro sérico son factores de riesgo para el cáncer colorrectal en la población de los Estados Unidos (Wurzelmann y col., 1996).

La mayor parte del hierro dentro de los órganos está unido a proteínas, pero una pequeña proporción se encuentra libre. Este hierro libre se encuentra disponible para catalizar la producción de radicales libres. Los riesgos potenciales de un exceso de hierro, asociado a un incremento en la generación de radicales libres fueron propuestos hace 40 años (Richmond, 1959), y el papel del hierro en la etiología de varios tipos de cáncer ha sido discutido en dos revisiones (Sahu, 1992; Weinberg, 1996). El estado nutricional del hierro en el organismo está controlado por la regulación de la entrada del hierro en el intestino delgado. Una vez que las reservas de hierro son replecionadas, el hierro dietético permanece casi completamente sin absorber aumentando las concentraciones de hierro en el lumen del intestino distal después de la reabsorción del agua. La hipótesis de que la presencia del hierro en el contenido fecal pueda conducir a la generación de radicales libres, y que este efecto puede ser procarcinógeno para el cáncer colorrectal, fue avanzada por Blakeborough y col. (1989) y Babbs (1990).

Estudios epidemiológicos en humanos y en animales han sugerido que elevadas ingestas de hierro pueden provocar estrés oxidativo en la mucosa del colon y favorecer el riesgo de cáncer de colon y colitis ulcerosa (Siegers y col., 1988; Nelson, 1992; Knekt y col., 1994; Wurzelmann y col., 1996). Younes y col. (1990) documentaron que la cantidad de peróxido lipídico en la mucosa del colon de ratones aumentaba dependiendo del contenido de hierro en la dieta. En un estudio en ratas donde se les indujo de manera química el cáncer de colon, la ingesta de elevadas dosis de hierro 535 mg/kg de pienso, aumentaba el riesgo de cáncer de colon en comparación con un grupo control que ingerían los requerimientos mínimos diarios para las ratas (35 mg Fe/kg dieta) (Thompson y Zhang, 1991).

El estrés oxidativo es una condición que se presenta cuando hay un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) potencialmente tóxicas, tales como el anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH) y las enzimas (superóxido dismutasa, catalasas, peroxidasas y peroxiredoxina), especies antioxidantes de bajo peso molecular (vitamina E, Vitamina C, glutatión), además de los transportadores de metales e inductores de factores de transcripción (Tapia y Araya., 2006). Los iones hierro tienen la capacidad de donar y aceptar electrones, lo que les permite reaccionar con otros compuestos generando ERO, afectando rápidamente a las membranas celulares, proteínas y ADN (Gutteridge y col., 1982). Por su capacidad de inducir daño a nivel intracelular, el estrés oxidativo ha sido involucrado en una variedad de patologías, entre las que se incluyen las infecciones (Victor y col., 2004), enfermedades gástricas por *Helicobacter pylori* que producen inflamación, ulceración y carcinogénesis (Baek y col., 2004), y como factor contribuyente al desarrollo de la malaria (Becker y col., 2004). Se considera mediador del daño vascular en la hipertensión y aterosclerosis (Touyz, 2003). Se asocian también a diversos tumores en próstata

(Sikka, 2003), cuello uterino (Manju y col., 2002), ovarios (Senthil y col., 2004) e hígado (Liu y col., 2003).

Existen estudios que han demostrado que los marcadores de estrés oxidativo como las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), que reflejan la peroxidación lipídica, son significativamente más elevados en pacientes con hemocromatosis. En animales, una sobrecarga de hierro resulta en una peroxidación lipídica hepática (Britton y col., 1990), oxidación de las proteínas hepáticas y daño oxidativo asociado a otros tejidos, incluidos los eritrocitos (Galleano y Puntarulo, 1995, 1997).

Por tanto, es importante destacar que aunque el hierro es un nutriente esencial, su exceso (en especial en forma ferrosa), puede causar estrés oxidativo en los órganos. El hierro ferroso es un catalizador de la reacción Haber-Weiss, cuyo resultado es la formación del radical hidroxilo (ERO), el cual está implicado en la iniciación y propagación de la peroxidación lipídica. El hierro administrado en forma de suplementos farmacológicos no es absorbido completamente en el intestino delgado proximal, por lo que más del 50% alcanza la parte del intestino delgado distal y grueso, y al ser éste hierro soluble podría aumentar la producción de radicales libres en el colon dañando la mucosa de las células (Ito y col., 2003). No obstante, uno de los tratamientos más empleados para reducir la anemia deficiente en hierro es la administración terapéutica de sales ferrosas. Las sales ferrosas prescritas en cantidades = 195 mg de hierro elemental/día dividida en tres dosis individuales como sulfato ferroso, fumarato o gluconato, respectivamente (Frewin y col., 1997), son preferidas frente a las sales férricas debido a su mayor biodisponibilidad. La cantidad media de hierro presente en una dieta diaria es ~ 15 mg, aproximadamente 2.5 mg de hierro será absorbido y un 1% del hierro dietético permanecerá en el lumen del intestino participando en la generación de radicales libres. Durante la suplementación en adultos utilizando dosis de 60-195 mg Fe/día, la proporción de hierro de la dieta que participará en la generación de radicales libres será la misma (un 1%), pero existirá una proporción considerable del hierro como suplemento que también estará disponible para la reacción Fenton (Freddy y col., 2003).

La terapia de hierro oral, indicada a personas con un elevado riesgo de desarrollar una deficiencia en hierro, como los niños, adolescentes, ancianos, mujeres embarazadas, vegetarianos, y atletas, puede inducir considerables daños gastrointestinales, tales como náuseas, vómitos, dolor abdominal, acidez, y estreñimiento, al contrario que el tratamiento con hierro intravenoso (Al-Momen y col., 1996). Adicionalmente, la terapia con hierro oral en pacientes que sufren de desordenes gastrointestinales asociada con una mucosa dañada, tales como la enfermedad inflamatoria intestinal o enfermedad celiaca, puede contribuir al desarrollo del daño oxidativo (Yamada y Grishman, 1991; Lih-Brody y col., 1996; Marx y van Asbeck, 1996;

Geerling y col., 1998; Odetti y col., 1998). Se han observado evidencias de que la suplementación con hierro induce inflamación tanto en ratas normales (Knutson y col., 2000) como en modelos de ratas con colitis ulcerosa (Oldenburg y col., 2001; Aghdassy y col., 2001; Carrier y col., 2002; Seril y col., 2002). Además, las sustancias quelantes de hierro mejoran el estrés oxidativo y la inflamación en ratas con colitis ulcerosa (Ablin y col., 1999) y en pacientes tras una biopsia del colon (Millar y col., 2000).

En general, debido a la frecuente utilización de los suplementos de hierro como medida terapéutica y al enriquecimiento de los alimentos como medida profiláctica frente a los desórdenes de la deficiencia del hierro, son necesarias más investigaciones en las que se evalúen el tipo de compuesto de hierro y las dosis de los mismos que podrían generar un mayor estrés oxidativo de las células de la mucosa del colon, y por lo tanto producir a largo plazo cáncer de colon, ya que según los estudios epidemiológicos éste es el lugar más vulnerable en caso de un exceso en la ingesta de hierro.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1 Néctar de frutas

El consumo de néctar y zumos de frutas ha experimentado un aumento considerable en los últimos años. En España, la compra de zumos de frutas en 2003 con respecto al año 2002 se ha cifrado en 18.8 L/cápita/año, lo que representa un aumento del 3.3 %. La evolución del consumo desde 1998 hasta 2003 es de un aumento establecido en un 14.4 %, según los datos facilitados por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación en *La alimentación en España, Madrid, 2004*.

Las investigaciones científicas sobre los beneficios que aportan diversos componentes de los alimentos, así como el creciente interés que muestran los consumidores por el papel que ejerce la alimentación en su estado de salud, hace que la industria alimentaria ofrezca continuamente nuevas variedades de alimentos que respondan a la demanda por parte de la población de prevenir enfermedades y mantener una buena salud. Los zumos de frutas y similares son utilizados desde hace varios años como vehículo de nutrientes y otras sustancias que han demostrado tener algún efecto beneficioso sobre el organismo. Debido a su amplia aceptabilidad, los alimentos y las bebidas enriquecidas con micronutrientes pueden ser útiles en la reducción de las deficiencias de micronutrientes, especialmente en los países en vías de desarrollo. Aunque la causa más común de anemia es la deficiencia en hierro, ésta raramente ocurre de manera aislada y a menudo está acompañada de otras deficiencias de micronutrientes, por ello el uso de múltiples micronutrientes en vez de la adición individual del hierro está siendo cada vez más considerada. Estos zumos de frutas y similares enriquecidos se engloban dentro del concepto de "alimentos funcionales".

De acuerdo con la Directiva 2001/112/CE del Consejo, publicada en el Diario Oficial de la Comunidades Europeas, relativa a los zumos de frutas y otros productos similares destinados a la alimentación humana, define al néctar de frutas como un producto susceptible de fermentación, pero no fermentado, obtenido por adición de agua y de azúcares o miel al zumo de frutas, al zumo de frutas a base de concentrado, al zumo de frutas concentrado, al zumo de frutas deshidratadas o en polvo, al puré de frutas o a una mezcla de estos productos, y que es conforme a lo dispuesto en la normativa sobre contenido mínimo de zumo de puré. La adición de azúcares o miel se autoriza en una cantidad no superior al 20% del peso total del producto

acabado. Así mismo se autoriza la adición de vitaminas y minerales, de acuerdo con lo dispuesto en el Real Decreto 930/1992 del etiquetado sobre propiedades nutritivas.

Para la realización del presente estudio se tomó como base un néctar de piña y maracuyá enriquecido con diferentes fuentes de hierro (sulfato ferroso, pirofosfato férrico micronizado y bis-glicinato ferroso) hasta alcanzar una concentración de 4,92 mg Fe/100 ml (33% CDR). Esta última fuente de hierro solamente fue incorporada en el quinto estudio. Según el estudio, se adicionaron una serie de vitaminas (C, B₆, B₁₂, y ácido fólico), en concentraciones de 40 mg/100 ml, 0,66 mg/100ml, 0,33 µg/100ml y 66 µg/100ml, respectivamente con el fin de favorecer la absorción del hierro y mejorar la formación de la hemoglobina eritrocitaria. Con estas dosis se alcanzan el 33% de las CDR. En el último estudio se incorporaron fructo-oligosacáridos, en concreto inulina (0,6%) junto al hierro y las vitaminas, ya que de acuerdo con la bibliografía científica puede favorecer la absorción de hierro, y otros minerales a nivel del intestino grueso. Para cada estudio se elaboró una receta diferente mediante la combinación de las vitaminas y los fructo-oligosacáridos, manteniendo la fuente de hierro como un ingrediente constante. Los diferentes tipos de néctar fueron elaborados en la planta piloto de Hero España, S.A. y almacenados a temperatura ambiente en oscuridad, con el fin de evitar reacciones de oxidación que pudiesen alterar las vitaminas y el hierro añadidos. En la Tabla 1, se muestran las distintas recetas empleadas en cada estudio.

Tabla 11. Composición del néctar según estudio.

Ingredientes	1^{er} Estudio		2^{do} Estudio		3^{er} Estudio		4^o Estudio		5^o Estudio		
	Néctar 1	Néctar 2	Néctar 3	Néctar 4	Néctar 5	Néctar 6	Néctar 7	Néctar 8	Néctar 9	Néctar 10	Néctar 11
Concentrado de Piña	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Concentrado de Maracuyá	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ciclamato sódico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarina Sódica	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sal de hierro	+ ¹	+ ²	+ ¹	+ ²	+ ¹	+ ²	+ ¹	+ ²	+ ¹	+ ²	+ ³
Vitamina C	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
Vitamina B ₆	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Vitamina B ₁₂	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Ácido fólico	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Fructo-oligosacáridos	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

¹ Sulfato ferroso (4,92 mg Fe/100ml, 33% CDR); ² Pirofosfato férrico micronizado (4,92 mg Fe/100ml, 33% CDR); ³ Bis-glicinato ferroso (4,92 mg Fe/100ml, 33% CDR)
 Vitamina C (40 mg/100ml); Vitamina B₆ (0,66 mg/100ml); Vitamina B₁₂ (0,33 µg/100ml), ácido fólico (66 µg/100ml), todas las vitaminas alcanzan un 33% de la CDR
 Fructo-oligosacáridos (Inulina, 0,6%)

+ Presencia

- Ausencia

1.2. Dietas AIN-93G modificadas

La dieta para roedores AIN-93 fue formulada para sustituir a la dieta que se ha utilizado comúnmente hasta los años 90, (AIN-76A), y así mejorar el desarrollo de los animales de experimentación que las consumían (Reeves, 1997).

En los estudios 1 y 2, la dieta AIN-93G se formuló sin la adición de la sal de hierro, destacando además la ausencia de vitamina C, porque a diferencia de los humanos, las ratas pueden sintetizar el ácido ascórbico (Reddy y Cook., 1994). Para los estudio 3, 4 y 5 se eliminaron de la dieta AIN-93G tanto el hierro como las vitaminas B₆, B₁₂ y el ácido fólico, ya que necesitábamos incorporar sólo en el néctar dichas vitaminas, la vitamina C y los FOS con el fin de averiguar un posible efecto sobre la absorción y biodisponibilidad del hierro incorporado a estas bebidas.

Tabla 12. Composición de las diferentes dietas utilizadas en los cinco estudios.

INGREDIENTES	ESTUDIOS 1-2	ESTUDIOS 3-5
	DIETA 1	DIETA 2
Caseinato cálcico	+	+
L-Cistina	+	+
Almidón de maíz	+	+
Maltodextrina	+	+
Sacarosa molida	+	+
Aceite de soja	+	+
Carboximetilcelulosa	+	+
MIX DE MINERALES	+ ¹	+ ¹
MIX DE VITAMINAS	+	+ ²
TBHQ	+	+
Bitartrato de colina	+	+

¹La sal de hierro fue eliminada de la dieta.

²Las vitaminas B₆, B₁₂ y ácido fólico fueron eliminadas de la dieta.

TBHQ: Ter- Butilhidroquinona

2. DISEÑO EXPERIMENTAL

El desarrollo del trabajo experimental se llevó a cabo en cinco estudios diferenciados en función del tipo de vitamina/FOS añadidos junto a la fuente de hierro pirofosfato férrico micronizado (PFM) y en comparación con el sulfato ferroso (SF), que constituye la sal de referencia, tal y como se muestra en la Figura 9.

Para desarrollar cada uno de los estudios tomamos como referencia el método oficial 974.31 de la AOAC (1998) para la biodisponibilidad del hierro, que describe un ensayo de repleción de la hemoglobina en ratas. El procedimiento para cada uno de los estudios fue idéntico en la primera fase, que corresponde al *periodo de depleción*, variando en el *periodo de repleción* dependiendo de cada ensayo (Figura 9).

Durante el *periodo de depleción*, los animales fueron alimentados con una dieta modificada (dieta AIN-93G) sin hierro, y agua desmineralizada *ad libitum*, durante 4 semanas, hasta que alcanzaron un estado de deficiencia en hierro (Hb < 6 g/100 ml). En la siguiente fase, el *periodo de repleción*, los animales fueron divididos en dos grupos, y manteniendo la misma dieta se les suministró a través de un néctar de frutas los micronutrientes necesarios para cubrir las deficiencias causadas (según estudio) durante el *periodo de depleción*.

En el primer estudio se procedió a evaluar la biodisponibilidad de dos fuentes de hierro (pirofosfato férrico micronizado y sulfato ferroso, este último como estándar de referencia) utilizando como vehículo un néctar de frutas, y su efecto como terapia en la recuperación de un estado de anemia deficiente en hierro. En el segundo estudio, a cada néctar de frutas con su correspondiente fuente de hierro se le adicionó la vitamina C, con el objetivo de evaluar su efecto favorecedor en la absorción del hierro y demás parámetros hematológicos y bioquímicos. En el tercer estudio, el néctar fue enriquecido con hierro y las vitaminas B₆, B₁₂ y ácido fólico, con el objetivo de evaluar el efecto de estas vitaminas en la absorción del hierro y parámetros hematológicos y bioquímicos. En el cuarto estudio se combinaron las vitaminas B₆, B₁₂, ácido fólico y vitamina C junto con las fuentes de hierro en cada uno de los néctares de frutas. Y por último, en el quinto estudio, además de las dos sales de hierro presentes en los estudios anteriores, se incorporó una nueva sal de hierro, el bis-glicinato ferroso, que junto a las vitaminas B₆, B₁₂, ácido fólico y vitamina C, se adicionó los fructo-oligosacáridos (FOS), este último por su potencial efecto prebiótico que pudiera favorecer la absorción del mineral a nivel del colon.

Para determinar la absorción de los compuestos de hierro se realizó un balance mineral del hierro en los animales sometidos al ensayo, determinando el contenido de hierro en heces, orina, la ingesta de hierro en la dieta y en el néctar. Para evaluar la incorporación del hierro a la hemoglobina y la recuperación de un estado anémico se evaluaron los parámetros sanguíneos de la serie roja (hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media y la concentración de la hemoglobina corpuscular media) y parámetros bioquímicos tales como el hierro sérico, capacidad total de fijación del hierro y el porcentaje de saturación del hierro. La biodisponibilidad del hierro fue calculada como la eficacia de regeneración de la hemoglobina (ERH). Asimismo se analizaron los depósitos de hierro en diferentes piezas anatómicas (corazón, hígado, bazo, riñón, parte proximal del intestino delgado).

Otro método utilizado para determinar la biodisponibilidad de los diferentes compuestos de hierro, fue la medida de la curva de la concentración de hierro sérico (CHS), mediante el cálculo del área bajo la curva (ABC).

Por último, se determinó la generación de radicales hidroxilo (OH) producidos en las heces durante el periodo de repleción, a través de la reacción de Fenton. Esta determinación está basada en los estudios realizados por Babbs (1990), el cual observó que los radicales libres derivados del oxígeno, generados en la materia fecal próximo al epitelio del colón, pueden jugar un papel importante en la etiología del cáncer de colon, siendo los radicales hidroxilo (OH) los responsables de dicha acción.

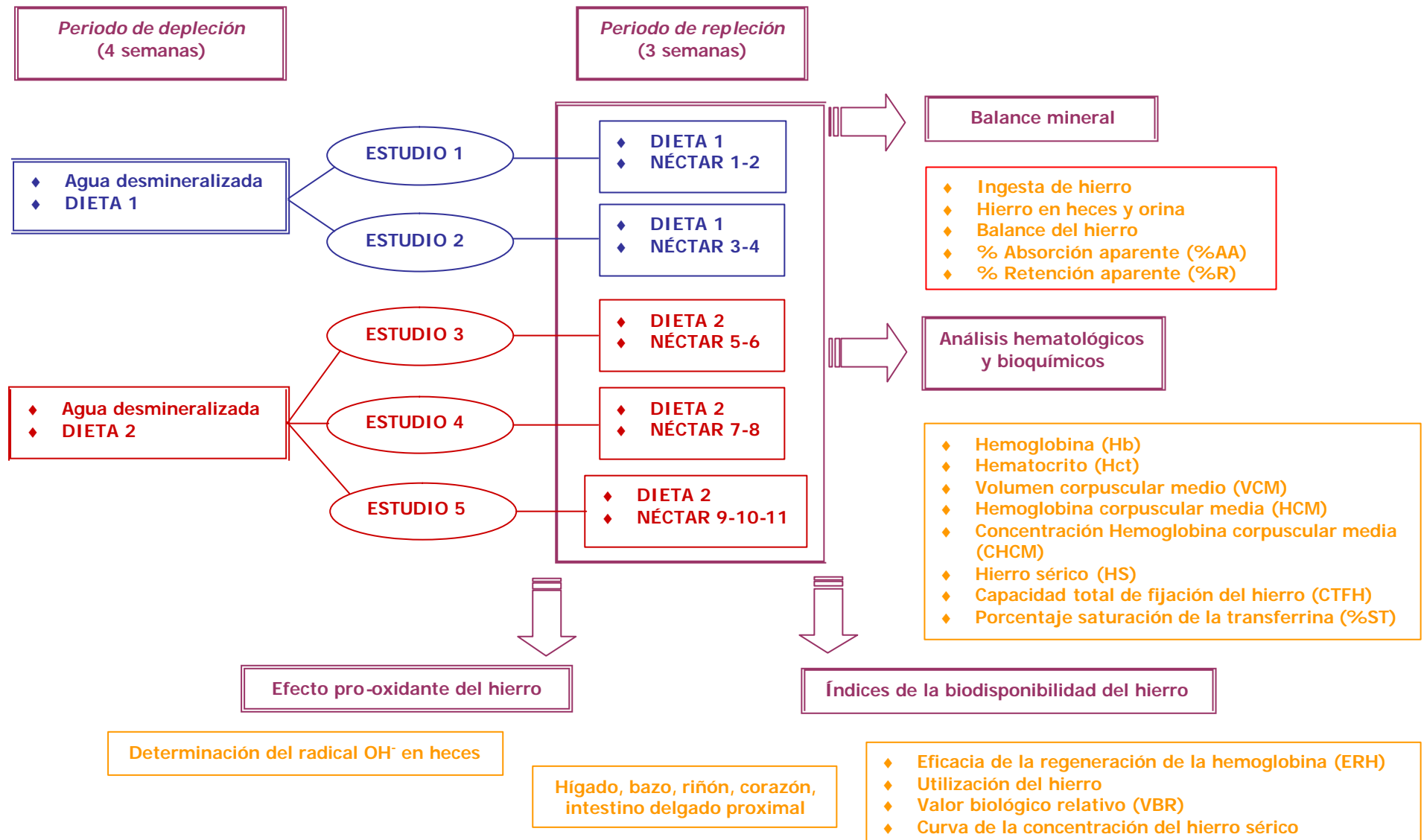


Figura 9. Representación gráfica del diseño experimental del presente estudio de investigación.

3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL Y ANALÍTICA

3.1. Animales

Las ratas de experimentación fueron suministradas por el animalario de la Universidad de Murcia (establecimiento autorizado para la producción y distribución de animales de laboratorio según el Real Decreto 223/1988, sobre la protección de los animales para experimentación y otros fines científicos, publicada en el B.O.E núm. 67 de 18 de Marzo de 1988). Para cada estudio se utilizó un total de 36 ratas macho del tipo Sprague-Dawley (SD) recién destetadas (21 días de edad), con un peso corporal medio de 40-50 g. Los animales se mantuvieron en una habitación con la temperatura, humedad relativa y periodos de luz-oscuridad controlada durante todo el estudio.

Periodo de depleción (Figura 10). Durante este periodo las 36 ratas fueron distribuidas en jaulas colectivas (6 animales/jaula) en un periodo de tiempo de 4-5 semanas, con el objetivo de disminuir las reservas corporales de hierro mediante una dieta deficiente en hierro (AIN-93G modificada). Para determinar el estado anémico de los animales al final de este periodo, se realizó una extracción de sangre de la vena coccígea o vena lateral de la cola para cuantificar los niveles de hemoglobina. El estado anémico se establece con niveles de hemoglobina < 6 g/100 ml, según el método oficial de la AOAC 974.31 (1998). Durante ese periodo de tiempo se registraron a diario los pesos de los animales y la ingesta de la dieta.

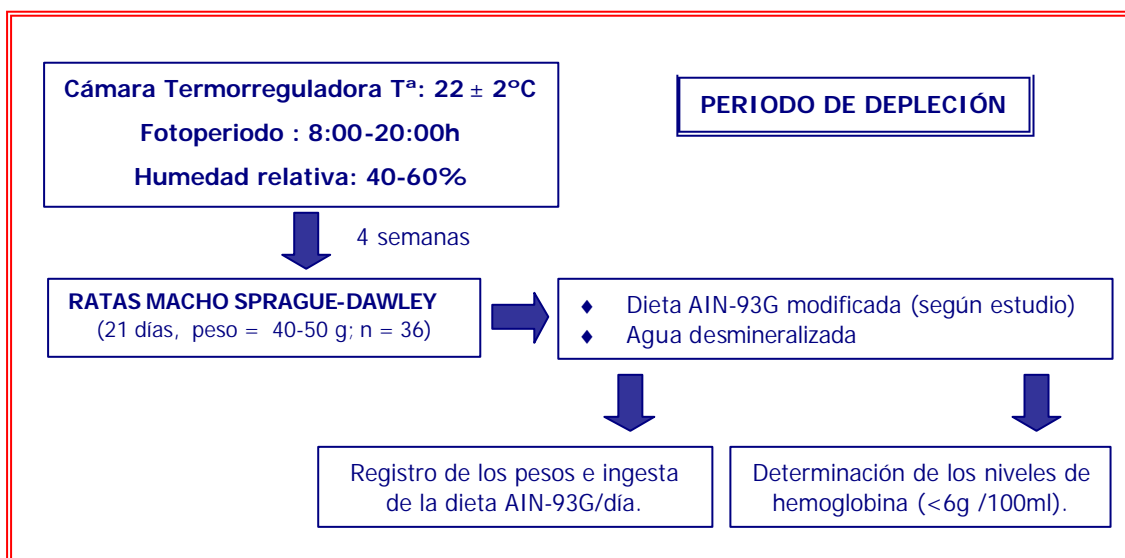


Figura 10. Esquema del periodo de depleción durante el estudio *in vivo* en ratas.

Periodo de repleción. Una vez alcanzados los niveles de hemoglobina deseados para considerar a los animales anémicos, se dividieron en dos grupos homogéneos (n = 18) con un peso corporal y concentración de hemoglobina similares. Los animales fueron alimentados con la misma dieta utilizada en el *periodo de depleción*, y a través del néctar se les proporcionó la fuente de hierro correspondiente y las vitaminas, dependiendo del estudio (Tablas 11 y 12). Se realizaron tres periodos para el balance mineral utilizando 6 ratas para cada uno de ellos, introduciéndose entonces en jaulas metabólicas. Cada balance mineral duró tres días (Figura 12). Durante esos tres días, se anotó el peso corporal del animal, la cantidad de orina y heces que excretaban, la cantidad de comida que consumían y el volumen de néctar que ingerían cada día. Al final de cada balance las ratas fueron sacrificadas, determinándose los niveles hematológicos y bioquímicos en sangre. Al mismo tiempo se extrajeron diferentes piezas anatómicas para posteriormente determinar la concentración de hierro en las mismas (Figura 11).

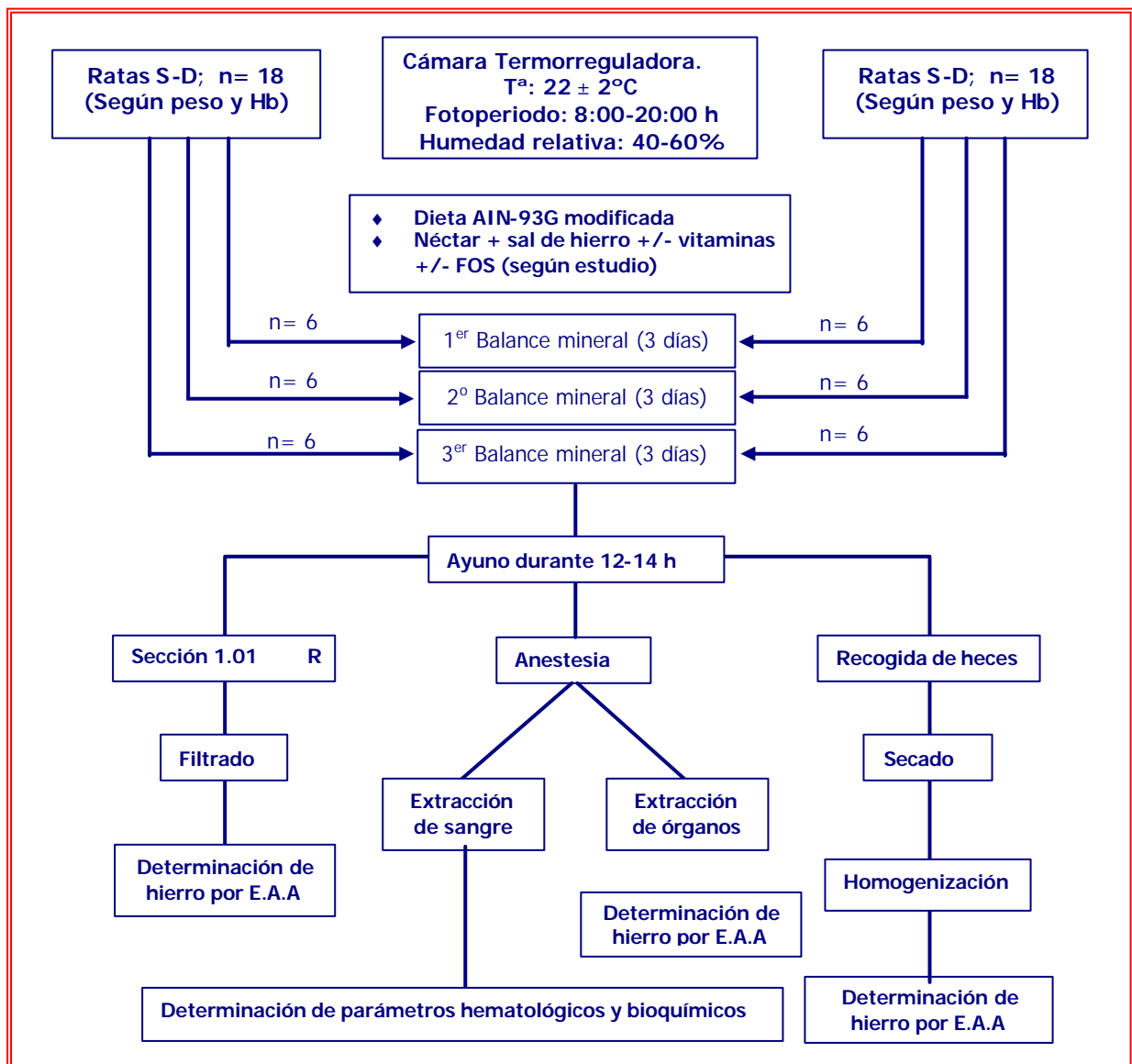


Figura 11. Esquema del periodo de repleción durante el estudio *in vivo* en ratas.

3.2. Pauta de recogida de datos y toma de muestras

3.2.1. Ingestión de alimento, anotación de peso en vivo, recogida de heces y orina

Reactivos utilizados

- Ácido clorhídrico (HCl) (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Ácido nítrico (HNO₃) (Merck, Darmstadt, Alemania)

Material utilizado

- Balanza granatario (Sartorius, Göttingen, Alemania)
- Filtros de membrana de acetato de celulosa de 25 mm de diámetro y 0.45 µm de poro (Iwaki glass, Japón)
- Jaulas metabólicas de plástico (Techniplastgazzada, Bugugiatte, Italia)
- Jeringuillas de 10 ml (Becton Dickinson, New Jersey, USA)
- Papel de filtro Whatman nº 41, exento de cenizas (Midstone, Kent, Inglaterra)
- Colectores urinarios de 120 cc (Enfa S.A., Barcelona, España)

Procedimiento

En las Figuras 10 y 11, se han representado los dos periodos en los que quedan divididos cada uno de los estudios. En el *periodo de depleción* (Figura 10), las ratas fueron pesadas al inicio y, diariamente, a lo largo de las cuatro semanas. El alimento y el agua de bebida (desionizada) se proporcionaron *ad libitum*, para cada grupo de 6 animales, cuantificando diariamente la ingesta de alimento y el volumen de agua.

Durante la fase de repleción las ratas fueron sometidas a un balance mineral de tres días durante tres semanas (Figura 12). Para ello, las ratas fueron introducidas individualmente en jaulas metabólicas, manteniendo las mismas condiciones ambientales que en periodo de depleción. Antes del comienzo de la experiencia las jaulas, los recipientes de polietileno utilizados para la recogida de heces y orina, los comederos, bebederos y los distintos botes para la recogida de muestras, se lavaron en HNO₃ al 10% y posteriormente se enjuagaron tres veces con agua desionizada. Durante los tres días de balance mineral, los pesos de los animales, el volumen de orina, peso inicial y final de la comida, y el volumen inicial y final del néctar fueron registrado diariamente.

Las muestras de heces y orina se prepararon para la determinación mineral del hierro, para ello, a la orina se le añadió HCl 0.5 M en una proporción de 10mL HCl/l de orina

(López y col., 2000), luego se filtró a través de papel Whatman n° 41 exento de cenizas para eliminar restos de comida, heces o cualquier material grosero, y posteriormente, la orina limpia, se hizo pasar a través de filtros de 0.45 µm de poro. La orina recogida de esta manera se almacenó a una Tª de 4°C. Las heces se depositaron directamente en recipientes estériles de plástico conservándose a una Tª de -20°C.

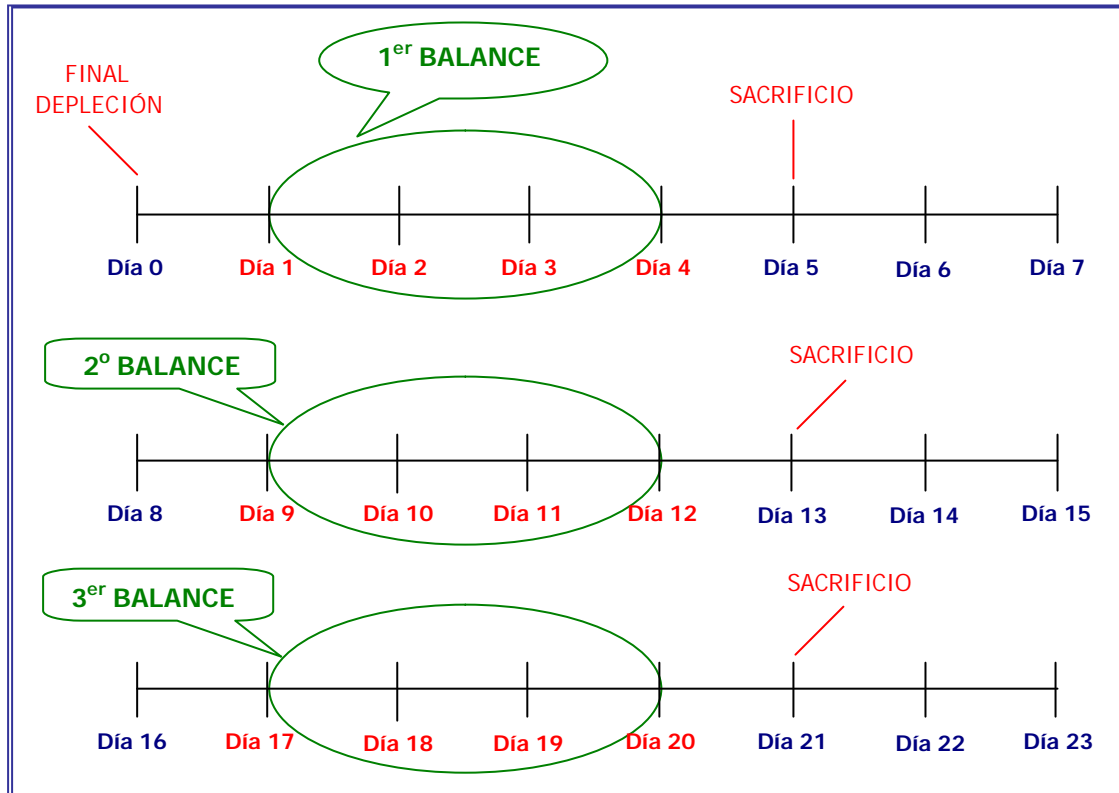


Figura 12. Etapas cronológicas durante el periodo de depleción

3.2.2. Anestesia y disección

Reactivos utilizados

- Éter etílico ((CH₃CH₂)₂O) (Probus, Barcelona, España)
- Solución salina fisiológica (9 g de NaCl/l)
- Anticoagulante heparina (Analema, Vigo, España)

Material utilizado

- Algodón hidrófilo.
- Balanza de precisión modelo ER-180A (Salter, Tokio, Japón)
- Balanza granatario (Sartorius, Göttingen, Alemania)
- Bolsas de plástico de cierre hermético 80 x 120 mm (Vidra Foc, España)
- Campana de anestesia

- Guantes de latex (Ibertex, Barcelona, España)
- Hoja de bisturí nº 23 (Romed, Wilnis, Holanda)
- Hoja de bisturí nº 10 (Romed, Wilnis, Holanda)
- Mangos de bisturí nº 3
- Jeringuillas de 5 ml (Becton Dickinson, Huesca, España)
- Aguja estériles 0.6 x 25 mm (Becton Dickinson, Huesca, España)
- Pinzas de disección
- Tabla de disección
- Tijeras de disección
- Tubos de poliestireno con base redonda

Procedimiento

Al final de cada periodo de balance, se procedió al sacrificio de las ratas de la siguiente manera: los animales fueron introducidos en una campana de anestesia, en cuyo interior se depositaron varios trozos de algodón impregnados con éter etílico. Una vez anestesiados fueron pesados e inmovilizados mediante la fijación de sus extremidades en una tabla de disección. Posteriormente, se les practicó una disección a la altura de la línea media abdominal, se separó la piel y luego se abrió la cavidad abdominal permitiendo un perfecto acceso a la aorta abdominal al desplazar lateralmente las vísceras. De la aorta abdominal se extrajo un volumen de sangre de 4-5 ml y se transfirió a los tubos de plástico impregnados con heparina. Posteriormente, se procedió a la disección de las piezas anatómicas seleccionadas (corazón, hígado, bazo, riñón derecho, y los 20 primeros centímetros del intestino delgado, además de la tibia y fémur derecho). Durante todo el ensayo se cumplió la normativa sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (REAL DECRETO 1201/2005, de 10 de Octubre), además este estudio ha sido autorizado por el comité de bioética de la Universidad de Murcia.

3.2.3. Preparación de las muestras

Reactivos utilizados

- Éter de petróleo 40-60° (Probus, Barcelona, España)
- n-Hexano (C₆ H₁₄) (Panreac, Barcelona, España)
- Solución salina fisiológica (9 g de NaCl /L)

Material y equipo utilizado

- Balanza de precisión modelo ER-180A (Salter, Tokio, Japón)
- Balanza granatario (Sartorius, Göttingen, Alemania)
- Bolsas de plástico de 80 x 120 mm (vidra Foc, España)
- Estufa de desecación (aire forzado) modelo 201 (P-Selecta, Barcelona, España)
- Liofilizador modelo TD-3-MP (FTS System, New York, U.S.A.)

Procedimiento

Las piezas anatómicas se congelaron y liofilizaron durante un periodo de 3 días. Pasado ese tiempo se trituraron, homogenizaron y se almacenaron en bolsas herméticas hasta su posterior análisis. Previamente a la liofilización se abrió el corazón para conseguir un mayor desangrado, así como el intestino (sección longitudinal) con el fin de eliminar todos los restos de los procesos digestivos de acuerdo a la metodología descrita por Kreuzer y Kirchgessner (1991).

Las piezas óseas se sometieron a un tratamiento distinto, que consistió en la desecación de los huesos en una estufa a 95°C durante 24 h, seguido de un desengrasado con n-Hexano durante 12 h y posteriormente con éter de petróleo durante otras 12 h. Después se introdujeron en una estufa de aire forzado a una Tª de 95°C durante 5-6 h para estimar su peso seco (Ros, 1995).

Las muestras fecales, una vez congeladas a una Tª de -20°C, se descongelaron y posteriormente se desecaron durante 3 días a 80°C en una estufa de aire forzado hasta obtener un peso constante. Posteriormente se homogenizaron y se almacenaron hasta su posterior análisis.

En cuanto a la preparación de la orina, ésta no requirió una preparación especial, salvo la adición de HCL 0.5 M y el proceso de filtración según se ha descrito en la sección anterior.

3.2.4. Obtención de cenizas y determinación del contenido mineral

Las piezas anatómicas liofilizadas se pesaron e incineraron íntegramente en una mufla a 550° C durante 24 h, salvo en el caso del hígado del que sólo se utilizó una cantidad de 0.5 g del liofilizado. De las muestras de heces desecadas y molidas se incineró también una pequeña porción (0.5 g) del homogeneizado durante 12 h a 550°C. Una vez obtenidas las cenizas de las piezas anatómicas y de las muestras de heces se procedió a la determinación del contenido en hierro por espectrofotometría de absorción atómica (EAA) siguiendo el método 985.35 de la AOAC (1999).

Reactivos utilizados

- Ácido clorhídrico (37%) calidad Suprapur (HCl) (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Ácido nítrico calidad Suprapur (HNO₃) (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Agua desionizada
- Solución stock-patrón de 1000 mg/l (Fluka, Buchs, Suiza):
 - Hierro (n° cat. 44093)

Material y equipo utilizado

- Balanza de precisión modelo ER-180A (Salter, Tokio, Japón)
- Crisoles de porcelana C-4 (KPM, Berlín, Alemania)
- Espectrofotómetro de absorción atómica modelo 3100 (Perkin-Elmer, Norwalk, U.S.A.)
- Horno mufla modelo L3/S (Naberthem, Bremen, Alemania)
- Matraces aforados de 50 y 100 ml (Pobel, Madrid, España)
- Placa calefactora (P-Selecta, Barcelona, España)

Limpieza del material de laboratorio

Todo el material de vidrio y los crisoles de porcelana utilizados en la determinación del contenido mineral fueron lavados durante 24h en ácido nítrico (HNO₃) al 10% para arrastrar cualquier tipo de impurezas adheridas a las paredes del material, y posteriormente enjuagados tres veces con agua desionizada.

Procedimiento

Una vez obtenidas las cenizas de las distintas piezas anatómicas y muestras de heces, éstas fueron recogidas con 2 mL de HNO₃ puro y 5 ml de (HCl 37%), agitando suavemente sobre una placa calefactora hasta aproximadamente la mitad de su evaporación. La solución obtenida fue llevada a un matraz de 50 ml, al cual se le adicionaron los volúmenes de lavado de los crisoles, enrasando finalmente con agua desionizada. En el caso de las muestras de orina, se tomaron alícuotas de 0.5 ml de la misma y se llevaron hasta 50 ml en un matraz aforado, para su posterior lectura en el espectrofotómetro de absorción atómica. Las condiciones instrumentales se encuentran descritas en la Tabla 13.

Tabla 13. Condiciones instrumentales establecidas para la determinación del hierro

Elemento mineral	Longitud de onda (nm)	Apertura de rendija (nm)	Sensibilidad del chequeo (mg / L)
Fe	248.3	0.2	5.0

La calibración se realizó utilizando distintas diluciones del patrón del elemento mineral. En la Tabla 14 se muestran las concentraciones escogidas para elaborar la recta de calibrado así como la ecuación de la recta obtenida.

Tabla 14. Concentraciones de los patrones utilizados, ecuación de la recta de calibrado y coeficiente de linealidad (R^2) para la recta patrón.

Mineral	Concentración (ppm)					Ecuación de la recta ¹	R^2
	1	2	3	4	5		
Fe	*	*	*	*	*	$y = 2,86 \cdot 10^{-3} + 4,76 \cdot 10^{-2} x$	0,998

* Concentración (ppm) utilizada para elaborar la ecuación de la recta.

¹ Definición de las variables dependientes e independientes de la ecuación de la recta. y = concentración del elemento; x = absorbancia.

3.2.5. Determinación de parámetros hematológicos

Reactivos utilizados

- Anticoagulante heparina (Analema, Vigo, España)

Material y equipo utilizados

- Contador celular Vet ABC (Veterinary Animal Blood Counter, ABX Diagnostics, Montpellier, Francia)
- Tubos de plástico de poliestireno (Vidra Foc, España)
- Viales eppendorf (Tecnoquim S.L. España)

Procedimiento

El análisis hematológico fue realizado inmediatamente después de la obtención de la muestra sanguínea para evitar cualquier tipo de alteración debida al paso del tiempo. En el caso de no ser analizada en 2-3 horas, la sangre se refrigeró a 4°C durante 24 horas. De cada animal se obtuvieron 4-5 mL de sangre en total, distribuyéndose en viales eppendorf de 1.5 ml de capacidad para la posterior determinación de la concentración de hemoglobina, valor hematocrito, proteínas plasmáticas, y los índices eritrocitarios: volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM) y concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) en un contador celular. El resto de la sangre fue distribuida en tubos de plástico de poliestireno previamente heparinizados para la determinación de los parámetros bioquímicos.

3.2.6. Determinación de parámetros bioquímicos

Material y equipo utilizado

- Autoanalizador Cobas Mira Plus (Abx, Abx diagnostics, Montpellier, Francia)

- Centrífuga modelo 5416 (Eppendorf, Hamburg, Alemania)
- Tubos de plástico de poliestireno (Vidra Foc, España)

Procedimiento

La valoración de los parámetros bioquímicos se realizó sobre el plasma heparinizado de las muestras de sangre centrifugadas a 3500 x g durante 10 min.

Para la cuantificación del hierro sérico se utilizó una determinación colorimétrica con Ferrozine® (Hach Chemical Co., Ames, Iowa, U.S.A.) / ácido ascórbico. El fundamento de este método consiste en liberar el hierro que se encuentra unido a la transferrina por la adición de clorhidrato de guanidina. Posteriormente el hierro férrico liberado es reducido a hierro ferroso por la acción del ácido ascórbico. El hierro ferroso forma con el Ferrozine® un complejo color rojo. La intensidad de la coloración es directamente proporcional a la concentración de hierro y se mide fotométricamente a una longitud de onda de 562 nm. La ecuación aplicada para la determinación del hierro sérico fue la siguiente:

$$\text{Hierro sérico } (\mu\text{g}/100 \text{ ml}) = \frac{A_m - A_{bm}}{A_p} \times n$$

Donde A_m es la absorbancia de la muestra, A_{bm} es la absorbancia del blanco (reactivo colorimétrico), A_p es la absorbancia del patrón y n es el factor de conversión.

La capacidad total de fijación de hierro (CTFH) se encuentra aumentada en la anemia ferropénica, en la pérdida de sangre aguda y crónica, en la hepatitis y en la fase final del embarazo. Por el contrario, disminuye en la cirrosis hepática, hemocromatosis y nefrosis. El fundamento del método es añadir una solución saturante de hierro para bloquear la transferrina. El hierro no fijado es tratado con un agente precipitante (carbonato de magnesio) y posteriormente se centrifuga a 3000 rpm durante 15 min. El hierro ligado a la transferrina se valora directamente en el sobrenadante y se procesa como una muestra para la determinación del hierro sérico. La ecuación aplicada para la determinación del CTFH es:

$$\text{CTFH } (\mu\text{g}/100 \text{ ml}) = \frac{A_m}{A_p} \times C_p \times 3$$

Donde A_m es la absorbancia de la muestra, A_p es la absorbancia del patrón, C_p es la concentración del patrón expresado en $\mu\text{g} / 100 \text{ ml}$, y n es un factor de dilución igual a 3.

3.2.7. Cálculos realizados para la evaluación del balance mineral

En la evaluación del balance mineral se procedió a la determinación del porcentaje de absorción aparente y retención mineral respecto a la ingestión del mineral estudiado por los animales según el tipo de dieta y bebida.

El porcentaje de absorción aparente (AA) es el porcentaje de absorción del mineral ingerido respecto al excretado. El porcentaje de retención aparente (R) se considera como el porcentaje mineral retenido por la rata durante la experiencia respecto al mineral ingerido y por último la relación entre la retención y la absorción (R/A), la cual nos indica las pérdidas de hierro por la orina. Estos parámetros fueron calculados según las siguientes fórmulas:

$$AA (\%) = \frac{(I - EH)}{I} \times 100$$

$$R (\%) = \frac{(I - EH - EO)}{I} \times 100$$

Donde I es la cantidad de mineral ingerido por al rata durante el balance; EH es la cantidad de mineral excretado en las heces durante el periodo de balance; y EO es la cantidad de mineral excretado por la orina durante el periodo de balance.

3.2.8. Índices de la biodisponibilidad del hierro

3.2.8.1. Porcentaje de la biodisponibilidad.

Se valoró utilizando la determinación de la eficacia de la regeneración de la hemoglobina (ERH). Ésta se calcula como el porcentaje del hierro añadido consumido que fue retenido en la hemoglobina circulante (Mahoney y Hendrick, 1982; Forbes y col., 1989).

$$ERH (\%) = [(HbFe_f - HbFe_i) \times 100] / InFeTo$$

Donde $HbFe_f$ es el contenido de hierro de la hemoglobina al final del periodo de repleción; $HbFe_i$ es el contenido de hierro de la hemoglobina al inicio del periodo de repleción, y $InFeTo$ es

la ingesta de hierro total durante el periodo de repleción, calculado como el producto de la concentración del hierro dietético por la cantidad de alimento consumido por cada animal durante el experimento. La HbFe fue calculada considerando un volumen de sangre de 0.067 ml sangre / g peso corporal de la rata, y un contenido de hierro en la hemoglobina de 3.4 mg Fe / g Hb.

$$\mathbf{HbFe} = \text{Peso corporal (g)} \times \text{Hb (g/l)} \times 0.067 \text{ mL / g} \times 3.4 \text{ mg Fe / g Hb}$$

3.2.8.2. Utilización del hierro:

Esta variable relaciona la ERH con el porcentaje de hierro del néctar.

$$\mathbf{\text{Utilización del hierro (mg)}} = (\% \text{ ERH} \times \% \text{ Fe néctar}) / 100$$

3.2.8.3. Valor de la biodisponibilidad relativa (VBR).

Calculado como el cociente entre la ERH o utilización del hierro de la fuente de hierro estudiada y la ERH o utilización del hierro de la fuente de hierro de referencia (sulfato ferroso).

$$\mathbf{VBR} = (\text{Utilización del hierro de la fuente de hierro estudiada} \times 100) / (\text{Utilización del hierro de la fuente de hierro de referencia})$$

3.2.8.4. Medida de la curva de la concentración de hierro sérico (CHS).

Este método está basado en el trazado de las concentraciones de hierro sérico después de la administración por vía oral de los compuestos de hierro a las ratas (Ekenved y col., 1976). A diferencia de los métodos establecidos por Dietzfelbinger (1987) y Ekenved y col. (1976), nosotros partimos de ratas deficientes en hierro ($hb < 6$ g/dl). Antes de iniciar el ensayo, se seleccionaron 5 ratas para cada compuesto de hierro con pesos similares. Los compuestos de hierro en estudio (pirofosfato férrico micronizado, bisglicinato ferroso y sulfato ferroso) se administraron con el néctar de frutas. La dosis fue de 2 mg Fe / Kg de peso corporal, según se recomienda en la técnica utilizada Dietzfelbinger (1987) y Ekenved y col. (1976). La toma de sangre se realizó a las 0.5, 1, 2, 4 y 12 horas de la administración del néctar. Los valores del área bajo la curva (ABC) para los compuestos de hierro fueron calculados como la cantidad de hierro sérico total. Se calculó la diferencia entre el ABC del PFM y BF, y la del SF (como control)

3.3. Detección y cuantificación de radicales hidroxilo en muestras fecales

Reactivos utilizados

- D-Glucosa (Sigma, St. Louis, U.S.A.)
- Ácido etilendiaminotetracético, sal sódica (Na_2EDTA) (Sigma St. Louis, U.S.A.)
- Tabletas de Tris salino tamponadas (Sigma St. Louis, U.S.A.)
- Ácido metanosulfínico, sal sódica ($\text{CH}_3\text{SO}_2\text{Na}$) (Sigma St. Louis, U.S.A.)
- Ácido benzenosulfínico, sal sódica ($\text{C}_6\text{H}_5\text{SO}_2\text{Na}$) (Sigma St. Louis, U.S.A.)
- Ácido clorhídrico (HCl) 12 M (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Ácido clorhídrico (HCl) 1 M (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Hidróxido sódico (NaOH) 1 M (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4) 1 M (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Acetato sódico ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$) 0.5 M (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Ácido acético glacial (CH_3COOH) 0.5 M (Merck, Darmstadt, Alemania)
- *n*-butanol (Panreac, Barcelona, España)
- Piridina (Fluka, Buchs, Suiza)
- Sal Fast Blue BB ($\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_3\text{Cl} \times \frac{1}{2} \text{ZnCl}_2$) 0.03M (Sigma St. Louis, U.S.A.)
- Tolueno (Panreac, Barcelona, España)
- Dimetil sulfóxido ($(\text{CH}_3)_2\text{SO}$) (Sigma St. Louis, U.S.A.)

Preparación de soluciones

- Medio de incubación salino tris-tamponado. Una tableta del tampón se disolvió en 15 mL de agua desionizada conteniendo un 5% de dimetil sulfóxido (0.7 mol/l), glucosa (0.1%), y Na_2EDTA (50 mmol/l) a 37°C.
- Solución Madre de la sal sódica del ácido benzenosulfínico, (ABS). Se pesaron 0.04104 g de la sal y se disolvieron en 25 ml de agua destilada para obtener una concentración 0.01M. A partir de la solución madre se prepararon los patrones necesarios para la recta de calibración. Las concentraciones de los patrones fueron los siguientes:
0 $\mu\text{mol/l}$, 10 $\mu\text{mol/l}$, 30 $\mu\text{mol/l}$, 50 $\mu\text{mol/l}$, y 70 $\mu\text{mol/l}$.
- Tampón acetato sódico. Se preparó 0.5 mol/l de acetato sódico y 0.5 mol/l de ácido acético, en una proporción 2:1 hasta obtener un pH 5.0.

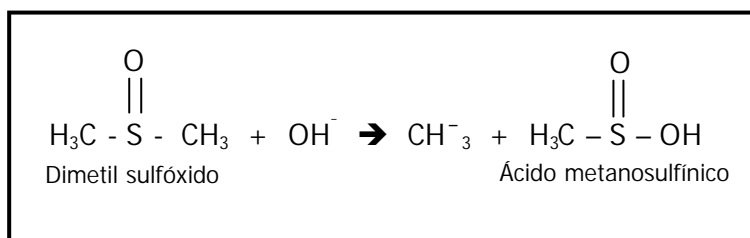
Material y equipo utilizados

- Tubos de vidrio con rosca (Vidra Foc, España)
- Tubos de ensayo (Vidra Foc, España)

- Pipetas Pasteur de plástico (Vidra Foc, España)
- Parafilm "M" (Chicago, Illinois, U.S.A.)
- pH-metro Basic 20 (Crison instruments S.A., Barcelona, España)
- Centrífuga modelo 5804 R (Eppendorf, Hamburg, Alemania)
- Espectrofotómetro de absorción molecular modelo U-2000 (Hitachi, Tokio, Japón)
- Matraces aforados de vidrio (Vidra Foc, España)
- Baño termostático modelo Prescisdig (P-Selecta)

Procedimiento

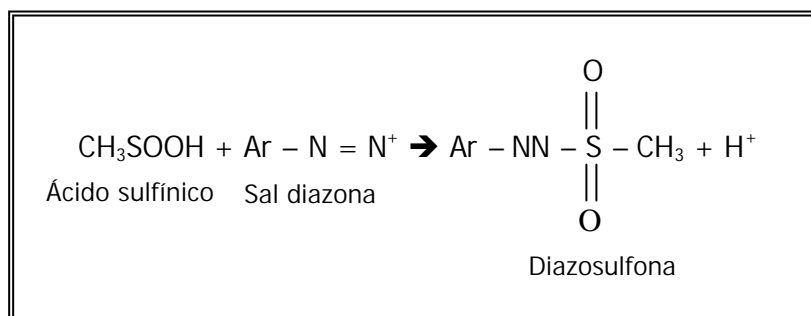
El efecto del hierro dietético sobre la producción de radicales libres en muestras fecales fue desarrollado por Babbs y Gale (1987), y Babbs y Steiner (1990) y se basa en la reacción:



En nuestro ensayo hemos cuantificado ácido bencenosulfínico en vez del metanosulfínico al ser un compuesto más estable e igual de útil para su utilización en este método (comunicación personal del autor del ensayo Charles F. Babbs).

Una porción de las heces obtenidas durante los tres periodos de balance, se destinaron directamente en fresco para la determinación de la capacidad de generación de radicales libres. De cada muestra fecal se tomaron 1-2 g de peso fresco y se incubaron en tubos de ensayo con 10 ml del medio salino tris-tamponado (pH 7.0), sellados ligeramente con parafilm para permitir el escape de gas mientras se mantiene una baja tensión para el oxígeno. Los tubos de ensayo se incubaron en un baño termostático a 37°C durante toda la noche. Posteriormente, fueron centrifugados a 900 x g durante 10 min. a Tª ambiente. El sobrenadante obtenido se transfirió un nuevo tubo y se llevó a pH 1.0 con HCl 12 M y luego a pH 7.4 añadiendo NaOH 1 M. Se volvieron a centrifugar a 900 x g durante 10 min. a Tª ambiente, y los sobrenadantes (donde se encuentra la mayoría del ácido sulfínico) se almacenaron a -20°C hasta la posterior determinación del ácido bencenosulfínico. Los patrones fueron preparados inmediatamente antes de cada ensayo (la preparación de los patrones se describe en el punto preparación de las soluciones), y tanto los patrones como las muestras se procesaron de igual manera.

Una alícuota con 2 ml de cada sobrenadante se mezcló con 0.2 ml H₂SO₄ 1M y con 4 mL de *n*-butanol. La fase superior se transfirió a otro tubo donde se le añadieron 2 ml del tampón acetato sódico (0.5 M, pH 5.0) y posteriormente se centrifugó a 500 x g durante 3 min. Se descartó la fase superior y la fase inferior se ajustó a pH 3.5 con HCl 1M, luego se mezcló con la sal Fast Blue BB (0.03 M) para formar un producto coloreado (amarillo canario). El color desarrollado está basado en la reacción de organo-sulfinatos con sales diazonas altamente coloreadas, descritas por Ritchie y col. (1961), para formar diazosulfonas que son secuestradas selectivamente con disolventes orgánicos.



La formación del producto coloreado tiene lugar tras 10 min. en la oscuridad, pasado ese tiempo se añadió a cada tubo 1.5 mL de tolueno: *n*-butanol (3:1 en volumen) y se mezcló durante 2 min., posteriormente los tubos fueron centrifugados a baja velocidad durante 3 min. La fase superior (tolueno – butanol) es retirada y transferida a otros tubos, donde se le añaden 2 mL de agua saturada en butanol, para eliminar lo que queda de la sal diazona que no ha reaccionado. Se vuelven a centrifugar (500 x g) durante 3 min. y la fase superior que contiene las diazosulfonas son transferidas a cubetas. A cada cubeta se le adicionó 0.1 mL de piridina – ácido acético glacial (95:5) para estabilizar el color. Las muestras fueron leídas en un espectrofotómetro de absorción molecular a 420 nm frente a un blanco preparado de la misma manera que las muestras. En la Tabla 15 se representan las diferentes ecuaciones obtenidas en la determinación del ácido bencenosulfinico en función de cada periodo de balance y estudio Se realizó la determinación del ABS en el primer y tercer balance de cada estudio, excluyendo el segundo balance como periodo intermedio.

Tabla 15. Ecuación de la recta de calibrado y coeficiente de linealidad (R^2) para cada estudio y periodo de balance.

	Periodo de Balance	Ecuación de la recta ¹	R^2
Estudio I	1 ^{er} Balance	$y = 0,0095 x + 0,0073$	0,9990
	3 ^{er} Balance	$y = 0,0091 x - 0,0023$	0,9999
Estudio II	1 ^{er} Balance	$y = 0,0096 x - 0,0034$	0,9997
	3 ^{er} Balance	$y = 0,0092 x - 0,0168$	0,9976
Estudio III	1 ^{er} Balance	$y = 0,0078 x - 0,0137$	0,9946
	3 ^{er} Balance	$y = 0,0078 x - 0,0134$	0,9946
Estudio IV	1 ^{er} Balance	$y = 0,0085 x - 0,0034$	0,9990
	3 ^{er} Balance	$y = 0,0099 x - 0,0118$	0,9957
Estudio V	1 ^{er} Balance	$y = 0,0092 x + 0,0097$	0,9978
	3 ^{er} Balance	$y = 0,0104 x + 0,0103$	0,9992

¹ Definición de las variables dependientes e independientes de la ecuación de la recta. y = absorbancia; x = concentración del ácido bencenosulfínico.

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En los cinco estudios en los que se dividió la presente tesis fue realizado un análisis de varianza (ANOVA) para comprobar si existen diferencias en la administración del néctar enriquecido con SF o PFM junto con/sin la vitamina o vitaminas correspondientes según el estudio, sobre los parámetros peso corporal inicial y final, ganancia de peso, ingesta total de alimento, parámetros relacionados con el balance mineral del hierro, parámetros relacionados con los índices de biodisponibilidad y la utilización del hierro, parámetros hematológicos y bioquímicos, en las concentraciones de hierro en los órganos y en la producción de radicales hidroxilo medidos a los animales, durante cada uno de los tres periodos de repleción. En aquellos casos en los que se detectaron diferencias debidas a las anteriores fuentes de variación se realizó un análisis de comparaciones múltiples por parejas utilizando las pruebas de Tukey y T3 Dunnett.

Uno de los métodos de medición de la biodisponibilidad del hierro de los diferentes compuestos de hierro se basa en el cálculo de los valores del área bajo la curva (ABC) obtenidos tras la determinación del hierro sérico en diferentes tiempos tras la ingesta del néctar problema, para ello se utilizó el programa WinNonlin Professional 5.0 (Pharsight Corporation, USA), que realiza un análisis no compartimental de los datos.

Para establecer una relación entre dos o más variables cuantitativas se realizó un análisis de correlación, utilizando el coeficiente de correlación de Pearson a un nivel de significación de 0,05. Además, se realizó un análisis de regresión múltiple de los cambios en la hemoglobina (ganancia o cambio de la hemoglobina y la ganancia de hierro en la hemoglobina) relativos a la ingesta de hierro para cada fuente de hierro durante los tres periodos de repleción, con el fin de observar relaciones de dependencia entre las variables.

Para poder seleccionar el tipo de néctar más idóneo por sus ingredientes (compuesto de hierro, vitaminas y/o FOS), se procedió al análisis de conglomerados, o análisis cluster que tiene como objetivo lograr una clasificación o agrupamiento de los individuos en grupos homogéneos, según el comportamiento de éstos en una serie de variables, que en nuestro caso fueron: los porcentajes de absorción y retención aparente y la eficiencia de regeneración de la hemoglobina.

En todos los casos un valor de $p < 0,05$ fue considerado como significativo. Los resultados de la presente tesis muestran el valor medio y el error típico obtenido de seis ratas por cada néctar problema. El análisis estadístico se realizó mediante el programa informático SPSS para Windows versión 11.5 (SPSS Inc., Chicago, IL).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1^{er} ESTUDIO

1. Biodisponibilidad del pirofosfato férrico micronizado (PFM) empleado en el enriquecimiento del néctar de frutas. Método de la Eficiencia de Regeneración de la Hemoglobina (ERH).

Este método está basado en la repleción de la hemoglobina en ratas anémicas después de la suplementación con una fuente de hierro problema, teniendo como referencia la sal de hierro sulfato ferroso (SF) que se administra a un grupo control de ratas (Mahoney y Hendricks., 1982; Zhang y col., 1989).

1.1. Crecimiento y consumo de alimento

Durante el estudio fueron medidos distintos parámetros fisiológicos en los animales, tales como el *peso corporal inicial y final*, la *ganancia de peso*, y la *ingesta total de alimento (dieta AIN-93G + néctar)*, con el objetivo de evaluar posibles diferencias como consecuencia del consumo de los diferentes tipos de néctar enriquecidos con PFM o SF.

La Tabla 1.1 muestra el análisis de varianza realizado en los parámetros medidos a los animales para evaluar el crecimiento de los mismos: *peso corporal inicial y final*, *ganancia de peso*, *ingesta total de alimento* (ingesta de la dieta + ingesta del néctar), durante el periodo de repleción. Tal y como se muestra, todos estos parámetros, excepto el *peso final* en el 2^o balance, no se vieron afectados significativamente ($p > 0.05$) por el consumo de ambos tipos de néctar, presentando los dos grupos de animales un ritmo de crecimiento muy similar.

Tabla 1.1. Análisis de varianza del peso corporal inicial y final, ganancia de peso e ingesta total de alimento tras la administración del SF o PFM añadidos a un néctar de frutas, durante los tres periodos de balance.

Variables	1 ^{er} Balance	2 ^{do} Balance	3 ^{er} Balance
<i>Peso corporal inicial</i>	NS	NS	NS
<i>Peso corporal final</i>	NS	*	NS
<i>Ganancia de peso</i>	NS	NS	NS
<i>Ingestión total de alimento</i>	NS	NS	NS

Diferencias significativas para: * $p < 0.05$; NS = no significación

En la Tabla 1.2 se muestran los valores medios y el error típico de los parámetros relacionados con el crecimiento y la ingesta en las ratas alimentadas con el néctar 1 y 2 (descritos en la Tabla 11 de la sección Material y Métodos) durante los tres periodos de balance.

Para poder describir mejor los cambios más significativos en los parámetros fisiológicos, primero se comparó entre sí el efecto de los dos tipos de néctar en cada periodo de balance, y

después con respecto al grupo en depleción (excepto en la ingesta total, puesto que las ratas en depleción no tomaron néctar). También se estudió la evolución de cada uno de estos parámetros a lo largo de los tres periodos de balance.

Tabla 1.2. Crecimiento e ingesta total de alimento en ratas, tras la administración del SF o PFM añadidos a un néctar de frutas durante el periodo de depleción – repleción.

	Néctar	S	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Ganancia en peso (g)	Ingesta total de alimento (g)
Depleción (a)	–		152,57 ± 26,48	161,90 ± 26,79	9,33 ± 4,37	28,00 ± 2,65
Repleción (b)						
1^{er} Periodo	SF		155,03 ± 17,67	167,20 ± 17,20	10,30 ± 4,33	177,66 ± 18,57 / [*]
	PFM		158,00 ± 10,79	172,85 ± 10,94	12,47 ± 2,65	226,57 ± 41,28 / [*]
2^o Periodo	SF		229,75 ± 7,14 / [*]	243,45 ± 3,43 ^{a/}	13,70 ± 6,43	282,20 ± 13,24 / [*]
	PFM		197,95 ± 10,29 / [*]	215,30 ± 9,30 ^{b/}	17,35 ± 2,40	306,23 ± 20,72 / [*]
3^{er} Periodo	SF		225,55 ± 16,04 / [*]	248,33 ± 15,67 / [*]	22,78 ± 4,22 / [*]	256,58 ± 48,12 / [*]
	PFM		195,83 ± 20,43	208,05 ± 24,19	12,23 ± 4,68	253,86 ± 69,50 / [*]

Cada valor representa la media ± error típico, n=6

^{a-b} Diferentes letras dentro de la misma columna, para cada parámetro y en cada periodo de repleción muestran diferencias estadísticamente significativas (p<0,05).

[/] La presencia de asteriscos dentro de la misma columna para cada uno de los tres periodos de repleción indica diferencias significativas (p<0,05) con respecto al periodo de depleción.

La ausencia de superíndices indica que no existen diferencias estadísticamente significativas

En el 1^{er} periodo de balance, los *pesos iniciales y finales* de los grupos de ratas alimentadas con dos tipos de néctar (155,03 y 167,20 g para el SF y 158,00 y 172,85 g para el PFM, respectivamente) fueron similares entre sí y muy semejantes al grupo en depleción (152,57 y 161,0 g, respectivamente). Este hecho se relaciona con la similitud encontrada en la *ganancia en peso* para todos los grupos, incluso en las ratas en depleción. La *ingesta total de alimento* fue ligeramente superior en las ratas que ingerían el néctar con PFM (226,57 g), aunque no existieron diferencias significativas debido a la alta variación entre individuos al compararlos con las ratas que ingerían el néctar con SF.

En el 2^o periodo de balance el tipo de néctar ingerido afectó significativamente (p<0,05) al *peso final*, siendo mayor para el grupo SF (243,45 g). Los *pesos iniciales y finales* de los animales fueron estadísticamente superiores a los del grupo en depleción, lo cual es lógico debido a que la *ingesta total* de alimento fue superior en esta etapa. Sin embargo, al igual que en el 1^{er} periodo de balance, la *ganancia de peso* aunque fue ligeramente superior, no mostró diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) con el grupo en depleción.

Finalizado el 3^{er} periodo de balance, no se observaron diferencias significativas entre los grupos de ratas que ingirieron el néctar con PFM ó SF. Es decir, ambos grupos mostraron un ritmo de crecimiento muy similar. Sin embargo, si hubo diferencias significativas (p<0,05) en la *ganancia en peso* de los animales que ingirieron el néctar con SF (22,78 g) en comparación con las ratas en depleción (9,33 g).

En resumen, durante las tres semanas que duró el periodo de repleción, los efectos del néctar enriquecido con PFM o SF sobre el crecimiento y la *ingesta total*, fueron muy similares. Aunque en principio se observaron diferencias en los *pesos iniciales y finales*, estas no fueron estadísticamente significativas. Este hecho probablemente se debe a la elevada variabilidad de las respuestas entre los individuos estudiados pertenecientes a un mismo grupo.

1.2. Balance mineral

La Tabla 1.3 muestra el balance mineral del hierro en los tres periodos, tiempo en los que se administró a las ratas el néctar enriquecido con los diferentes compuestos de hierro. El grupo en depleción fue desestimado por presentar valores negativos en el balance del hierro, porcentajes de absorción, retención y la relación entre ambos. El balance negativo se debe a una mayor pérdida de hierro a través de las heces y a una baja ingesta de mineral (2,5 mg Fe/Kg), situación que tiene lugar en un estado de deficiencia en hierro, donde las reservas de hierro, el transporte del hierro y la producción de enzimas y proteínas con hierro van disminuyendo.

En el 1^{er} periodo de balance, la *cantidad de hierro ingerido* en el grupo de ratas alimentadas con el néctar PFM (11,16 mg) fue estadísticamente superior ($p < 0,05$) al grupo alimentado con el néctar SF (7,93 mg). La *excreción fecal* fue similar en ambos grupos, en cambio la *excreción urinaria* fue estadísticamente superior ($p < 0,05$) para el grupo alimentado con el néctar SF (22,21 μg) frente al grupo alimentado con PFM (4,21 μg). A pesar de las diferencias en la *ingesta de hierro* y en la *excreción urinaria*, el *balance de hierro*, el *porcentaje de absorción y retención aparente* no se vieron afectados. Al ser las pérdidas de hierro en la orina tan bajas, los *porcentajes de retención aparente* apenas se diferencian de los *porcentajes de absorción aparente*. Una cifra cercana a 1 en el cociente entre la *retención* y la *absorción aparente*, nos indica que las pérdidas de hierro en la orina son pequeñas y viceversa (Sarriá y Vaquero., 2004).

En el 2^o y 3^{er} periodo de balance, no se observó ningún efecto según el tipo de néctar (PFM o SF) en los parámetros evaluados para el cálculo del balance mineral durante el periodo de repleción.

Tabla 1.3. Absorción y retención del hierro, tras la administración del SF y PFM a un néctar de frutas durante los tres periodos de repleción.

	Néctar	Ingesta (mg Fe)	Excreción fecal (mg Fe)	Excreción urinaria (mg Fe)	Balance del hierro ¹ (mg)	Absorción aparente ² (%)	Retención ³ (%)	Retención x100 / Absorción
(c)								
Repleción								
1^{er} Periodo	SF	7,93 ± 0,95 ^{b/b}	1,47 ± 0,15 ^{/b}	22,21 ± 5,90 ^a	6,45 ± 0,97 ^{/ab}	80,33 ± 3,85 ^{/a}	80,04 ± 3,84 ^{/a}	99,65 ± 0,08
	PFM	11,16 ± 3,58 ^a	1,54 ± 0,68 ^{/c}	4,21 ± 1,63 ^{b/b}	9,62 ± 1,77	85,65 ± 3,43 ^{/a}	85,50 ± 3,40 ^{/a}	99,82 ± 0,08
2^o Periodo	SF	12,09 ± 0,60 ^{/a}	3,89 ± 0,39 ^{/ab}	42,40 ± 12,80	8,20 ± 0,61 ^{/a}	67,74 ± 3,33 ^{/b}	67,32 ± 3,25 ^{/b}	99,40 ± 0,12
	PFM	13,67 ± 1,13	4,20 ± 0,61 ^{/b}	22,91 ± 3,93 ^{/a}	9,47 ± 0,95	69,25 ± 3,24 ^{/b}	69,06 ± 3,23 ^{/b}	99,72 ± 0,05
3^{er} Periodo	SF	10,81 ± 2,29 ^{/b}	6,27 ± 1,31 ^{/a}	29,92 ± 5,28	4,54 ± 1,01 ^{/a}	41,90 ± 1,34 ^{/c}	41,60 ± 1,31 ^{/c}	99,29 ± 0,12
	PFM	12,46 ± 1,99	6,66 ± 0,45 ^{/a}	19,09 ± 3,69 ^{/a}	5,81 ± 1,62	44,88 ± 6,06 ^{/c}	44,870 ± 6,06 ^{/c}	99,28 ± 0,29

Media ± Error típico, n=6

^{a-b} Diferentes letras dentro de la misma columna, para cada parámetro y en cada periodo de repleción muestran diferencias estadísticamente significativas (p < 0.05).

^{/a-c} Diferentes letras dentro de la misma columna para un mismo compuesto (SF y PFM) indican diferencias significativas (p < 0.05) para cada uno de los tres periodos de repleción.

¹Balance del hierro = Ingesta de hierro (mg) – Excreción fecal (mg)

²Absorción aparente (%) = [Ingesta de hierro (mg) – Excreción fecal (mg)] x 100 / Ingesta de hierro (mg).

³Retención (%) = [Ingesta de hierro (mg) – (Excreción fecal (mg) + Excreción urinaria (mg))] x 100 / Ingesta de hierro (mg).

La ausencia de superíndices indica que no existen diferencias estadísticamente significativas

En general, en situaciones de estrés fisiológico, como la hipoxia (Wheby y Crosby, 1964), anemia (Conrad y col., 1964, Weintraub y col., 1965a), depleción de las reservas de hierro (Conrad y Crosby., 1963; Charlton y col., 1965) y una alimentación baja en hierro (Bannerman y col., 1962; Wheby y Crosby, 1964; Oates y Morgan, 1996) la absorción del hierro aumenta. Por este motivo los elevados valores en el *porcentaje de absorción aparente* (80,33% para SF y 85,65% para PFM) durante el 1^{er} periodo de repleción están justificados. Sin embargo, el *porcentaje de absorción aparente* en las ratas alimentadas con el néctar SF o PFM disminuyeron progresivamente en el 2^o (67,74% para SF y 69,25% para PFM), y 3^{er} periodo de repleción (41,90% para SF y 44,70% para PFM) debido a que las necesidades del mineral se van cubriendo al suministrar un aporte de hierro de forma continuada. Esta disminución en el *porcentaje de absorción aparente* está inversamente correlacionada con la *excreción fecal* tanto en las ratas alimentadas con el néctar PFM ($r = -0,899$; $p < 0,01$) como en las ratas alimentadas con el néctar SF ($r = -0,802$; $p < 0,01$). Además, la *ingesta de hierro* en ambos grupos de ratas aumentó hasta el 2^o periodo de repleción, disminuyendo ligeramente en el 3^{er} periodo de repleción, este aumento solamente fue significativo ($p < 0,05$) para el grupo de ratas alimentadas con el néctar SF.

Si relacionamos la *ingesta de hierro* con el *balance del hierro* existe una correlación positiva entre ambos parámetros, siendo para el grupo de ratas alimentadas con el néctar SF ($r = 0,634$; $p < 0,05$) y para el néctar PFM ($r = 0,729$; $p < 0,01$), pero en cambio no existe una relación significativa entre la *ingesta de hierro* y el *porcentaje de absorción aparente*. Este mismo planteamiento también fue sugerido por Cook y col (1973) y Layrisse y García-Casal (1997) los cuales observaron que el *porcentaje de absorción aparente* disminuía a medida que la *ingesta de hierro* aumentaba, pero que el hierro total absorbido (*balance del hierro*) era más elevado. Este hecho lo hemos comprobado entre el 1^{er} y 2^o periodo de repleción.

1.3. Biodisponibilidad y utilización del hierro

La biodisponibilidad del hierro puede ser cuantificada como la cantidad de hierro adquirida por la hemoglobina durante el periodo de repleción (Anderson y col., 1972; Mahoney y col., 1974).

1.3.1. Eficiencia de la regeneración de la hemoglobina (ERH)

En la Tabla 1.4 se muestran los valores obtenidos de los parámetros necesarios para el cálculo de la *eficiencia de la regeneración de la hemoglobina (ERH)* y el *valor biológico relativo (VBR)*: *ganancia en peso*, *ingesta de hierro*, *hemoglobina inicial (Hb_i)*, *hemoglobina final (Hb_f)*, *hierro en la hemoglobina inicial (FeHb_i)*, y *hierro en la hemoglobina final (FeHb_f)*. Destacar que

las variables *ganancia en peso* e *ingesta de hierro*, no coinciden con la tabla anterior (Tabla 1.3), puesto que en este caso los cálculos se realizaron desde el inicio del periodo de repleción hasta el final de cada periodo (ver Material y Métodos), además esta misma situación también tuvo lugar en los posteriores estudios. La concentración de la Hb_i se obtuvo al final del periodo de depleción (4 semanas), coincidiendo con el inicio del periodo de repleción. Al final de cada periodo de balance y tras el sacrificio de los animales se determinó la concentración de la Hb_f. Como se puede observar, en el 1^{er} periodo de repleción la ganancia de hierro en la Hb (diferencia entre FeHb_f y FeHb_i) tanto para las ratas alimentadas con el néctar SF (1,39 mg) como con el néctar PFM (1,43 mg), fue muy similar. Los niveles de Hb_i en ambos grupos de ratas fueron ligeramente más elevados que el nivel de referencia que establece el método oficial de la AOAC 974.31, (< 6,0 g/dl). El motivo fue no causar un excesivo sufrimiento a los animales, puesto que tras 5 semanas con una alimentación deficiente en hierro y varios desangrados no alcanzaron dicho valor por lo que decidimos comenzar el periodo de repleción.

Al final del 1^{er} periodo de repleción los niveles de Hb en ambos grupos fueron >11,1 g/dl. Este es el límite inferior del rango que hemos tomado como referencia según Kaneko (1989) (ver Tabla 1.5), siendo para el grupo SF (11,68 g/dl) y para el grupo PFM (11,35 g/dl). El porcentaje de la biodisponibilidad del hierro, expresado como ERH, para el grupo SF (20,55%) fue estadísticamente superior ($p < 0,05$) al grupo PFM (14,80%). Este valor nos indica la proporción del contenido en hierro presente en el néctar que fue utilizado por las ratas para la síntesis de la Hb en la médula ósea. Este método fue empleado por Sakaguchi y col. (2004) para determinar la biodisponibilidad del PFM añadido a una dieta estándar, y dichos autores encontraron valores de ERH superiores a un 50% para el PFM, sin hallar diferencias estadísticamente significativas con el SF, tras un periodo de dos semanas. La diferencia posiblemente se deba a la ingesta de hierro durante las dos semanas de balance que duró nuestro estudio, que fue 3 veces superior al de estos autores. La elevada ingesta puede deberse a que en nuestro ensayo la administración del hierro se realizó a través de un alimento líquido, siendo la ingesta media de néctar por cada animal de ~ 50 ml/día. Otra explicación de estas diferencias tan notables puede estar en la ausencia de vitaminas en la dieta y néctar que empleamos. Por otra parte, si calculamos el contenido de hierro del néctar utilizado por las ratas (utilización del hierro en mg) podemos comprobar, según Tabla 1.4, que según el tipo de compuesto las diferencias son estadísticamente significativas, siendo este valor superior al grupo SF (1,01 mg) en relación al grupo PFM (0,73 mg). Podemos concluir por tanto que, en estas condiciones, la utilización del SF fue muy superior a la del PFM.

El VBR (Biodisponibilidad relativa), expresa la utilización de un compuesto de hierro en relación al estándar de referencia SF, es por tanto, el cociente de la ERH del compuesto problema

(en nuestro estudio, el FPM) y la ERH del SF en el mismo alimento (en nuestro caso el néctar). Por tanto, en este 1^{er} periodo de repleción el VBR del PFM fue del 71%. No hemos encontrado estudios en la bibliografía científica sobre la biodisponibilidad del hierro añadido a bebidas de este tipo en ratas, sin embargo cuando el compuesto de hierro PFM se añade a una dieta estándar los valores encontrados fueron de 105% (Sakaguchi y col., 2004), y entre 86% y 104% (Wegmüller y col., 2004).

En el 2^o periodo de repleción, la ganancia de hierro en la Hb fue similar y no significativa ($p > 0,05$) para ambos grupos de ratas alimentadas con el néctar SF ó PFM (4,51 y 4,13 mg Fe, respectivamente). El periodo de suplementación de 10 días, establecido en el 2^o periodo de repleción fue, al igual que en el 1^{er} periodo de repleción, suficiente para alcanzar los niveles normales de hemoglobina, que en este caso, llegaron a ser > 14 g/dl. En este caso, la biodisponibilidad del PFM expresada como ERH fue muy similar a la del SF (13,79% y 16,85%, respectivamente) al igual que la utilización del hierro (0,68 y 0,83 mg, respectivamente). Además, el VBR para el PFM (82%) mejoró, aunque no de manera significativa con respecto al 1^{er} periodo de repleción (72%).

Durante el 3^{er} periodo de balance, los dos grupos de ratas alimentadas con el néctar SF y PFM no mostraron diferencias significativas en ninguno de los parámetros evaluados. Podemos observar que la utilización del hierro fue disminuyendo progresivamente a lo largo de los tres periodos de repleción, debido a que los niveles de Hb se recuperaban paralelamente. Fisiológicamente la absorción y utilización del hierro está relacionada con los niveles de hierro en el organismo, lógicamente cuando se recuperan las reservas, la absorción y utilización del mineral en la regeneración de la hemoglobina será inferior a los estados anémicos. Buchowski y col. (1989) encontraron que la ERH y la absorción aparente de hierro fue mayor en ratas con anemia severa, siendo inversamente proporcional a la ingesta total de hierro. En nuestro estudio también encontramos una correlación negativa entre ambas variables siendo el coeficiente de correlación para el grupo alimentado con el néctar SF de $r = - 0,803$, y para el grupo con el néctar PFM de $r = - 0,774$, ambos con un nivel de significación de $p < 0,01$.

Tabla 1.4. Eficiencia de regeneración de la hemoglobina (ERH), utilización del hierro y valor biológico relativo (VBR) en ratas anémicas alimentadas con un néctar de frutas enriquecido con diferentes compuestos de hierro (SF o PFM) durante los tres periodos de repleción.

	Néctar	Ganancia de peso (g)	Ingesta de Fe (mg)	Hb inicial (g/dl)	Hb final (g/dl)	Fe Hb inicial ¹ (mg)	Fe Hb final ¹ (mg)	ERH ² (%)	Utilización del hierro ³ (mg)	VBR ⁴
(a)										
Repleción										
1^{er} Periodo	SF	10,30 ± 4,33 ^{/c}	7,42 ± 1,98 ^{/c}	7,88 ± 0,81 ^{/a}	11,68 ± 0,98 ^{/b}	2,82 ± 0,91	4,21 ± 1,23 ^{/b}	20,55 ± 4,27 ^{/a/a}	1,01 ± 0,21 ^a	100
	PFM	12,47 ± 2,65 ^{/c}	9,88 ± 4,21 ^{/c}	7,75 ± 0,78 ^{/a}	11,35 ± 1,91 ^{/b}	2,79 ± 0,57	4,22 ± 1,06 ^{/b}	14,80 ± 3,17 ^{/b/a}	0,73 ± 0,16 ^b	71
2^{do} Periodo	SF	38,05 ± 3,96 ^{/b}	27,47 ± 4,78 ^{/c}	7,62 ± 0,16 ^{/a}	14,12 ± 0,37 ^{/a}	3,05 ± 0,76	7,55 ± 0,77 ^{/a}	16,85 ± 5,06 ^{/ab}	0,83 ± 0,25	100
	PFM	42,12 ± 6,97 ^{/b}	30,33 ± 2,72 ^{/c}	7,50 ± 0,37 ^{/a}	14,47 ± 0,61 ^{/a}	2,96 ± 0,50	7,09 ± 0,78 ^{/a}	13,79 ± 2,79 ^{/a}	0,68 ± 0,14	82
3^{er} Periodo	SF	80,50 ± 15,73 ^{/a}	56,78 ± 4,58 ^{/c}	6,33 ± 0,40 ^{/b}	14,00 ± 0,42 ^{/a}	2,30 ± 1,13	7,94 ± 1,19 ^{/a}	10,02 ± 1,96 ^{/b}	0,49 ± 0,09	100
	PFM	64,30 ± 7,21 ^{/a}	53,04 ± 5,95 ^{/c}	6,35 ± 0,53 ^{/b}	14,60 ± 0,51 ^{/a}	2,56 ± 0,77	6,88 ± 1,45 ^{/a}	8,09 ± 0,88 ^{/b}	0,40 ± 0,04	82

Media ± error típico, n=6

^{a-b} Diferentes letras dentro de la misma columna, para cada parámetro y en cada periodo de repleción muestran diferencias estadísticamente significativas (p < 0.05).

^{/a-c} Diferentes letras dentro de la misma columna, para cada parámetro y compuesto de hierro en todos los periodos de repleción muestran diferencias significativas (p<0,05)

¹ Fe en Hb se describe en la sección de material y métodos: mg Fe en Hb = (peso x Hb x 0,067 x 3,4).

² ERH (%) = [Fe Hb (final) – Fe Hb (inicial) x 100] / Ingesta de Fe (mg).

³ Utilización del hierro (mg) = ERH (%) x Fe en la dieta (%) / 100.

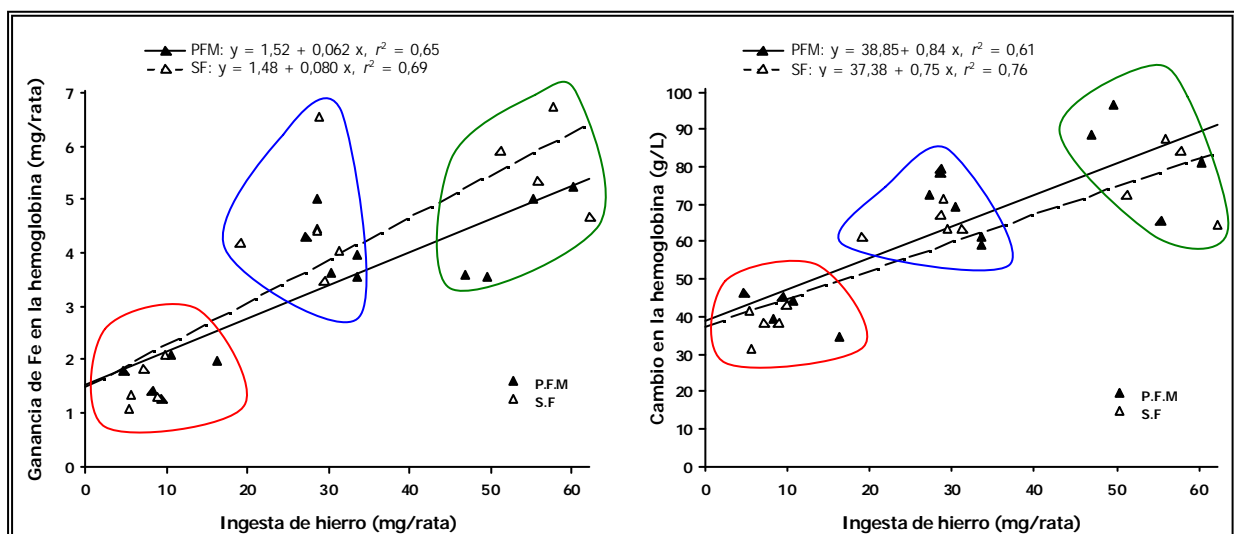
⁴ VBR = ERH (PFM) / ERH (SF)

La ausencia de superíndices indica que no existen diferencias estadísticamente significativas

Debemos destacar que en etapas de deficiencia severa (1^{er} periodo de repleción), la utilización del SF fue significativamente superior que la del PFM, sin embargo, conforme se recuperan los valores de hemoglobina en las ratas, la ERH de ambos compuestos se hace semejante según pudimos comprobar, en el 3^{er} periodo de repleción. No obstante la VBR sigue siendo inferior para el PFM.

1.3.2. Relación entre las modificaciones en la hemoglobina y la ingesta de hierro.

La mejora en la concentración de hemoglobina final en ambos grupos de ratas fue claramente significativa ($p < 0,05$) en el 2^o y 3^{er} periodo de balance (14,12 y 14,00 g/dl para el SF; y, 14,47 y 14,60 g/dl para el PFM, respectivamente) con respecto al 1^{er} periodo (circulo rojo) (11,68 g/dl para el SF y 11,35 g/dl para PFM) (Tabla 1.4). Este aumento en la concentración de la hemoglobina final está directamente correlacionado con la ingesta total de hierro en ambos grupos de ratas ($r = 0,729$; $p < 0,01$). El aumento en la concentración de la hemoglobina final se ve reflejada en la cantidad de hierro presente en la hemoglobina final, mostrando las mismas diferencias significativas ($p < 0,05$) en cada periodo de balance. También se observan correlaciones entre la cantidad de hierro en la hemoglobina final y la ingesta total de hierro, siendo para el grupo SF ($r = 0,690$; $p < 0,01$) y para el grupo PFM ($r = 0,750$; $p < 0,01$). Para observar mejor la relación entre la ganancia de hierro en la hemoglobina y la ganancia de la hemoglobina frente a la ingesta total de hierro a lo largo del periodo de repleción se realizó un análisis de regresión lineal (Figuras 1.1 y 1.2, respectivamente). Este modelo de regresión nos permite comparar la biodisponibilidad de diferentes compuestos de hierro añadidos a los alimentos (Shaw y col., 2000; Sakaguchi y col., 2004; Swain y col., 2003; Wegmüller y col., 2004).



Figuras 1.1 y 1.2. Análisis de regresión lineal entre las dos medidas de regeneración de la hemoglobina y la ingesta de hierro durante el periodo de repleción. ○ 1^{er} Periodo de repleción, ○ 2^o Periodo de repleción y ○ 3^{er} Periodo de repleción.

Como se puede observar en las Figuras 1.1 y 1.2, el coeficiente de regresión lineal r^2 nos describe la dependencia entre ambas variables, es decir, un elevado valor de r^2 indica una fuerte relación entre las variables en estudio. En este caso, el coeficiente de regresión r^2 es inferior a 0,7 en la mayoría de las ecuaciones, salvo en la ecuación que relaciona la ganancia de la hemoglobina con la ingesta de hierro para el grupo SF, que presentó un valor de $r^2 = 0,76$. A pesar de presentar una relación de dependencia relativamente baja, todas las ecuaciones presentaron un nivel de significación de $p < 0,001$.

En general, las relaciones existentes entre las dos medidas de la regeneración de la hemoglobina y la ingesta total de hierro son débiles, en cambio al realizar una correlación entre ellas, observamos que los coeficientes de correlación r son ligeramente más elevados que los r^2 . Por lo tanto, ambas variables varían conjuntamente, se decir, a medida que aumentaba la ingesta a lo largo del periodo de repleción la ganancia de la hemoglobina y la ganancia de hierro en la hemoglobina aumentaban, siendo para el grupo de ratas alimentadas con el néctar SF: $r = 0,872$; $p < 0,01$ y $r = 0,833$; $p < 0,01$ respectivamente, y para el grupo de ratas alimentadas con el néctar PFM: $r = 0,782$; $p < 0,01$ y $r = 0,810$; $p < 0,01$ respectivamente.

Como observamos en ambas gráficas, las rectas de regresión son casi paralelas y están muy próximas entre sí. Estos resultados nos indican que la biodisponibilidad del PFM está muy próxima a la del SF. El pirofosfato férrico es un compuesto insoluble, que ha sido tecnológicamente mejorado mediante su encapsulación y reducción del tamaño de partícula. En nuestro estudio utilizamos el PFM (SunActive FeTM). La razón de su elevada absorción y biodisponibilidad podría ser su reducido tamaño de partícula ($\sim 0,5 \mu\text{m}$). Se ha demostrado que el tamaño de partícula tiene una influencia positiva en la absorción de hierro de compuestos poco solubles en agua, como son los polvos de hierro elemental y el pirofosfato férrico. En un reciente estudio realizado por Wegmüller y col. (2004), se observó que descendiendo el tamaño de partícula del pirofosfato férrico de $\sim 21 \mu\text{m}$, $2,5 \mu\text{m}$ y $0,5 \mu\text{m}$, la biodisponibilidad aumentaba desde un 59%, 69% y 95% respectivamente. Pero en cambio, demostraron que el material empleado en la cápsula influye también en la biodisponibilidad. Por ejemplo, en ese mismo estudio la encapsulación del pirofosfato férrico (con un tamaño de partícula de $\sim 2,5 \mu\text{m}$), con aceite de palma hidrogenada con un ratio cápsula:sustrato del 60:40 redujo el VBR de un 69%, que presenta el compuesto comercial SunActive FeTM, a un 43%. Por lo tanto, podemos concluir en nuestro ensayo que el elevado VBR del PFM puede ser debido a su pequeño tamaño de partícula o si los emulsificadores que envuelven a las partículas puede jugar un papel importante.

1.4. Índices hematológicos y bioquímicos

Al final del periodo de depleción y de cada periodo de balance, se realizó la determinación de los parámetros sanguíneos de la serie roja: hemoglobina (Hb), hematocrito (Hct), volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM), concentración de la hemoglobina corpuscular media (CHCM) y otros parámetros bioquímicos relacionados con el transporte del hierro, como el hierro sérico (HS), capacidad total de fijación del hierro (CTFH) y el porcentaje de saturación de la transferrina (%ST). En la Tabla 1.5, se representa el estatus del hierro medido a través de los parámetros hematológicos y bioquímicos. Cada parámetro refleja cambios en diferentes compartimentos del cuerpo y están afectados según los diferentes niveles de la deficiencia en hierro.

Tabla 1.5. Diagnóstico de la anemia deficiente en hierro en ratas.

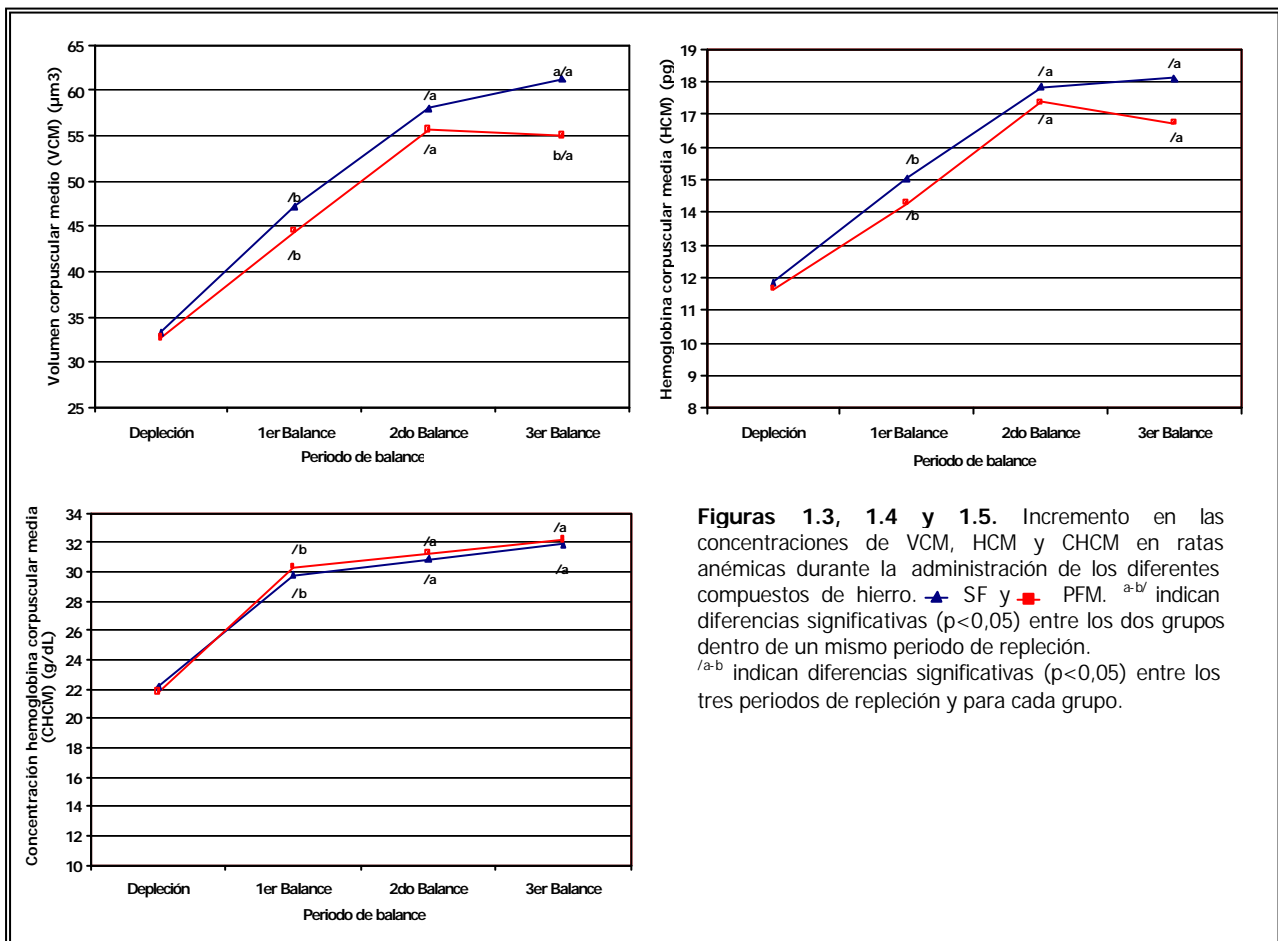
	<i>Rango normal</i>	<i>Anemia deficiente en hierro</i>
Hemoglobina (g/dl)	11,1-18,0	< 6
Hematocrito (%)	36-52	↓
Volumen corpuscular medio (µm ³)	44-69	↓
Hemoglobina corpuscular media (pg)	12-24,5	↓
Concentración hemoglobina corpuscular media (g/dl)	21,6-42	↓
Hierro sérico (µg/dl)	220±124	↓
Capacidad total de fijación del hierro (µg/dl)	368±124	↑
Saturación de la transferrina (%)	>16	↓

(Kaneko, 1989)

Los niveles de hemoglobina en el periodo de depleción y al final de cada periodo de balance ya han sido discutidos en el apartado anterior. Durante la anemia deficiente en hierro, las reservas corporales de hierro son reducidas, la saturación de la transferrina disminuye, la síntesis de la hemoglobina se reduce, y los eritrocitos sufren divisiones adicionales, dando lugar a la formación de eritrocitos microcíticos e hipocrómicos (Jain, 1993). Aunque las alteraciones en el metabolismo del hierro ocurren pronto en la deficiencia en hierro, los cambios morfológicos en los eritrocitos, tales como microcitosis e hipocromatosis, generalmente ocurre en los estados más avanzados de la depleción del hierro, conduciendo a la anemia deficiente en hierro (Fairbanks y Beutler, 1995).

El volumen corpuscular medio (VCM), es uno de los índices eritrocitarios junto con la hemoglobina corpuscular media (HCM) y la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM). Un descenso en el VCM, indica eritrocitos de menor tamaño (eritrocitos microcíticos), apareciendo cuando la deficiencia en hierro llega a ser severa y la anemia empieza a desarrollarse. Las Figuras 1.3, 1.4 y 1.5, representan los cambios del VCM, HCM y CHCM respectivamente, al final del periodo de depleción y tras la administración de los compuestos de hierro en los tres periodos de repleción.

Después de 3 días de suplementación (1^{er} periodo), los grupos SF y PFM alcanzaron valores normales (47,2 y 44,5 μm^3 , respectivamente) y significativamente superiores ($p < 0,05$) a los valores en depleción (33,31 para SF y 32,68 μm^3 para PFM). En el 2^o periodo de repleción, el VCM aumentó alcanzando valores significativamente superiores ($p < 0,05$) (58 μm^3 para SF y 55,67 μm^3 para PFM) al 1^{er} periodo de repleción. Por el contrario, en el 3^{er} periodo de repleción el VCM se mantuvo constante para el grupo PFM presentando valores muy similares (55 μm^3) al 2^o periodo de repleción, mientras que en el grupo SF el VCM aumentó, pero sin mostrar diferencias significativas (61,25 μm^3) con respecto al 2^o periodo de repleción. Únicamente en el 3^{er} periodo de repleción, se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos alimentados con el néctar SF y PFM (61,25 y 55 μm^3). En general, la ingesta de un compuesto de hierro u otro fue claramente positiva en la recuperación del VCM, desde el 1^{er} periodo de repleción (Figura 1.3, superior izquierda).



Figuras 1.3, 1.4 y 1.5. Incremento en las concentraciones de VCM, HCM y CHCM en ratas anémicas durante la administración de los diferentes compuestos de hierro. \blacktriangle SF y \blacksquare PFM. ^{a-b/} indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los dos grupos dentro de un mismo periodo de repleción. ^{/a-b} indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tres periodos de repleción y para cada grupo.

Otros índices eritrocitarios relacionados con la hemoglobina son la hemoglobina corpuscular media (HCM) (Figura 1.4, superior derecha) y la concentración de la hemoglobina corpuscular media (CHCM) (Figura 1.5, inferior izquierda). La HCM corresponde al valor medio de la hemoglobina contenida en cada eritrocito, mientras que la CHCM corresponde a la concentración de hemoglobina en un volumen de eritrocitos. La disminución de ambos

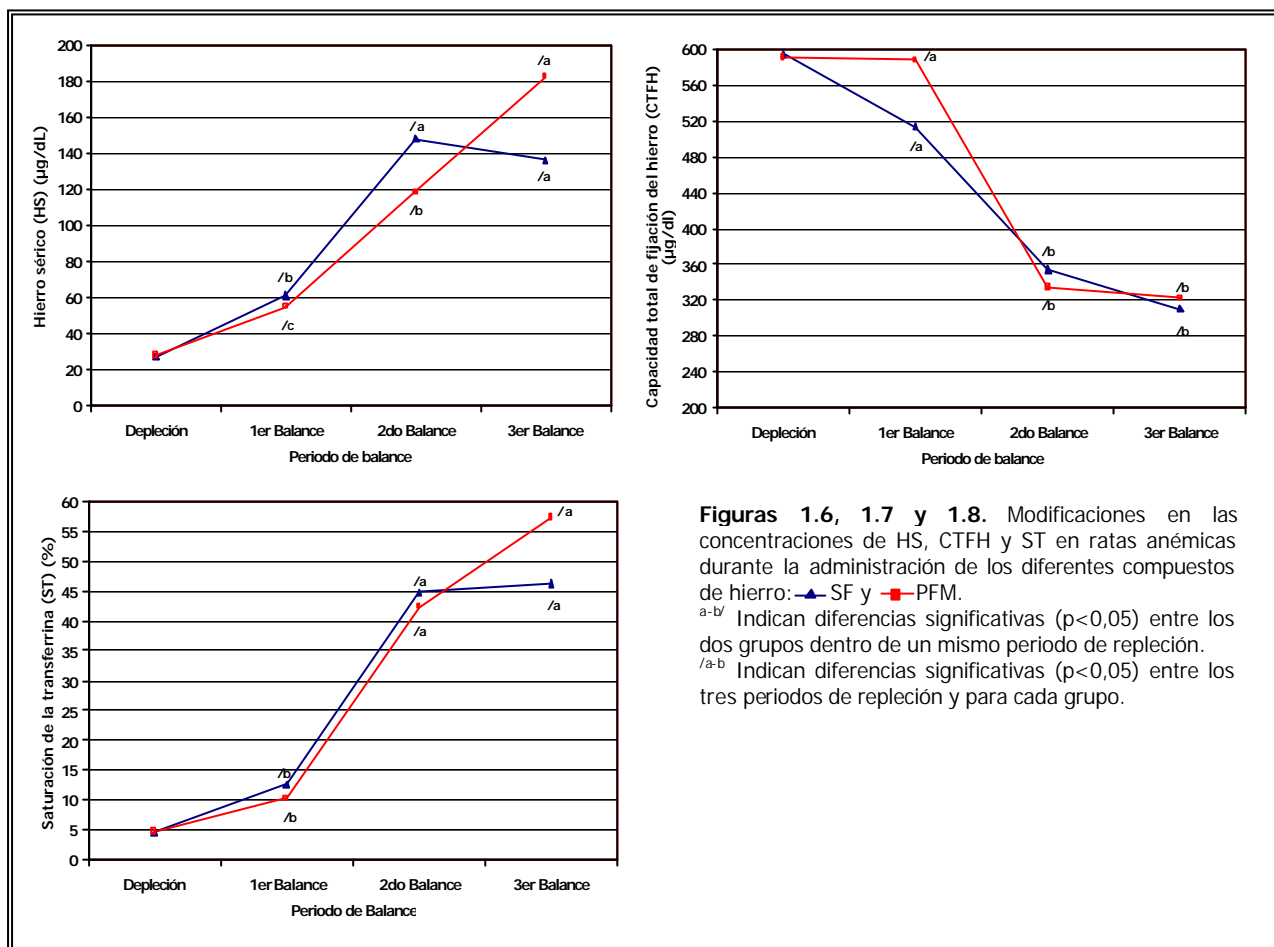
parámetros tiene lugar por una deficiencia de hierro, y da lugar a la aparición de eritrocitos poco teñidos con un contenido de hemoglobina reducido (eritrocitos hipocrómicos). Los niveles de HCM y CHCM al final del periodo de depleción en los grupos de ratas seleccionadas para ser suplementadas con SF y PFM (11,86 pg y 22,16 g/dl; 11,65 pg y 21,8 g/dl, respectivamente) se mostraron ligeramente por debajo del límite inferior normal (Tabla 1.5). Después de 3 días de suplementación los niveles de HCM y CHCM fueron significativamente superiores ($p < 0,05$) (15,04 pg y 29,78 g/dl para el SF; 14,28 pg y 30,33 g/dl para el PFM, respectivamente) al comienzo de la suplementación. Destacar por tanto, que el tipo de hierro añadido al néctar no influyó significativamente en los niveles de HCM y CHCM.

Después de 10 días de suplementación (2º periodo), ambos grupos de ratas seguían mostrando valores similares de HCM y CHCM (17,84 pg y 30,88 g/dl para el SF; 17,38 pg y 31,28 g/dl para el PFM) y significativamente superiores ($p < 0,05$) al 1º periodo de repleción. Los niveles de HCM y CHCM se mantuvieron similares y sin diferencias significativas después de 17 días de suplementación (3º periodo) para ambos grupos y con respecto al periodo anterior. En conclusión, la ingesta de ambos compuestos de hierro tuvo un efecto positivo en la recuperación de estos parámetros, aumentando su valor hasta alcanzar un máximo a los 10 días de suplementación.

Otra de las pruebas realizadas en este estudio, fue evaluar las condiciones del transporte del hierro mediante la determinación hierro sérico (HS), capacidad total de fijación del hierro (CTFH) y la saturación de la transferrina (%ST). Durante la eritropoyesis deficiente en hierro tiene lugar una restricción en el suministro del hierro a las células rojas en desarrollo, traduciéndose en una disminución del hierro sérico y un aumento de la transferrina, lo que determina que exista una reducción en la saturación de la transferrina (cociente entre el HS y la CTFH). Además son útiles para el diagnóstico clínico de la anemia deficiente en hierro y las enfermedades inflamatorias crónicas (Huebers y col., 1987; Fairbanks y Klee., 1994) y como indicador de ciertas situaciones clínicas (Brittenham y col., 1981). Las Figuras 1.6, 1.7 y 1.8, representan los valores medios de HS, CTFH y %ST respectivamente, al final del periodo de depleción y al final de los periodos de cada balance.

Durante el periodo de depleción los niveles de HS y %ST fueron significativamente inferiores ($p < 0,05$) a cada uno de los tres periodos de balance y para cada uno de los grupos de ratas alimentados con el néctar enriquecido con SF y PFM. Teniendo en cuenta que el %ST es el cociente entre el HS y CTFH, y es el indicador más preciso en el suministro de hierro a la médula ósea, una reducción en el %ST por debajo del 15% provoca alteraciones en la síntesis de la hemoglobina y por tanto en el desarrollo de los eritrocitos (NCCLS, 1995). En el 1º periodo de balance, los niveles de HS, CTFH y %ST en ambos grupos de ratas suplementadas con los

diferentes compuestos de hierro no alcanzaron los niveles de referencia según la Tabla 1.5, siendo el %ST en ambos casos < 15% lo que significa un bajo suministro de hierro a la médula ósea para la síntesis de la hemoglobina.



Por el contrario, a partir del 2º periodo de balance estos parámetros experimentaron un claro aumento para el HS y la ST y en cambio para la CTFH un significativo descenso hasta alcanzar los niveles normales según los valores de referencia (Tabla 1.5). Durante el 1º y 2º periodo de balance, el tipo de sal empleada como suplemento no produjo diferencias estadísticas en los parámetros analizados.

En cambio, en el 3º periodo de balance los valores de HS (136,33 µg/dl) para el grupo de ratas suplementadas con SF fueron semejantes al periodo anterior (148 µg/dl), sin embargo en el grupo alimentado con PFM siguieron aumentando los niveles de HS hasta alcanzar 182,33 µg/dl. La tendencia de la CTFH es a disminuir durante el periodo de repleción hasta alcanzar valores normales (Tabla 1.5), situación que no tiene lugar hasta el 2º periodo de balance. En el 3º periodo, el grupo de ratas suplementado con PFM se mantuvo prácticamente constante con respecto al 2º periodo de balance (333,8 µg/dl y 322 µg/dl, respectivamente), en cambio el grupo suplementado con SF siguió disminuyendo, aunque sin mostrar diferencias significativas con respecto al periodo anterior. En cuanto al %ST en el 3º periodo de balance, el grupo PFM

aumentó hasta alcanzar un valor del 57,25%, este aumento está relacionado con el incremento del hierro sérico y el descenso de la CTFH, por el contrario en el grupo SF, el %ST prácticamente se mantuvo constante con respecto al 2º periodo (46,16 y 44,77%, respectivamente).

En general, partiendo de un estado de anemia deficiente en hierro caracterizado por una concentración de hemoglobina baja, microcitosis, hipocromatosis, bajo nivel de HS, muy bajo %ST y una elevada CTFH, las ratas alimentadas con el néctar enriquecido con los diferentes compuestos de hierro (SF y PFM) experimentaron una clara recuperación desde el 1º periodo de balance, mejorando sus niveles hasta el 3º periodo de balance. Si tomamos como referencia el compuesto de hierro SF, el PFM presentó un comportamiento muy similar al SF, no observándose diferencias significativas, debido probablemente a la amplia variación en los valores de HS entre sujetos dentro del mismo grupo.

1.5. Almacenamiento del hierro

La concentración de hierro en el hígado y otros órganos se puede utilizar como un indicativo del estatus del hierro del animal (Wienk y col., 1999). Sin embargo, las reservas de hierro en estos órganos no siempre apuntan a un incremento en la biodisponibilidad del compuesto de hierro en estudio. Existe una relación inversa entre la absorción del hierro y el estatus del hierro (Magnusson y col., 1981; Taylor y col., 1988; Lynch y col., 1989; Flanagan, 1989; Hallberg y col., 1997). Además, un aporte de hierro a través de la dieta por debajo de sus necesidades fisiológicas lleva consigo una disminución de las reservas de hierro más rápida que la absorción del hierro, conduciendo a una deficiencia en este mineral. En la Tabla 1.6 se muestran las concentraciones de hierro total en las diferentes piezas anatómicas durante los tres periodos de balance.

Durante el 1º periodo de repleción, el tipo de compuesto de hierro añadido al néctar no influyó en la concentración del hierro en las piezas anatómicas.

En el 3º periodo de repleción, la concentración de hierro en las diferentes piezas anatómicas se mantiene prácticamente constante con respecto al 1º periodo de repleción, no presentando diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ambos tipos de suplemento.

Tabla 1.6. Concentración de hierro en los distintos órganos de las ratas alimentadas con sulfato ferroso (SF) o pirofosfato férrico micronizado (PFM) añadidos a un néctar de frutas. Los resultados se expresan en mg/g peso seco.

	Néctar	Hígado	Bazo	Riñón	Corazón	Intestino delgado
Repleción ^(e)						
1^{er} Balance	SF	1,60 ± 0,66	6,54 ± 2,68	1,40 ± 0,35	1,51 ± 0,30	0,85 ± 0,31
	PFM	0,52 ± 0,27	9,04 ± 1,65	2,14 ± 0,24	2,83 ± 0,52	0,96 ± 0,35
3^{er} Balance	SF	1,03 ± 0,15	5,40 ± 1,68	1,36 ± 0,03	1,63 ± 0,17	0,56 ± 0,22
	PFM	0,69 ± 0,17	7,10 ± 1,57	1,70 ± 0,45	2,15 ± 0,46	0,91 ± 0,19

Cada valor es la media ± error típico, n=6

^{a-b} Diferentes letras dentro de la misma columna, para cada parámetro y en cada periodo de repleción muestran diferencias estadísticamente significativas (p < 0.05).

En un trabajo realizado por Park y col. (1987), se observó que las ratas alimentadas con 30 mg de hierro elemental por Kg de dieta durante 30 días no provocan en las ratas ningún efecto sobre el estado de salud. Reddy y Cook (1989) sugirieron que la concentración de hierro en el hígado puede ser usada como un índice de sobrecarga de hierro en la rata. Nuestros resultados podrían sugerir una sobrecarga de hierro en los animales de acuerdo con los resultados obtenidos por Yeung y col (2004), donde la concentración de hierro en el hígado fue de 7 $\mu\text{mol/g}$ ó 0,40 mg/g, en el bazo de 5,5 $\mu\text{mol/g}$ ó 0,31 mg/g y en el riñón de ~ 1 $\mu\text{mol/g}$ ó 0,06 mg/g. Pero en cambio, Appel y col (2001) observaron que la ingesta de aproximadamente 11 mg Fe/Kg peso corporal/día, no resulta en un exceso de hierro en el tejido ni daño toxicológico. En nuestro caso la ingesta de hierro diaria por Kg de peso fue aproximadamente de 2,46 mg Fe/Kg/día. Otro hecho importante en la sobrecarga de hierro es que se caracteriza por la acumulación de hierro en los órganos parenquimales tales como el hígado, corazón, páncreas y órganos endocrinos. Las ratas afectadas muestran síntomas tales como una hipertrófia hepatocelular, cardiomiopatía, hemosiderosis, etc (Whittaker y col., 1996). En nuestro caso, estos daños no se observaron a medida que se realizaba la extracción de los órganos.

En general y de acuerdo con Jacobs (1985), la sobrecarga de hierro a través de la dieta no puede ocurrir bajo circunstancias normales, e incluso después de elevadas ingestas diarias de hierro de 300-500 mg.

1.6 Efecto pro-oxidante de los diferentes compuestos de hierro añadidos al néctar.

Hoy en día la mayoría de los alimentos están enriquecidos con compuestos de hierro, como una medida preventiva contra la deficiencia en hierro. En cambio, un exceso en la ingesta de hierro podría estar implicado en la elevada incidencia de cáncer de colon en los países desarrollados (Knekt y col., 1994; Nelson y col., 1994). La gran mayoría del hierro dietético que no se absorbe en el intestino delgado puede entrar en el colon y participar, en combinación con las bacterias del colon, en las reacciones tipo Fenton, las cuales incrementan la producción de peróxidos de hidrógeno y radicales hidroxilo en la superficie de la mucosa (Babbs, 1989). Para ver si la ingesta de hierro durante el periodo de repleción tiene efecto en la producción de

radicales libres se empleó un método desarrollado por Babbs y Gale (1987, 1990) descritos en la sección de Material y Métodos. En la Gráfica 1.9, se representa los niveles de ABS (Ácido bencenosulfínico) producido tras la reacción entre los radicales hidroxilo y el Dimetil sulfóxido (DMSO), que han sido cuantificados en las heces de las ratas durante el periodo de depleción y posteriormente, en el 1^{er} y 3^{er} periodo de repleción.

Durante el periodo de depleción, la producción de radicales hidroxilo cuantificados a través del ácido bencenosulfínico (ABS) fue menor de 0,5 $\mu\text{mol/g}$ de heces totales, obviamente estos valores son significativamente menores ($p < 0,05$) que los encontrados en los periodos de repleción ya que durante este periodo el aporte de hierro en la dieta es mínimo (2 mg/kg de dieta).

En el 1^{er} periodo de balance, los niveles de ABS aumentaron claramente con respecto al periodo de depleción. Este aumento también se observó en humanos a los que se les administró un suplemento de hierro elemental (19 mg/día) durante dos semanas (Lund y col. 1999). En este caso los valores obtenidos por estos autores fueron aproximadamente de 1,5 $\mu\text{mol/g}$ heces totales tras la suplementación incrementándose la concentración de ABS en un 40% con respecto a los niveles obtenidos antes de dicha suplementación.

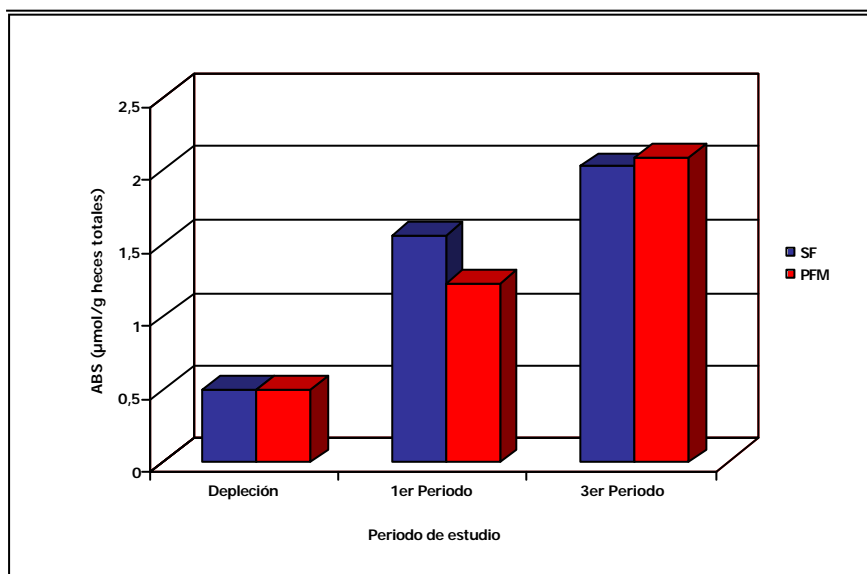


Figura 1.9. Efecto de la administración de los dos compuestos de hierro en la producción de radicales libres en heces, determinado por la cuantificación del Ácido bencenosulfínico (ABS) como producto final en un ensayo *in vitro*.

No obstante, estos autores no parten de niveles de ABS en personas anémicas (estado de depleción). No existen en la literatura, valores de referencia de ABS en heces de ratas, sin embargo pudimos observar un incremento en el 1^{er} periodo de repleción de tres veces los valores obtenidos en depleción. Además, en el 3^{er} periodo de balance existió un aumento del ABS aunque no fue estadísticamente significativo ($p < 0,05$) con respecto al 1^{er} periodo de balance. La producción de radicales hidroxilo es producida por el hierro ferroso en presencia de

aniones superóxido y peróxido de hidrógeno, ambos producidos como resultado de un metabolismo normal. Está claro, que no hay diferencias en la capacidad de generación de radicales libres en heces en función del tipo de sal añadida al néctar, no obstante, la cantidad de hierro ingerida está claramente relacionada con el contenido de ABS en heces. Lund y col. (2001) estudiaron en el contenido de colon y ciego de ratas, la capacidad de generación de radicales hidroxilo utilizando el método de Babbs (1987), y observaron que la producción de ABS en ciego, no se ve afectada por la dosis de hierro en la dieta. Sin embargo, los valores obtenidos en contenido del colon tras suministrar una dieta con sulfato ferroso de 29 mg/kg durante 6 meses, fueron semejantes a los obtenidos en nuestro estudio en el periodo de depleción, siendo la concentración de hierro en el néctar de 49,2 mg/l. No obstante desconocemos en qué proporción los valores de ABS en heces de rata están relacionados con los valores de este mismo compuesto en el contenido de colon. Sería necesario realizar posteriores estudios con el fin de encontrar esta relación y la implicación en la generación de células aberrantes en las criptas del colon.

2° ESTUDIO

2. Efecto del ácido ascórbico sobre la biodisponibilidad del pirofosfato férrico micronizado (PFM) en un néctar de frutas enriquecido. Método de la Eficiencia de Regeneración de la Hemoglobina (ERH).

2.1. Crecimiento y consumo de alimento

Durante el estudio se analizaron diferentes parámetros fisiológicos en los animales: *peso corporal*, *ganancia de peso*, e *ingesta de la dieta + ingesta néctar (Ingestión total de alimento)*, con el objetivo de evaluar cualquier trastorno nutricional provocado por la dieta o el néctar, ya que los trastornos nutricionales aparecen por el defecto o el exceso de uno o varios de los elementos nutritivos necesarios para mantener al animal en un buen estado de salud.

La Tabla 2.1 muestra el efecto de un néctar enriquecido con (SF o PFM) junto con la vitamina C, sobre los parámetros medidos a los animales, para evaluar el crecimiento de los mismos: *peso corporal inicial y final*, *ganancia de peso*, *ingesta total de alimento* (ingesta de la dieta + ingesta del néctar), durante el periodo de cada balance mineral.

Tabla 2.1. Análisis de varianza del peso corporal inicial y final, ganancia de peso e ingesta total de alimento tras la administración del SF + Vit C y PFM + Vit C añadidos a un néctar de frutas, durante los tres periodos de balance.

Variables	1 ^{er} Balance	2 ^o Balance	3 ^{er} Balance
<i>Peso corporal inicial</i>	***	*	***
<i>Peso corporal final</i>	***	*	***
<i>Ganancia de peso</i>	NS	NS	NS
<i>Ingestión total de alimento</i>	NS	**	NS

Diferencias significativas para: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; NS = no significación

Al comienzo de cada periodo de balance, el *peso corporal inicial* de ambos grupos de ratas fue significativamente diferente. Este hecho, unido a que no existió diferencia en la *ganancia de peso*, hizo que el *peso corporal final* también fuera significativo, para ambos grupos de ratas. Únicamente en el 2° periodo de balance, la *ingestión total de alimento*, influyó de manera significativa ($p < 0.01$) sobre los dos grupos de ratas, sin embargo no afectó a la *ganancia de peso*.

La Tabla 2.2, muestra los valores medios y el error típico de los parámetros relacionados con el crecimiento y la ingesta de los grupos de ratas alimentadas con el néctar 3 y 4 (2° Estudio) y el néctar 1 y 2 (1^{er} Estudio) (descritos en la Tabla 11 de la sección Material y Métodos) durante los tres balances, que constituyó el periodo de repleción.

En este apartado, únicamente discutiremos las diferencias existentes entre los grupos alimentados con el néctar SF o PFM + Vit C y con respecto a los grupos SF o PFM sin vitaminas añadidas (1^{er} Estudio), en los tres periodos de balance.

Tabla 2.2. Crecimiento e ingesta total de alimento en ratas, tras la administración del SF o PFM junto con la vitamina C añadidos a un néctar de frutas durante el periodo de depleción – repleción.

	Néctar	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Ganancia de peso (g)	Ingestión total de alimento (g)
Depleción (f)	-	152,57 ± 10,81	161,90 ± 10,94	9,33 ± 1,78	28,00 ± 2,65
Repleción (g)					
1^{er} Periodo	SF	155,03 ± 17,67	167,20 ± 17,20	10,30 ± 4,33	177,66 ± 18,57
	SF + Vit. C	231,42 ± 11,70 ^{*/b}	244,02 ± 13,43 ^{*/b}	12,60 ± 3,93	149,23 ± 25,27 ^{/b}
	PFM	158,00 ± 10,79	172,85 ± 10,94	12,47 ± 2,65	226,57 ± 41,28
	PFM + Vit. C	141,97 ± 8,95 ^{/b}	154,78 ± 8,29 ^{/b}	12,82 ± 2,44 ^{/b}	113,28 ± 8,41 ^{*/b}
2^o Periodo	SF	229,75 ± 7,14	243,45 ± 3,43	13,70 ± 6,43	282,20 ± 13,24
	SF + Vit. C	289,00 ± 13,94 ^{*/a}	306,23 ± 15,87 ^{*/a}	17,23 ± 3,20	245,07 ± 22,25 ^{/a}
	PFM	197,95 ± 10,29	215,30 ± 9,30	17,35 ± 2,40	306,23 ± 20,72
	PFM + Vit. C	236,58 ± 12,88 ^{*/a}	257,42 ± 11,09 ^{*/a}	20,83 ± 3,84 ^{/a}	155,04 ± 15,19 ^{*/a}
3^{er} Periodo	SF	225,55 ± 16,04	248,33 ± 15,67	22,78 ± 4,22	256,58 ± 48,12
	SF + Vit. C	306,96 ± 7,19 ^{*/a}	315,61 ± 7,54 ^{*/a}	10,09 ± 2,69 [*]	162,18 ± 9,42 ^{*/b}
	PFM	195,83 ± 20,43	208,05 ± 24,19	16,07 ± 3,78	253,86 ± 69,50
	PFM + Vit. C	256,56 ± 5,64 ^{*/a}	260,83 ± 5,78 ^{*/a}	4,89 ± 1,46 ^{*/c}	158,33 ± 5,33 ^{*/a}

Cada valor representa la media ± error típico, n=6

^{*/} La presencia de asteriscos dentro de la misma columna para cada uno de los tres periodos de repleción indica diferencias significativas (p<0,05) entre los grupos suplementados con SF + Vit C y SF sin vitamina; y los grupos suplementados con PFM + Vit C y PFM sin vitamina.

^{/a-c} Diferentes letras dentro de la misma columna indican diferencias significativas (p < 0.05) entre los tres periodos de repleción, dentro de un mismo compuesto (SF + Vit C y PFM + Vit C)

La ausencia de superíndices indica que no existen diferencias estadísticamente significativas

En el 1^{er} periodo de balance, la *ingesta total de alimento* fue similar en ambos grupos de animales suplementados con el néctar SF + Vit C y PFM + Vit C (149,23 y 113,28 g, respectivamente) y claramente superior (P<0,05) al grupo en depleción (28 g). Esta diferencia en la *ingesta total de alimento* se debe a que durante el periodo de repleción se tuvo en cuenta tanto la ingesta del néctar como la ingesta de la dieta, mientras que durante el periodo de depleción solamente se tuvo en cuenta la ingesta de la dieta y se excluyó la ingesta del agua, al no tener valor energético. La *ingesta total de alimento* en los grupos SF + Vit C y PFM + Vit C, no influyó en la *ganancia de peso*, siendo ésta muy similar (12,60 y 12,82 g, respectivamente). En el caso de los grupos PFM y PFM + Vit C, la *ingesta total de alimento* fue diferente (226,57 y 113,28 g, respectivamente) (p<0,05) y sin embargo este hecho no influyó en la *ganancia de peso*, la cual fue similar.

Durante el 2^o periodo de balance, la *ingesta total de alimento* para el grupo SF + Vit C (245,07 g) fue significativamente superior (p<0,05) al grupo PFM + Vit C (155,04 g), en cambio la *ganancia de peso* se mantuvo constante para ambos grupos, no existiendo diferencias significativas. Con respecto al *peso inicial y final* el grupo SF + Vit C presentó valores significativamente más elevados (289 y 306,23 g, respectivamente) que el grupo PFM + Vit C (236,58 g y 257,42 g, respectivamente). Además, estos *pesos iniciales y finales* fueron

significativamente superiores ($p < 0,05$) a los grupos sin vitamina C. Un hecho que no influyó en la *ganancia de peso*, la cual fue similar en todos los grupos.

En el último periodo de balance, no se observaron diferencias significativas en la *ingesta total de alimento* y tampoco en la *ganancia de peso* para los grupos SF o PFM + Vit C. Únicamente hubo diferencias significativas en el *peso inicial y final*, siendo el grupo SF + Vit C (306,96 g y 315,61 g, respectivamente) significativamente superior ($p < 0,05$) al grupo PFM + Vit C (256,56 g y 260,83 g, respectivamente). A pesar de existir diferencias estadísticamente significativas en los *pesos iniciales* de los grupos SF o PFM + Vit C con respecto a los grupos SF y PFM, la *ingesta total de alimento* y la *ganancia de peso* fue superior en los grupos SF y PFM.

Observando la tendencia de cada parámetro en función de los tres periodos de balance, en los grupos SF + Vit C, la *ingesta total de alimento* obtuvo su máximo valor en el 2º periodo de balance (245,07 g) siendo significativamente superior al 1º y 3º periodo de balance (149,23 g y 162,18 g, respectivamente). Esta diferencia no supuso un aumento en la *ganancia de peso*, siendo los valores en los tres periodos de balance muy similares. Por tanto, el ritmo de crecimiento fue constante en los tres periodos de balance en los grupos de animales suplementados con SF + Vit C. En general, el consumo del néctar con SF y vitamina C no supuso un aumento en el ritmo de crecimiento ni en la *ingesta total de alimento*. Con respecto a los grupos PFM + Vit C, la *ingesta total de alimento* en el 1º periodo de balance (113,28 g) fue significativamente inferior ($p < 0,05$) al 2º y 3º periodo de balance (155,04 y 158,33 g, respectivamente), en cambio la *ganancia de peso* en el 3º periodo de balance (4,89 g) fue significativamente inferior ($p < 0,05$) al 2º y 3º periodo de balance (12,82 y 20,83 g, respectivamente). Esta clara disminución en la *ganancia de peso* durante el 3º periodo de balance, podría estar relacionada con un menor aprovechamiento nutricional del alimento, lo que hace que el ritmo de crecimiento se ralentice.

2.2. Balance mineral

La Tabla 2.3 muestra el efecto del tipo de compuesto de enriquecimiento (SF o PFM) en los parámetros relacionados con el balance mineral del hierro durante los tres periodos de balance del 2º Estudio. Como podemos apreciar, solamente en el 2º periodo de balance se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) para las variables *ingesta*, *excreción fecal*, *absorción* y *retención aparente*.

Tabla 2.3. Análisis de varianza de los parámetros relacionados con el balance mineral del hierro, tras la administración del SF + Vit C y PFM + Vit C añadidos a un néctar de frutas, durante el periodo de repleción.

VARIABLES	1^{er} Balance	2^{do} Balance	3^{er} Balance
Ingesta (mg Fe)	NS	**	NS
Excreción fecal (mg Fe)	NS	***	NS
Excreción urinaria (µg Fe)	NS	NS	NS
Balance del hierro (mg)	NS	NS	NS
Absorción aparente (%)	NS	***	NS
Retención aparente (%)	NS	***	NS
Retención x 100/ Absorción	NS	NS	NS

Diferencias significativas para: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; NS = no significación

La Tabla 2.4 muestra el balance mineral del hierro en los tres periodos de balance. En esta misma Tabla 2.4, se representan también los valores obtenidos en el 1^{er} Estudio, con el objetivo de compararlos con el 2^o Estudio y establecer el posible efecto de la adición de la vitamina C en el néctar enriquecido con los diferentes compuestos de hierro.

En el 1^{er} periodo de repleción, los grupos SF + Vit C y PFM + Vit C presentaron un comportamiento muy similar en cuanto al balance mineral del hierro. En cambio, al comparar estos mismos grupos con los grupos SF y PFM, observamos que la *ingesta de hierro* (4,32 y 4,28 mg Fe, respectivamente) fue significativamente inferior ($p<0,05$) a los grupos SF y PFM (7,93 y 11,16 mg Fe, respectivamente). Esta notable diferencia se vio reflejada en el *balance del hierro* existiendo diferencias significativas ($p<0,05$) con los grupos SF y PFM. Sin embargo, y a pesar de estas diferencias, únicamente el *porcentaje de absorción y retención aparente* del grupo PFM + Vit C (70,50 y 70,28%, respectivamente) fue significativamente inferior al PFM (85,65 y 85,50%, respectivamente).

Durante el 2^o periodo de balance, la *ingesta del hierro* aumentó con respecto al periodo anterior, pero este aumento fue más significativo ($p<0,05$) para el grupo SF + Vit C (10,99 mg Fe) comparado con el grupo PFM + Vit C (5,35 mg Fe). En cuanto a la *excreción fecal*, el grupo SF + Vit C (5,88 mg Fe) fue significativamente superior al grupo PFM + Vit C (2,03 mg Fe). A pesar de los elevados niveles en la *ingesta de hierro* y en la *excreción fecal* obtenidos en el grupo SF + Vit C, el *balance del hierro* (5,12 mg) fue similar al grupo PFM + Vit C (3,31 mg). En cambio, la *absorción aparente* del grupo SF + Vit C (49,21%) fue significativamente inferior ($p<0,05$) al grupo PFM + Vit C (62,79%). Esta diferencia tan notable puede ser atribuida a la elevada pérdida de hierro a través de las heces por parte del grupo SF + Vit C, la cual supuso más del 50% de la *ingesta de hierro* durante el 2^o periodo de balance. Las pérdidas de hierro a través de la orina fueron muy pequeñas y sin diferencias entre ambos grupos (SF + Vit C: 18,00 µg Fe y PFM + Vit C: 15,44 µg Fe). Estas pérdidas al ser tan mínimas a penas hicieron variar los valores en el porcentaje de *retención aparente*, siendo, para el grupo SF + Vit C (49,02%) significativamente inferior ($p<0,05$) que el grupo PFM + Vit C (62,51%). En este sentido la

relación entre la *retención y la absorción aparente* nos indica si las pérdidas de hierro en la orina son elevadas o bajas. En este caso, los valores para los grupos SF + Vit C y PFM + Vit C (99,62 y 99,57%, respectivamente) fueron muy similares.

Si comparamos estos resultados con los obtenidos por los grupos sin vitamina C durante el 2º periodo de balance, observamos que la *excreción fecal* para el grupo SF + Vit C (5,88 mg Fe) fue significativamente superior ($p < 0,05$) al grupo SF (3,89 mg Fe), en cambio el grupo PFM + Vit C (2,03 mg Fe) fue significativamente inferior ($p < 0,05$) al grupo PFM (4,20 mg Fe). Además la *excreción urinaria* en los grupos con la vitamina C fueron significativamente inferiores ($p < 0,05$) a los grupos sin la vitamina C. El *balance del hierro* en los grupos SF + Vit C y PFM + Vit C (5,12 y 3,31 mg Fe, respectivamente) fue significativamente inferior ($p < 0,05$) a los grupos SF y PFM (8,20 y 9,47 mg Fe, respectivamente), pero en cambio, la *absorción aparente* fue muy similar en todos los grupos, salvo para el grupo SF + Vit C (49,21%), debido a las elevadas pérdidas de hierro en las heces.

En el último periodo de repleción, todos los parámetros relacionados con el balance mineral del hierro fueron similares para los grupos SF + Vit C y PFM + Vit C. Por el contrario, sí se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto a los grupos SF y PFM. En este caso, la *ingesta de hierro* en los grupos SF + Vit C (5,64 mg Fe) y PFM + Vit C (7,12 mg Fe) fue significativamente inferior ($p < 0,05$) a los grupos SF (10,81 mg Fe) y PFM (12,46 mg Fe), de igual modo ocurrió con la *excreción fecal*. A pesar de estas diferencias, el *balance del hierro* fue similar en los cuatro grupos, pero no el *porcentaje de absorción aparente*, donde se encontró un claro efecto positivo de la adición de vitamina C sobre la absorción de ambos compuestos (SF y PFM).

A lo largo del periodo de repleción, los grupos SF + Vit C y PFM + Vit C mostraron una correlación positiva entre la *ingesta del alimento* y el *balance del hierro*, siendo para el SF + Vit C ($r = 0,904$; $p < 0,01$) y para PFM + Vit C ($r = 0,866$; $p < 0,01$). Estos coeficientes fueron superiores a los presentados por los grupos SF ($r = 0,634$; $p < 0,05$) y PFM ($r = 0,729$; $p < 0,01$), indicando que la adición de la vitamina C en el néctar enriquecido con los compuestos de hierro SF y PFM favoreció la absorción del hierro.

Tabla 2.4. Absorción y retención del hierro, tras la administración del SF o PFM con/sin la vitamina C a un néctar de frutas, durante los tres periodos de repleción.

Néctar		Ingesta (mg Fe)	Excreción fecal (mg Fe)	Excreción urinaria (mg Fe)	Balance del hierro ¹ (mg)	Absorción aparente ² (%)	Retención aparente ³ (%)	Retención x100 / Absorción
⁽ⁿ⁾ Repleción								
1 ^{er} Periodo	SF	7,93 ± 0,95 /b	1,47 ± 0,15 /b	22,21 ± 5,90 /a	6,45 ± 0,97 /b	80,33 ± 3,85 /a	80,04 ± 3,84 /a	99,65 ± 0,08
	SF + Vit C	4,32 ± 0,69 ^{*/b}	1,37 ± 0,06 /c	8,48 ± 1,87 ^{*/b}	2,96 ± 0,68 [*]	72,06 ± 5,17 /a	71,88 ± 5,17 /a	99,74 ± 0,03
	PFM	11,16 ± 3,58	1,54 ± 0,68 /c	4,21 ± 1,63 /b	9,62 ± 1,77	85,65 ± 3,43 /a	85,50 ± 3,40 /a	99,82 ± 0,08
	PFM + Vit C	4,28 ± 0,38 ^{*/b}	1,25 ± 0,09 /c	4,78 ± 1,01 /b	3,02 ± 0,29 [*]	70,50 ± 0,67 ^{*/a}	70,28 ± 0,72 ^{*/a}	99,72 ± 0,12
2 ^o Periodo	SF	12,09 ± 0,60 /a	3,89 ± 0,39 /ab	42,40 ± 12,80 ^{/*}	8,20 ± 0,61 /a	67,74 ± 3,33 /b	67,32 ± 3,25 /b	99,40 ± 0,12
	SF + Vit C	10,99 ± 1,27 /a	5,88 ± 0,54 ^{*/a}	18,00 ± 2,54 ^{*/a}	5,12 ± 0,87 [*]	49,21 ± 1,25 ^{*/b}	49,02 ± 1,24 ^{*/b}	99,62 ± 0,09
	PFM	13,67 ± 1,13	4,20 ± 0,61 /b	22,91 ± 3,93 /a	9,47 ± 0,95	69,25 ± 3,24 /b	69,06 ± 3,23 /b	99,72 ± 0,05
	PFM + Vit C	5,35 ± 0,79 ^{*/ab}	2,03 ± 0,19 ^{*/b}	15,44 ± 2,55 ^{*/a}	3,31 ± 0,62 [*]	62,79 ± 1,81 /a	62,51 ± 1,80 /a	99,57 ± 0,02
3 ^{er} Periodo	SF	10,81 ± 2,29 /b	6,27 ± 1,31 /a	29,92 ± 5,28 / [*]	4,54 ± 1,01 /b	41,90 ± 1,34 /c	41,60 ± 1,31 /c	99,29 ± 0,12
	SF + Vit C	5,64 ± 0,55 ^{*/b}	2,55 ± 0,12 ^{*/b}	15,44 ± 2,42 ^{*/a}	3,09 ± 0,46	53,24 ± 3,54 ^{*/b}	52,97 ± 3,54 ^{*/b}	99,55 ± 0,08
	PFM	12,46 ± 1,99	6,66 ± 0,45 /a	19,09 ± 3,69 ^a	5,81 ± 1,62	44,88 ± 6,06 /c	44,70 ± 6,06 /c	99,23 ± 0,41
	PFM + Vit C	7,12 ± 0,64 ^{*/a}	3,26 ± 0,33 ^{*/a}	13,34 ± 1,53 ^{*/a}	3,99 ± 0,44	56,48 ± 4,55 ^{*/b}	56,26 ± 4,54 ^{*/b}	99,62 ± 0,05

Cada valor es la media ± Error típico, n=6

^{*/} La presencia de asteriscos dentro de la misma columna para cada uno de los tres periodos de repleción indica diferencias significativas (p<0,05) entre los grupos suplementados con SF + Vit C y SF sin vitaminas; y los grupos suplementados con PFM + Vit C y PFM sin vitaminas.

^{/a-c} Diferentes letras dentro de la misma columna indican diferencias significativas (p < 0.05) entre los tres periodos de repleción, dentro de un mismo compuesto (SF + Vit C y PFM + Vit C)

¹Balance del hierro = Ingesta de hierro (mg) – Excreción fecal (mg)

²Absorción aparente (%) = [Ingesta de hierro (mg) – Excreción fecal (mg)] x 100 / Ingesta de hierro (mg).

³Retención (%) = [Ingesta de hierro (mg) – (Excreción fecal (mg) + Excreción urinaria (mg))] x 100 / Ingesta de hierro (mg).

La ausencia de superíndices indica que no existen diferencias estadísticamente significativas

Por otra parte, Wienk y col. (1997) y Layrisse y García-Casal (1997) observaron que un aumento en el estatus del hierro y en la *ingesta de hierro* conducía a un descenso en el *porcentaje de absorción aparente*. Aunque encontramos una relación inversa entre la *ingesta de hierro* y el *porcentaje de absorción aparente* en todos los grupos, la correlación entre ambos parámetros presentó un nivel de significación muy elevado ($p > 0,05$).

Como ya se sabe, el ácido ascórbico es el compuesto más empleado para favorecer la absorción del hierro en alimentos enriquecidos con hierro (Hurrell y col., 2004). El efecto favorecedor parece ser debido, tanto a su poder reductor como a su acción de quelación (Conrad y Schade., 1968). En nuestro ensayo, la forma química de los compuestos de hierro utilizados no influyó en los valores de la *absorción aparente*, es decir, los grupos suplementados con SF o PFM + Vit C no presentaron diferencias significativas entre ellos, comportándose de manera similar. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Derman y col (1980), los cuales observaron un incremento en el *porcentaje de la absorción del hierro* cuando el ácido ascórbico fue añadido a los cereales infantiles con sulfato ferroso, pirofosfato férrico o citrato amónico férrico, y concluyeron que la forma química de los compuestos de hierro empleados en el enriquecimiento no pareció influir en el resultado. No obstante, en el 3^{er} periodo de balance, la adición de la vitamina C al néctar enriquecido con SF o PFM favoreció el porcentaje de absorción aparente comparado con los grupos PFM y SF. Hay que tener en cuenta que el néctar fue formulado con un ratio molar ácido ascórbico/hierro de 2,8:1, ligeramente superior al que recomiendan diferentes autores (2:1), para obtener un incremento suficiente en la absorción de hierro en humanos (Hurrell, 2002; Lynch y Stolfus, 2003; Hurrell y col., 2004), sin embargo, es posible que el efecto de la adición de esta vitamina no sea tan evidente al utilizar ratas como modelo de estudio, ya que, a diferencia de los humanos, las ratas sintetizan ácido ascórbico, el cual es liberado de manera continua a la bilis aumentando por tanto la asimilación del hierro (Reddy y Cook., 1994). Sin embargo, en un estudio realizado en ratas anémicas por Wienk y col, (1997), se encontró un efecto claro de la vitamina C en la captación de hierro por las células de la mucosa intestinal debido a un mecanismo independiente de la solubilidad intestinal de este mineral. Este hecho puede servir de explicación, en nuestro estudio, a los bajos niveles de hierro encontrados en las heces de las ratas pertenecientes a los grupos con SF o PFM con vitamina C.

2.3. Biodisponibilidad y utilización del hierro

La Tabla 2.5, muestra el efecto del tipo de compuesto de enriquecimiento (SF o PFM) añadido al néctar junto con la vitamina C, sobre las variables relacionadas con el índice de la biodisponibilidad y la utilización del hierro durante los tres periodos de balance.

Tabla 2.5. Análisis de varianza de los parámetros relacionados con los índices de biodisponibilidad y la utilización del hierro, en los grupos alimentados con SF + Vit C y PFM + Vit C, durante los tres periodos de balance.

VARIABLES	1^{er} Balance	2^o Balance	3^{er} Balance
Ganancia de peso (g)	NS	NS	NS
Ingesta (mg Fe)	NS	**	NS
Hb inicial (g/dl)	NS	NS	NS
Hb final (g/dl)	NS	NS	NS
Fe Hb inicial (mg)	**	*	***
Fe Hb final (mg)	**	*	***
ERH¹ (%)	NS	NS	NS
Utilización del hierro (mg)	NS	NS	NS

Diferencias significativas para: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; NS = no significación

¹ERH: eficiencia de la regeneración de la hemoglobina.

2.3.1. Eficiencia de la regeneración de la hemoglobina (ERH).

La Tabla 2.6, muestra los resultados obtenidos para el cálculo de la biodisponibilidad y utilización del hierro en los tres periodos de balance en el 1^{er} y 2^o Estudio.

En el 1^{er} periodo de balance, únicamente se observaron diferencias significativas (p<0,01) en los parámetros, FeHb_i y FeHb_f, siendo el grupo SF + Vit C (3,95 y 6,01 mg, respectivamente) significativamente superior al grupo PFM + Vit C (2,00 y 3,58 mg respectivamente). Estas diferencias se deben a los pesos tanto iniciales como finales, los cuales fueron significativamente diferentes (ver Tabla 2.2). Con respecto al porcentaje de la biodisponibilidad del hierro, expresado ERH, éste fue muy similar en ambos grupos, es decir, el tipo de compuesto (SF o PFM) junto con la vitamina C no afectó a la ERH. Pero lo más significativo durante el 1^{er} periodo de repleción, fue la elevada eficiencia de regeneración de la hemoglobina y utilización del hierro de los grupos SF + Vit C (40,67% y 2,00 mg; respectivamente) y PFM + Vit C (39,42% y 1,94 mg, respectivamente) comparada con los grupos SF (20,55% y 1,01 mg; respectivamente) y PFM (14,80% y 0,73 mg respectivamente). Teniendo en cuenta que para el cálculo de la ERH es necesario conocer la ganancia de hierro en la Hb (FeHb_f - FeHb_i) en relación a la *ingesta de hierro*, y que para el caso de los grupos PFM + Vit C y PFM, la ganancia de hierro en la Hb fue similar, la diferencia en la ERH se debió a la *ingesta de hierro*, siendo para el grupo PFM + Vit C (4,28 mg) significativamente inferior (p<0,05) al grupo PFM (9,88 mg). Sin embargo, en el caso de los grupos SF + Vit C y SF, la diferencia (p<0,05) se debió tanto a la *ingesta de hierro* (4,32 y 7,42 mg, respectivamente) como a la ganancia de hierro en la Hb (2,06 y 1,69 mg, respectivamente). Al calcular la biodisponibilidad relativa de los diferentes compuestos con respecto al SF, al que se le atribuye una VBR de 100, concluimos que en el 1^{er} periodo de balance, la adición de vitamina C tanto al SF (198%) como al PFM (192%) mejora considerablemente su biodisponibilidad.

Durante los 10 días que duró el 2º periodo de repleción, el grupo SF + Vit C presentó una *ingesta de hierro*, FeHb_i y FeHb_f significativamente superior ($p < 0,05$) al grupo PFM + Vit C (Tabla 2.6). Al igual que en el periodo anterior, estas diferencias no fueron suficientes para que el grupo SF + Vit C presentara una eficiencia de regeneración de la hemoglobina y utilización del hierro (20,51% y 1,01 mg, respectivamente) superior al grupo PFM + Vit C (23,36% y 1,15 mg, respectivamente).

Al comparar los grupos SF + Vit C y PFM + Vit C con los grupos SF y PFM si se observaron claras diferencias. La *ganancia de peso* de los grupos SF + Vit C y PFM + Vit C (68,35 y 69,38 g, respectivamente) fue estadísticamente superior ($p < 0,05$) a los grupos SF y PFM (38,05 y 42,12 g, respectivamente). La concentración de la Hb_i en los grupos SF + Vit C y PFM + Vit C (7,04 y 6,42 g/dl, respectivamente) fue significativamente inferior ($p < 0,05$) a los grupos SF (7,62 g/dl) y PFM (7,50 g/dl). Sin embargo, la FeHb_i en los grupos SF + Vit C y PFM + Vit C (3,87 y 2,72 mg, respectivamente) no presentó diferencias significativas con los grupos SF y PFM (3,05 y 2,96 mg, respectivamente), probablemente estas diferencias fueron compensadas por los *pesos iniciales* de las ratas, los cuales fueron más elevados. En cuanto a la concentración de la Hb_f, obtenida tanto en los grupos SF + Vit C y PFM + Vit C (13,68 y 13,12 g/dl, respectivamente) como en los grupos SF y PFM (14,12 y 14,47 g/dl, respectivamente) nos indican una clara recuperación de un estado de anemia deficiente en hierro, tomando como referencia el rango normal (11,1-18 g/dl) (Tabla 1.5). Esta recuperación se debe a una buena biodisponibilidad del hierro, que se ve reflejada en la eficiencia de regeneración de la hemoglobina (ERH). El grupo SF + Vit C mostró valores ligeramente superiores aunque no significativos al grupo SF (20,51 y 16,85%, respectivamente), sin embargo, para el grupo PFM + Vit C (23,36%), la adición de la vitamina C, tuvo un efecto más acusado ($p < 0,05$) sobre este parámetro, en comparación al grupo PFM (13,79%).

En general, la utilización del hierro en las ratas alimentadas con la fuente de hierro SF con/sin vitamina C (1,01 y 0,83 mg, respectivamente) fue similar. En cambio, para las ratas con PFM, la adición de la vitamina C tuvo un efecto favorecedor presentando diferencias significativas entre ellas ($p < 0,05$) (PFM + Vit C: 1,15 mg y PFM: 0,68 mg). La biodisponibilidad relativa del PFM + Vit C fue de 139, claramente superior al grupo PFM, que tuvo un VBR de 82. Este mismo efecto se encontró en el SF ya que la vitamina C en este 2º periodo de repleción mejoró considerablemente su biodisponibilidad en relación al control, SF (considerado como 100).

En el último periodo de repleción, la concentración de la Hb_i para los grupos SF + Vit C y PFM + Vit C (7,20 y 6,88 g/dl, respectivamente) fue muy similar y con respecto a los grupos SF

y PFM (6,33 y 6,88 g/dl, respectivamente) únicamente existieron diferencias significativas ($p < 0,05$) para el grupo SF. Tanto el FeHb_i como FeHb_f para el grupo SF + Vit C (3,55 y 9,72 mg, respectivamente) fue superior significativamente ($p < 0,001$) al grupo PFM + Vit C (2,62 y 8,04 mg, respectivamente) y al grupo SF (2,30 y 7,94 mg, respectivamente). Sin embargo, la eficiencia de regeneración de la hemoglobina (ERH) y la utilización del hierro fue similar entre los grupos SF + Vit C (11,85% y 0,58 mg, respectivamente) y PFM + Vit C (10,91% y 0,54 mg, respectivamente). Con respecto a los grupos SF y PFM, solamente el grupo PFM + Vit C fue significativamente superior ($p < 0,05$) al grupo PFM (8,09% y 0,40 mg). Aunque de forma menos notable, la biodisponibilidad relativa del PFM y del SF en este 3^{er} periodo de repleción, mejoró considerablemente con la adición de la vitamina C.

Cuando las ratas anémicas comienzan un periodo de repleción, la ingesta de hierro y la ganancia de la hemoglobina ($\text{Hb}_f - \text{Hb}_i$) se encuentran correlacionadas positivamente con la ganancia de peso (Wienk y col., 1999). Al igual que Wienk y col (1999), durante el periodo de repleción encontramos una correlación positiva entre la ingesta de hierro y la ganancia de peso, tanto para el grupo SF + Vit C ($r = 0,922$; $p < 0,001$) como para el grupo PFM + Vit C ($r = 0,897$; $p < 0,001$), y entre la ganancia de hemoglobina y la ganancia de peso, grupo SF + Vit C ($r = 0,838$; $p < 0,001$) y grupo PFM + Vit C ($r = 0,857$; $p < 0,001$). Además, las ratas recuperaban completamente sus niveles de hemoglobina al final de los 10 días que duró el 2^o periodo de repleción ($\text{Hb} > 12$ g/dl), siendo para el grupo SF + Vit C y PFM + Vit C (13,68 y 13,12 g/dl, respectivamente), no existiendo diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto a los mismos grupos durante el 3^{er} periodo de repleción (13,53 y 13,54 g/dl, respectivamente).

El aumento en la ingesta total de hierro durante el periodo de repleción determinó solamente un aumento en la concentración de la hemoglobina y por tanto en la ganancia de la misma, sino también un notable aumento en la ganancia de hierro en la hemoglobina, existiendo una correlación positiva entre ambas variables, siendo para el grupo SF + Vit C ($r = 0,833$; $p < 0,001$), y para el grupo PFM + Vit C ($r = 0,771$; $p < 0,001$).

Tabla 2.6. Eficiencia de regeneración de la hemoglobina (ERH), utilización del hierro y valor biológico relativo (VBR) en ratas anémicas, tras la administración del SF o PFM con/sin la Vitamina C, en un néctar de frutas, durante los tres periodos de repleción.

Néctar		Ganancia de peso (g)	Ingesta de Fe (mg)	Hb inicial (g/dl)	Hb final (g/dl)	Fe Hb inicial ¹ (mg)	Fe Hb final ¹ (mg)	ERH ² (%)	Utilización del Fe ³ (mg)	VBR ⁴
Repleción										
1^{er} Periodo	SF	10,30 ± 4,33 /c	7,42 ± 1,98 /c	7,88 ± 0,81 /a	11,68 ± 0,98 /b	2,82 ± 0,91	4,21 ± 1,23 /b	20,55 ± 4,27 /a	1,01 ± 0,21	100
	SF + Vit C	12,58 ± 3,94 /c	4,32 ± 0,69*/c	7,05 ± 0,47	10,70 ± 0,50 /b	3,95 ± 0,36	6,01 ± 0,56*/b	40,67 ± 6,76*/a	2,00 ± 0,33*/a	198
	PFM	12,47 ± 2,65 /c	9,88 ± 4,21 /c	7,75 ± 0,78 /a	11,35 ± 1,91 /b	2,79 ± 0,57	4,22 ± 1,06 /b	14,80 ± 3,17 /a	0,73 ± 0,16 /a	72
	PFM + Vit C	12,82 ± 2,44 /c	4,28 ± 0,38*/c	6,19 ± 0,33*	10,12 ± 0,17 /b	2,00 ± 0,14*/b	3,58 ± 0,22 /b	39,42 ± 5,53*/a	1,94 ± 0,27*/a	192
2^o Periodo	SF	38,05 ± 3,96 /b	27,47 ± 4,78 /b	7,62 ± 0,16 /ab	14,12 ± 0,37 /a	3,05 ± 0,76	7,55 ± 0,77 /a	16,85 ± 5,06 /ab	0,83 ± 0,25	100
	SF + Vit C	68,35 ± 1,91*/b	28,04 ± 1,91 /b	7,04 ± 0,12*	13,68 ± 0,34 /a	3,87 ± 0,29	9,60 ± 0,70*/a	20,51 ± 1,12 /b	1,01 ± 0,06 /b	122
	PFM	42,12 ± 6,97 /b	30,33 ± 2,72 /b	7,50 ± 0,37 /ab	14,47 ± 0,61 /a	2,96 ± 0,50	7,09 ± 0,78 /a	13,79 ± 2,79 /a	0,68 ± 0,14 /a	82
	PFM + Vit C	69,38 ± 1,86*/b	21,45 ± 0,86*/b	6,42 ± 0,25*	13,12 ± 0,24*/a	2,72 ± 0,23 /a	7,70 ± 0,39 /a	23,36 ± 2,14*/b	1,15 ± 0,11*/b	139
3^{er} Periodo	SF	80,50 ± 15,73 /a	56,78 ± 4,58 /a	6,33 ± 0,40 /b	14,00 ± 0,42 /a	2,30 ± 1,13	7,94 ± 1,19 /a	10,02 ± 1,96 /b	0,49 ± 0,09	100
	SF + Vit C	99,36 ± 6,20 /a	52,22 ± 1,18 /a	7,20 ± 0,09*	13,53 ± 0,15 /a	3,55 ± 0,13*	9,72 ± 0,24*/a	11,85 ± 0,51 /c	0,58 ± 0,03 /b	118
	PFM	64,30 ± 7,21 /a	53,04 ± 5,95 /a	6,35 ± 0,53 /b	14,60 ± 0,51 /a	2,56 ± 0,77	6,88 ± 1,45 /a	8,09 ± 0,88 /b	0,40 ± 0,04 /b	81
	PFM + Vit C	93,90 ± 3,70*/a	50,13 ± 1,50 /a	6,88 ± 0,13	13,54 ± 0,18*/a	2,62 ± 0,10 /a	8,04 ± 0,17 /a	10,91 ± 0,56*/c	0,54 ± 0,03*/c	109

Cada valor es la media ± Error típico, n=6

* La presencia de asteriscos dentro de la misma columna para cada uno de los tres periodos de repleción indica diferencias significativas (p<0,05) entre los grupos suplementados con SF + Vit C y SF sin vitaminas; y los grupos suplementados con PFM + Vit C y PFM sin vitaminas.

/a-c Diferentes letras dentro de la misma columna indican diferencias significativas (p < 0.05) entre los tres periodos de repleción, dentro de un mismo compuesto (SF + Vit C y PFM + Vit C)

La ausencia de superíndices indican que no hay diferencias significativas entre los diferentes grupos en estudio

¹ Fe en Hb se describe en la sección de material y métodos: mg Fe en Hb = (peso x Hb x 0,067 x 3,4).

² ERH (%) = [Fe Hb (final) – Fe Hb (inicial) x 100] / mg Fe consumido.

³ Utilización del hierro (mg) = ERH (%) x Fe en la dieta (%) / 100.

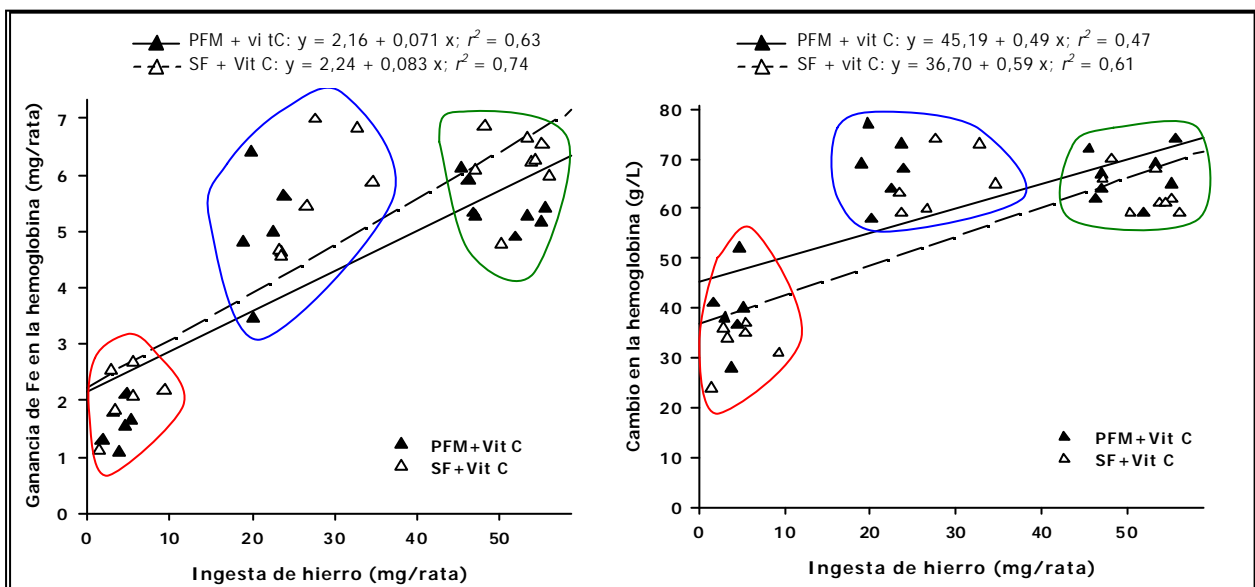
⁴ VBR = ERH (SF o PFM) con/sin Vit C / ERH (SF)

La ausencia de superíndices indica que no existen diferencias estadísticamente significativas

También se observó una correlación inversa entre la ingesta total de hierro y la eficiencia de regeneración de la hemoglobina en los dos grupos de ratas en estudio, es decir a medida que aumenta la ingesta total de hierro la eficiencia de regeneración de la hemoglobina (ERH) va disminuyendo, siendo para el grupo SF + Vit C ($r = -0,907$; $p < 0,001$) y para el grupo PFM + Vit C ($r = -0,865$; $p < 0,001$). En el 1^{er} periodo de repleción, aproximadamente un 40% del hierro consumido por el grupo PFM + Vit C y SF + Vit C fue utilizado para la síntesis de la hemoglobina, mientras que en el 2^o y 3^{er} periodo de repleción la cantidad de hierro utilizada para la síntesis de la hemoglobina por los grupos SF + Vit C (20,51 y 11,85%, respectivamente) y PFM + Vit C (23,36 y 10,91%, respectivamente) fue significativamente inferior ($p < 0,05$) al 1^{er} periodo de repleción. Esta misma relación inversa entre la ingesta total de hierro y la ERH fue observada por Buchowski y col (1989).

2.3.2. Relación entre las modificaciones en la hemoglobina y la ingesta de hierro.

Se realizó un análisis de regresión lineal entre las dos medidas utilizadas para el cálculo de la regeneración de la hemoglobina (ganancia o cambio en la hemoglobina y la ganancia de hierro en la hemoglobina) y la ingesta de hierro (Figuras 2.1 y 2.2, respectivamente).



Figuras 2.1 y 2.2. Análisis de regresión lineal entre las dos medidas utilizadas para el cálculo de la regeneración de la hemoglobina y la ingesta de hierro durante el periodo de repleción. □ 1^{er} Periodo de repleción, □ 2^o Periodo de repleción y □ 3^{er} Periodo de repleción

La ganancia de hierro en la hemoglobina presentó un mejor coeficiente de regresión lineal r^2 con respecto a la ingesta de hierro que la ganancia de la hemoglobina para ambos grupos (Figura 2.1, figura de la izquierda), ya que el primer parámetro tiene en cuenta las diferencias en la ganancia de peso, y por tanto el aumento en los volúmenes de sangre durante el periodo de repleción (Shaw y Liu, 2000). Como se puede apreciar en la Figura 2.1, la ganancia de hierro en la hemoglobina es similar entre el 2^o y 3^{er} periodo de repleción independientemente de la

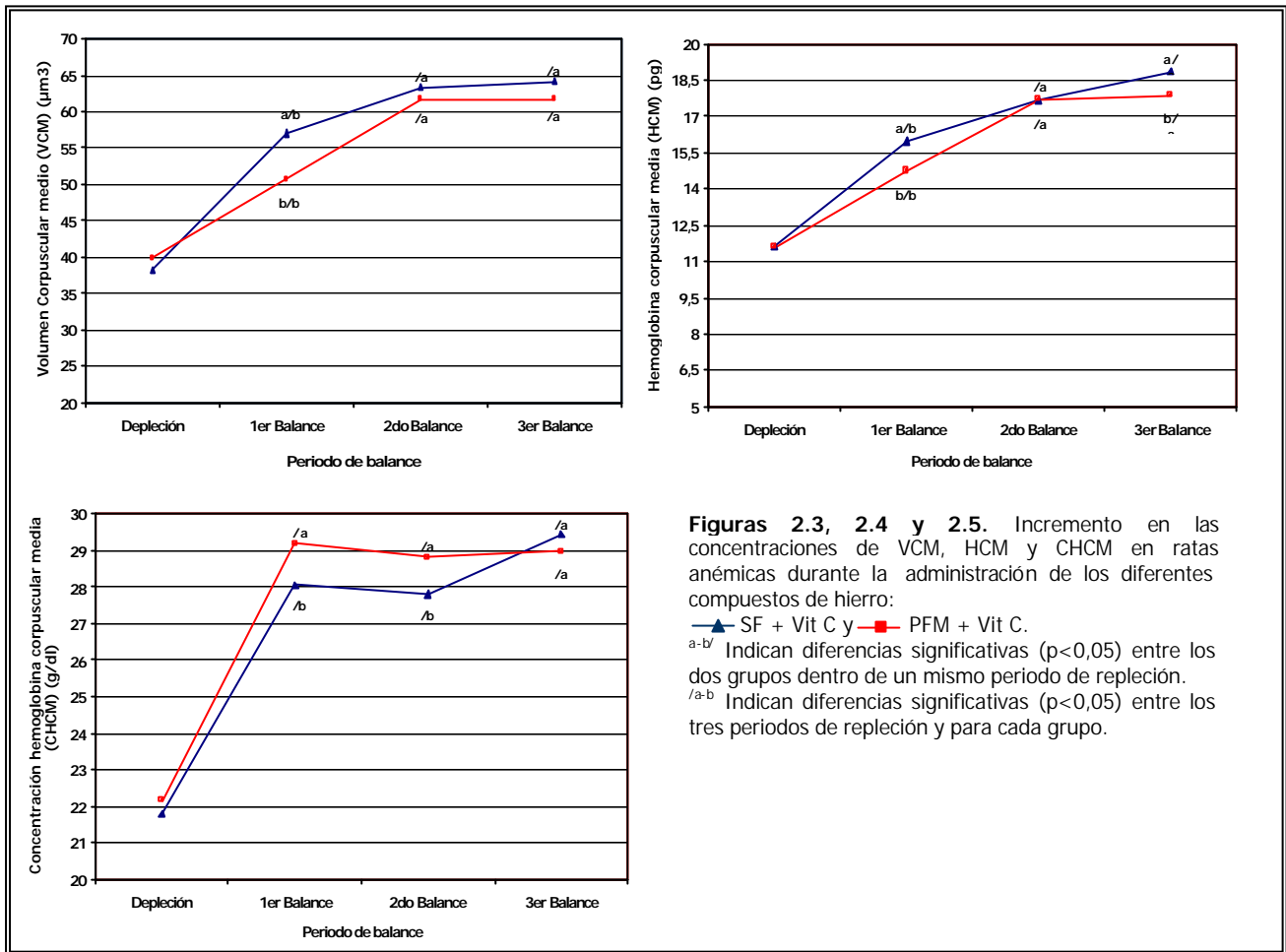
ingesta de hierro, siendo para el grupo SF + Vit C (5,72 y 6,17 mg, respectivamente) y para el grupo PFM + Vit C (4,98 y 5,41 mg, respectivamente). La ingesta diaria de hierro en el 2º y 3º periodo fue aproximadamente de 3 mg. En la ganancia o cambio en la hemoglobina (Figura 2.2, figura de la derecha) se observó la misma tendencia, lo cual puede ser indicativo de que la recuperación de un estado de deficiencia en hierro, se ha completado en el 2º periodo de balance. En cambio, la eficiencia de regeneración de la hemoglobina (ERH), que relaciona la ganancia de hierro en la hemoglobina con la ingesta total de hierro, si presentó diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ambos periodos de repleción, debido a que se tiene en cuenta la ingesta total de hierro y no la ingesta diaria de hierro.

2.4. Índices hematológicos y bioquímicos

Las Figuras 2.3, 2.4 y 2.5, muestran la evolución del VCM, HCM y CHCM respectivamente, desde un estado de anemia deficiente en hierro a un estado nutricional de hierro adecuado durante los tres periodos de repleción, tomando como referencia los valores presentados en la Tabla 1.5.

Los niveles en depleción fueron inferiores a los niveles normales de acuerdo con los valores de referencia de la Tabla 1.5. Al inicio de la suplementación ambos grupos de ratas presentaron una anemia microcítica (tamaño de los eritrocitos más pequeños que los normales) e hipocrómica (concentración de la hemoglobina reducida), situaciones que son características de una anemia deficiente en hierro. Después de 3 días de suplementación (1º periodo) con el néctar enriquecido con SF + Vit C o PFM + Vit C, los índices eritrocitarios alcanzaron valores de $VCM > 44 \mu\text{m}^3$, $HCM > 12,0 \text{ pg}$ y para $CHCM > 21,6 \text{ g/dl}$ (ver Tabla 1.5). Además, en el grupo PFM + Vit C, los niveles de VCM y HCM ($57 \mu\text{m}^3$ y $15,98 \text{ pg}$, respectivamente), fueron significativamente superiores ($p < 0,05$) al grupo SF + Vit C ($50,67 \mu\text{m}^3$ y $14,75 \text{ pg}$) (Figura 2.3 y 2.4, respectivamente).

Al final del 2º periodo de repleción (10 días de suplementación), no se observaron diferencias significativas para los niveles de VCM, HCM y CHCM en ambos grupos. En cambio, al final del 3º periodo (17 días de suplementación) el grupo PFM + Vit C presentó valores significativamente superiores ($p < 0,05$) para la variable HCM con respecto al grupo SF + Vit C ($18,87$ y $17,87 \text{ pg}$, respectivamente). Mientras las otras dos variables (VCM y CHCM) fueron similares entre los dos grupos.

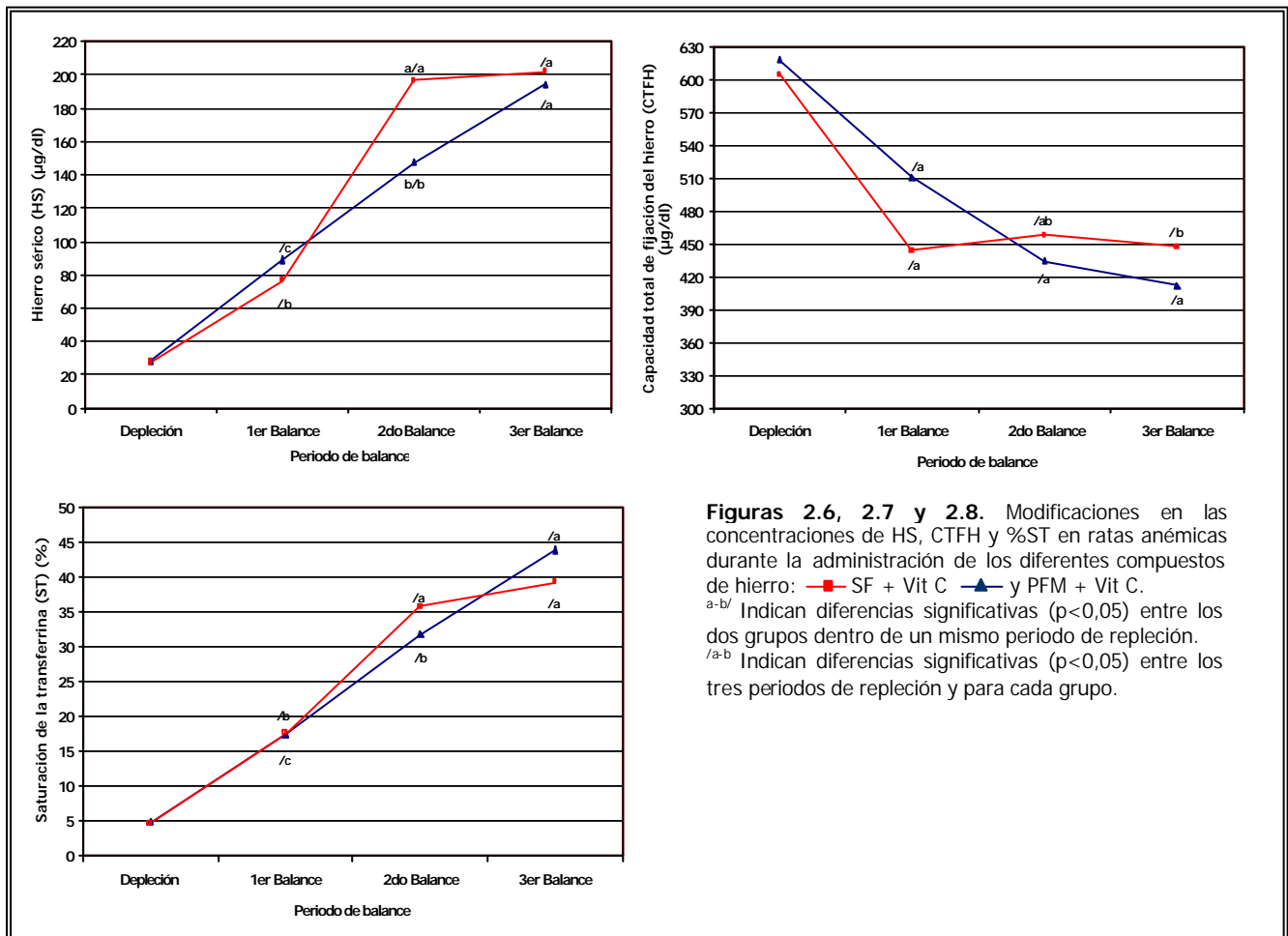


Al comparar los tres periodos de repleción entre sí, observamos que los índices eritrocitarios (VCM, HCM y CHCM) para el grupo SF + Vit C fueron constantes en el 2^o y 3^{er} periodo de repleción y significativamente superiores ($p < 0,05$) al 1^{er} periodo de repleción. Sin embargo, para el grupo PFM + Vit C la CHCM aumentó en el último periodo de repleción (29,44 g/dl), siendo este aumento significativamente superior ($p < 0,05$) al 1^{er} y 2^o periodo de repleción (28,05 y 27,80 g/dl, respectivamente). En los restantes índices eritrocitarios (VCM y HCM) los niveles en el 2^o (63,33 μm^3 y 17,67 pg, respectivamente) y 3^{er} periodo (64,14 μm^3 y 18,87 pg, respectivamente) se mantuvieron constantes respecto al 2^o periodo y significativamente superiores al 1^{er} periodo (57 μm^3 y 15,98 pg).

El efecto de ambos compuestos de hierro sobre los índices eritrocitarios fue similar a lo largo de los tres periodos de repleción. Tras un periodo de suplementación de tres días los índices eritrocitarios VCM, HCM y CHCM de ambos grupos alcanzaron los niveles normales en cuanto a su tamaño, contenido y concentración de la hemoglobina en el eritrocito. Sin embargo, si el periodo de suplementación es mayor de 10 días, los índices eritrocitarios mejoran considerablemente con respecto a una suplementación de sólo tres días con ambos tipos de néctar.

Las Figuras 2.6, 2.7 y 2.8 representan el efecto de la adición de los dos compuestos de hierro y la vitamina C en el HS, CTFH y ST (cociente entre el HS y la CTFH) durante los tres periodos de repleción. Durante el periodo de depleción los niveles de HS y ST fueron significativamente inferiores ($p < 0,05$) a los tres periodos de repleción y para cada uno de los grupos SF + Vit C y PFM + Vit C mientras que la CTFH fue significativamente superior ($p < 0,05$).

Los niveles de HS (Figura 2.6, superior izquierda) en ambos grupos fueron aumentando a lo largo de los tres periodos de repleción. El aumento más significativo para el grupo SF + Vit C tuvo lugar al final de los 10 días de suplementación (196,65 $\mu\text{g}/\text{dl}$) no variando de manera significativa tras una suplementación de 17 días (202,17 $\mu\text{g}/\text{dl}$). En cambio, el grupo PFM + Vit C alcanzó su máxima concentración de HS después de 17 días de suplementación (194,61 $\mu\text{g}/\text{dl}$), siendo significativamente superior ($p < 0,05$) a los 3 días de suplementación (89,23 $\mu\text{g}/\text{dl}$) y a los 10 días (147,41 $\mu\text{g}/\text{dl}$).



Solamente se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los dos grupos durante el 2º periodo, donde el grupo SF + Vit C alcanzó una concentración de HS (196,65 $\mu\text{g}/\text{dl}$) superior al grupo PFM + Vit C (147,41 $\mu\text{g}/\text{dl}$), mientras que en el 1º y 3º periodo la concentración de HS fue similar.

La CTFH (Figura 2.7, superior derecha) disminuyó de manera significativa ($p < 0,05$) al final de los 3 días de repleción (1^{er} periodo) tanto para el grupo SF + Vit C (444,14 $\mu\text{g/dl}$) como para el grupo PFM + Vit C (510,83 $\mu\text{g/dl}$) al compararlo con los niveles en depleción. Además, una repleción de 3 días no fue suficiente para que el grupo PFM + Vit C alcanzara niveles normales (368 ± 124 $\mu\text{g/dl}$), y sí para el grupo SF + Vit C. Este último, obtuvo valores muy similares durante los periodos de repleción de 10 y 17 días (2^o y 3^{er} periodo) (457,98 y 447,64 $\mu\text{g/dl}$, respectivamente). Sin embargo, la CTFH disminuyó considerablemente para el grupo PFM + Vit C durante los periodos 2^o y 3^{er} (434,66 y 412,21 $\mu\text{g/dl}$, respectivamente). No se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos durante los diferentes periodos de repleción.

Destacar que los niveles más adecuados fisiológicamente para el grupo SF + Vit C se alcanzaron a los 3 días de la repleción, manteniendo sin variación ese valor durante 17 días de repleción, en cambio el grupo PFM + Vit C mostró un descenso más paulatino, alcanzando el nivel más adecuado al final del 3^{er} periodo de repleción.

El porcentaje de la saturación de la transferrina, %ST ($\text{HS} \times 100/\text{CTFH}$) (Gráfica 2.8, inferior izquierda), representa la proporción de esta proteína que se encuentra fijando el hierro para su transporte a los diversos órganos y tejidos. Una reducción en la saturación de la transferrina $< 16\%$, es un indicador fiable de un bajo suministro de hierro a la médula ósea para el desarrollo de bs eritrocitos (Bothwell y col., 1979). Al final del periodo de depleción, la saturación de la transferrina fue aproximadamente de un 5%. Después de 3 días de suplementación (1^{er} periodo), el %ST aumentó hasta alcanzar valores $> 16\%$, siendo para el grupo SF + Vit C (17,52%) muy similar a la del grupo PFM + Vit C (17,39%). Tras 10 días de suplementación, el %ST aumento el doble con respecto al periodo anterior, siendo para el grupo SF + Vit C (35,61%) y para el grupo PFM + Vit C (31,68%). En el 3^{er} periodo de repleción, el grupo SF + Vit C alcanzo un %ST (39,14%) similar al periodo anterior, mientras que el grupo PFM + Vit C alcanzo un % ST (43,77%) significativamente superior ($p < 0,05$) al periodo anterior.

En resumen, la adición al néctar con PFM y Vit C, ha demostrado tener un comportamiento muy similar a la del SF + Vit C en ratas con anemia deficiente en hierro. Ambos compuestos favorecieron la recuperación de las ratas de un estado anémico, desde el 1^{er} periodo de repleción, sin embargo analizando los parámetros empleados se observó que tras una suplementación de 10 o 17 días los resultados mejoran considerablemente, por lo que sería aconsejable que en estados anémicos se prolongara al menos la ingesta del néctar hasta 17 días.

2.4.1. Efecto de la vitamina C en los índices hematológicos y bioquímicos

La vitamina C puede mejorar la absorción del hierro, proteger contra el daño oxidativo y contrarrestar los efectos de los inhibidores de la absorción del hierro. Además, aumenta el hierro sérico y las concentraciones de hemoglobina en niños y mujeres no embarazadas (Fishman y col., 2000).

En nuestro estudio, la adición de la vitamina C al néctar enriquecido con SF ó PFM mejoró de manera significativa los parámetros relacionados con la hemoglobina (VCM, HCM y CHCM) y los relacionados con el transporte del hierro (HS, CTFH y %ST).

Al final del 1^{er} periodo de repleción, la concentración de la hemoglobina en el eritrocito (CHCM) para los grupos SF + Vit C (29,18 g/dl) y PFM + Vit C (28,05 g/dl) fueron significativamente inferiores ($p < 0,05$) a los grupos SF (31,88 g/dl) y PFM (32,17 g/dl). Durante el 2^o periodo de repleción, la CHCM para los grupos SF + Vit C (28,82 g/dl) y PFM + Vit C (27,80 g/dl) se mantuvo significativamente inferior ($p < 0,05$) a los grupos SF (30,88 g/dl) y PFM (31,28 g/dl). Sin embargo, el tamaño de los eritrocitos (VCM) para los grupos SF + Vit C ($61,67 \mu\text{m}^3$) y PFM + Vit C ($63,33 \mu\text{m}^3$) aumentó significativamente ($p < 0,05$) con respecto a los grupos SF ($58,00 \mu\text{m}^3$) y PFM ($55,67 \mu\text{m}^3$). Además, se observó que la CTFH en los grupos suplementados con las fuentes de hierro más la vitamina C eran significativamente superiores ($p < 0,05$) a los grupos sin la vitamina C, mientras que los demás parámetros (HS y %ST) no se vieron modificados por la adición de la vitamina C. Esta misma situación se mantuvo en el 3^{er} periodo de repleción, siendo el grupo PFM + Vit C el que mostró valores estadísticamente superiores ($p < 0,05$) tanto para los parámetros (VCM, HCM y CHCM) como para los parámetros (CTFH y %ST).

2.5. Almacenamiento del hierro

La Tabla 2.7 muestra las diferencias existentes entre los dos grupos de ratas que ingirieron las fuentes de hierro SF ó PFM más la vitamina C en relación a los depósitos de hierro en cada una de las piezas anatómicas analizadas durante el 1^{er} y 3^{er} periodo de repleción. La administración de los diferentes compuestos de hierro junto con la vitamina C resultó significativa en los valores de concentración de hierro del riñón, corazón (1^{er} periodo) e intestino delgado (3^{er} periodo).

Tabla 2.7. Análisis de varianza del contenido en hierro de las distintas piezas anatómicas en los grupos alimentados con el néctar SF ó PFM + Vit C, durante el 1^{er} y 3^{er} periodo de balance.

	Hígado	Bazo	Riñón	Corazón	Intestino delgado
1^{er} Balance	NS	NS	*	*	NS
3^{er} Balance	NS	NS	NS	NS	*

Diferencias significativas para: *p<0,05; NS = no significación

La Tabla 2.8 muestra las concentraciones de hierro no hemo en las diferentes piezas anatómicas durante el 1^{er} y 3^{er} periodo de repleción entre los grupos suplementados con SF ó PFM + vitamina C y los grupos control, SF y PFM.

Tabla 2.8. Concentración de hierro en los distintos órganos de las ratas alimentadas con SF o PFM con/sin Vit C, añadidos a un néctar de frutas. Los resultados se expresan en mg/g peso seco (p.s).

Néctar		Hígado	Bazo	Riñón	Corazón	Intestino delgado
Repleción						
1^{er} Periodo	SF	1,60 ± 0,66	6,54 ± 2,68	1,40 ± 0,35	1,51 ± 0,30	0,85 ± 0,31
	SF + Vit. C	0,74 ± 0,25	3,44 ± 0,45	1,04 ± 0,08 ^{/a}	1,39 ± 0,21	0,18 ± 0,04
	PFM	0,52 ± 0,27	9,04 ± 1,65	2,14 ± 0,24	2,83 ± 0,52	0,96 ± 0,35
	PFM + Vit. C	0,42 ± 0,12 ^{/b}	3,43 ± 1,38 ^{/b}	1,67 ± 0,13	2,18 ± 0,20	0,17 ± 0,02 ^{/b}
3^{er} Periodo	SF	1,03 ± 0,15	5,40 ± 1,68	1,36 ± 0,03	1,63 ± 0,17	0,56 ± 0,22
	SF + Vit. C	0,87 ± 0,14	5,35 ± 2,67	0,75 ± 0,06 ^{*/b}	1,43 ± 0,04	0,15 ± 0,04
	PFM	0,69 ± 0,17	7,10 ± 1,57	1,70 ± 0,45	2,15 ± 0,46	0,91 ± 0,19
	PFM + Vit. C	0,91 ± 0,13 ^{/a}	8,13 ± 0,80 ^{/a}	1,30 ± 0,20	1,46 ± 0,20	0,37 ± 0,03 ^{/a}

Media ± Error típico, n=6

^{/a} La presencia de asteriscos dentro de la misma columna para cada uno de los tres periodos de repleción indica diferencias significativas (p<0,05) entre los grupos suplementados con SF + Vit C y SF sin vitaminas; y los grupos suplementados con PFM + Vit C y PFM sin vitaminas.

^{/a-c} Diferentes letras dentro de la misma columna indican diferencias significativas (p < 0.05) entre los tres periodos de repleción, dentro de un mismo compuesto (SF + Vit C y PFM + Vit C)

La ausencia de superíndices indica que no existen diferencias estadísticamente significativas

Al final del 1^{er} periodo de repleción, no hubo diferencias significativas en la concentración de hierro de las diferentes piezas anatómicas para los grupos SF + Vit C y PFM + Vit C y los grupos SF y PFM. Este hecho, está relacionado con la amplia variabilidad en los resultados, los cuales se reflejan en un elevado error típico. Después de 17 días de suplementación, la concentración de hierro del hígado, bazo e intestino delgado del grupo PFM + Vit C (0,91, 8,13 y 0,37 mg Fe/g, respectivamente) aumentó significativamente (p<0,05) con respecto al 1^{er} periodo (0,42, 3,43 y 0,17 mg Fe/g, respectivamente). Este aumento tan significativo en el hígado y bazo puede estar relacionado con el hecho de que el almacenamiento del hierro tiene lugar preferentemente en estos dos compartimentos (Hershko, 1977). En cambio, para el grupo SF + Vit C la concentración de hierro en el riñón (0,75 mg Fe/g) fue significativamente inferior (p<0,05) al 1^{er} periodo (1,04 mg Fe/g). Destacar que la administración de la vitamina C en el grupo suplementado con SF (3^{er} periodo) provocó una disminución significativa (p<0,05) en la concentración de hierro en el riñón (0,75 mg Fe/g) con respecto al grupo SF (1,36 mg Fe/g). Mientras que para los demás órganos las concentraciones de hierro se mantuvieron similares, tanto en el 1^{er} como en el 3^{er} periodo de repleción.

Según Appel y col. (2001) la concentración de hierro en el hígado, bazo y riñón aumenta con la edad de las ratas y/o con la duración del tratamiento, independientemente de la concentración de hierro en la dieta o del compuesto de hierro. Sin embargo, este aumento no implicó una sobrecarga de hierro en los órganos, principalmente en el bazo, ya que se han observado mayores niveles de hierro no hemo en los bazos de ratas alimentadas con hierro carbonilo (Papanastasiou y col., 2000).

Mediante datos clínicos es posible diagnosticar una sobrecarga de hierro, cuando los niveles de saturación de la transferrina y de ferritina son elevados (Gurzau y col., 2003). Además se sabe que la absorción del hierro está inversamente relacionada con el estado nutricional del hierro, por lo que en una sobrecarga de hierro la absorción del hierro estaría disminuida y viceversa (Magnusson y col., 1981; Taylor y col., 1988; Lynch y col., 1989; Flanagan, 1989; Hallberg y col., 1997). En nuestro caso, esta situación no se produjo ya que la saturación de la transferrina fue > 16% durante el periodo de suplementación de 17 días, y la absorción no alcanzó niveles muy bajos durante ese mismo periodo de tiempo. Por esta razón descartamos una sobrecarga de hierro en las ratas suplementadas con los diferentes compuestos de hierro y vitamina C.

2.6. Efecto pro-oxidante del SF + Vit C y PFM + Vit C añadidos al néctar.

Una vez que las reservas de hierro están recuperadas, disminuye la absorción del hierro dietético en el intestino delgado. Posteriormente y tras la reabsorción del agua en la parte distal del intestino, se concentra el hierro de tal manera, que según ciertas hipótesis, pueda conducir a la generación de radicales libres. Este efecto puede ser procarcinógeno promoviendo el cáncer colorrectal (Blakeborough y col., 1989 y Babbs, 1990). Por esta razón, determinamos en este estudio si la administración diaria durante 3 días (1^{er} periodo) y 17 días (3^{er} periodo) con una concentración de hierro constante (4,92 mg Fe/100 mL) conducía a una variación en la producción de radicales libres en las heces.

La Figura 2.9 representa la producción de radicales libres en heces determinadas por la cuantificación del ácido bencenosulfínico (ABS) en los dos grupos suplementados con los diferentes compuestos de hierro durante los periodos de tiempo especificados.

La producción del ABS al final del 1^{er} periodo de repleción para el grupo SF + Vit C (2,72 $\mu\text{mol/g}$ heces totales) fue significativamente superior ($p < 0,05$) al grupo PFM + Vit C (1,61 $\mu\text{mol/g}$ heces totales) y al grupo SF (1,55 $\mu\text{mol/g}$ heces totales). En cambio, al final del 3^{er} periodo de repleción, observamos que el grupo PFM + Vit C incrementó significativamente ($p < 0,05$) la producción de radicales libres (4,54 $\mu\text{mol/g}$ heces totales) con respecto al periodo

anterior (1,60 $\mu\text{mol/g}$ heces) y al grupo PFM (2,08 $\mu\text{mol/g}$ heces totales). También fue significativo ($p < 0,05$) el aumento en la producción de radicales libres para el grupo SF + Vit C (3,52 $\mu\text{mol/g}$ heces totales) con respecto al grupo SF (2,71 $\mu\text{mol/g}$ heces totales). Una posible explicación a este aumento en la generación de radicales libres puede ser debida a la presencia de la vitamina C.

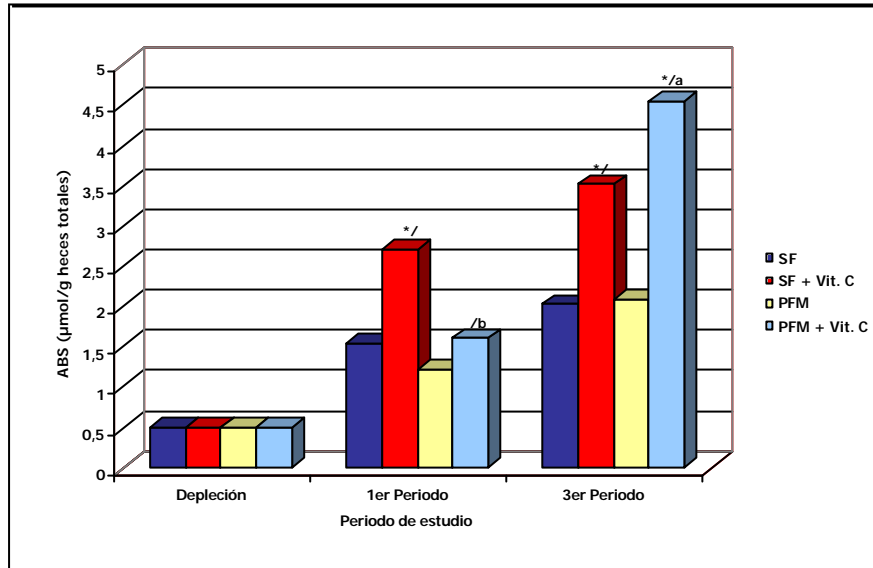


Figura 2.9. Efecto de la administración del néctar con SF con/sin vitamina C y PFM con/sin vitamina C, en la producción de radicales libres en heces, determinado por la cuantificación del ácido benzenosulfínico (ABS) como producto final en un ensayo *in vitro*

* La presencia de un asterisco muestra diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto a los grupos control (SF y PFM).

^{/a-b} Diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los dos periodos de repleción para un mismo compuesto de hierro.

La vitamina C además de favorecer la absorción del hierro y contrarrestar los efectos inhibitorios del calcio, fosfatos (Monsen y Cook., 1976) y fitatos (Hallberg y col., 1989) tiene un efecto pro-oxidante en presencia de hierro libre o hierro no unido a proteínas. Probablemente, la actividad pro-oxidante de la vitamina C resulte de la reducción del hierro férrico a la forma ferrosa (Stadtman, 1991; Chatt opadhyay y col., 1992). Posteriormente la forma oxidada de la vitamina C puede reducir otro ión férrico u oxidarse hasta el ácido dehidroascórbico. Además, como el peróxido de hidrógeno se produce durante la oxidación de la vitamina C, los substratos necesarios para la reacción Fenton están presentes y por tanto tendría lugar la producción de los radicales libres (Almaas y col., 1997). La concentración de ABS del grupo PFM + Vit C estuvo correlacionada positivamente con la excreción de hierro fecal ($r = 0,962$; $p < 0,01$), esto podría explicar la elevada producción de ABS en el último periodo de repleción, ya que la excreción de hierro fecal fue más elevada para el grupo PFM + Vit C (3,26 mg Fe) frente a la del SF + Vit C (2,55 mg Fe).

3^{er} ESTUDIO

3. Efecto de las vitaminas B₆, B₁₂ y ácido fólico sobre la biodisponibilidad del pirofosfato férrico micronizado (PFM) en el néctar de frutas enriquecido. Método de la Eficiencia de Regeneración de la Hemoglobina (ERH).

3.1. Crecimiento y consumo de alimento

La Tabla 3.1 muestra el análisis de varianza realizado en los parámetros medidos a los animales para evaluar el crecimiento de los mismos: *peso corporal inicial y final*, *ganancia de peso*, *ingestión total de alimento* (ingesta de la dieta + ingesta del néctar), durante el periodo de cada balance mineral.

Tabla 3.1. Análisis de varianza del peso corporal inicial y final, ganancia de peso e ingesta total de alimento tras la administración del SF o PFM + mezcla Vit B añadidos a un néctar de frutas, durante los tres periodos de balance

Variables	1 ^{er} Balance	2 ^o Balance	3 ^{er} Balance
<i>Peso corporal inicial</i>	*	NS	NS
<i>Peso corporal final</i>	*	*	NS
<i>Ganancia de peso</i>	NS	NS	*
<i>Ingestión total de alimento</i>	NS	NS	NS

Diferencias significativas para: *p<0.05; NS = no significación

La *ingestión total de alimento* en cada uno de los tres periodos de balance fue similar para los grupos SF + mezcla Vits B y PFM + mezcla Vits B, no influyendo en la *ganancia de peso* excepto en el 3^{er} periodo de balance, donde si hubo diferencias significativas entre los grupos de animales.

En la Tabla 3.2, se muestran los valores medios y el error típico de los parámetros relacionados con el crecimiento y la ingesta, de las ratas alimentadas con el néctar SF + mezcla Vits B o PFM + mezcla Vits B en comparación con los grupos de ratas alimentadas sólo con las fuentes de hierro (SF y PFM), durante los tres periodos de balance.

Al comienzo del 1^{er} periodo de balance, el *peso corporal inicial* en los grupos SF + mezcla Vits B y PFM + mezcla Vits B (126,60 y 150,16 g, respectivamente) fueron estadísticamente diferentes (p<0,05), manteniéndose esta diferencia hasta el final del 1^{er} balance. La *ganancia de peso* fue similar para ambos grupos de ratas, así como la *ingesta total de alimento*. Comparándolo con el 1^{er} Estudio, la adición de la mezcla de vitaminas B incrementó significativamente la *ganancia de peso* de las ratas alimentadas con ambas fuentes de hierro, pero no influyó en el resto de los parámetros.

Tabla 3.2. Crecimiento e ingesta total de alimento en ratas, tras la administración del SF o PFM junto con la mezcla de vitaminas B añadidos a un néctar de frutas durante el periodo de depleción – repleción.

	Néctar	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Ganancia de peso (g)	Ingesta total de alimento (g)
Depleción		152,57 ± 10,81	161,90 ± 10,94	9,33 ± 1,78	28,00 ± 2,65
Repleción					
1^{er} Periodo	SF	155,03 ± 17,67 ^{/b}	167,20 ± 17,20 ^{/b}	10,30 ± 4,33 ^{/a}	177,66 ± 18,57 ^{/a}
	SF + Vits ¹ . B	126,60 ± 3,78 ^{/b}	164,62 ± 5,79 ^{/a}	38,36 ± 6,01 ^{*/a}	226,61 ± 18,52 ^{/a}
	PFM	158,00 ± 10,79 ^{/a}	172,85 ± 10,94 ^{/a}	12,47 ± 2,65 ^{/a}	226,57 ± 41,28 ^{/a}
	PFM + Vits. B	150,16 ± 4,17 ^{/a}	189,12 ± 5,23 ^{/a}	38,96 ± 1,55 ^{*/a}	221,62 ± 16,55 ^{/a}
2^o Periodo	SF	229,75 ± 7,14 ^{/a}	243,45 ± 3,43 ^{/a}	13,70 ± 6,43 ^{/a}	282,20 ± 13,24 ^{/a}
	SF + Vits. B	155,74 ± 4,97 ^{*/a}	178,50 ± 2,48 ^{*/a}	22,76 ± 3,57 ^{/b}	189,41 ± 23,38 ^{*/a}
	PFM	197,95 ± 10,29 ^{/a}	215,30 ± 9,30 ^{/a}	17,35 ± 2,40 ^{/a}	306,23 ± 20,72 ^{/a}
	PFM + Vits. B	164,98 ± 4,86 ^{*/a}	193,14 ± 5,23 ^{/a}	28,16 ± 3,48 ^{*/b}	234,98 ± 13,75 ^{*/a}
3^{er} Periodo	SF	225,55 ± 16,04 ^{/a}	248,33 ± 15,67 ^{/a}	22,78 ± 4,22 ^{/a}	256,58 ± 48,12 ^{/a}
	SF + Vits. B	156,05 ± 6,91 ^{*/a}	183,97 ± 7,06 ^{/a}	27,92 ± 1,26 ^{/ab}	226,83 ± 35,92 ^{/a}
	PFM	195,83 ± 20,43 ^{/a}	208,05 ± 24,19 ^{/a}	12,23 ± 4,68 ^{/a}	253,86 ± 69,50 ^{/a}
	PFM + Vits. B	158,02 ± 6,58 ^{/a}	192,37 ± 6,68 ^{/a}	34,35 ± 0,84 ^{*/a}	201,94 ± 11,98 ^{/a}

Media ± error típico, n=6.

Vits¹ B: Vitamina B₆ + Vitamina B₁₂ + Ácido fólico

^{*/} La presencia de asteriscos dentro de la misma columna para cada uno de los tres periodos de repleción indica diferencias significativas (p<0,05) de los grupos suplementados con SF + Vits B y PFM + Vits B respecto a los grupos SF y PFM.

^{/a-b} Diferentes letras dentro de la misma columna para cada uno de los tres periodos de balance, indican diferencias significativas (p < 0,05) entre los grupos SF + Vits B, PFM + Vits B, SF y PFM.

La ausencia de superíndices indica que no existen diferencias estadísticamente significativas

El 2^o periodo de balance se inició con *pesos iniciales* significativamente diferentes entre los grupos SF + mezcla Vits B, PFM + mezcla Vits B (155,74 y 164,98 g, respectivamente) y los grupos SF y PFM (229,75 y 197,95 g, respectivamente). Aunque, la *ingesta total de alimento* en los grupos SF + mezcla Vits B y PFM + mezcla Vits B (189,41 y 234,98 g, respectivamente) fue significativamente inferior (p<0,05) a los grupos SF y PFM (282,20 y 306,23 g, respectivamente), la *ganancia de peso* fue mayor para los grupos SF + mezcla Vits B y PFM + mezcla Vits B (22,76 y 28,16 g, respectivamente) frente a los grupos SF y PFM (13,70 y 17,35 g, respectivamente). De acuerdo con esto, la relación entre la *ganancia de peso* y la *ingesta total de alimento*, que nos da una idea de la eficiencia alimentaria, fue mejor para los grupos que tomaron la fuente de hierro y la mezcla de vitaminas B, en especial para el grupo PFM + mezcla Vits B.

En el 3^{er} periodo de balance, únicamente la *ganancia de peso* entre los grupos PFM + mezcla Vits B y SF + mezcla Vits B mostraron diferencias significativas (p<0,05). Teniendo en cuenta que los *pesos iniciales* de los grupos SF con/sin mezcla Vits B (156,05 y 225,55 g, respectivamente) fueron significativamente diferentes (p<0,05), esto no afectó a la *ingesta total de alimento* y a la *ganancia de peso*, los cuales fueron similares. Sin embargo, y a pesar de la diferencia entre los *pesos iniciales* y *finales*, la relación entre la *ganancia de peso* y la *ingesta total de alimento* fue similar entre ambos grupos. No fue así, para los grupos PFM con/sin mezcla Vits B, los cuales aunque mostraron *pesos iniciales*, *finales* y una *ingesta total de*

alimento similar, la *ganancia de peso* fue significativamente diferente, siendo el grupo PFM + mezcla Vits B el que presentó una mejor eficiencia alimentaria.

3.2. Balance mineral del hierro

La Tabla 3.3 muestra el análisis de varianza de los parámetros relacionados con el balance mineral del hierro en los tres periodos de balance, para los grupos SF y PFM con la mezcla de vitaminas B. Destacar, que únicamente en el 1^{er} periodo de balance, la *excreción fecal*, *porcentaje de absorción y retención aparente*, y la *relación entre la retención y la absorción aparente* presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$), para los grupos SF + mezcla Vits B y PFM + mezcla Vits B, mientras que en el 2^o y 3^{er} periodo de balance, el balance mineral del hierro no mostró diferencias significativas entre ambos grupos.

Tabla 3.3. Análisis de varianza de los parámetros relacionados con el balance mineral del hierro, tras la administración del SF o PFM + mezcla de vitaminas B añadidos a un néctar de frutas, durante el periodo de repleción

Variables	1^{er} Balance	2^{do} Balance	3^{er} Balance
<i>Ingesta (mg Fe)</i>	NS	NS	NS
<i>Excreción fecal (mg Fe)</i>	*	NS	NS
<i>Excreción urinaria (µg Fe)</i>	NS	NS	NS
<i>Balance del hierro (mg)</i>	NS	NS	NS
<i>Absorción aparente (%)</i>	*	NS	NS
<i>Retención (%)</i>	*	NS	NS
<i>Retención x 100/ Absorción</i>	*	NS	NS

Diferencias significativas para: * $p < 0,05$; NS = no significación

La Tabla 3.4, representa las medias y el error típico de las variables empleadas para el cálculo del balance mineral en los grupos PFM + mezcla Vits B y SF + mezcla Vits B, comparados con los grupos PFM y SF (1^{er} Estudio).

3.2.1. Comparación del balance mineral del hierro entre los grupos SF y PFM con la mezcla de vitaminas B.

Durante el 1^{er} periodo de balance, los grupos SF + mezcla Vits B y PFM + mezcla Vits B (8,22 y 9,52 mg Fe) presentaron una *ingesta de hierro* similar. Sin embargo, la *excreción fecal* fue significativamente superior ($p < 0,05$) para el grupo SF + mezcla Vits B (1,18 mg Fe) frente al grupo PFM + mezcla Vits B (0,43 mg Fe), esto explicaría las diferencias significativas ($p < 0,05$) existentes en el *porcentaje de absorción aparente y retención aparente*, para los grupos PFM + mezcla Vits B (92,84% y 93,77%, respectivamente) y SF + mezcla Vits B (85,76% y 85,60%, respectivamente). Se sabe que en estados anémicos el transporte y la absorción del hierro aumentan, estando en relación inversa con las reservas de hierro presentes en el organismo (Benito y col., 1997). Por este motivo, los *porcentajes de absorción y retención aparente* se

encuentran elevados en este periodo de balance, indicando que las reservas de hierro aún se encuentran por debajo de lo normal.

Además, la *relación entre la retención y la absorción aparente* para el grupo PFM + mezcla Vits B (99,93%) fue significativamente superior ($p < 0,05$) al grupo SF + mezcla Vits B (99,81%), indicando una menor pérdida de hierro en la orina (7,15 $\mu\text{g Fe}$) frente al grupo SF + mezcla Vits B (12,06 $\mu\text{g Fe}$), este hecho, junto a una menor *excreción fecal*, explicaría la elevada retención del hierro por parte del grupo PFM + mezcla Vits B.

Durante el 2º y 3º periodo de balance, observamos que los dos grupos, PFM + mezcla Vits B y SF + mezcla Vits B mostraron un balance mineral muy similar, no detectándose diferencias significativas en ninguna de las variables calculadas.

3.2.2. Efecto de las vitaminas B₆, B₁₂ y ácido fólico sobre el balance mineral del hierro.

En el 1º periodo de balance, los grupos SF con/sin mezcla Vits B, presentaron valores muy similares para cada uno de los parámetros relacionados con el balance mineral del hierro. El mismo comportamiento se observó en los grupos PFM con/sin mezcla Vits B, salvo en la *excreción fecal*, la cual fue significativamente inferior ($p < 0,05$) para el grupo PFM + mezcla Vits B (0,43 mg Fe) frente al grupo PFM (1,54 mg Fe). Esta diferencia, posiblemente se deba a que las ratas del primer grupo presentaron valores de hemoglobina inferiores al segundo, dando lugar a una mayor retención y por tanto a una disminución en la excreción de este mineral, tal como describen otros autores (Zhang y col., 1989). Si además observamos los *porcentajes de absorción aparente y retención*, podemos concluir que durante este periodo la adición de la mezcla de vitaminas B no tuvo un efecto significativo, destacando la elevada asimilación de este mineral en todos los casos.

Durante el 2º periodo de balance, la *ingesta de hierro*, la *excreción fecal y urinaria* del grupo SF + mezcla Vits B (7,31, 1,47 mg Fe y 20,77 $\mu\text{g Fe}$, respectivamente) fue significativamente inferior ($p < 0,05$) al grupo SF (12,09 y 3,89 mg Fe y 42,40 $\mu\text{g Fe}$, respectivamente). No obstante, el *balance del hierro* no se vio afectado significativamente por esta disminución, observándose valores similares entre el grupo SF + mezcla Vits B y el grupo SF (5,84 y 8,20 mg Fe, respectivamente). Así mismo, el *balance del hierro* para el grupo SF + mezcla Vits B no varió con respecto al periodo anterior (7,29 mg Fe) al igual que la *ingesta de hierro* (8,22 mg Fe), traduciéndose en un *porcentaje de absorción y retención aparente* para el grupo SF + mezcla Vits B (75,97 y 75,54%, respectivamente) muy similar al 1º periodo (85,76 y 85,60%, respectivamente). En cuanto al grupo SF, los *porcentajes de absorción y retención*

aparente en el 2º periodo (67,74 y 67,32%, respectivamente) fueron significativamente inferiores al 1º periodo (80,33 y 80,04%, respectivamente).

La misma situación tuvo lugar para los grupos PFM con/sin mezcla Vits B. Es decir, la *ingesta de hierro* y la *excreción fecal* para el grupo PFM + mezcla Vits B (9,11 y 1,79 mg Fe) fue significativamente inferior ($p < 0,05$) al grupo PFM (13,67 y 4,20 mg Fe), en cambio el *balance de hierro* en ambos grupos fue similar (7,57 y 9,47 mg Fe, respectivamente). Sin embargo, en este caso el *porcentaje de absorción y retención aparente* para el grupo PFM + mezcla Vits B (80,52 y 80,28%, respectivamente) fue significativamente superior ($p < 0,05$) al grupo PFM (69,25 y 69,06%, respectivamente). Por tanto hay que destacar, una notable disminución en los *porcentajes de absorción y retención aparente* en el grupo PFM (69,25 y 69,06%, respectivamente) con respecto al periodo anterior (85,65 y 85,50%, respectivamente) y una ligera disminución en el grupo PFM + mezcla Vits B (80,52 y 80,28%, respectivamente) con respecto al periodo anterior (93,84 y 93,77%, respectivamente).

En el 3º periodo de balance, la *excreción fecal y urinaria* por parte del grupo SF + mezcla Vits B (1,84 mg y 17,12 µg Fe, respectivamente) fue significativamente inferior ($p < 0,05$) al grupo SF (6,27 mg y 29,92 µg Fe, respectivamente). En cambio la *ingesta de hierro* fue muy similar para ambos grupos, por lo tanto cabe esperar que el *balance de hierro* sea estadísticamente diferente. De hecho, el *balance de hierro* para el grupo SF + mezcla Vits B (7,67 mg Fe) fue significativamente superior ($p < 0,05$) al grupo SF (4,54 mg Fe). Esta clara diferencia se manifestó en los *porcentajes de absorción y retención aparente*, siendo el grupo SF + mezcla Vits B (74,64 y 74,42%, respectivamente) significativamente superior ($p < 0,05$) al grupo SF (41,90 y 41,60%, respectivamente).

En el caso de los grupos PFM con/sin mezcla Vits B, se observó el mismo comportamiento. Una *ingesta de hierro* y *excreción fecal* baja (8,00 y 1,83 mg Fe, respectivamente) y *porcentajes de absorción y retención aparente* elevados (74,14 y 73,93%, respectivamente) por parte del grupo PFM + mezcla Vits B, siendo estos resultados estadísticamente significativos ($p < 0,05$) al grupo PFM, *ingesta de hierro* y *excreción fecal* (12,46 y 6,66 mg Fe) y *porcentaje de absorción y retención aparente* (44,88 y 44,70%, respectivamente). Además, la *ingesta de hierro*, *excreción fecal*, *balance de hierro*, *porcentaje de absorción y retención aparente* fueron similares al periodo anterior para el grupo PFM + mezcla Vits B.

Tabla 3.4. Absorción y retención del hierro, tras la administración del SF o PFM con/sin la mezcla de vitaminas B en un néctar de frutas, durante los tres periodos de repleción.

Néctar		Ingesta (mg Fe)	Excreción fecal (mg Fe)	Excreción urinaria (mg Fe)	Balance del hierro ¹ (mg)	Absorción aparente ² (%)	Retención ³ (%)	Retención x 100 / Absorción
ϕ								
Repleción								
1^{er} Periodo	SF	7,93 ± 0,95 / ^b	1,47 ± 0,15 / ^b	22,21 ± 5,90 / ^a	6,45 ± 0,97 / ^b	80,33 ± 3,85 / ^a	80,04 ± 3,84 / ^a	99,65 ± 0,08 / ^a
	SF + Vits. B	8,22 ± 1,21 / ^a	1,18 ± 0,20 / ^a	12,06 ± 1,99 / ^a	7,29 ± 1,37 / ^a	85,76 ± 1,42 / ^a	85,60 ± 1,40 / ^a	99,81 ± 0,02 / ^a
	PFM	11,16 ± 3,58 / ^a	1,54 ± 0,68 / ^c	4,21 ± 1,63 / ^b	9,62 ± 1,77 / ^a	85,65 ± 3,43 / ^a	85,50 ± 3,40 / ^a	99,82 ± 0,08 / ^a
	PFM + Vits. B	9,52 ± 1,03 / ^a	0,43 ± 0,13 / ^b	7,15 ± 0,57 / ^b	8,74 ± 1,24 / ^a	93,84 ± 1,86 / ^a	93,77 ± 1,86 / ^a	99,93 ± 0,01 / ^a
2^o Periodo	S.F	12,09 ± 0,60 / ^a	3,89 ± 0,39 / ^{ab}	42,40 ± 12,80 / ^a	8,20 ± 0,61 / ^a	67,74 ± 3,33 / ^b	67,32 ± 3,25 / ^b	99,40 ± 0,12 / ^a
	SF + Vits. B	7,31 ± 1,21 / ^a	1,47 ± 0,45 / ^a	20,77 ± 3,88 / ^a	5,84 ± 0,88 / ^a	75,97 ± 1,55 / ^a	75,54 ± 1,56 / ^a	99,43 ± 0,14 / ^a
	PFM	13,67 ± 1,13 / ^a	4,20 ± 0,61 / ^b	22,91 ± 3,93 / ^a	9,47 ± 0,95 / ^a	69,25 ± 3,24 / ^b	69,06 ± 3,23 / ^b	99,72 ± 0,05 / ^a
	PFM + Vits. B	9,11 ± 0,73 / ^a	1,79 ± 0,26 / ^a	22,48 ± 4,05 / ^a	7,57 ± 1,17 / ^a	80,52 ± 2,46 / ^b	80,28 ± 2,48 / ^b	99,70 ± 0,03 / ^b
3^{er} Periodo	SF	10,81 ± 2,29 / ^b	6,27 ± 1,31 / ^a	29,92 ± 5,28 / ^a	4,54 ± 1,01 / ^b	41,90 ± 1,34 / ^c	41,60 ± 1,31 / ^c	99,29 ± 0,12 / ^a
	SF + Vits. B	9,51 ± 2,11 / ^a	1,84 ± 0,99 / ^a	17,12 ± 1,40 / ^a	7,67 ± 1,86 / ^a	74,64 ± 6,59 / ^a	74,42 ± 6,65 / ^a	99,68 ± 0,12 / ^a
	PFM	12,46 ± 1,99 / ^a	6,66 ± 0,45 / ^a	19,09 ± 3,69 / ^a	5,81 ± 1,62 / ^a	44,88 ± 6,06 / ^c	44,70 ± 6,06 / ^c	99,23 ± 0,41 / ^a
	PFM + Vits. B	8,00 ± 0,56 / ^a	1,83 ± 0,31 / ^a	15,04 ± 1,48 / ^a	6,17 ± 0,58 / ^a	74,14 ± 2,22 / ^b	73,93 ± 2,24 / ^b	99,71 ± 0,05 / ^b

Cada valor es la media ± error típico n = 6

* La presencia de asteriscos dentro de la misma columna para cada uno de los tres periodos de repleción indica diferencias significativas (p<0,05) de los grupos suplementados con SF + mezcla Vits B y PFM + mezcla Vits B respecto a los grupos SF y PFM.

^{a-c} Diferentes letras dentro de la misma columna para cada uno de los tres periodos de balance, indican diferencias significativas (p < 0.05) entre los grupos SF + mezcla Vits B, PFM + mezcla Vits B, SF y PFM.

¹Balance del hierro = Ingesta de hierro (mg) – Excreción fecal (mg)

²Absorción aparente (%) = [Ingesta de hierro (mg) – Excreción fecal (mg)] x 100 / Ingesta de hierro (mg).

³Retención (%) = [Ingesta de hierro (mg) – (Excreción fecal (mg) + Excreción urinaria (mg))] x 100 / Ingesta de hierro (mg).

La ausencia de superíndices indica que no existen diferencias estadísticamente significativas

En general, las ratas suplementadas con la fuente de hierro SF o PFM con/sin la mezcla de vitaminas B, mostraban un comportamiento muy similar desde el 2º periodo de balance hasta el último periodo de balance. Exceptuando al 1º periodo de balance, donde los resultados obtenidos previsiblemente eran lógicos (elevados *porcentajes de la absorción y retención aparente*), debido a que tras un periodo de anemia deficiente en hierro, donde las reservas de hierro están disminuidas, la demanda de hierro del organismo aumenta para cubrir todas las necesidades metabólicas del animal. Pero en cambio, era de esperar que tras 10 o 17 días de repleción con un balance mineral de tres días (2º y 3º periodo de balance), los animales se fueran recuperando alcanzando valores en los porcentajes de absorción y retención aparente similares a los obtenidos por los grupos SF y PFM.

Normalmente, en animales adultos bien alimentados que mantienen aproximadamente el mismo peso durante largos periodos de tiempo, la composición corporal generalmente es constante y por lo tanto la ingesta de nutrientes debe ser aproximadamente similar a las pérdidas corporales (Hegsted, 1976). En nuestro estudio, el *balance del hierro (ingesta de hierro - excreción fecal)* en ambos grupos de ratas alimentadas con el néctar enriquecido con PFM + mezcla Vits B o SF + mezcla Vits B, no varió de manera significativa ($p < 0,05$) de un periodo de balance a otro. Esto significa que independientemente del periodo de repleción hubo un equilibrio entre la *ingesta de hierro* y la *excreción fecal* del mineral, coincidiendo con una correlación positiva entre ambas variables para el grupo SF + mezcla Vits B ($r = 0,645$; $p < 0,05$), sin embargo para el grupo PFM + mezcla Vits B no se estableció esa misma correlación puesto que la *excreción fecal* en el 1º periodo de balance (0,43 mg Fe) fue significativamente inferior ($p < 0,05$) al 2º periodo (1,79 mg Fe) y 3º periodo de balance (1,83 mg Fe). De igual modo, el *porcentaje de absorción y retención aparente* en el grupo PFM + mezcla Vits B en el 1º periodo (93,84 y 93,77%, respectivamente) mostró valores significativamente superiores ($p < 0,05$) al 2º periodo (80,52 y 80,28%, respectivamente) y 3º periodo de balance (74,14 y 73,93%, respectivamente). Sería obvio pensar que a medida que la *excreción fecal* aumente de un periodo de balance a otro, el *porcentaje de absorción aparente* disminuya. Este hecho sólo se ve reflejado en el grupo PFM + mezcla Vits B, donde ambas variables estaban correlacionadas de manera inversa ($r = -0,924$; $p < 0,001$). El mismo patrón de conducta, lo observamos entre la *excreción urinaria* y el *porcentaje de retención aparente* para el grupo PFM + mezcla Vits B, donde hubo una correlación negativa entre ambas variables ($r = -0,622$; $p < 0,05$), mientras que en el grupo SF + mezcla Vits B no se observó tal correlación, ya que tanto la *excreción urinaria* como el *porcentaje de retención aparente* no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$) a lo largo de los tres periodos de repleción.

En resumen, podemos concluir que el grupo de ratas alimentadas con el néctar enriquecido con PFM + mezcla Vits B presentó un comportamiento desde el punto de vista metabólico muy similar al encontrado en el grupo de ratas alimentadas con el néctar SF + mezcla Vits B. Además, los resultados obtenidos sugieren que la adición de la mezcla de vitaminas B a ambas fuentes de hierro mejoró la absorción de dicho mineral con respecto al 1^{er} estudio.

3.3. Biodisponibilidad y utilización del hierro

La Tabla 3.5, muestra el análisis de varianza de las variables relacionadas con la biodisponibilidad y la utilización del hierro durante los tres periodos de repleción.

Tabla 3.5. Análisis de varianza de los parámetros relacionados con los índices de biodisponibilidad y la utilización del hierro, en los grupos alimentados con SF + mezcla Vits B y PFM + mezcla Vits B, durante los tres periodos de balance.

Variables	1 ^{er} Balance	2 ^{do} Balance	3 ^{er} Balance
<i>Ganancia de peso (g)</i>	NS	NS	NS
<i>Ingesta (mg Fe)</i>	NS	NS	NS
<i>Hb inicial (g/dl)</i>	NS	**	*
<i>Hb final (g/dl)</i>	NS	NS	NS
<i>Fe Hb inicial (mg)</i>	NS	**	NS
<i>Fe Hb final (mg)</i>	*	NS	NS
<i>ERH (%)</i>	NS	*	NS
<i>Utilización del hierro (mg)</i>	NS	*	NS

Diferencias significativas para: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; NS = no significación

La Tabla 3.6, muestra los valores obtenidos para cada una de las variables empleadas para el cálculo de la biodisponibilidad relativa del PFM con/sin mezcla Vits B y la utilización del hierro respecto a los grupos SF con/sin mezcla Vits B, en cada uno de los tres periodos de repleción.

3.3.1. Comparación entre los grupos PFM y SF con la mezcla de vitaminas B.

El hecho de que los *pesos iniciales*, Hb_i y FeHb_i en los dos grupos no presentaran diferencias significativas entre ellos, demuestra que el estatus del hierro era homogéneo para comenzar el 1^{er} periodo de repleción. La Hb_f en los grupos PFM + mezcla Vits B y SF + mezcla Vits B (12,48 y 12,54 g/dl, respectivamente) alcanzó niveles normales y similares entre ellos (ver Tabla 1.5). Sin embargo, el FeHb_f para el grupo PFM + mezcla Vits B (5,88 mg Fe) fue significativamente superior (p<0,05) al grupo SF + mezcla Vits B (4,70 mg Fe), debido al *peso final* del grupo PFM + mezcla Vits B (189,12 g), el cual fue superior al grupo SF + mezcla Vits B (164,62 g). No obstante, este hecho no afectó de manera significativa a la ganancia de hierro en la hemoglobina (FeHb_f - FeHb_i), la cual fue muy similar para los grupos PFM + mezcla Vits B y SF + mezcla Vits B (3,70 y 3,32 mg Fe, respectivamente). La biodisponibilidad del hierro, expresada como la *ERH*, para los grupos PFM o SF + mezcla Vits B, fue muy similar (40,07% y 44,87%, respectivamente). De igual modo, la *utilización del hierro*, que expresa la cantidad de hierro utilizado con respecto al contenido presente en el néctar (4,92 mg Fe/100 ml), fue

también muy similar en ambos grupos (1,97 y 2,21 mg Fe, respectivamente). En resumen, el hierro proporcionado por ambos compuestos junto con las vitaminas B tuvo similar biodisponibilidad.

Al comienzo del 2º periodo de repleción, los *pesos iniciales* de los grupos PFM + mezcla Vits B y SF + mezcla Vits B fueron muy similares (121,62 y 117,20 g, respectivamente), sin embargo, la Hb_i (2,82 y 4,00 g/dl, respectivamente) y por tanto el $FeHb_i$ (0,77 y 1,06 mg Fe, respectivamente) fueron diferentes ($p < 0,05$) entre ambos grupos. La *ingesta de hierro* en los grupos PFM + mezcla Vits B y SF + mezcla Vits B fue muy similar (26,90 y 27,33 mg Fe, respectivamente), la cual permitió que la Hb_f y $FeHb_f$ en los grupos PFM + mezcla Vits B (13,74 g/dl y 5,96 mg Fe, respectivamente) y SF + mezcla Vits B (13,72 g/dl y 5,50 mg Fe, respectivamente) presentaran valores similares. Lógicamente, la ganancia de hierro en la hemoglobina para el grupo PFM + mezcla Vits B (5,19 mg Fe) fue significativamente superior ($p < 0,05$) al grupo SF + mezcla Vits B (4,44 mg Fe). De acuerdo con esto, la *ERH*, para el grupo PFM + mezcla Vits B (19,31%) fue significativamente superior ($p < 0,05$) al grupo SF + mezcla Vits B (16,44%). Por tanto, el PFM + mezcla Vits B mostró una mayor biodisponibilidad, a pesar de que el grupo PFM + mezcla Vits B inició el periodo de repleción con niveles de hemoglobina y un contenido de hierro en la hemoglobina inferiores al grupo SF + mezcla Vits B.

Al comienzo del 3º periodo de repleción, el *peso inicial* y un $FeHb_i$ en los grupos PFM + mezcla Vits B (117,17 g y 0,93 mg Fe, respectivamente) y SF + mezcla Vits B (111,22 g y 1,23 mg Fe, respectivamente) fue similar. Sin embargo, la Hb_i para el grupo SF + mezcla Vits B (4,90 g/dl) fue ligeramente superior al grupo PFM + mezcla Vits B (3,47 g/dl). En cuanto a la *ingesta de hierro*, ésta fue similar para los grupos PFM + mezcla Vits B (42,82 mg Fe) y SF + mezcla Vits B (39,46 mg Fe). De igual manera, la Hb_f y $FeHb_f$, en los grupos PFM + mezcla Vits B (14,48 g/dl y 6,26 mg Fe, respectivamente) y SF + mezcla Vits B (14,20 g/dl y 5,87 mg Fe, respectivamente) también fue similar. Por tanto, la biodisponibilidad del hierro, medida como *ERH*, en el grupo PFM + mezcla Vits B (12,46%) fue muy similar a la del grupo SF + mezcla Vits B (11,96%). Del mismo modo, la *utilización del hierro* que evalúa la eficiencia en la regeneración de la hemoglobina en relación al hierro de la dieta, fue semejante para ambos grupos: PFM + mezcla Vits B (0,61 mg Fe) y SF + mezcla Vits B (0,59 mg Fe).

Al evaluar el comportamiento de cada compuesto de hierro junto con las vitaminas B sobre cada una de las variables empleadas en el cálculo de la biodisponibilidad del hierro, pudimos observar que desde el punto de vista hematológico, 3 días de administración del néctar fueron suficientes para alcanzar niveles de $Hb > 11,1$ g/dl (ver Tabla 1.5). Periodos de suplementación más largos (2º y 3º periodo), permitieron alcanzar niveles de Hb significativamente más

elevados ($p < 0,05$) para el grupo PFM + mezcla Vits B (13,74 y 14,48 g/dl, respectivamente) y para el grupo SF + mezcla Vits B (13,72 y 14,20 g/dl, respectivamente) con respecto al 1^{er} periodo. El aumento en la concentración de la Hb o ganancia de la Hb, estuvo favorecida por la *ingesta de hierro*, existiendo una correlación positiva entre ambas variables, por lo que una mayor ingesta de hierro permitió un aumento en la síntesis de la hemoglobina, grupo SF + mezcla Vits B ($r = 0,768$, $p < 0,001$) y el grupo PFM + mezcla Vits B ($r = 0,880$, $p < 0,001$).

Entre la *ganancia de hemoglobina* y *ganancia de hierro en la hemoglobina*, esta última es la variable que mejor refleja la regeneración de la hemoglobina, ya que tiene en cuenta las diferencias en el peso ganado y por tanto la expansión del volumen de sangre durante el periodo de repleción. De esta manera, la *ganancia en peso* y la *ingesta de hierro* estuvieron correlacionadas con la *ganancia de hierro en la hemoglobina* tanto para el grupo PFM + mezcla Vits B ($r = 0,825$; $p < 0,001$ y $r = 0,747$; $p < 0,001$, respectivamente) como para el grupo SF + mezcla Vits B ($r = 0,810$; $p < 0,001$, y $r = 0,668$; $p < 0,01$, respectivamente). Por tanto, el hierro suministrado por el PFM y SF se incorporó de manera efectiva a la hemoglobina. Sin embargo, esto no significa que la biodisponibilidad de los compuestos de hierro vaya aumentando de manera paralela a la *ingesta de hierro*, ya que llega un momento en que la *absorción del hierro* mantiene constante el contenido de hierro en el organismo, y la síntesis de hemoglobina se produce gracias al reciclaje de los hematíes tras su ciclo vital (Miret y col., 2003). De acuerdo con esto, la biodisponibilidad del hierro (medida como *ERH*) fue disminuyendo en cada periodo de repleción, mientras que la *ingesta de hierro* fue aumentando, existiendo una correlación inversa entre ambas, siendo para el grupo PFM + mezcla Vits B ($r = -0,932$; $p < 0,001$) y para el grupo SF + mezcla Vits B ($r = -0,855$; $p < 0,001$).

Tabla 3.6. Eficiencia de regeneración de la hemoglobina (ERH), utilización del hierro y valor biológico relativo (VBR) en ratas anémicas, tras la administración del SF o PFM con/sin la mezcla de vitaminas B en un néctar de frutas, durante los tres periodos de repleción.

Néctar		Ganancia de peso (g)	Ingesta Fe (mg)	Hb inicial (g/dl)	Hb final (g/dl)	Fe Hb inicial ¹ (mg)	Fe Hb final ¹ (mg)	ERH ² (%)	Utilización del hierro ³ (mg)	VBR ⁴
Repleción										
1^{er} Periodo	SF	10,30 ± 4,33 ^{/c}	7,42 ± 1,98 ^{/c}	7,88 ± 0,81 ^{/a}	11,68 ± 0,98 ^{/b}	2,82 ± 0,91 ^{/a}	4,21 ± 1,23 ^{/b}	20,55 ± 4,27 ^{/a}	1,01 ± 0,21	100
	SF + Vits. B	38,36 ± 6,01 ^{*/b}	8,22 ± 1,21 ^{/c}	4,82 ± 0,20 ^{*/a}	12,54 ± 0,30 ^{/b}	1,38 ± 0,12 ^{*/a}	4,70 ± 0,17 ^{/b}	44,87 ± 8,12 ^{*/a}	2,21 ± 0,40 ^{*/a}	218
	PFM	12,47 ± 2,65 ^{/c}	9,88 ± 4,21 ^{/c}	7,75 ± 0,78 ^{/a}	11,35 ± 1,91 ^{/b}	2,79 ± 0,57 ^{/a}	4,22 ± 1,06 ^{/b}	14,80 ± 3,17 ^{/a}	0,73 ± 0,16 ^{/a}	72
	PFM + Vits. B	38,96 ± 1,55 ^{*/b}	9,52 ± 1,03 ^{/c}	4,88 ± 0,34 ^{*/a}	12,48 ± 0,55 ^{/b}	1,67 ± 0,30 ^{*/a}	5,38 ± 0,20 ^{*/b}	40,07 ± 3,40 ^{*/a}	1,97 ± 0,17 ^{*/a}	195
2^o Periodo	SF	38,05 ± 3,96 ^{/b}	27,47 ± 4,78 ^{/b}	7,62 ± 0,16 ^{/ab}	14,12 ± 0,37 ^{/a}	3,05 ± 0,76 ^{/a}	7,55 ± 0,77 ^{/a}	16,85 ± 5,06 ^{/ab}	0,83 ± 0,25	100
	SF + Vits. B	61,30 ± 4,33 ^{*/a}	27,33 ± 1,86 ^{/b}	4,00 ± 0,23 ^{*/a}	13,72 ± 0,14 ^{/a}	1,06 ± 0,05 ^{*/b}	5,50 ± 0,09 ^{*/a}	16,44 ± 0,85 ^{/b}	0,81 ± 0,04 ^{/b}	98
	PFM	42,12 ± 6,97 ^{/b}	30,33 ± 2,72 ^{/b}	7,50 ± 0,37 ^{/ab}	14,47 ± 0,61 ^{/a}	2,96 ± 0,50 ^{/a}	7,09 ± 0,78 ^{/a}	13,79 ± 2,79 ^{/a}	0,68 ± 0,14 ^{/a}	82
	PFM + Vits. B	71,52 ± 4,00 ^{*/a}	26,90 ± 0,73 ^{*/b}	2,82 ± 0,24 ^{*/a}	13,74 ± 0,27 ^{/a}	0,77 ± 0,04 ^{*/b}	5,96 ± 0,20 ^{*/a}	19,31 ± 0,85 ^{*/b}	0,95 ± 0,04 ^{*/b}	115
3^{er} Periodo	SF	80,50 ± 15,73 ^{/a}	56,78 ± 4,58 ^{/a}	6,33 ± 0,40 ^{/b}	14,00 ± 0,42 ^{/a}	2,30 ± 1,13 ^{/a}	7,94 ± 1,19 ^{/a}	10,02 ± 1,96 ^{/b}	0,49 ± 0,09	100
	SF + Vits. B	72,75 ± 4,00 ^{/a}	39,46 ± 1,79 ^{*/a}	4,90 ± 0,50 ^{/a}	14,20 ± 0,27 ^{/a}	1,23 ± 0,11 ^{/b}	5,87 ± 0,29 ^{*/a}	11,96 ± 1,17 ^{/b}	0,59 ± 0,06 ^{/c}	119
	PFM	64,30 ± 7,21 ^{/a}	53,04 ± 5,95 ^{/a}	6,35 ± 0,53 ^{/b}	14,60 ± 0,51 ^{/a}	2,56 ± 0,77 ^{/a}	6,88 ± 1,45 ^{/a}	8,09 ± 0,88 ^{/b}	0,40 ± 0,04 ^{/b}	82
	PFM + Vits. B	75,20 ± 5,74 ^{/a}	42,82 ± 0,60 ^{*/a}	3,47 ± 0,40 ^{*/a}	14,48 ± 0,17 ^{/a}	0,93 ± 0,13 ^{*/b}	6,26 ± 0,26 ^{/a}	12,46 ± 0,74 ^{*/b}	0,61 ± 0,04 ^{*/c}	124

Media ± Error típico, n=6

Diferentes letras dentro de la misma columna, para cada parámetro y en cada periodo de repleción muestran diferencias estadísticamente significativas (p < 0.05).

^{/a-c} Diferentes letras dentro de la misma columna para cada uno de los tres periodos de balance, indican diferencias significativas (p < 0.05) entre los grupos SF ó PFM + mezcla Vits B

¹ Fe en Hb se describe en la sección de material y métodos: mg Fe en Hb = (peso x Hb x 0,067 x 3,4).

²ERH (%) = [Fe Hb (final) – Fe Hb (inicial) x 100]/ mg Fe consumido.

³ Utilización del hierro (mg) = ERH (%) x Fe en la dieta (%) / 100.

⁴ VBR = ERH (SF o PFM) con/sin mezcla de Vits B / ERH (SF)

La ausencia de superíndices indica que no existen diferencias estadísticamente significativas

3.3.2. Efecto de las vitaminas B₆, B₁₂ y ácido fólico en la biodisponibilidad y utilización del hierro

Al inicio del 1^{er} periodo de repleción, la *ganancia de peso*, la Hb_i y el FeHb_i para el grupo SF + mezcla Vits B (38,36 g, 4,82 g/dl y 1,38 mg Fe, respectivamente) presentó diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al grupo SF (10,30 g, 7,88 g/dl y 2,82 mg Fe, respectivamente). Las diferencias en la Hb_i y por consiguiente en el FeHb_i se debieron a la dificultad en disminuir la concentración de la Hb en el grupo SF tras varios desangrados, por lo que nos vimos obligados a iniciar el periodo de repleción, a pesar de presentar un estatus del hierro diferentes en ambos grupos. No obstante, la *ingesta de hierro*, la Hb_f y el FeHb_f en ambos grupos fueron muy similares. Posiblemente, el aumento en la *ganancia de peso* por parte del grupo SF + mezcla Vits B compensó las diferencias encontradas al inicio del periodo de repleción, favoreciendo el aumento en el volumen de sangre y por tanto el aumento en la Hb_f y en el FeHb_f. Respecto a la biodisponibilidad del hierro (medido como *ERH*) y la *utilización del hierro*, el grupo SF + mezcla Vits B (44,87% y 2,21 mg, respectivamente) mostró valores superiores ($p < 0,05$) al grupo SF (20,55% y 1,01 mg, respectivamente). Relacionando la *ERH* del grupo SF + mezcla Vits B con la del SF, obtenemos el valor biológico relativo (VBR), siendo el VBR del grupo SF + mezcla Vits B de 218,3%, el doble con respecto al grupo SF (VBR 100%).

La misma situación tuvo lugar para los grupos PFM con/sin mezcla Vits B. La *ganancia de peso*, la Hb_i y el FeHb_i para el grupo PFM + mezcla Vits B (38,96 g, 4,88 g/dl y 1,67 mg Fe, respectivamente) mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al grupo PFM (12,47 g, 7,75 g/dl y 2,79 mg Fe, respectivamente). La *ERH* y la *utilización del hierro* para el grupo PFM + mezcla Vits B (40,07% y 1,97 mg Fe, respectivamente) fue significativamente superior ($p < 0,05$) al grupo PFM (14,80% y 0,73 mg Fe, respectivamente). Al calcular el VBR del PFM + mezcla Vits B (195%) con respecto al SF (100%), observamos que la biodisponibilidad relativa fue casi el doble.

En el 2^o periodo de repleción, las diferencias encontradas en la Hb_i para el grupo SF con respecto al grupo SF + mezcla Vits B, se debieron al mismo motivo descrito en el 1^{er} periodo de repleción. Por tanto, la Hb_i y el FeHb_i para el grupo SF + mezcla Vits B (4,00 g/dl y 1,06 mg Fe, respectivamente) fue significativamente inferior ($p < 0,05$) al grupo SF (7,62 g/dl y 3,05 mg Fe, respectivamente). Al final de este periodo, la Hb_f fue similar en ambos grupos, sin embargo el FeHb_f para los grupos SF y SF + mezcla Vits B (7,55 y 5,50 mg Fe, respectivamente) fue significativamente diferente ($p < 0,05$) entre ellos. La adición de la mezcla de vitaminas B en este periodo repleción no afectó a la biodisponibilidad del SF ni tampoco a la *utilización del hierro*, ya que en ambos grupos sus valores fueron muy similares, grupo SF + mezcla Vits B (16,44% y 0,81 mg Fe, respectivamente) y para el grupo SF (16,85% y 0,83 mg Fe, respectivamente).

La *ganancia de peso*, la Hb_i , y el $FeHb_i$ para el grupo PFM + mezcla Vits B (71,52 g, 2,82 g/dl y 0,77 mg Fe, respectivamente) varió significativamente ($p < 0,05$) con respecto al grupo PFM (42,12 g, 7,50 g/dl y 2,96 mg Fe, respectivamente). En este caso, la adición de las vitaminas B sí mejoró la biodisponibilidad del PFM y la *utilización del hierro*, siendo el grupo PFM + mezcla Vits B (19,31% y 0,95 mg Fe, respectivamente) significativamente superior ($p < 0,05$) al grupo PFM (13,79% y 0,68 mg Fe, respectivamente). El VBR para el grupo SF + mezcla Vits B (98%) fue prácticamente similar al grupo SF (100%), lo que nos sugiere que la adición de las vitaminas B no afectó a la biodisponibilidad del SF, sin embargo el grupo PFM + mezcla Vits B (115%) fue significativamente superior al del SF (100%), por lo que este compuesto de hierro presentó una mejor biodisponibilidad en un periodo de tiempo más largo (10 días).

Al comienzo del 3^{er} periodo de repleción, el estatus del hierro en los grupos SF con/sin mezcla Vits B fue homogéneo, es decir, los *pesos iniciales*, la Hb_i y el $FeHb_i$ fueron similares en ambos grupos. Al final de periodo de repleción, el $FeHb_f$ en el grupo SF + mezcla Vits B (5,87 mg Fe) fue significativamente inferior ($p < 0,05$) al grupo SF (7,94 mg Fe), hecho que tuvo lugar por la diferencia en el *peso final* de ambos grupos. Al igual que en el 2^o periodo de repleción, la mezcla de vitaminas B no influyó en la biodisponibilidad y utilización del hierro, alcanzando valores similares en ambos grupos: SF + mezcla Vits B (11,96% y 0,59 mg Fe, respectivamente) y SF (10,02% y 0,49 mg Fe, respectivamente).

En cuanto al grupo PFM + mezcla Vits B, el *peso inicial*, la Hb_i y el $FeHb_i$ (117,17 g, 3,47 g/dl y 0,93 mg Fe, respectivamente) fueron significativamente diferentes ($p < 0,05$) al grupo PFM (174,18 g, 6,35 g/dl y 2,56 mg Fe, respectivamente). En cambio, el *peso final*, Hb_f y $FeHb_f$ no mostró diferencias significativas entre los dos grupos. La *ERH* y la *utilización del hierro* para el grupo PFM + mezcla Vits B (12,46% y 0,61 mg Fe, respectivamente) fue significativamente superior al grupo PFM (8,09% y 0,40 mg Fe, respectivamente). Esta diferencia se debió principalmente a los valores obtenidos al inicio del periodo de repleción, debido a que al final del periodo de repleción no se observaron diferencias significativas en los parámetros implicados en el cálculo de la biodisponibilidad.

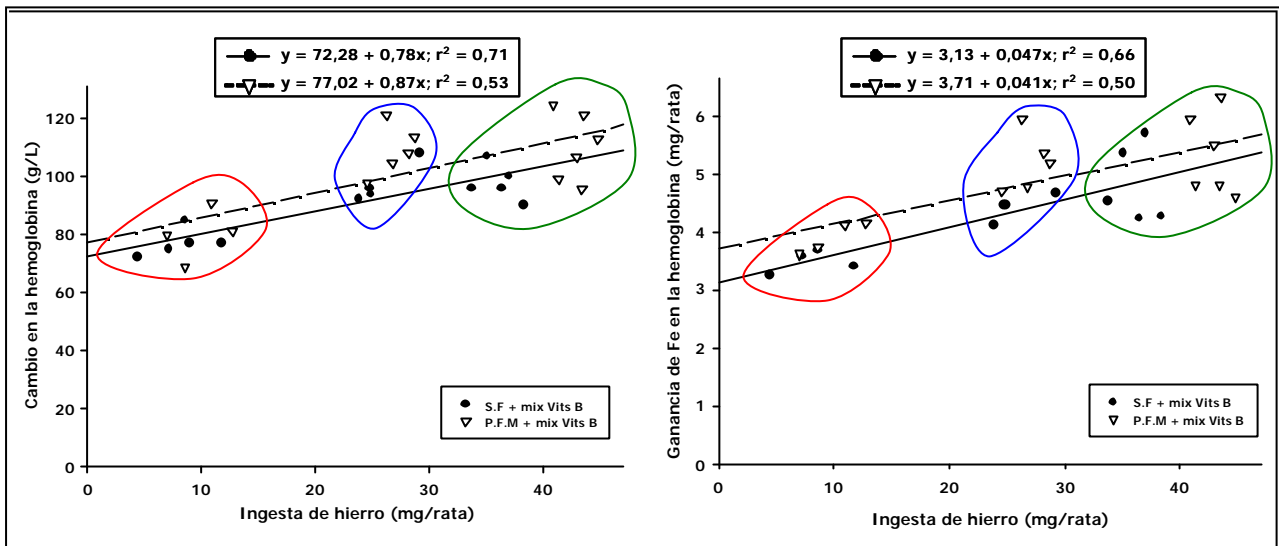
En múltiples estudios se han valorado los efectos hematológicos de una sola vitamina o de un pequeño número de vitaminas combinadas, con o sin hierro, pero muy pocos ensayos han examinado el impacto hematopoyético de la suplementación múltiple de vitaminas. Aquellos ensayos en los que se han valorado el impacto de la suplementación múltiple de vitaminas, han utilizado mezclas de varias vitaminas con hierro, y no han diferenciado los efectos de las vitaminas de aquellos obtenidos del hierro individualmente (Bradfield y col., 1968; Reinken y Kurz, 1978; Buzina y col., 1982; Das y col., 1984; Powers y col., 1985; Tell'mann Akh y col.,

1992; Liu y col., 1993; Van Stuijvenberg y col., 1999; Thu y col., 1999). Un dato en común en todos estos estudios es que solamente se valoraban los niveles de Hb y no otros parámetros hematológicos. En nuestro caso, si únicamente valoramos los niveles de Hb, podemos observar que la adición de la mezcla de vitaminas B no tuvo ningún efecto en la concentración de Hb al final de cada periodo de repleción. Sin embargo, lo que verdaderamente se valora en este estudio es cómo afecta la adición de la mezcla de vitaminas B a la biodisponibilidad de las fuentes de hierro SF y PFM. Si descartamos los dos primeros periodos de repleción por no similitud en el estatus del hierro de las ratas en los grupos SF y PFM con/sin mezcla Vits B, y nos centramos en el 3^{er} periodo de repleción, que fue el único periodo donde los niveles de Hb_i eran = 6 g/dl, observamos que el grupo PFM + mezcla Vits B presentó una mayor biodisponibilidad y utilización del hierro ($p < 0.05$) al compararlo con el grupo PFM, mientras que estos parámetros fueron similares entre el grupo SF + mezcla Vits B y el grupo SF. En resumen, la adición de la mezcla de vitaminas B solamente tuvo un efecto positivo en la biodisponibilidad de la fuente de hierro PFM, tras un periodo de suplementación de 17 días.

3.3.3. *Relación entre las modificaciones en la hemoglobina y la ingesta de hierro.*

Siguiendo el mismo patrón que en los estudios anteriores, se realizó el análisis de regresión lineal entre las variables *ingesta de hierro* y las dos medidas de la regeneración de la hemoglobina: *ganancia de la hemoglobina* y *ganancia de hierro en la hemoglobina* (Figuras 3.1 y 3.2, respectivamente).

En la Figura 3.1 (parte izquierda), el análisis de regresión entre la *ingesta de hierro* y la *ganancia de la hemoglobina* o *cambio en la hemoglobina*, únicamente fue indicativo para el grupo SF + mezcla Vits B, indicando que la *ingesta de hierro* fue el principal determinante en la *ganancia de la hemoglobina*, durante los periodos de repleción. En el caso del grupo PFM + mezcla Vits B, el coeficiente de regresión lineal $r^2 = 0.53$ fue muy bajo, lo que indica una dependencia muy débil entre ambas variables. Por lo tanto, salvo en el caso del grupo SF + mezcla Vits B, no podríamos establecer una relación lineal entre ambas variables.



Figuras 3.1 y 3.2. Análisis de regresión lineal entre las dos medidas de la regeneración de la hemoglobina y la ingesta de hierro durante los periodos de repleción. ○ 1^{er} Periodo de repleción, ○ 2^o Periodo de repleción y ○ 3^{er} Periodo de repleción.

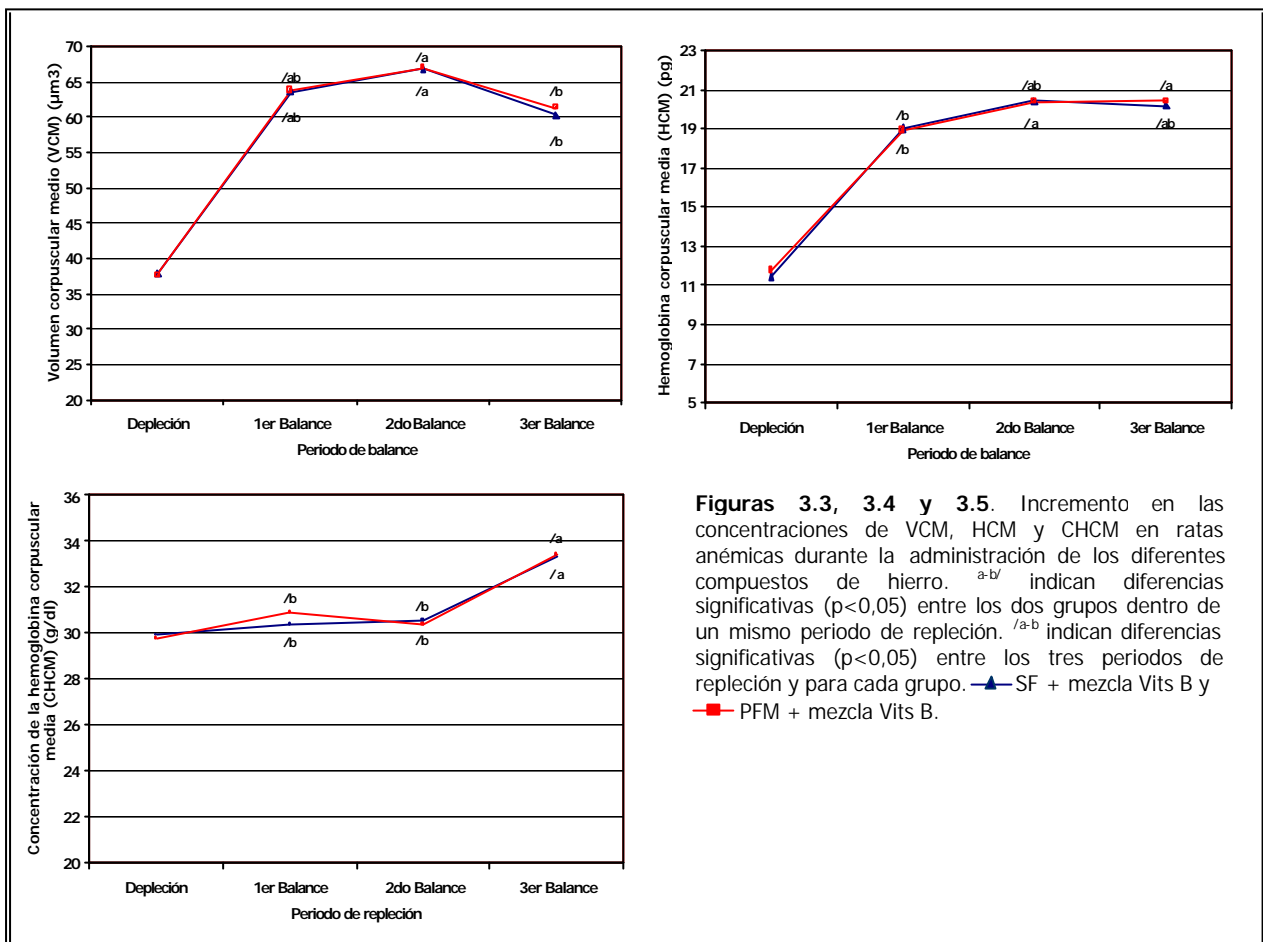
En la Figura 3.2 (parte derecha), el coeficientes de regresión lineal para el grupo PFM + mezcla Vits B ($r^2 = 0,50$; $p < 0,005$) y para el grupo SF + mezcla Vits B ($r^2 = 0,66$; $p < 0,001$) fueron bajos. Esto significa que la relación de dependencia de ambas variables (*ingesta de hierro* y *ganancia de hierro en la hemoglobina*) es débil., por lo que no podemos estimar la ganancia de hierro en la hemoglobina en función de la ingesta de hierro.

3.4. Índices hematológicos y bioquímicos

Las Figuras 3.3, 3.4 y 3.5, muestran los cambios producidos en los parámetros VCM, HCM y CHCM respectivamente, desde un estado de anemia deficiente en hierro a un estado nutricional de hierro adecuado durante los tres periodos de repleción.

Los niveles de VCM, y HCM (Figuras 3.3 y 3.4, superior izquierda y derecha, respectivamente) en depleción fueron significativamente inferiores a los obtenidos en repleción ($p < 0,05$) para cada grupo de ratas suplementadas con el néctar enriquecido con PFM o SF + mezcla Vits B. En cambio los valores en depleción para la CHCM (Figura 3.5, inferior izquierda), solamente fueron inferiores a los obtenidos en el 3^{er} periodo de repleción para ambos grupos.

Finalizado el 1^{er} periodo de repleción, los índices eritrocitarios alcanzaron valores normales: VCM $> 44 \mu\text{m}^3$, HCM $> 12,0 \text{ pg}$ y para CHCM $> 21,6 \text{ g/dl}$ (Tabla 1.5). Además los valores de estos parámetros obtenidos en los grupos PFM + mezcla Vits B y SF + mezcla Vits B, VCM (63,80 y 63,60 μm^3), HCM (18,92 y 19,00 pg) y CHCM (30,92 y 30,39 g/dl, respectivamente) fueron similares.

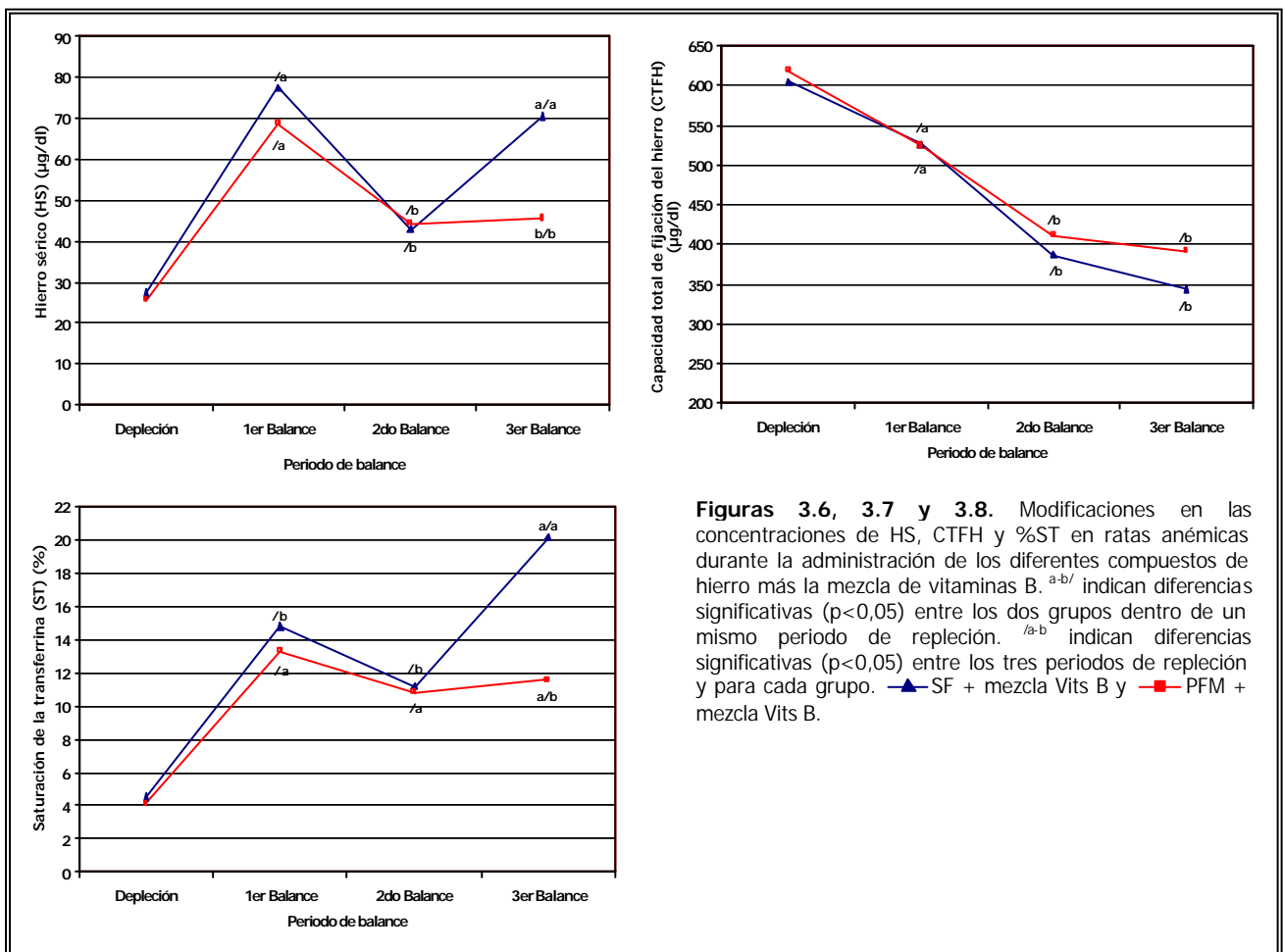


Al final del 2º periodo de repleción, el VCM y la HCM aumentaron significativamente ($p < 0,05$) con respecto al periodo anterior, siendo para el grupo PFM + mezcla Vits B ($67,00 \mu\text{m}^3$ y $20,38 \text{ pg}$, respectivamente) y para el grupo SF + mezcla Vits B ($66,80 \mu\text{m}^3$ y $20,40 \text{ pg}$, respectivamente). Además, entre ambos grupos no existieron diferencias significativas para los parámetros VCM y HCM. Por otra parte, como hemos comentado, la CHCM para los grupos PFM + mezcla Vits B y SF + mezcla Vits B ($30,40$ y $30,54 \text{ g/dl}$, respectivamente) no varió con respecto al 1º periodo.

Al finalizar el 3º periodo de repleción, observamos que los valores del VCM en el grupo PFM + mezcla Vits B y SF + mezcla Vits B ($61,33$ y $60,33 \mu\text{m}^3$, respectivamente) fueron significativamente inferiores ($p < 0,05$) a los valores obtenidos en el 2º periodo de repleción y muy similares al 1º periodo de repleción. Respecto a la HCM, el grupo PFM + mezcla Vits B y SF + mezcla Vits B ($20,42$ y $20,17 \text{ pg}$, respectivamente) no experimentaron cambios con respecto al 2º periodo ($20,38$ y $20,40 \text{ pg}$, respectivamente). La CHCM aumentó significativamente ($p < 0,05$) para el grupo PFM + mezcla Vits B ($33,43 \text{ g/dl}$) y para el grupo SF + mezcla Vits B ($33,37 \text{ g/dl}$) con respecto a los periodos anteriores.

En las Figuras 3.6, 3.7 y 3.8, se representan los parámetros relacionados con el transporte del hierro (HS, CTFH y %ST, respectivamente) para cada grupo con SF o PFM con la mezcla de vitaminas B en cada uno de los tres periodos de repleción.

En la Figura 3.6 (superior izquierda), claramente se puede observar que en ninguno de los periodos de repleción las concentraciones de HS alcanzaron valores normales ($220 \pm 124 \mu\text{g/dl}$) (según Tabla 1.5). Al final del 1^{er} periodo de repleción, los niveles de HS estaban disminuidos en ambos grupos, siendo para el grupo SF + mezcla Vits B ($77,56 \mu\text{g/dl}$) y para el grupo PFM + mezcla Vits B ($68,73 \mu\text{g/dl}$). Tras un estado de deficiencia en hierro (periodo de depleción), los animales tienden a recuperar sus niveles normales, pero en este caso, un periodo de suplementación de tres días no fue suficiente para alcanzar niveles normales de HS ($220 \pm 124 \mu\text{g/dl}$).



Figuras 3.6, 3.7 y 3.8. Modificaciones en las concentraciones de HS, CTFH y %ST en ratas anémicas durante la administración de los diferentes compuestos de hierro más la mezcla de vitaminas B. ^{a-b/} indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los dos grupos dentro de un mismo periodo de repleción. ^{/a-b} indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tres periodos de repleción y para cada grupo. ▲ SF + mezcla Vits B y ■ PFM + mezcla Vits B.

No obstante, tras un periodo de suplementación de 10 días (2^o periodo de repleción), observamos que los niveles de HS experimentaron un descenso significativo ($p < 0,05$) con respecto al periodo anterior, siendo para el grupo SF + mezcla Vits B ($42,96 \mu\text{g/dl}$) y para el grupo PFM + mezcla Vits B ($44,29 \mu\text{g/dl}$). En cambio, tras 17 días de suplementación (3^{er} periodo), los niveles de HS para el grupo SF + mezcla Vits B ($70,61 \mu\text{g/dl}$) aumentaron

significativamente ($p < 0,05$) con respecto al 2º periodo de repleción, sin embargo, el grupo PFM + mezcla Vits B (45,56 $\mu\text{g}/\text{dl}$) mantuvo los valores con respecto al periodo anterior. La única explicación lógica a estas fluctuaciones está en la amplia variabilidad de resultados para este parámetro a lo largo del día, incluso en los mismos individuos (Ritchie y col., 2002). Este hecho, supone que la discusión de los datos con respecto a esta variable se realice con cautela y sin obtener conclusiones que puedan inducir a error.

Además, los valores de la CTFH (Figura 3.7, superior derecha) obtenidos para los grupos SF y PFM con la mezcla de vitaminas B, fueron descendiendo a lo largo de los tres periodos de repleción. Al final del 1º periodo de repleción, la CTFH para el grupo SF + mezcla Vits B (525,50 $\mu\text{g}/\text{dl}$) y para el grupo PFM + mezcla Vits B (524,12 $\mu\text{g}/\text{dl}$) fue muy similar. Aún así, en este periodo los valores permanecían elevados con respecto al rango normal (368 $\mu\text{g}/\text{dl}$) (Tabla 1.5). En el 2º periodo de repleción, la CTFH en los dos grupos disminuyó significativamente ($p < 0,05$) con respecto al periodo anterior, siendo para el grupo SF + mezcla Vits B (386,36 $\mu\text{g}/\text{dl}$) similar al grupo PFM + mezcla Vits B (411,28 $\mu\text{g}/\text{dl}$). Al final del 3º periodo de repleción, el grupo SF + mezcla Vits B (343,61 $\mu\text{g}/\text{dl}$) y el grupo PFM + mezcla Vits B (391,56 $\mu\text{g}/\text{dl}$) disminuyeron ligeramente pero sin presentar diferencias significativas entre ellos.

Peter y Wang (1981) determinaron que la saturación de la transferrina es un buen indicador en la detección de la deficiencia en hierro cuando los niveles de HS son bajos y la CTFH normal. En la Figura 3.8 (inferior izquierda) se muestran los %ST para los grupos SF + mezcla Vits B y PFM + mezcla Vits B al final de cada periodo de repleción. Como se puede observar, al final del 1º periodo, el %ST para el grupo SF + mezcla Vits B (14,78%) fue muy similar al grupo PFM + mezcla Vits B (13,31%). Esta misma situación, pero más acusada tuvo lugar en el 2º periodo de repleción, donde los %ST en el grupo SF + mezcla Vits B (11,15%) y el grupo PFM + mezcla Vits B (10,83%) disminuyeron con respecto al periodo anterior, no mostrando diferencias significativas. Por el contrario, en el 3º periodo de repleción el %ST del grupo SF + mezcla Vits B (20,12%) aumentó significativamente ($p < 0,05$) con respecto al 2º periodo, mientras que el grupo PFM + mezcla Vits B (11,58%) mantuvo su valor con respecto al periodo anterior. El NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (1995) estableció que cuando los valores de %ST están por debajo de 15%, la síntesis de la hemoglobina se altera. Tomando como referencia este valor, en los tres periodos de repleción, el grupo PFM + mezcla Vits B tendría alterada la síntesis de la hemoglobina, pero en cambio los niveles de Hb_f en cada periodo de repleción demuestra todo lo contrario (ver Tabla 3.6) al igual que los índices hematológicos (VCM, HCM y CHCM). En el grupo SF + mezcla Vits B la situación mejor favorecida tendría lugar en el 3º periodo de repleción, donde el %ST es $> 15\%$, sin embargo, en los periodos anteriores donde el %ST fue $< 15\%$, aunque la Hb_f se encontró dentro del rango

normal. Una posible explicación, podría estar relacionada con las fluctuaciones encontradas en los valores de HS, ya que el %ST se calcula en función de esta variable.

3.4.1. Efecto de la mezcla de vitaminas B en los índices hematológicos y bioquímicos

Junto al hierro y la vitamina B₁₂, el ácido fólico es uno de los componentes más importantes en la eritropoyesis. Su deficiencia es la principal causa de anemia megaloblástica en el mundo (Gallagher y Ehrenkranz, 1995). Hematológicamente, se ve reflejado en un elevado VCM y una baja concentración de hemoglobina (Hughes-Jones y Wickramasinghe, 1996). En cuanto a la vitamina B₁₂, su deficiencia es la segunda causa de anemia megaloblástica, produciendo anemia macrocítica, así como un amplio daño neurológico. Su deficiencia es menos frecuente que la deficiencia en ácido fólico, la cual resulta de manera general, por un defecto en la absorción más que por una ingesta insuficiente (Anthony, 1991). Otra vitamina, cuya deficiencia no es frecuente, es la B₆. Su deficiencia puede alterar la síntesis del grupo hemo y conducir a una anemia normocítica (HCM normal), microcítica (VCM bajo) o una anemia sideroblástica.

Al final del 1^{er} periodo de repleción, los grupos alimentados con la fuente de hierro SF o PFM con/sin mezcla Vits B alcanzaron valores normales para los parámetros VCM, HCM y CHCM (Tabla 1.5), siendo los grupos PFM + mezcla Vits B y SF + mezcla Vits B, los que presentaron valores significativamente superiores ($p < 0,05$) con respecto a los grupos PFM y SF. La misma situación tuvo lugar al final del 2^o y 3^{er} periodo de repleción. En general, los índices hematológicos analizados, alcanzaron valores normales desde el 1^{er} periodo de repleción, independientemente de la adición de la mezcla de vitaminas B. Únicamente, se podría destacar los valores más elevados (dentro del rango normal) como posible efecto de la adición de la mezcla de vitaminas B.

La adición de la mezcla de vitamina B al néctar enriquecido con SF, no mejoró los niveles de HS, CTFH y %ST en ninguno de los tres periodos de repleción al compararlo frente al grupo SF. En el caso del grupo PFM + mezcla Vits B, los valores de HS, CTFH y %ST no alcanzaron valores normales en ninguno de los periodos de repleción y además en el 2^o y 3^{er} periodo estos valores fueron significativamente inferiores ($p < 0,05$) al grupo PFM. Al igual que para el grupo SF + mezcla Vits B, la adición de la mezcla de vitaminas B al grupo PFM, no tuvo ningún efecto sobre los parámetros analizados.

3.5. Almacenamiento del hierro.

La Tabla 3.7 muestra el análisis de varianza entre los dos grupos SF ó PFM + mezcla Vits B en relación a los depósitos de hierro de cada una de las piezas anatómicas analizadas en el 1^{er} y

3^{er} periodo de repleción. Destacar que el tipo de compuesto de hierro con la mezcla de vitaminas B, influyó significativamente en los valores de concentración de hierro del bazo (1^{er} periodo) y riñón (3^{er} periodo).

Tabla 3.7. Análisis de varianza del contenido en hierro de las distintas piezas anatómicas en los grupos alimentados con el néctar SF ó PFM + mezcla Vits B, durante el 1^{er} y 3^{er} periodo de balance.

	Hígado	Bazo	Riñón	Corazón	Intestino delgado
1^{er} Balance	NS	*	NS	NS	NS
3^{er} Balance	NS	*	*	NS	NS

Diferencias significativas para: * $p < 0,05$; NS = no significación

La Tabla 3.8 muestra las concentraciones de hierro en las diferentes piezas anatómicas durante el 1^{er} y 3^{er} periodo de repleción entre los grupos suplementados con SF ó PFM + mezcla vitaminas B y los grupos SF y PFM.

Tabla 3.8. Concentración de hierro en los distintos órganos de las ratas alimentadas con SF o PFM con/sin mezcla Vits B, añadidos a un néctar de frutas. Los resultados se expresan en mg / g peso seco (p.s).

Néctar		Hígado	Bazo	Riñón	Corazón	Intestino delgado
Repleción						
1^{er} Balance	SF	1,60 ± 0,66	6,54 ± 2,68	1,40 ± 0,35	1,51 ± 0,30	0,85 ± 0,31
	SF + Vits. B	1,18 ± 0,22	6,29 ± 0,73	1,66 ± 0,56 ^{/a}	1,27 ± 0,30	0,97 ± 0,23
	PFM	0,52 ± 0,27	9,04 ± 1,65	2,14 ± 0,24	2,83 ± 0,52	0,96 ± 0,35
	PFM + Vits. B	1,25 ± 0,44	1,48 ± 0,16 ^{*/b}	2,03 ± 0,68	1,83 ± 0,30	0,79 ± 0,21
3^{er} Balance	SF	1,03 ± 0,15	5,40 ± 1,68	1,36 ± 0,03	1,63 ± 0,17	0,56 ± 0,22
	SF + Vits. B	1,41 ± 0,47	4,47 ± 1,11	0,20 ± 0,05 ^{*/b}	1,22 ± 0,37	0,31 ± 0,05
	PFM	0,69 ± 0,17	7,10 ± 1,57	1,70 ± 0,45	2,15 ± 0,46	0,91 ± 0,19
	PFM + Vits. B	1,63 ± 0,27	8,44 ± 2,34 ^{/a}	3,02 ± 0,54	1,56 ± 0,47	0,37 ± 0,04

Media ± Error típico, n=6

^{*/} La presencia de asteriscos dentro de la misma columna para cada uno de los tres periodos de repleción indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos suplementados con SF + mezcla Vits B y SF sin vitaminas; y los grupos suplementados con PFM + mezcla Vits B y PFM sin vitaminas.

^{/a-c} Diferentes letras dentro de la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tres periodos de repleción, dentro de un mismo compuesto (SF + mezcla Vits B y PFM + mezcla Vits B).

La ausencia de superíndices indica que no existen diferencias estadísticamente significativas

Al final del 1^{er} periodo de repleción, la concentración de hierro en el bazo del grupo PFM + mezcla Vits B (1,48 mg Fe/g p.s) fue significativamente inferior ($p < 0,05$) al grupo PFM (9,04 mg Fe/g p.s) y al grupo SF + mezcla Vits B (6,29 mg Fe/g p.s). El resto de las piezas anatómicas no mostraron diferencias significativas, presentando concentraciones de hierro similares a los grupos SF y PFM. En el 3^{er} periodo de repleción, la concentración de hierro en el bazo y riñón para el grupo PFM + mezcla Vits B (8,44 y 3,02 mg Fe/g p.s, respectivamente) fue significativamente superior ($p < 0,05$) al grupo SF + mezcla Vits B (4,47 y 0,20 mg Fe/g p.s, respectivamente). Además, la concentración de hierro en el riñón para el grupo SF + mezcla Vits B (0,20 mg Fe/g p.s) fue significativamente inferior ($p < 0,05$) al grupo SF (1,36 mg Fe/g p.s).

En general, el aumento en la *ingesta de hierro* desde el 1^{er} al 3^{er} periodo de repleción no supuso un aumento en la concentración de hierro en los órganos de los grupos PFM con/sin Vits

B y SF con/sin Vits B. Además, la mezcla de vitaminas B no favoreció en ningún caso un aumento en la concentración de hierro en los distintos órganos.

3.6. Efecto pro-oxidante del SF + mezcla Vits B y PFM + mezcla Vits B añadidos al néctar

La Figura 3.9, representa la producción de radicales libres (OH) en heces determinadas por la cuantificación del ácido bencenosulfínico (ABS) en los dos grupos alimentados con los diferentes compuestos de hierro más la mezcla de vitaminas B durante los periodos de tiempo especificados.

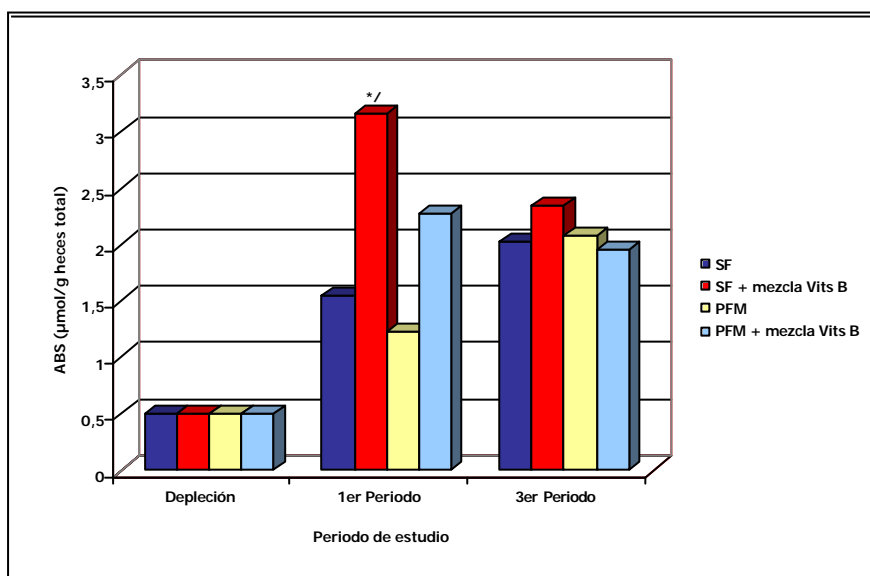


Figura 3.9. Efecto de la administración del néctar con los dos compuestos de hierro con/sin la mezcla vitaminas B en la generación de radicales libres en heces, determinado por la cuantificación del ácido bencenosulfínico (ABS) como producto final en un ensayo *in vitro*.

* La presencia de asterisco muestra diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto a los grupos control (SF y PFM) en cada periodo de estudio.

^{/a-b} Diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los dos periodos de repleción para un mismo compuesto de hierro.

La producción de ABS al final del 1^{er} periodo de repleción para los grupos SF + mezcla Vits B ($3,16 \mu\text{mol/g heces}$) y PFM + mezcla Vits B ($2,27 \mu\text{mol/g heces}$) fue muy similar. Si tenemos en cuenta que ambos grupos mostraron un balance mineral muy similar (Tabla 3.4), podemos sugerir que durante este periodo ambos compuestos de hierro junto con la mezcla de vitaminas B se comportan de manera similar. Sin embargo, el grupo SF + mezcla Vits B mostró valores significativamente superiores ($p < 0,05$) con respecto al grupo SF ($1,55 \mu\text{mol/g heces}$). Aunque en la literatura científica no se ha documentado, en nuestro estudio se sugiere la existencia de un ligero efecto promotor de las vitaminas B₆, B₁₂ y ácido fólico sobre el sulfato ferroso en la producción de radicales hidroxilo.

No obstante las diferencias encontradas son mínimas si tenemos en cuenta la escala de medida utilizada en la Figura.3.9.

No se observaron diferencias significativas en el 3^{er} periodo de balance entre los grupos SF y PFM más la mezcla de vitaminas B, ni tampoco con respecto a los grupos SF y PFM. Además, la producción de ABS de los grupos SF + mezcla Vits B y PFM + mezcla Vits B no varió con

respecto al 1^{er} Periodo, debido a que la ingesta de hierro se mantuvo constante. No se encontraron correlaciones entre la *ingesta de hierro* y la *excreción fecal* con respecto a la producción de radicales libres en las heces, por lo que la presencia de la mezcla de vitaminas B en el néctar enriquecido con los diferentes compuestos de hierro no favorece la generación de radicales libres entre un periodo de 3 a 17 días.

4° ESTUDIO

4. Efecto de la vitamina C y mezcla de vitaminas B (B₆, B₁₂ y ácido fólico) sobre la biodisponibilidad del pirofosfato férrico micronizado (PFM) en el néctar de frutas enriquecido. Método de la Eficiencia de Regeneración de la Hemoglobina (ERH).

4.1. Crecimiento y consumo de alimento

La Tabla 4.1 muestra el análisis de varianza realizado en los parámetros medidos a los animales para evaluar el crecimiento de los mismos: *peso corporal inicial y final*, *ganancia de peso*, *ingestión total de alimento* (ingesta de la dieta + ingesta del néctar), durante el periodo de cada balance mineral.

Tabla 4.1. Análisis de varianza del peso corporal inicial y final, ganancia de peso e ingesta total de alimento tras la administración del SF o PFM + Vits B + C añadidos a un néctar de frutas, durante los tres periodos de balance

VARIABLES	1 ^{er} Balance	2 ^o Balance	3 ^{er} Balance
<i>Peso corporal inicial</i>	NS	NS	**
<i>Peso corporal final</i>	NS	NS	NS
<i>Ganancia de peso</i>	NS	NS	*
<i>Ingestión total de alimento</i>	NS	***	NS

Diferencias significativas para: *p<0.05; **p<0,01; ***p<0,001; NS = no significación

Durante el 1^{er} periodo de balance el ritmo de crecimiento y la *ingesta total de alimento* en ambos grupos (PFM + Vits B + C y SF + Vits B + C) fue similar. En el 2^o periodo de balance, la *ingestión total de alimento* fue estadísticamente diferente entre ambos grupos y por tanto la eficiencia alimentaria (*ganancia de peso/ingesta total de alimento*). En el 3^{er} periodo de balance, los *pesos iniciales* y *ganancia de peso* fueron estadísticamente diferentes, sin embargo, aunque el *peso final* fue similar, la eficiencia alimentaria fue diferente entre los dos grupos, siendo superior para el grupo PFM + Vits B + C.

En la Tabla 4.2, se muestran los valores medios y el error típico de los parámetros relacionados con el crecimiento y la ingesta, en las ratas alimentadas con el néctar SF + Vits B + C y PFM + Vits B + C, comparándolos a su vez con los grupos SF y PFM, en los tres periodos de balance.

Durante el 1^{er} periodo de balance, el *peso inicial* de los grupos SF + Vits B + C (202,20 g) y PFM + Vits B + C (210,08 g), fueron significativamente superiores a los grupos SF y PFM (155,03 y 158,00 g, respectivamente), y aunque la *ingesta total de alimento* fue similar, el *peso final* y por tanto la *ganancia de peso* si se vieron afectados significativamente (p<0,05). De

acuerdo con los resultados, el ritmo de crecimiento de los grupos SF + Vits B + C y PFM + Vits B + C, fue aproximadamente tres veces superior al de los grupos SF y PFM.

Tabla 4.2. Crecimiento e ingesta total de alimento en ratas, tras la administración del SF o PFM junto con las vitaminas B y C añadidos a un néctar de frutas durante el periodo de depleción – repleción.

	Néctar	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Ganancia de peso (g)	Ingesta total de alimento (g)
Depleción	-	152,57 ± 10,81	161,90 ± 10,94	9,33 ± 1,78	28,00 ± 2,65
Repleción					
1^{er} Periodo	SF	155,03 ± 17,67 ^{/b}	167,20 ± 17,20 ^{/b}	10,30 ± 4,33	177,66 ± 18,57
	SF + Vits ¹	202,20 ± 10,84 ^{*/b}	234,00 ± 10,95 ^{*/b}	31,80 ± 2,32 [*]	190,06 ± 29,46
	PFM	158,00 ± 10,79	172,85 ± 10,94	12,47 ± 2,65	226,57 ± 41,28
	PFM + Vits ¹	210,88 ± 7,49 [*]	241,47 ± 8,93 [*]	30,58 ± 3,42 [*]	225,63 ± 22,64 ^{/b}
2^o Periodo	SF	229,75 ± 7,14 ^{/a}	243,45 ± 3,43 ^{/a}	13,70 ± 6,43	282,20 ± 13,24
	SF + Vits ¹	220,40 ± 11,00 ^{/b}	244,55 ± 11,73 ^{/b}	24,15 ± 2,95	246,26 ± 17,01
	PFM	197,95 ± 10,29	215,30 ± 9,30	17,35 ± 2,40	306,23 ± 20,72
	PFM + Vits ¹	220,13 ± 5,43	249,70 ± 7,73 [*]	29,57 ± 2,65 [*]	351,35 ± 10,56 ^{/a}
3^{er} Periodo	SF	225,55 ± 16,04 ^{/a}	248,33 ± 15,67 ^{/a}	22,78 ± 4,22	256,58 ± 48,12
	SF + Vits ¹	271,13 ± 5,45 ^{*/a}	294,30 ± 7,54 ^{*/a}	23,17 ± 2,48	235,08 ± 13,22
	PFM	195,83 ± 20,43	208,05 ± 24,19	12,23 ± 4,68	253,86 ± 69,50
	PFM + Vits ¹	227,47 ± 10,45	261,22 ± 14,69	33,75 ± 4,35 [*]	274,74 ± 24,74 ^{/b}

Media ± error típico, n=6. Vits¹: Vitamina C + Vitaminas B₆, B₁₂ y ácido fólico

^{*/} La presencia de asteriscos dentro de la misma columna para cada uno de los tres periodos de repleción indica diferencias significativas (p<0,05) de los grupos suplementados con SF + Vits B + C y PFM + Vits B + C respecto a los grupos SF y PFM.

^{/a-b} Diferentes letras dentro de la misma columna para cada uno de los tres periodos de balance, indican diferencias significativas (p < 0,05) entre los grupos SF + Vits B + C, PFM + Vits B + C, SF y PFM.

La ausencia de superíndices indica que no existen diferencias estadísticamente significativas

El 2^o periodo de balance, la *ingesta total de alimento* en los grupos PFM + Vits B + C y SF + Vits B + C (351,35 y 246,26 g, respectivamente) fue significativamente diferente (p<0,001), sin embargo esta diferencia no afectó a los parámetros finales, como el *peso final* y la *ganancia de peso*. Los grupos SF con/sin Vits B + C presentaron un ritmo de crecimiento muy similar a lo largo de este periodo. Por el contrario, los grupos PFM con/sin Vits B + C, a pesar de comenzar con un *peso inicial* (220,13 y 197,95 g, respectivamente), y tener una *ingesta total de alimento* similar (351,35 y 306,23 g, respectivamente), la *ganancia de peso* (29,57 y 17,35 g, respectivamente) y por tanto el *peso final* (249,70 y 215,30 g, respectivamente) resultaron diferentes (p<0,05). En resumen, el ritmo de crecimiento del grupo PFM + Vits B + C fue superior al grupo PFM.

En el 3^{er} periodo de balance, observamos que la *ganancia de peso* y la *ingesta total de alimento* en los grupos SF + Vits B + C (23,17 y 235,08 g, respectivamente) y SF (22,78 y 256,58 g, respectivamente) fueron similares, dando lugar a un ritmo de crecimiento semejante, a pesar de mostrar *pesos iniciales* significativamente diferentes (p<0,05). Por el contrario, en los grupos PFM y PFM + Vits B + C, aunque mostraron *pesos iniciales* y una *ingesta total de alimento* parecidos, la *ganancia de peso* (16,07 y 33,75 g, respectivamente) fue significativamente superior para el segundo grupo (p<0,05). Por tanto, la eficiencia alimentaria

(*ganancia de peso/ingesta total de alimento*) para el grupo PFM + Vits B + C fue mejor que la del grupo PFM en este periodo.

4.2. Balance mineral

La Tabla 4.3 muestra el análisis de varianza de los parámetros relacionados con el balance mineral del hierro durante los tres periodos de repleción para los grupos SF + Vits B + C y PFM + Vits B + C.

Tabla 4.3. Análisis de varianza de los parámetros relacionados con el balance mineral del hierro, tras la administración del SF o PFM + Vits B + C añadidos a un néctar de frutas, durante el periodo de repleción

Variables	1 ^{er} Balance	2 ^{do} Balance	3 ^{er} Balance
Ingesta (mg Fe)	NS	***	NS
Excreción fecal (mg Fe)	*	**	*
Excreción urinaria (µg Fe)	NS	NS	NS
Balance del hierro (mg)	NS	*	NS
Absorción aparente (%)	NS	NS	**
Retención aparente (%)	NS	NS	**
Retención x 100/Absorción	NS	NS	NS

Diferencias significativas para: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; NS = no significación

La Tabla 4.4, representa las medias y el error típico de las variables empleadas para el cálculo del balance mineral en los grupos PFM + Vits B + C y SF + Vits B + C, comparados con los grupos PFM y SF.

4.2.1. Balance mineral de los grupos SF + Vits B + C y PFM + Vits B + C

En el 1^{er} periodo de balance, aunque la *excreción fecal* en los grupos SF + Vits B + C y PFM + Vits B + C (0,66 y 1,03 mg Fe, respectivamente) mostrara diferencias significativas (p<0,05), no influyó en el *balance de hierro* y por tanto en los *porcentajes de absorción y retención aparente*, los cuales fueron similares (Tabla 4.4).

Durante el 2^o periodo de balance, la *ingesta de hierro* y la *excreción fecal* en el grupo PFM + Vits B + C (14,75 y 2,54 mg Fe, respectivamente) fue significativamente superior (p<0,001 y p<0,01, respectivamente) al grupo SF + Vits B + C (9,89 y 1,18 mg Fe, respectivamente). Como resultado final del cálculo del *balance del hierro*, el grupo PFM + Vits B + C (12,36 mg Fe) fue significativamente superior (p<0,05) al grupo SF + Vits B + C (8,71 mg Fe). Los *porcentajes de absorción y retención aparente* no variaron con respecto al periodo anterior. En el 3^{er} periodo de balance, la *ingesta total de hierro* en ambos grupos fue similar, en cambio la *excreción fecal* por parte del grupo PFM + Vits B + C (2,81 mg Fe) fue significativamente inferior (p<0,05) al grupo SF + Vits B + C (3,63 mg Fe). A pesar de esta diferencia, el *balance de hierro* resultó ser estadísticamente similar en ambos grupos. Esta diferencia se vio reflejada en los *porcentajes de absorción y retención aparente*, siendo estos valores en el grupo PFM + Vits B + C (74,51 y

74,42%, respectivamente) significativamente superiores ($p < 0,01$) al grupo SF + Vits B + C (60,58 y 60,47%, respectivamente).

4.2.2. Efecto de las vitaminas C, B₆, B₁₂ y ácido fólico sobre el balance mineral del hierro.

En el 1^{er} periodo de balance (Tabla 4.4), la *ingesta de hierro* tanto para los grupos SF con/sin Vits B + C (7,77 y 7,93 mg Fe, respectivamente) como para los grupos PFM con/sin Vits B + C (9,13 y 11,16 mg Fe, respectivamente) fueron muy similares. En cambio, para la *excreción fecal* de los grupos SF con/sin Vits B + C (0,66 y 1,47 mg Fe, respectivamente) si mostraron diferencias significativas entre sí ($p < 0,05$), mientras que los grupos PFM con/sin Vits B + C mostraron valores semejantes. Estos resultados influyeron en los *porcentajes de absorción aparente*, siendo para el grupo SF + Vits B + C (90,72%) significativamente superior ($p < 0,05$) al grupo SF (80,33%), mientras que los grupos PFM con/sin Vits B + C (89,70 y 85,65%, respectivamente) mostraron valores semejantes.

Durante el 2^o periodo de balance, la *ingesta de hierro* se mantuvo sin diferencias. En cambio, la *excreción fecal* de los grupos SF + Vits B + C y PFM + Vits B + C (1,18 y 2,54 mg Fe, respectivamente) fue significativamente inferior ($p < 0,05$) a la obtenida por los grupos SF y PFM (3,89 y 4,20 mg Fe, respectivamente). Las reducidas pérdidas de hierro a través de las heces unidas a una *ingesta de hierro* similar, dieron como resultado *porcentajes de absorción y retención aparente* para los grupos SF + Vits B + C (87,31 y 87,17%, respectivamente) y PFM + Vits B + C (82,74 y 82,66%, respectivamente) significativamente superiores ($p < 0,05$) a los grupos SF (67,74 y 67,32%, respectivamente) y PFM (69,25 y 69,06%, respectivamente).

En el 3^{er} periodo de balance, y al igual que en los periodos anteriores, la *ingesta de hierro* fue similar en los cuatro grupos. La *excreción fecal* por parte del grupo SF + Vits B + C (3,63 mg Fe), aunque no fue estadísticamente diferente fue 2,5 veces inferior al grupo SF (6,27 mg Fe). En cambio, la *excreción urinaria* si fue significativamente diferente ($p < 0,01$) para los grupos SF + Vits B + C y SF (9,29 y 29,92 μ g Fe, respectivamente). No obstante, el *balance del hierro* no se vio afectado. Por tanto y de acuerdo con las diferencias encontradas, los *porcentajes de absorción y retención aparente* fueron significativamente superiores ($p < 0,05$) para el grupo SF + Vits B + C (60,58 y 60,47%, respectivamente) frente al SF (41,90 y 41,60%, respectivamente). En cuanto a los grupos PFM con/sin Vits B + C, la *excreción fecal* (2,81 y 6,66 mg Fe, respectivamente) resultó ser diferente entre ellos ($p < 0,05$). Esta diferencia se vio reflejada en la absorción del hierro (*balance del hierro*), siendo en el grupo PFM + Vits B + C (8,49 mg Fe) estadísticamente superior ($p < 0,05$) al grupo PFM (5,81 mg Fe), y en los *porcentajes de absorción y retención aparente*, siendo en el grupo PFM + Vits B + C (74,51 y

74,42%, respectivamente) significativamente superiores ($p < 0,05$) al grupo PFM (44,88 y 44,70%, respectivamente).

Según estos resultados, es claro el efecto positivo de la adición de las vitaminas del grupo B (B_6 , B_{12} y ácido fólico) y C, para conseguir un incremento en el *balance de hierro* y en el *porcentaje de la absorción y retención aparente*, en ambos compuestos de hierro (SF y PFM).

Estableciendo una relación en el tiempo de cada uno de los parámetros para los grupos, SF + Vits B + C y PFM + Vits B + C, se observó que desde el principio (1^{er} Periodo) al final de la repleción (3^{er} Periodo), la *ingesta de hierro* y el *balance de hierro* aumentaban de manera paralela, es decir, existía una correlación positiva entre ambas variables, siendo para el grupo SF + Vits B + C ($r = 0,855$; $p < 0,001$) y para el grupo PFM + Vits B + C ($r = 0,963$; $p < 0,001$). En dos estudios diferentes realizados en ratas, Buchowski y col. (1989) y Sánchez-Morito y col. (2000) encontraron que la relación entre la ingesta de hierro y el estatus del hierro se basa en una elevada correlación lineal entre la ingesta de hierro y el balance del hierro. Por tanto, estas correlaciones confirman que es posible mejorar el estatus del hierro mediante la administración de SF + Vits B + C y PFM + Vits B + C.

Otro dato importante a destacar, fue la correlación inversa entre la *excreción fecal* y el *porcentaje de absorción aparente* en los grupos SF + Vits B + C ($r = - 0,967$; $p < 0,001$) y PFM + Vits B + C ($r = - 0,794$; $p < 0,01$). En un estudio realizado por Zhang y col. (1989), observaron que en ratas con una anemia severa y alimentadas con una dieta cuya concentración de hierro en forma de SF era de 30 mg/Kg, excretaban menos hierro y la absorción aparente era más elevada (situación que tuvo lugar en el 1^{er} y 2^o periodo de balance) y que en ratas normales esta situación se invirtió, es decir, la excreción fecal aumentaba mientras que la absorción aparente disminuía (similar al 3^{er} periodo de balance).

Tabla 4.4. Absorción y retención del hierro, tras la administración del SF o PFM con/sin Vits B + C en un néctar de frutas, durante los tres periodos de repleción.

Néctar		Ingesta (mg Fe)	Excreción fecal (mg Fe)	Excreción urinaria (mg Fe)	Balace del hierro ¹ (mg)	Absorción aparente ² (%)	Retención ³ (%)	Retención x 100 / Absorción
Repleción								
1er Periodo	SF	7,93 ± 0,95 / ^b	1,47 ± 0,15 / ^b	22,21 ± 5,90 / ^a	6,45 ± 0,97 / ^{ab}	80,33 ± 3,85 / ^a	80,04 ± 3,84 / ^a	99,65 ± 0,08 / ^a
	SF + Vits ¹	7,77 ± 1,18 / ^a	0,66 ± 0,12 / ^{*c}	9,92 ± 1,43 / ^{*a}	7,10 ± 1,09 / ^{ab}	90,72 ± 1,15 / ^{*a}	90,42 ± 1,41 / ^{*a}	99,79 ± 0,03 / ^a
	PFM	11,16 ± 3,58 / ^a	1,54 ± 0,68 / ^c	4,21 ± 1,63 / ^b	9,62 ± 1,77 / ^a	85,65 ± 3,43 / ^a	85,50 ± 3,40 / ^a	99,82 ± 0,08 / ^a
	PFM + Vits ¹	9,13 ± 0,99 / ^b	1,03 ± 0,11 / ^b	11,41 ± 1,76 / ^{*a}	8,10 ± 0,93 / ^b	89,70 ± 1,58 / ^a	89,54 ± 1,55 / ^a	99,82 ± 0,05 / ^a
2º Periodo	SF	12,09 ± 0,60 / ^a	3,89 ± 0,39 / ^{ab}	42,40 ± 12,80 / ^a	8,20 ± 0,61 / ^a	67,74 ± 3,33 / ^b	67,32 ± 3,25 / ^b	99,40 ± 0,12 / ^b
	SF + Vits ¹	9,89 ± 0,84 / ^a	1,18 ± 0,13 / ^{*b}	12,84 ± 2,26 / ^{*a}	8,71 ± 0,78 / ^a	87,31 ± 1,22 / ^{*a}	87,17 ± 1,24 / ^{*a}	99,85 ± 0,03 / ^{*a}
	PFM	13,67 ± 1,13 / ^a	4,20 ± 0,61 / ^b	22,91 ± 3,93 / ^a	9,47 ± 0,95 / ^a	69,25 ± 3,24 / ^b	69,06 ± 3,23 / ^b	99,72 ± 0,05 / ^a
	PFM + Vits ¹	14,75 ± 0,56 / ^a	2,54 ± 0,34 / ^a	18,48 ± 5,22 / ^a	12,36 ± 0,96 / ^a	82,74 ± 2,56 / ^{*a}	82,66 ± 2,55 / ^{*a}	99,90 ± 0,02 / ^a
3er Periodo	SF	10,81 ± 2,29 / ^{ab}	6,27 ± 1,31 / ^a	29,92 ± 5,28 / ^a	4,54 ± 1,01 / ^b	41,90 ± 1,34 / ^c	41,60 ± 1,31 / ^c	99,29 ± 0,12 / ^c
	SF + Vits ¹	9,27 ± 0,71 / ^a	3,63 ± 0,13 / ^a	9,29 ± 2,33 / ^{*a}	5,64 ± 0,58 / ^b	60,58 ± 1,66 / ^{*b}	60,47 ± 1,69 / ^{*b}	99,82 ± 0,06 / ^{*a}
	PFM	12,46 ± 1,99 / ^a	6,66 ± 0,45 / ^a	19,09 ± 3,69 / ^{ab}	5,81 ± 1,62 / ^a	44,88 ± 6,06 / ^c	44,70 ± 6,06 / ^c	99,28 ± 0,29 / ^a
	PFM + Vits ¹	11,30 ± 1,30 / ^{ab}	2,81 ± 0,16 / ^{*a}	10,16 ± 1,88 / ^a	8,49 ± 1,16 / ^{ab}	74,51 ± 1,88 / ^{*b}	74,42 ± 1,90 / ^{*b}	99,87 ± 0,03 / ^a

Cada valor es la media ± error típico n = 6. Vitaminas¹: Vitamina C + Vitaminas B₆, B₁₂ y ácido fólico

* La presencia de asteriscos dentro de la misma columna para cada uno de los tres periodos de repleción indica diferencias significativas (p<0,05) de los grupos suplementados con SF + Vits B + C y PFM + Vits B + C respecto a los grupos SF y PFM.

^{a-c} Diferentes letras dentro de la misma columna para cada uno de los tres periodos de balance, indican diferencias significativas (p < 0.05) entre los grupos SF + Vits B y C, PFM + Vits B + C, SF y PFM.

¹Balace del hierro = Ingesta de hierro (mg) – Excreción fecal (mg)

²Absorción aparente (%) = [Ingesta de hierro (mg) – Excreción fecal (mg)] x 100 / Ingesta de hierro (mg).

³Retención (%) = [Ingesta de hierro (mg) – (Excreción fecal (mg) + Excreción urinaria (mg))] x 100 / Ingesta de hierro (mg).

La ausencia de superíndices indica que no existen diferencias estadísticamente significativas

Miret y col. (2003), propusieron que los principales factores que afectan a la absorción del hierro son la cantidad de hierro presente en el organismo y el ritmo de la eritropoyesis. Según esto, cuando el estatus del hierro es bajo o cuando las reservas de hierro están disminuidas, la absorción del hierro aumenta, y viceversa. En nuestro caso, los *porcentajes de absorción y retención aparente* de los grupos SF + Vits B + C y PFM + Vits B + C al final de cada periodo de balance fueron significativamente superiores ($p < 0,05$) a los grupos SF y PFM. Este aumento puede estar relacionado con la presencia de la vitamina C en el néctar, la cual podría aumentar los porcentajes de la absorción del hierro en ambos grupos, según se ha explicado en el 2º Estudio. Además, como hemos comentado anteriormente, la absorción del hierro también está relacionada con el ritmo en la producción de los eritrocitos (eritropoyésis), por tanto es necesario relacionar estos parámetros del balance mineral con los parámetros hematológicos, como se comentará en el apartado 4.3 y 4.4.

4.2.3. ¿Cuál es el efecto relativo de cada una de las vitaminas sobre la absorción y balance del hierro?

En este apartado, se pretende deducir si el incremento que hemos observado en el balance del hierro, se debe a la adición de la vitamina C, o del grupo de vitaminas B, o por el contrario a una acción conjunta de todas estas vitaminas. Para ello, únicamente vamos a comparar los *porcentajes de absorción y retención aparente*, ya que es el parámetro más importante y engloba en su cálculo los demás parámetros.

Entre el 4º y 2º Estudio, la vitamina común presente en el néctar enriquecido con PFM o SF, es la vitamina C, siendo la mezcla de vitaminas B el factor que podría diferenciar a los diferentes grupos alimentados con su respectivo néctar enriquecido. Obviamente, hay variables que hay que tener en cuenta antes de poder realizar una comparación entre los diferentes grupos. Estas variables son el *peso inicial* la Hb_i y el $FeHb_i$, las cuales nos dan una idea del estatus del hierro presente en el animal.

En cada uno de los tres periodos, los *porcentajes de absorción* aparente para el grupo PFM + Vits B + C (89,70; 82,74 y 74,51%, respectivamente) y *retención aparente* (89,54; 82,66 y 74,42%, respectivamente) fueron significativamente superiores ($p < 0,001$) al grupo PFM + Vit C (70,50; 62,79 y 56,48%, respectivamente) y (70,28; 62,51 y 56,26%, respectivamente). De acuerdo con los *porcentajes de absorción y retención aparente*, podríamos sugerir que la acción conjunta de la mezcla de vitaminas B y C favorece la absorción del hierro del PFM en relación a la adición únicamente de la vitamina C. Pero en cambio, si tenemos en cuenta que los *pesos iniciales*, Hb_i y $FeHb_i$ entre los grupos deben ser similares para hacer una comparación, únicamente habría que tener en cuenta los resultados obtenidos en el 2º periodo de repleción.

Durante el 1^{er} y 2^o periodo de balance, los *porcentajes de absorción* para el grupo SF + Vits B + C (90,72; 87,93%, respectivamente) y *retención aparente* (90,42; 87,79%, respectivamente) fueron significativamente superiores ($p < 0,05$) al grupo SF + Vit C (72,06; 49,21%, respectivamente) y (71,88; 49,02%, respectivamente). Sin embargo, en el 3^{er} periodo de balance esta situación se equilibró, mostrando valores muy similares entre ellos. No obstante, solamente en el 1^{er} periodo de repleción, ambos grupos mostraron *pesos iniciales*, Hb_i y FeHb_i similares, mientras que en los periodos restantes esta situación no se cumplió, por lo que sería conveniente tratar los datos con cautela en los dos últimos periodos.

En general, desconocemos si existe algún mecanismo por el cual la mezcla de las vitaminas B puede influir en los *porcentajes de absorción y retención aparente* en ratas, debido a la ausencia de referencia bibliográficas sobre este hecho, sin embargo, de acuerdo con los resultados obtenidos la adición de las mismas junto a la vitamina C mejora la absorción del PFM y SF añadidos al néctar.

Al comparar el grupo PFM + Vits B + C (4^o Estudio) con el grupo PFM + mezcla Vits B (3^{er} Estudio), para ver el efecto de la vitamina C en cada uno de los tres periodos de balance, observamos que los *porcentajes de absorción y retención aparente* fueron similares. En principio, estos resultados nos sugieren que la vitamina C aunque mejora la absorción del hierro, no supone un incremento mayor que la que produce la adición de vitaminas del grupo B. Una posible explicación a este hecho puede estar relacionada con el ratio molar entre la vitamina C y el hierro, que en nuestro estudio fue de 2,8:1, quizá insuficiente en roedores que sintetizan esta vitamina. Además, el aumento de la absorción del hierro en presencia de la vitamina C es más pronunciada en alimentos o dietas que contienen inhibidores de la absorción del hierro, que no es el caso del néctar en estudio. Según Teucher y col., (2004), las dietas con niveles bajos o medios de inhibidores requieren la adición de vitamina C en un ratio de 2:1 (por ejemplo, 20 mg de Vit C: 3 mg Fe), mientras que para favorecer la absorción del hierro en presencia de niveles altos de inhibidores, la vitamina C debe estar en un ratio $> 4:1$. Aunque el efecto de la vitamina C ha sido examinada en combinación con varios compuestos de hierro, la mayoría de los estudios emplearon el sulfato ferroso. Con la excepción del Fe (III)-EDTA (MacPhail y col., 1981), bisglicinato ferroso (Olivares y col., 1997), y fumarato ferroso, la vitamina C parece aumentar la absorción de la mayoría de los compuestos de hierro en una manera similar (Hurrell, 2002b). Además, el efecto de la vitamina C sobre compuestos de hierro con baja solubilidad parece ser menos pronunciado. De acuerdo con esto, poco se sabe sobre el efecto de la vitamina C en la absorción del PFM, por lo que futuros estudios serían necesarios para determinar la efectividad de la vitamina C como favorecedor de la absorción del hierro sobre el PFM.

En el 1^{er} periodo de balance, la única diferencia que hizo que los *porcentajes de absorción* fueran diferentes fue la *excreción fecal*, siendo para el grupo SF + mezcla Vits B de 1,18 mg Fe y para el grupo SF + Vits B + C de 0,66 mg Fe. Con respecto al 2^o periodo de balance, la *excreción fecal* y la *ingesta de hierro* fueron similares, aunque en el último parámetro a pesar de no existir diferencias significativas, esta diferencia fue suficiente para que al calcular el balance del hierro sí las hubiera. En el 3^{er} periodo de balance, la *ingesta de hierro* fue similar en ambos grupos, pero un aumento en la *excreción fecal* de hierro por parte del grupo SF + Vits B + C (3,63 mg Fe) hizo que el porcentaje de absorción aparente (60,58%) disminuyera con respecto al grupo SF + mezcla Vits B (74,64%). En resumen, no podemos concluir de manera categórica que la adición de la vitamina C tuviera un efecto favorecedor en la absorción del hierro, puesto que sólo se observó en los dos primeros periodos de balance. Esto puede deberse a otros factores relacionados con la absorción como pueden ser la ingesta de hierro, la excreción fecal y en general al estatus del hierro de ambos grupos. Sin embargo y al igual que para el compuesto de hierro PFM, son necesarios futuros estudios para determinar el efecto de la vitamina C junto a otras vitaminas en la absorción del hierro y establecer un ratio molar entre la vitamina C y el compuesto de hierro.

En general, se conoce que las ratas tienen la capacidad de sintetizar la vitamina C en el hígado a partir de la glucosa. Siendo la concentración de vitamina C de 20–30 mg, el equivalente aproximado a unos 7,5 g de vitamina C en un humano adulto (Burns y col., 1954). Sin embargo, el aporte extra de vitamina C no fue suficiente para favorecer la absorción de las dos fuentes de hierro, SF y PFM.

4.3. Biodisponibilidad y utilización del hierro

La Tabla 4.5, muestra el análisis de varianza de las variables relacionadas con el índice de la biodisponibilidad y la utilización del hierro durante los tres periodos de repleción.

La Tabla 4.6, muestra los valores medios y el error típico obtenidos para cada una de las variables empleadas en el cálculo de la biodisponibilidad relativa y la utilización del hierro para el PFM + Vits B + C y SF + Vits B + C, con respecto a los grupos PFM y SF, en cada uno de los tres periodos de repleción.

Tabla 4.5. Análisis de varianza de los parámetros relacionados con los índices de biodisponibilidad y la utilización del hierro, en los grupos alimentados con SF o PFM + Vits B + C, durante los tres periodos de balance.

Variables	1^{er} Balance	2^{do} Balance	3^{er} Balance
Ganancia de peso (g)	NS	NS	NS
Ingesta (mg Fe)	NS	**	***
Hgb inicial (g/dl)	NS	NS	NS
Hgb final (g/dl)	NS	NS	NS
Fe Hgb inicial (mg)	NS	NS	NS
Fe Hgb final (mg)	NS	NS	NS
ERH (%)	NS	NS	**
Utilización del hierro (mg)	NS	NS	**

Diferencias significativas para: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; NS = no significación

4.3.1. Biodisponibilidad y utilización del hierro entre los grupos PFM o SF + Vits B + C

Al comienzo del 1^{er} periodo de repleción, los *pesos iniciales* de los grupos PFM + Vits B + C y SF + Vits B + C (202,20 y 210,88 g, respectivamente), Hb_i (6,38 y 6,50 g/dl, respectivamente) y FeHb_i (2,95 y 3,12 mg, respectivamente) fueron similares, y por tanto con un estatus del hierro homogéneo. Además, la *ingesta de hierro* en los grupos SF + Vits B + C y PFM + Vits B + C (7,77 y 8,43 g, respectivamente), fue adecuada para alcanzar una concentración de Hb_f (12,12 y 11,82 g/dl, respectivamente) dentro del rango normal (Tabla 1.5). La *ERH* de los grupos PFM + Vits B + C y SF + Vits B + C (51,68 y 42,23%, respectivamente) fue similar, indicando una biodisponibilidad muy parecida. En cuanto a la *utilización del hierro*, ambos grupos presentaron valores similares (2,54 y 2,08 mg, respectivamente), indicando que aproximadamente la mitad del hierro del néctar es utilizado para recuperar un estatus del hierro adecuado.

Al igual que en el 1^{er} periodo, en el 2^o periodo de repleción, los grupos SF + Vits B + C y PFM + Vits B + C mostraron *pesos iniciales* (194,50 y 188,17 g, respectivamente), Hb_i (5,93 y 5,93 g/dl, respectivamente) y FeHb_i (2,63 y 2,54 mg, respectivamente), muy homogéneos. La *ingesta de hierro* del grupo PFM + Vits B + C (28,43 mg Fe) fue significativamente superior (p<0,05) al grupo SF + Vits B + C (24,49 mg Fe), esta diferencia no supuso ninguna variación en los parámetros Hb_f y FeHb_f, de ambos grupos. En cuanto a la biodisponibilidad del hierro, expresado como *ERH*, los grupos SF + Vits B + C y PFM + Vits B + C (21,78 y 19,96%, respectivamente) no mostraron diferencias significativas, al igual que en la *utilización del hierro* (1,07 y 0,98 mg, respectivamente). Por tanto, el hierro proporcionado por el PFM y SF junto con las vitaminas B y C se incorporó de manera efectiva y similar a la hemoglobina.

En el 3^{er} periodo de repleción, y al igual que en los dos anteriores, los grupos SF + Vits B + C y PFM + Vits B + C, presentaron *pesos iniciales* (227,40 y 205,45 g, respectivamente), Hb_i (5,70 y 5,52 g/dl, respectivamente) y FeHb_i (2,95 y 2,60 mg, respectivamente) muy similares. La *ingesta total de hierro* aumentó con el tiempo, y para el grupo PFM + Vits B + C (46,08 g)

fue significativamente superior ($p < 0,05$) al grupo SF + Vits B + C (35,23 g), esta diferencia no afectó a la Hb_f , y el $FeHb_f$. En cuanto a la *ERH* y a la *utilización del hierro*, el grupo PFM + Vits B + C (13,45% y 0,66 mg, respectivamente) reflejaron valores inferiores ($p < 0,01$) al grupo SF + Vits B + C (18,57% y 0,91 mg, respectivamente), lo cual nos sugiere que en este periodo de repleción, el hierro del SF fue el más biodisponible.

Al evaluar el comportamiento de cada compuesto de hierro junto con las vitaminas B y C sobre cada una de las variables empleadas en el cálculo de la biodisponibilidad del hierro, pudimos observar que desde el punto de vista hematológico, 3 días de repleción (1^{er} periodo) fueron suficientes para alcanzar niveles de hemoglobina $> 11,1$ g/dl (Tabla 1.5). Periodos más largos (2^o y 3^{er} periodo), permitieron alcanzar niveles de Hb_f significativamente más elevados ($p < 0,05$) para el grupo PFM + Vits B + C (14,67 y 14,98 g/dl, respectivamente) y para el grupo SF + Vits B + C (14,42 y 14,73 g/dl, respectivamente) con respecto al 1^{er} periodo. La ganancia de la Hb estuvo favorecida por la *ingesta de hierro*, existiendo una correlación positiva entre ambas variables, por lo que una mayor ingesta de hierro permitió un aumento en la síntesis de la hemoglobina, siendo para el grupo SF + Vits B + C ($r = 0,852$, $p < 0,001$) y para el grupo PFM + Vits B + C ($r = 0,829$, $p < 0,001$). Al igual que Wienk y col., (1999), observamos que la *ingesta de hierro* estuvo correlacionada con la *ganancia de peso*, siendo para el grupo PFM + Vits B + C ($r = 0,513$; $p < 0,05$) y para el grupo SF + Vits B + C ($r = 0,688$; $p < 0,01$), es decir, un aumento en la *ganancia de peso* estuvo directamente relacionada con un aumento en el volumen sanguíneo y por tanto con un aumento en los niveles de hemoglobina. Zhang y col. (1989), observaron que las ratas alimentadas con SF mostraban una relación inversa entre la ganancia de la Hb y la ganancia de hierro en la Hb, es decir, cuando la concentración inicial de la hemoglobina es más baja la incorporación del hierro a la hemoglobina es más elevada. Esta misma situación tuvo lugar en nuestro estudio, donde el grupo SF + Vits B + C mostró una correlación inversa entre la Hb_i con la ganancia de la Hb y la ganancia de hierro en la Hb ($r = -0,713$ y $r = -0,642$; $p < 0,01$, respectivamente). Esta misma relación se encontró para el grupo PFM + Vits B + C ($r = -0,835$ y $r = -0,598$; $p < 0,01$, respectivamente).

La ganancia de hierro en la Hb, es la que mejor refleja la regeneración de la Hb, ya que tiene en cuenta las diferencias en el peso ganado y por tanto la expansión del volumen de sangre durante el periodo de repleción. De esta manera, la *ganancia en peso* y la *ingesta de hierro* estuvieron correlacionadas con la ganancia de hierro en la Hb, tanto para el grupo PFM + Vits B + C ($r = 0,805$ y $r = 0,868$; $p < 0,001$, respectivamente) como para el grupo SF + Vits B + C ($r = 0,745$; $p < 0,001$, y $r = 0,858$; $p < 0,01$, respectivamente). Observamos que la biodisponibilidad del hierro (medida como *ERH*) fue disminuyendo progresivamente por cada periodo de balance, mientras que la *ingesta de hierro* fue aumentando. Ambas variables

mostraron una correlación inversa, siendo para el grupo PFM + Vits B + C ($r = - 0,906$; $p < 0,001$) y para el grupo SF + Vits B + C ($r = - 0,877$; $p < 0,001$).

4.3.2. Efecto de las vitaminas B y C en la biodisponibilidad y utilización del hierro

El estatus de hierro al inicio de cada periodo de repleción debe ser lo más homogéneo para cada uno de los grupos en estudio para que podamos establecer comparaciones, para ello nos fijamos en el *peso inicial* Hb_i y $FeHb_i$. En el 1^{er} periodo de repleción, el *peso inicial* y la Hb_i del grupo SF + Vits B + C (202,20 g, 6,38 g/dl, respectivamente) fue significativamente superior ($p < 0,01$) al grupo SF (155,03 g, 7,88 g/dl, respectivamente), mientras que el $FeHb_i$ se mantuvo sin diferencias. Aunque la *ingesta de hierro* fuera similar para el grupo SF + Vits B + C (7,77 mg Fe) y el grupo SF (7,42 mg Fe), la *ganancia de peso* marcaría las diferencias en la Hb_f y el $FeHb_f$ para el grupo SF + Vits B + C (31,80 g, 12,12 g/dl y 6,47 mg, respectivamente) y para el grupo SF (10,30 g, 11,68 g/dl y 4,21 mg, respectivamente). Respecto a la biodisponibilidad del hierro (medido como *ERH*) y la *utilización del hierro*, el grupo SF + Vits B + C (51,68% y 2,54 mg, respectivamente) fue significativamente superior ($p < 0,01$) al grupo SF (20,55% y 1,01 mg, respectivamente). Si relacionamos la *ERH* del grupo SF + Vits B + C con la del SF, obtenemos el valor biológico relativo (VBR), siendo el VBR del grupo SF + Vits B + C de 251%, algo más del doble con respecto al grupo SF (VBR 100%). Por lo tanto, la adición de las vitaminas B y C en el néctar con la fuente de hierro SF, claramente favoreció la biodisponibilidad del SF, a pesar de las diferencias existentes al inicio del periodo de repleción entre ambos grupos.

Tabla 4.6. Eficiencia de regeneración de la hemoglobina (ERH), utilización del hierro y valor biológico relativo (VBR) en ratas anémicas, tras la administración del SF o PFM con/sin Vits B + C en un néctar de frutas, durante los tres periodos de repleción.

	Néctar	Ganancia de peso (g)	Ingesta Fe (mg)	Hb inicial (g/dL)	Hb final (g/dL)	Fe Hb inicial ¹ (mg)	Fe Hb final ¹ (mg)	ERH ² (%)	Utilización del hierro ³ (mg)	VBR ⁴
Repleción										
1^{er} Periodo	SF	10,30 ± 4,33 /c	7,42 ± 1,98 /c	7,88 ± 0,81 /a	11,68 ± 0,98 /b	2,82 ± 0,91 /a	4,21 ± 1,23 /b	20,55 ± 4,27 /a	1,01 ± 0,21 /a	100
	SF + Vits ¹	31,80 ± 2,32 ^{a/b}	7,77 ± 1,18 /c	6,38 ± 0,12 ^{a/a}	12,12 ± 0,15 /b	2,95 ± 0,20 /a	6,47 ± 0,36 ^{a/c}	51,68 ± 7,03 ^{a/a}	2,54 ± 0,35 ^{a/a}	251
	PFM	12,47 ± 2,65 /c	9,88 ± 4,21 /c	7,75 ± 0,78 /a	11,35 ± 1,91 /b	2,79 ± 0,57 /a	4,22 ± 1,06 /b	14,80 ± 3,17 /a	0,73 ± 0,16 /a	72
	PFM + Vits ¹	30,58 ± 3,42 ^{a/b}	8,43 ± 1,07 /c	6,50 ± 0,09 ^{a/a}	11,82 ± 0,39 /b	3,12 ± 0,11 /a	6,49 ± 0,29 ^{a/b}	42,23 ± 4,26 ^{a/a}	2,08 ± 0,21 ^{a/a}	205
2^o Periodo	SF	38,05 ± 3,96 /b	27,47 ± 4,78 /b	7,62 ± 0,16 /ab	14,12 ± 0,37 /a	3,05 ± 0,76 /a	7,55 ± 0,77 /a	16,85 ± 5,06 /ab	0,83 ± 0,25 /ab	100
	SF + Vits ¹	50,05 ± 5,18 /a	24,49 ± 0,84 /b	5,93 ± 0,10 ^{a/ab}	14,42 ± 0,35 /a	2,63 ± 0,18 /a	7,92 ± 0,46 /b	21,78 ± 1,64 /b	1,07 ± 0,08 /b	129
	PFM	42,12 ± 6,97 /b	30,33 ± 2,72 /b	7,50 ± 0,37 /ab	14,47 ± 0,61 /a	2,96 ± 0,50 /a	7,09 ± 0,78 /a	13,79 ± 2,79 /a	0,68 ± 0,14 /a	82
	PFM + Vits ¹	61,53 ± 5,93 ^{a/a}	28,43 ± 0,56 /b	5,93 ± 0,08 ^{a/ab}	14,67 ± 0,29 /a	2,54 ± 0,90 /b	8,21 ± 0,19 ^{a/a}	19,96 ± 0,64 ^{a/b}	0,98 ± 0,03 ^{a/b}	118
3^{er} Periodo	SF	80,50 ± 15,73 /a	56,78 ± 4,58 /a	6,33 ± 0,40 /b	14,00 ± 0,42 /a	2,30 ± 1,13 /a	7,94 ± 1,19 /a	10,02 ± 1,96 /b	0,49 ± 0,09 /b	100
	SF + Vits ¹	66,90 ± 8,35 /a	35,23 ± 0,95 ^{a/a}	5,70 ± 0,19 /b	14,73 ± 0,11 /a	2,95 ± 0,13 /a	9,73 ± 0,25 ^{a/a}	18,57 ± 0,78 ^{a/b}	0,91 ± 0,04 ^{a/b}	185
	PFM	64,30 ± 7,21 /a	53,04 ± 5,95 /a	6,35 ± 0,53 /b	14,60 ± 0,51 /a	2,56 ± 0,77 /a	6,88 ± 1,45 /a	8,09 ± 0,88 /b	0,40 ± 0,04 /b	82
	PFM + Vits ¹	55,78 ± 7,95 /a	46,08 ± 1,23 /a	5,52 ± 0,27 /b	14,98 ± 0,38 /a	2,60 ± 0,23 /ab	8,75 ± 0,44 ^{a/a}	13,45 ± 0,91 ^{a/b}	0,66 ± 0,04 ^{a/b}	134

Media ± Error típico, n=6.

Vits¹: Vitamina C + Vitaminas B₆, B₁₂ y ácido fólico.

^{a-b/} Diferentes letras dentro de la misma columna, para cada parámetro y en cada periodo de repleción muestran diferencias estadísticamente significativas (p < 0.05).

^{/a-c} Diferentes letras dentro de la misma columna para cada uno de los tres periodos de balance, indican diferencias significativas (p < 0.05) entre los grupos SF + Vits B + C y PFM + Vits B + C

¹ Fe en Hb se describe en la sección de material y métodos: mg Fe en Hb = (peso x Hb x 0,067 x 3,4).

²ERH (%) = [Fe Hb (final) – Fe Hb (inicial) x 100]/ mg Fe consumido.

³ Utilización del hierro (mg) = ERH (%) x Fe en la dieta (%) (4,92 mg/100 g) / 100.

⁴ VBR = ERH (SF o PFM) con/sin Vits B + C / ERH (SF)

La ausencia de superíndices indica que no existen diferencias estadísticamente significativas

En cuanto a los grupos PFM con/sin Vits B + C, encontramos las mismas diferencias significativas ($p < 0,01$) que en los grupos con la fuente de hierro SF. El *peso inicial* y la Hb_i en el grupo PFM + Vits B + C (210,88 g, 6,50 g/dl, respectivamente) fue significativamente diferente ($p < 0,01$) al grupo PFM (128,00 g, 7,75 g/dl, respectivamente). La *ganancia de peso* para el grupo PFM + Vits B + C (30,58 g) fue significativamente superior ($p < 0,05$) al grupo PFM (12,47 g) a pesar de que la *ingesta de hierro* para ambos grupos fuera similar. Por lo tanto, este aumento en la *ganancia de peso* determinó que el $FeHb_f$ para el grupo PFM + Vits B + C (6,49 mg Fe) fuera significativamente superior ($p < 0,05$) al grupo PFM (4,22 mg Fe). La *ERH* y la *utilización del hierro* para el grupo PFM + Vits B + C (42,23% y 2,08 mg Fe, respectivamente) fue significativamente superior ($p < 0,05$) al grupo PFM (14,80% y 0,73 mg Fe, respectivamente). Por tanto el VBR del PFM + Vits B + C (205%) fue el doble con respecto al del SF, mientras que el del grupo PFM fue del 72%. Al igual que el grupo SF + Vits B + C, la adición de las vitaminas B y C al néctar con la fuente de hierro PFM favoreció significativamente la biodisponibilidad del PFM.

En el 2º periodo de repleción, la Hb_i fue significativamente diferente ($p < 0,001$) para los grupos SF y SF + Vits B + C. Sin embargo, el *peso inicial* y el $FeHb_i$ fueron similares, siendo para el grupo SF (175,20 g y 3,05 mg Fe, respectivamente) y para el grupo SF + Vits B + C (194,50 g y 2,63 mg Fe, respectivamente). En ambos grupos, SF y SF + Vits B + C, la *ingesta de hierro* (27,47 y 24,49 mg, respectivamente) dio lugar a valores de Hb_f (14,12 y 14,42 g/dl, respectivamente) y $FeHb_f$ (7,55 y 7,92 mg Fe, respectivamente) muy similares. La adición de las vitaminas B y C en este periodo de repleción no afectó a la *ERH* ni a la *utilización del hierro* en ambos grupos, siendo para el grupo SF + Vits B + C: 21,78% y 1,07 mg Fe, respectivamente y para el grupo SF 16,85% y 0,83 mg Fe, respectivamente. Por tanto, el VBR del grupo SF + Vits B + C (129%) aunque fue ligeramente superior, no fue significativamente superior al SF (100%).

Para los grupos PFM con/sin Vits B + C, el *peso inicial* (188,17 y 173,18 g, respectivamente) y el $FeHb_i$ (2,54 y 2,96 mg Fe, respectivamente) fueron muy similares, sin embargo la Hb_i (5,93 y 7,50 g/dl, respectivamente) varió significativamente ($p < 0,001$). La *ingesta de hierro* para el grupo PFM + Vits B + C (28,43 mg) fue muy similar a la del grupo PFM (30,33 mg), dando lugar a valores de Hb_f semejantes en ambos grupos. Sin embargo el $FeHb_f$ para el grupo PFM + Vits B + C (8,21 mg) fue significativamente superior ($p < 0,05$) al grupo PFM (7,09 mg), esta diferencia se debió al aumento significativo en la *ganancia de peso* para el grupo PFM + Vits B + C (61,53 g) frente a la del grupo PFM (42,12 g). En este caso, la adición de las vitaminas B y C sí mejoró la *ERH* y la *utilización del hierro* en el 2º balance, siendo para el grupo PFM + Vits B + C (19,96% y 0,98 mg Fe, respectivamente) significativamente superior ($p < 0,05$) al grupo PFM

(13,79% y 0,68 mg Fe, respectivamente). Comparando el VBR del PFM + Vits B + C (118%) con la del PFM (82%), observamos que está claramente favorecida la biodisponibilidad del PFM cuando se le adicionan las vitaminas B y C.

En el 3^{er} periodo de repleción, los grupos SF con/sin Vits B + C mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en el *peso inicial* (227,40 y 154,36 g, respectivamente), mientras que la Hb_i (5,70 y 6,33 g/dl, respectivamente) y el $FeHb_i$ (2,95 y 2,30 mg, respectivamente) fueron similares. En este periodo, la *ingesta de hierro* para los grupos SF con/sin Vits B + C (35,23 y 56,78 g, respectivamente) fue diferente ($p < 0,001$), aunque esta diferencia no afectó a la Hb_f (14,73 y 14,00 g/dl, respectivamente) y sí al $FeHb_f$ (9,73 y 7,94 mg, respectivamente). A diferencia del 2^o periodo de repleción, la *ERH* y la *utilización del hierro* para los grupos SF + Vits B + C (18,57% y 0,91 mg, respectivamente) y para el grupo SF (10,02% y 0,49 mg, respectivamente) si mostraron diferencias significativas ($p < 0,001$). En este caso, el VBR del grupo SF + Vits B + C (185%) fue significativamente superior ($p < 0,05$) al del grupo SF (100%), poniendo de manifiesto que la adición de las vitaminas B y C favoreció la biodisponibilidad del SF.

En los grupos PFM con/sin las vitaminas B y C, los *pesos iniciales* (205,43 y 174,18 g, respectivamente), la Hb_i (5,52 y 6,35 g/dl, respectivamente) y el $FeHb_i$ (2,60 y 2,56 mg, respectivamente) no mostraron diferencias entre ellos, por lo que ambos grupos presentaron un estatus del hierro muy homogéneo. Al final del periodo de repleción, el $FeHb_f$ para el grupo PFM + Vits B + C (8,75 mg) fue significativamente superior ($p < 0,05$) al grupo PFM (6,88 mg). Por lo tanto, la *ERH* y la *utilización del hierro* para el grupo PFM + Vits B + C (13,45% y 0,66 mg Fe, respectivamente) fue significativamente superior ($p < 0,05$) al grupo PFM (8,09% y 0,40 mg Fe, respectivamente). En cierta manera, podemos concluir que el efecto de las vitaminas B y C sobre la biodisponibilidad del PFM fue claramente significativo, esto se refleja en los valores del VBR, siendo para el grupo PFM + Vits B + C (134%) y para el grupo PFM (82%) frente al SF (100%).

En general, si nos fijamos en los niveles Hb_f de cada periodo de repleción, podemos deducir que desde el 1^{er} periodo de repleción los niveles de Hb_f se encontraban dentro del rango normal ($> 11,1$ g/dl, Tabla 1.5). Estos niveles de Hb_f aumentaron significativamente ($p < 0,05$) en el 2^o periodo de repleción y manteniéndose constantes en el 3^{er} periodo de repleción. Del mismo modo, ocurrió para la *ERH* y la *utilización del hierro*, donde los valores más elevados tuvieron lugar en el 1^{er} periodo de repleción, coincidiendo con la etapa donde las necesidades para el hierro eran las más elevadas, y en el 2^o y 3^{er} periodo de repleción estos valores disminuyeron de manera significativa ($p < 0,05$), coincidiendo con los periodos donde la *ingesta de hierro*

umentaba. Por tanto, la adición de las vitaminas B y C junto con las fuentes de hierro SF y PFM, favorecieron la biodisponibilidad del compuesto de hierro, aunque debemos estudiar si el efecto se debe a la acción conjunta de ambos tipos de vitaminas o a alguna de ellas por separado.

4.3.3. ¿Cuál es el efecto relativo de cada una de las vitaminas sobre la biodisponibilidad y utilización del hierro?

Al comparar los parámetros relacionados con la *biodisponibilidad y utilización del hierro* del PFM en el 2º y 4º Estudio, pudimos observar que en el 1º periodo de repleción el grupo PFM + Vits B + C y el grupo PFM + Vit C no presentaban el mismo estatus del hierro. Este hecho se debió en parte a la dificultad de poder contar con grupos homogéneos en función de sus *pesos iniciales*, Hb_i y por tanto el $FeHb_i$. Sin embargo la *ERH* y la *utilización del hierro* alcanzaron valores muy similares en ambos casos. En cambio, en el 2º periodo de repleción, esta situación fue diferente, es decir, el estatus del hierro para ambos grupos fue similar, por lo que los resultados sí tendrían sentido a la hora de compararlos. En este caso, la *ERH* y la *utilización del hierro* no presentaron diferencias significativas para los grupos PFM + Vit C y PFM + Vits B + C, por tanto podemos sugerir que la adición de las vitaminas B no afectó a la biodisponibilidad del PFM en este periodo. El 3º periodo de repleción al igual que el 1º periodo, los dos grupos PFM + Vit C y PFM + Vits B + C no partieron de un estatus del hierro similar por lo que sus resultados se verían sobreestimados al compararlos entre sí.

Con respecto al grupo SF + Vit C (2º Estudio) y al grupo SF + Vits B + C (4º Estudio), al iniciar el 1º periodo de repleción ambos grupos partieron de un estatus para el hierro muy similares. Siendo la *ingesta de hierro* similar entre ellos, la Hb_f para el grupo SF + Vit C (10,70 g/dl) fue significativamente inferior ($p < 0,05$) a la del grupo SF + Vits B + C (12,12 g/dl). Sin embargo este valor no afectó a la *ERH* y a la *utilización del hierro* que fueron en ambos grupos muy similares. Por tanto, tras una suplementación de 3 días, la adición de las vitaminas del grupo B no afectó de manera significativa a la biodisponibilidad del SF. Durante los 10 días de suplementación que duró el 2º periodo, la Hb_i y el $FeHb_i$ fueron estadísticamente diferentes ($p < 0,01$) en ambos grupos. La *ERH* y la *utilización del hierro* no variaron entre ellos, pero al partir de un estatus del hierro diferente no sabemos si verdaderamente podría o no haber influido en la biodisponibilidad del SF. En el 3º periodo de repleción, los parámetros analizados variaron desde el inicio hasta el final del mismo, por lo que resultaría difícil estimar la influencia de la adición de las vitaminas B en la biodisponibilidad del SF.

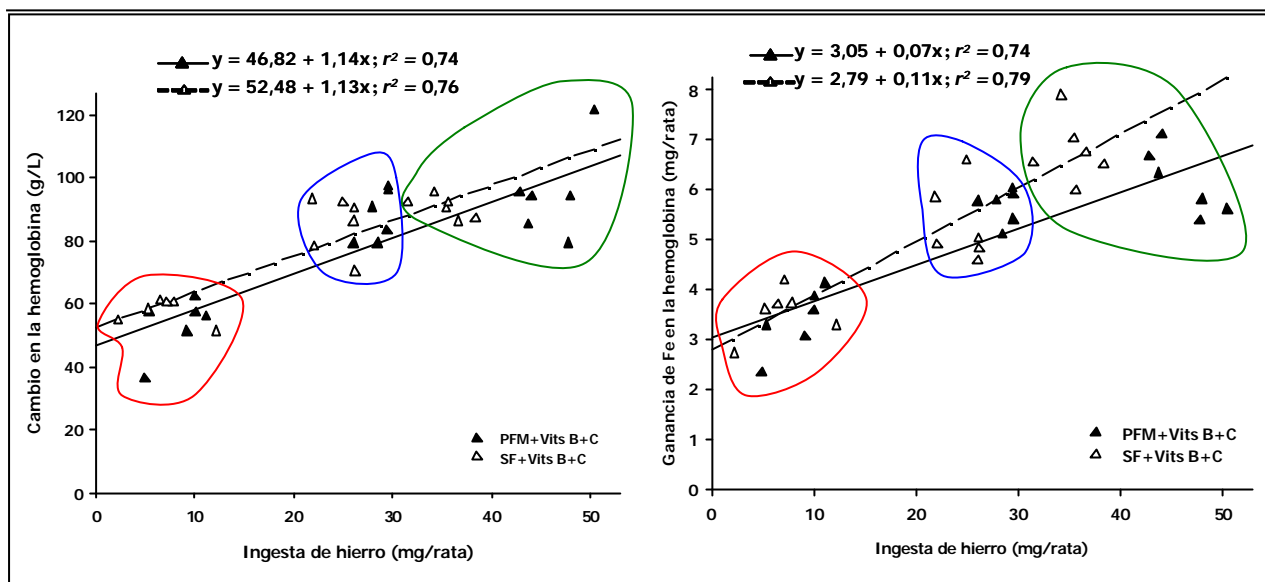
Si comparamos el 3^{er} y 4^o Estudio podemos averiguar si la vitamina C tiene un efecto superior a las del grupo B sobre la biodisponibilidad de los compuestos del estudio. Con respecto a la fuente de hierro PFM, la Hb_i, el FeHb_i y el *peso inicial* del grupo PFM + mezcla Vits B en cada uno de los tres periodos de repleción, fue significativamente inferior ($p < 0,001$) a los obtenidos por el grupo PFM + Vits B + C. Esta situación nos sugiere que la incorporación del hierro al grupo PFM + mezcla Vits B debería ser mayor con respecto al grupo PFM + Vits B + C, ya que las necesidades metabólicas de hierro de este grupo de ratas serían más elevadas. Sin embargo, a pesar de ello, la ganancia de hierro en la hemoglobina (FeHb_f – FeHb_i) y por tanto la incorporación del hierro a la hemoglobina para cada uno de los dos grupos fue similar. Relacionando este parámetro con la *ingesta de hierro*, la cual fue similar en los tres periodos de repleción, obtenemos la *ERH*. Esta variable no varió en ningún periodo de repleción para cada uno de los dos grupos. Por tanto, y a pesar de presentar un estatus del hierro distinto al inicio de cada periodo de repleción, y tomando estos datos con discreción, la adición de la vitamina C no parece afectar a la biodisponibilidad del PFM.

La misma situación tuvo lugar para los grupos SF + mezcla Vits B y SF + Vits B + C. La Hb_i, el *peso inicial* y el FeHb_i en cada periodo de repleción fue, para el grupo SF + mezcla Vits B significativamente inferior ($p < 0,001$) al grupo SF + Vits B + C. Sin embargo en este caso, la ganancia de hierro en la Hb sí varió en cada uno de los tres periodos de repleción, y aunque la *ERH* y la *utilización del hierro* no presentaran diferencias significativas, no podemos asegurar que fuera por el efecto de la vitamina C.

4.3.4. *Relación entre las modificaciones en la hemoglobina y la ingesta de hierro.*

Siguiendo el mismo patrón que en los estudios anteriores, se realizó el análisis de regresión lineal entre las variables *ingesta de hierro* y las dos medidas de la regeneración de la Hb, ganancia ó cambio en la Hb y ganancia de hierro en la Hb (Figuras 4.1 y 4.2, respectivamente).

En la Figura 4.1 (izquierda), el análisis de regresión entre la *ingesta de hierro* y la ganancia de la Hb o cambio en la Hb, fue significativo ($p < 0,0001$) tanto para el grupo SF + Vits B + C como para el grupo PFM + Vits B y C, indicando que la *ingesta de hierro* fue determinante en la ganancia de la Hb, durante los periodos de repleción ($r^2 = 0,76$ y $r^2 = 0,74$, respectivamente).



Figuras 4.1 y 4.2. Análisis de regresión lineal entre las dos medidas de la regeneración de la hemoglobina y la ingesta de hierro durante los periodos de repleción. ○ 1^{er} Periodo de repleción, ○ 2^o Periodo de repleción y ○ 3^{er} Periodo de repleción.

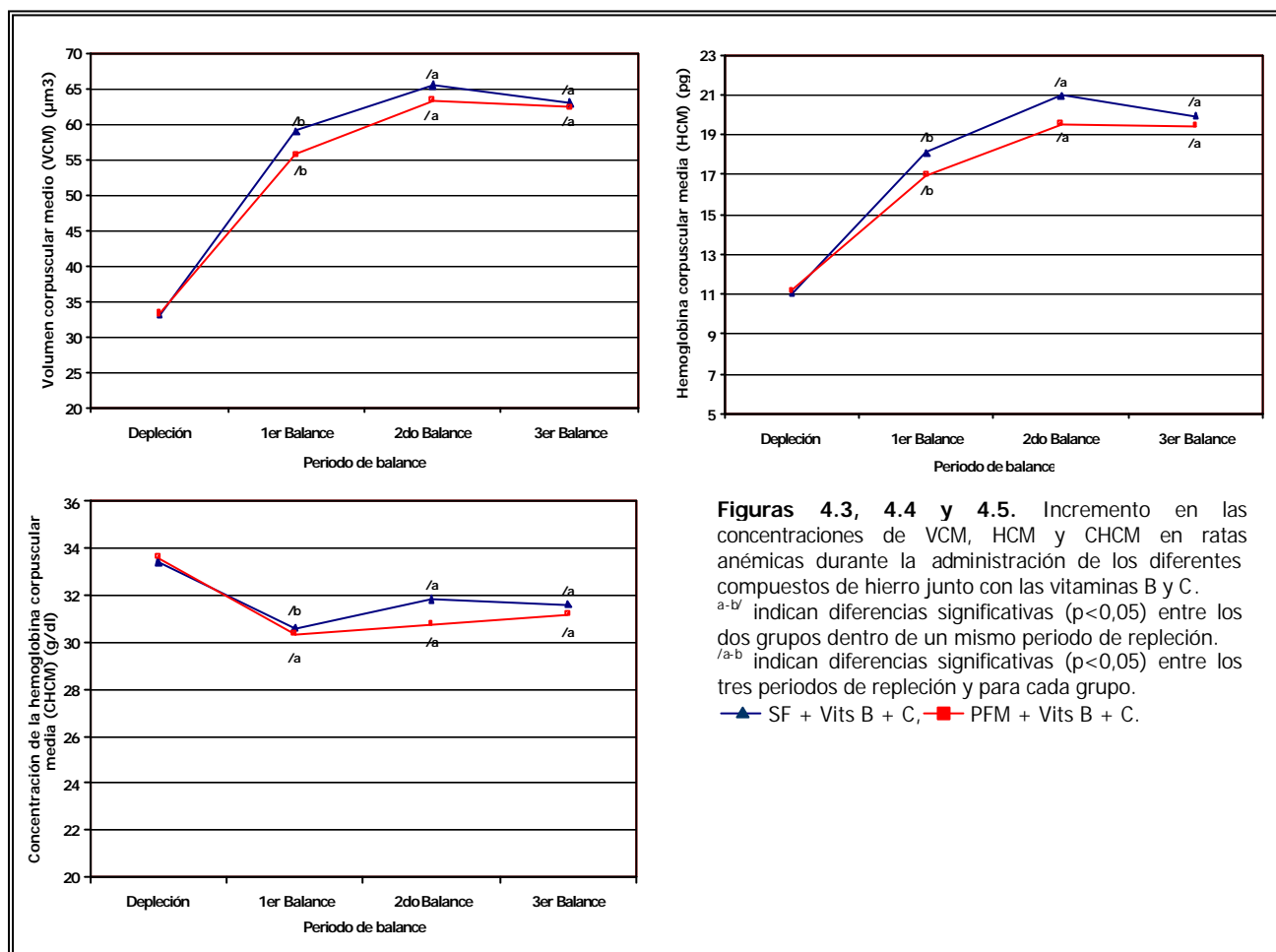
En la Figura 4.2 (derecha), los coeficientes de regresión lineal fueron $r^2 = 0,79$; $p < 0,0001$ para el grupo SF + Vits B + C y $r^2 = 0,74$; $p < 0,0001$ para el grupo PFM + Vits B + C. Se verificó la relación de dependencia de ambas variables (*ingesta de hierro* y *ganancia de hierro en la Hb*). En el 1^{er} y 2^o periodo de repleción, ambos grupos mostraron la misma ganancia de hierro en la Hb, sin embargo en el 3^{er} periodo de repleción, una ingesta menor de hierro por parte del grupo SF + Vits B + C alcanzó una mayor ganancia de hierro en la Hb, aunque esta diferencia no fue significativa. La incorporación del hierro por parte del PFM, al igual que la del SF, fue progresiva en el tiempo y dependiente de la ingesta de hierro.

4.4. Índices hematológicos y bioquímicos

Las Figuras 4.3, 4.4 y 4.5, muestran los cambios producidos en los parámetros VCM, HCM y CHCM respectivamente, desde un estado de anemia deficiente en hierro a un estado nutricional de hierro adecuado durante los tres periodos de repleción.

Los niveles de VCM, HCM y CHCM en depleción fueron significativamente inferiores ($p < 0,05$) a los obtenidos en cada uno de los tres periodos de repleción y para cada grupo de ratas. Destacar que los valores de la CHCM en depleción, se mantuvieron dentro del rango normal (Tabla 1.5), y sorprendente no disminuyeron durante este periodo, una explicación a este hecho se debe a que los cambios morfológicos en los eritrocitos, tales como la microcitosis y la hipocromasia, generalmente ocurren en estados más avanzados de la depleción del hierro, hasta llegar a la anemia deficiente en hierro (Fairbanks y Beutler., 1995). No obstante, para establecer un estado de anemia nosotros tomamos como referencia los valores de hemoglobina de acuerdo con el método oficial de la AOAC 974.31 (1998).

En el 1^{er} periodo, los índices eritrocitarios alcanzaron valores normales: VCM > 44 μm^3 , HCM > 12,0 pg y para CHCM > 21,6 g/dl (Figuras 4.3, 4.4 y 4.5, respectivamente), no presentaron diferencias significativas entre los grupos PFM + Vits B + C y SF + Vits B + C.



Al final del 2^o periodo de repleción, el VCM y la HCM para el grupo PFM + Vits B + C (63,33 μm^3 y 19,55 pg, respectivamente) y para el grupo SF + Vits B + C (65,50 μm^3 y 20,97 pg, respectivamente) aumentaron significativamente ($p < 0,05$) con respecto al periodo anterior. Además, entre ambos grupos no existieron diferencias significativas para estas variables. Sin embargo, la CHCM para el grupo PFM + Vits B + C en el 2^o periodo (30,78 g/dl) no varió con respecto al 1^{er} periodo (30,35 g/dl), mientras que sí lo hizo en el grupo SF + Vits B + C (30,60 y 31,85 g/dl, respectivamente). Al finalizar el 3^{er} periodo de repleción, observamos que los valores del VCM en el grupo PFM + Vits B + C (62,33 μm^3) y en el grupo SF + Vits B + C (63,00 μm^3) disminuyeron, pero esta disminución no fue significativa con respecto al 2^o periodo de repleción. Respecto a la HCM y CHCM, ninguno de los grupos experimentó cambios con respecto al 2^o periodo (Figuras 4.4 y 4.5).

En general, la fuente de hierro PFM mostró un comportamiento muy similar a la del SF. La incorporación del hierro para la síntesis de la hemoglobina fue adecuada para ambas fuentes de

hierro, no observándose ninguna alteración en los eritrocitos, de acuerdo con los parámetros analizados. Además, la recuperación de un estado de anemia deficiente en hierro, desde el punto de vista hematológico, ocurrió tras 3 días de repleción, pero los valores más elevados tuvieron lugar entre los 10 y 17 días.

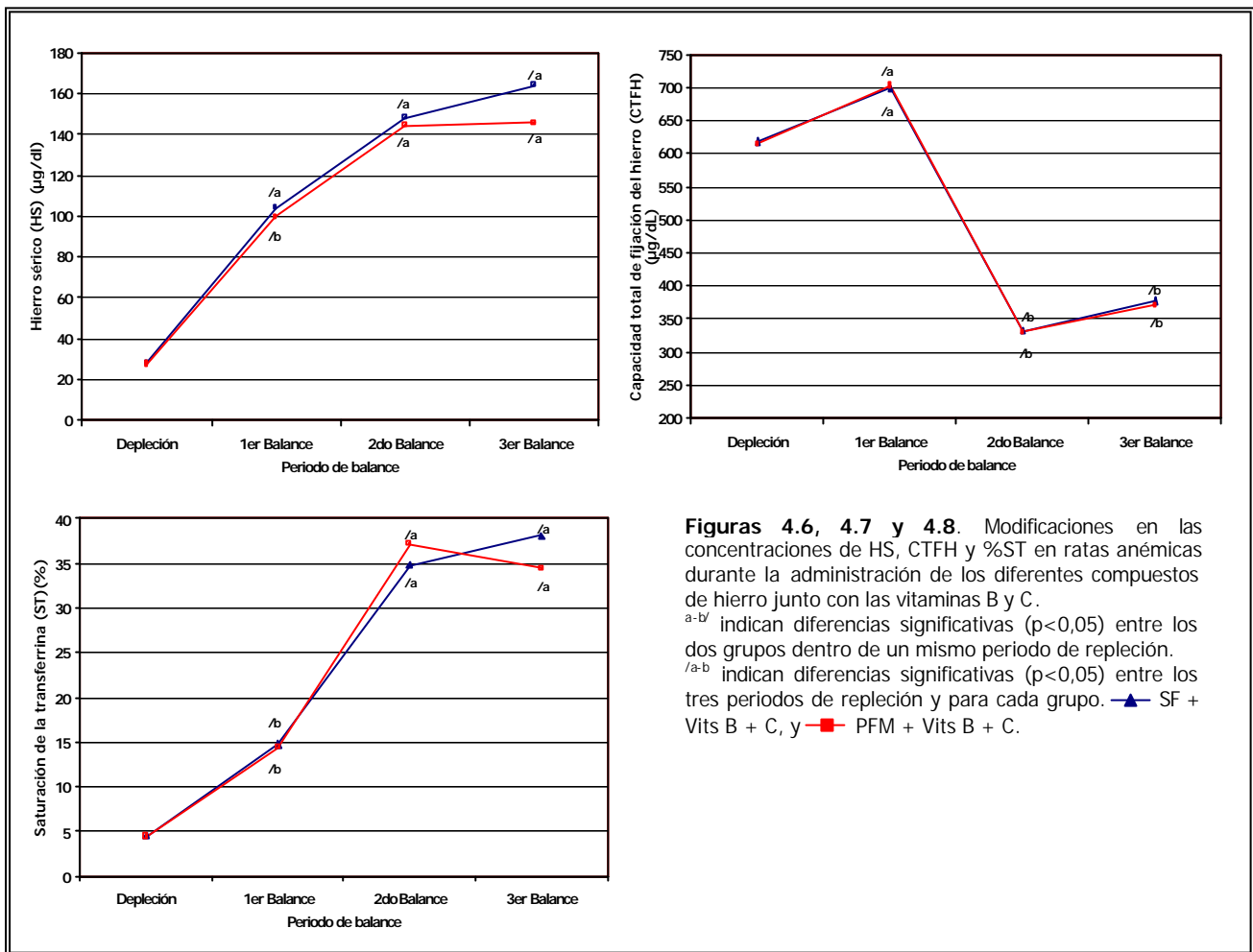
En las Figuras 4.6, 4.7 y 4.8, se representan los parámetros relacionados con el transporte del hierro, HS, CTFH y %ST respectivamente, para cada grupo tratado con SF o PFM más las vitaminas B y C en cada uno de los tres periodos de repleción.

La Figura 4.6 (superior izquierda) representa las concentraciones de HS de los grupos PFM + Vits B + C y SF + Vits B + C. Al final del 1^{er} periodo de repleción, los niveles de HS aumentaron significativamente con respecto al periodo de depleción, hasta alcanzar valores próximos al límite inferior de referencia ($220 \pm 124 \mu\text{g/dl}$), siendo para el grupo SF + Vits B + C ($104,00 \mu\text{g/dl}$) y para el grupo PFM + Vits B + C ($99,50 \mu\text{g/dl}$). Este aumento con respecto al periodo de depleción, fue similar para ambos grupos.

Tras un periodo de suplementación de 10 días (2^o periodo de repleción), observamos que los niveles de HS aumentaron significativamente para el grupo PFM + Vits B + C ($144,33 \mu\text{g/dl}$), con respecto al periodo anterior, sin embargo en el grupo SF + Vits B + C ($148,20 \mu\text{g/dl}$) este aumento no fue significativo.

Después de 17 días de suplementación (3^{er} periodo de repleción), los niveles de HS para el grupo SF + Vits B + C ($164,00 \mu\text{g/dl}$) se incrementaron ligeramente, aunque este aumento no fue significativo con respecto al 2^o periodo de repleción. El grupo PFM + Vits B + C ($145,60 \mu\text{g/dl}$) mantuvo los valores con respecto al periodo anterior. Por consiguiente, los grupos PFM + Vits B + C y SF + Vits B + C alcanzaron, desde el 1^{er} periodo de repleción, valores de HS cercanos a los normales.

En la Figura 4.7 (superior derecha) se representan los valores de la CTFH obtenidos por los grupos PFM + Vits B + C y SF + Vits B + C. Finalizado el 1^{er} periodo de repleción, la CTFH para el grupo SF + Vits B + C ($698,25 \mu\text{g/dl}$) y para el grupo PFM + Vits B + C ($702,75 \mu\text{g/dl}$) experimentaron un notable aumento con respecto a los valores en depleción. Se sabe que los valores de la CTFH, generalmente están elevados en etapas de anemia deficiente en hierro (Smith, 1989). Por este motivo, nos pareció extraña esta situación, ya que todos los demás parámetros hematológicos se encontraban dentro de la normalidad.



En el 2º periodo de repleción, la CTFH en los dos grupos disminuyó significativamente ($p < 0,05$) con respecto al periodo anterior, siendo para el grupo SF + Vits B + C (331,83 µg/dl) similar al grupo PFM + Vits B + C (330,40 µg/dl). Esta disminución está relacionada con el notable aumento del HS en ambos grupos. Los valores obtenidos al final del 3º periodo de repleción, para el grupo SF + Vits B + C (377,75 µg/dl) y para el grupo PFM + Vits B + C (371,00 µg/dl) aumentaron ligeramente con respecto al periodo anterior, pero este aumento no fue estadísticamente significativo. Claramente la CTFH se normalizó a partir del 2º periodo de repleción, alcanzando valores similares a los establecidos como referencia (368 µg/dl).

En la Figura 4.8 (inferior izquierda) se muestran los %ST para los grupos SF + Vits B + C y PFM + Vits B + C al final de cada periodo de repleción. Al final del 1º periodo, el %ST para el grupo SF + Vits B + C (14,78%) fue muy similar al grupo PFM + Vits B + C (14,36%). Esta misma situación, pero más acusada, tuvo lugar en el 2º periodo de repleción, donde los %ST en el grupo SF + Vits B + C (34,81%) y el grupo PFM + Vits B + C (37,12%) aumentaron significativamente ($p < 0,05$) con respecto al periodo anterior. En el 3º periodo de repleción, el %ST del grupo SF + Vits B + C (38,09) se produjo un aumento no significativo, mientras que el grupo PFM + Vits B + C (34,45%) disminuyó su valor con respecto al periodo anterior, no

existiendo diferencias significativas. El NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (1995) estableció que valores de %ST <15%, conllevan a una alteración de la síntesis de Hb. Tomando como referencia este valor, únicamente el 1^{er} periodo de repleción podría tener afectada la síntesis de la Hb, pero en cambio los niveles de Hb al final de cada periodo de repleción demuestra todo lo contrario (ver Tabla 4.6) al igual que los índices hematológicos (VCM, HCM y CHCM). Una posible explicación podría estar relacionada con los valores de CTFH, los cuales eran muy similares a los valores en depleción. Al estar relacionados la CTFH y el HS con la %ST, sería lógico esperar valores para la %ST < 15% aún presentando valores para el HS normales.

4.4.1. *Efecto de la adición de las vitaminas B y C en los índices hematológicos y bioquímicos*

Para conocer si la adición de las vitaminas B y C al néctar con las fuentes de hierro, SF y PFM, favorecieron de alguna manera en los índices hematológicos y bioquímicos de los diferentes grupos de ratas, comparamos el 1^{er} Estudio frente al 4^o Estudio.

Durante el 1^{er} periodo de repleción, los parámetros VCM y HCM de los grupos PFM + Vits B + C y SF + Vits B + C mostraron valores significativamente superiores ($p < 0,05$) a los grupos PFM y SF. En cuanto a los parámetros HS, CTFH y %ST, no se observaron diferencias significativas. En el 2^o periodo de repleción, se mantuvo la misma dinámica del periodo anterior, siendo los grupos PFM + Vits B + C y SF + Vits B + C significativamente superiores ($p < 0,05$) para los parámetros VCM y HCM, con respecto a los grupos SF y PFM. En el último periodo de repleción, el grupo PFM + Vits B + C siguió, al igual que en los periodos anteriores, mostrando diferencias significativas ($p < 0,05$) para los parámetros VCM y HCM con respecto al grupo PFM. Además, también se encontró diferencias significativas para el parámetro %ST, pero en este caso fue el grupo PFM el que presentó los valores más elevados. En cuanto al grupo SF + Vits B + C, únicamente mostró diferencias significativamente superiores ($p < 0,05$) para el parámetro HCM con respecto al grupo SF.

Por consiguiente, podemos asegurar y de acuerdo con los resultados obtenidos que la adición de las vitaminas B y C al néctar enriquecido con las diferentes fuentes de hierro (SF y PFM) mejoró el tamaño de los eritrocitos y el contenido de hemoglobina de los mismos.

4.4.2. *¿Hay interacción entre el mezcla de vitaminas B y la vitamina C en los índices hematológicos y bioquímicos?*

Para evaluar si la adición de la mezcla de vitaminas B sobre la fuente de hierro PFM en cada uno de los tres periodos de repleción aporta un beneficio superior a la Vit C, se comparó los

Estudios II y IV. En el 1^{er} periodo de repleción los grupos PFM + Vit C y PFM + Vits B + C no mostraron diferencias significativas para el VCM, HCM, CHCM, HS y % ST. Después de 10 días de suplementación (2^o periodo), únicamente se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en la HCM, siendo el grupo PFM + Vits B + C (19,55 pg) superior al grupo PFM + Vit C (17,67 pg). Por último en el 3^{er} periodo de repleción, los parámetros hematológicos y bioquímicos fueron muy similares entre ambos grupos. Por tanto, no se observan diferencias que indiquen que la adición de las vitaminas B pueda beneficiar más que la vitamina C a los parámetros hematológicos y bioquímicos.

En cuanto a los grupos, SF + Vits B + C y SF + Vit C, se observaron diferencias más notables en comparación con los grupos suplementados con la fuente de hierro PFM. En el 1^{er} periodo de repleción, el VCM y la HCM fueron significativamente superiores ($p < 0,05$) para el grupo SF + Vits B + C ($59,00 \mu\text{m}^3$ y 18,08 pg, respectivamente) con respecto al grupo SF + Vit C ($50,67 \mu\text{m}^3$ y 14,75 pg, respectivamente). Además, la CTFH del grupo SF + Vits B + C (698,25 $\mu\text{g/dl}$) fue significativamente superior ($p < 0,05$) al grupo SF + Vit C (444,14 $\mu\text{g/dl}$), esto no indica que fuera mejor, ya que en etapas de anemia deficiente en hierro este parámetro se encuentra elevado, siendo lógico que disminuyera durante el periodo de repleción. En cuanto al 2^o y 3^{er} periodo de repleción, el grupo SF + Vits B + C alcanzó valores significativamente superiores para los parámetros HCM y CHCM (20,97 pg y 31,85 g/dl, respectivamente) comparados con los del grupo SF + Vit C (17,73 pg y 28,82 g/dl, respectivamente), además la CTFH para el grupo SF + Vit C fue significativamente superior ($p < 0,05$) al grupo SF + Vits B + C, pero ambos valores estaban dentro del rango normal. Por tanto, en el caso de la fuente de hierro SF la adición de las vitaminas B, mejoró de forma puntual ciertos parámetros como la HCM y la CHCM, pero no podemos afirmar que tenga un efecto global sobre los índices hematológicos y bioquímicos.

Para poder evaluar si la adición de la vitamina C favoreció o no a los parámetros hematológicos y bioquímicos, se compararon el 3^{er} y 4^o Estudio. Con respecto a la fuente de hierro PFM, en el 1^{er} periodo de repleción observamos que el VCM y HCM para el grupo PFM + Vits B ($63,80 \mu\text{m}^3$ y 18,92 pg, respectivamente) fue significativamente superior ($p < 0,05$) al grupo PFM + Vits B + C ($55,67 \mu\text{m}^3$ y 16,97 pg, respectivamente). Además, la CTFH para ambos grupos fue elevada, siendo este aumento más significativo ($p < 0,05$) para el grupo PFM + Vits B + C (702,75 $\mu\text{g/dl}$) frente al grupo PFM + Vits B (524,12 $\mu\text{g/dl}$). Por tanto, una suplementación de 3 días no supuso una mejora por parte del grupo PFM + Vits B + C sobre los índices hematológicos, siendo el grupo PFM + mezcla Vits B el que presentó mejores resultados. Además, la CTFH que reflejan la máxima cantidad de hierro necesaria para saturar todos los lugares de fijación para el hierro en la transferrina, nos indica que los niveles de transferrina

eran elevados en ambos grupos y similares a los alcanzados durante el periodo de depleción, es decir, probablemente se deba a que aún se encuentren en una etapa estacionaria, entre el periodo de depleción y el periodo de repleción. Durante el 2º y 3º periodo de repleción, el grupo PFM + Vits B + C presentó mejores valores para los parámetros HS y %ST, mientras que para los índices eritrocitarios se mantuvieron similares al grupo PFM + Vits B. Por consiguiente, la presencia de la vitamina C en el grupo PFM + Vits B + C favoreció los parámetros relacionados con el transporte del hierro, en concreto en el HS y % ST, mientras que en el resto de los parámetros no se observaron diferencias.

Referente a la fuente de hierro SF, durante el 1º periodo de repleción los grupos SF + Vits B y SF + Vits B + C no mostraron diferencias significativas entre ellos. En el 2º periodo, el grupo SF + Vits B + C presentó valores significativamente superiores ($p < 0,05$) en los parámetros HS y %ST (148,20 µg/dl y 34,81%, respectivamente) con respecto al grupo SF + Vits B (48,64 µg/dl y 14,18%, respectivamente). Esta misma situación se repitió en el 3º periodo de repleción, siendo el grupo SF + Vits B + C (164,00 µg/dl y 38,09%, respectivamente) significativamente superior ($p < 0,05$) al grupo SF + Vits B (66 µg/dl y 17,40%, respectivamente). Por tanto, la presencia de la vitamina C en el grupo SF + Vits B + C mejoró significativamente los parámetros relacionados con el transporte del hierro HS y %ST, mientras que los índices eritrocitarios no se vieron afectados.

4.5. Almacenamiento del hierro.

La Tabla 4.7 muestra las diferencias existentes entre los grupos PFM + Vits B + C y SF + Vits B + C, en relación a los depósitos de hierro de cada una de las piezas anatómicas analizadas en el 1º y 3º periodo de repleción. El análisis de varianza refleja que ambos grupos presentaron semejantes concentraciones de hierro en las diferentes piezas anatómicas analizadas, durante los diferentes periodos de repleción.

Tabla 4.7. Análisis de varianza del contenido en hierro de las distintas piezas anatómicas en los grupos alimentados con el néctar SF ó PFM + Vits B + C, durante el 1º y 3º periodo de balance.

	Hígado	Bazo	Riñón	Corazón	Intestino del gado
1º Balance	NS	NS	NS	NS	NS
3º Balance	NS	NS	NS	NS	NS

Diferencias significativas para: * $p < 0,05$; NS = no significación

La Tabla 4.8 muestra las concentraciones de hierro en las diferentes piezas anatómicas durante el 1º y 3º periodo de repleción entre los grupos SF y PFM con/sin Vits B + C.

Tabla 4.8. Concentración de hierro en los distintos órganos de las ratas alimentadas con SF o PFM con/sin Vits B + C, añadidos a un néctar de frutas. Los resultados se expresan en mg / g peso seco (p.s).

	Néctar	^S Hígado	Bazo	Riñón	Corazón	Intestino delgado
Repleción						
1^{er}	SF	1,60 ± 0,66	6,54 ± 2,68	1,40 ± 0,35	1,51 ± 0,30	0,85 ± 0,31
	SF + Vits ¹	0,92 ± 0,07	2,81 ± 0,25 ^{/b}	1,28 ± 0,22	0,96 ± 0,37	0,38 ± 0,10 ^{/b}
	Balance					
	PFM	0,52 ± 0,27	9,04 ± 1,65	2,14 ± 0,24	2,83 ± 0,52	0,96 ± 0,35
3^{er}	PFM + Vits ¹	0,68 ± 0,07	2,08 ± 0,31 ^{*/b}	0,73 ± 0,12 [*]	0,65 ± 0,12 ^{*/b}	0,24 ± 0,10
	SF	1,03 ± 0,15	5,40 ± 1,68	1,36 ± 0,03	1,63 ± 0,17	0,56 ± 0,22
	SF + Vits ¹	1,11 ± 0,09	8,94 ± 1,81 ^{/a}	1,42 ± 0,07	1,29 ± 0,10	1,90 ± 0,14 ^{*/a}
	Balance					
Balance	PFM	0,69 ± 0,17	7,10 ± 1,57	1,70 ± 0,45	2,15 ± 0,46	0,91 ± 0,19
	PFM + Vits ¹	1,30 ± 0,24	7,16 ± 1,34 ^{/a}	1,73 ± 0,52	1,72 ± 0,35 ^{/a}	2,61 ± 1,11

Media ± Error típico, n=6. ¹Vits: Vitamina B₆, B₁₂, ácido fólico y vitamina C

^{*/} La presencia de asteriscos dentro de la misma columna para cada uno de los tres periodos de repleción indica diferencias significativas (p<0,05) entre los grupos suplementados con SF + Vits B + C y SF sin vitaminas; y los grupos suplementados con PFM + Vits B + C y PFM sin vitaminas.

^{/a-c} Diferentes letras dentro de la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05) entre los tres periodos de repleción, dentro de un mismo compuesto (SF + Vits B + C y PFM + Vits B + C)

La ausencia de superíndices indica que no existen diferencias estadísticamente significativas

Tal y como se muestra en la Tabla 4.8, al final del 1^{er} periodo de repleción, la concentración de hierro en el bazo, riñón y corazón del grupo PFM + Vits B + C (2,08, 0,73 y 0,65 mg Fe/g p.s, respectivamente) fueron significativamente inferiores (p<0,05) al grupo PFM (9,04, 2,14 y 2,83 mg Fe/g p.s, respectivamente). Cuando comparamos los *porcentajes de absorción aparente* de los dos grupos observamos que no existieron diferencias entre ellos, por lo tanto, aún presentando el mismo *porcentaje de absorción aparente*, esta diferencia puede ser debida al patrón de distribución del PFM después de la absorción del mismo. En el 3^{er} periodo de repleción, la concentración de hierro de las diferentes piezas anatómicas en el grupo PFM + Vits B + C fue similar a la del grupo PFM. Únicamente, en este último periodo, la concentración de hierro en el intestino delgado del grupo SF + Vits B + C (1,90 mg Fe/g p.s) fue significativamente superior (p<0,05) al grupo SF (0,56 mg Fe/g p.s).

En general, la concentración de hierro en el hígado y en menor extensión la del bazo ha sido rutinariamente utilizada como indicadores del estatus del hierro corporal en ratas (Park y col., 1987; Fairweather-Tait y col., 1991; Whittaker y col., 1996 y 1997; Fisher y col., 2002). Desde el 1^{er} al 3^{er} periodo de repleción, hay una acumulación de hierro en el bazo, corazón e intestino delgado, la cual aumentaba a medida que aumentaba la *ingesta de hierro*. Pero si tenemos en cuenta, que el hígado el principal órgano de almacenamiento en el cuerpo y que contiene aproximadamente el 70% del contenido total (Angelucci y col., 2000), el aumento en la *ingesta de hierro* no supuso en ninguno de los grupos un aumento en la concentración del mineral en el órgano. Por tanto, la adición de las vitaminas B y C no favoreció en ningún caso un aumento en la concentración de hierro en los distintos órganos.

4.5.1. ¿Afecta la vitamina C ó la mezcla de vitaminas B al almacenamiento del hierro en los órganos?

Para conocer si la mezcla de las vitaminas B tuvo algún efecto en el almacenamiento del hierro en las diferentes piezas anatómicas durante el 1^{er} y 3^{er} periodo de repleción, comparamos el 4^o Estudio frente al 2^o Estudio.

Durante el 1^{er} periodo de repleción, únicamente se observaron diferencias en los grupos suplementados con la fuente de hierro PFM. En el grupo PFM + Vit C, la concentración de hierro en el riñón y corazón (1,67 y 2,18 mg Fe/g p.s, respectivamente) fue significativamente superior ($p < 0,05$) al grupo PFM + Vits B + C (0,73 y 0,65 mg Fe/g p.s, respectivamente). En el 3^{er} periodo de repleción, la concentración de hierro en el riñón del grupo SF + Vit C (0,75 mg Fe/g p.s) disminuyó significativamente ($p < 0,05$) con respecto al 1^{er} periodo (1,04 mg Fe/g p.s), existiendo diferencias significativas ($p < 0,05$) con el grupo SF + Vits B + C (1,42 mg Fe/g p.s), el cual no varió con respecto al 1^{er} periodo. También hubo diferencias ($p < 0,05$) en la concentración de hierro en el intestino delgado del grupo SF + Vits B + C (1,90 mg Fe/g p.s) frente al grupo SF + Vit C (0,15 mg Fe/g p.s). Con respecto a los grupos PFM + Vit C y PFM + Vits B + C, solamente la concentración de hierro en el intestino delgado (0,37 y 2,61 mg Fe/g p.s, respectivamente) mostró diferencias significativas ($p < 0,05$). No existen referencias bibliográficas que documenten algún efecto de las vitaminas B en el almacenamiento del hierro, aunque en ambos casos encontramos diferencias en el contenido mineral del intestino.

En cuanto al efecto de la vitamina C (3^{er} Estudio frente 4^o Estudio), durante el 1^{er} periodo de repleción la concentración de hierro en el bazo del grupo SF + Vits B + C (2,81 mg Fe/g p.s) fue significativamente inferior ($p < 0,05$) al grupo SF + Vits B (6,29 mg Fe/g p.s). Del mismo modo, la concentración de hierro en el riñón y corazón en el grupo PFM + Vits B + C (0,73 y 0,65 mg Fe/g p.s, respectivamente) fue inferior ($p < 0,05$) al grupo PFM + Vits B (2,03 y 1,83 mg Fe/g p.s, respectivamente). Claramente, durante este periodo de repleción los grupos a los que se le incorporó la vitamina C mostraron bajas concentraciones de hierro en los diferentes órganos. Esto puede estar relacionado con el hecho de que la vitamina C, como agente reductor, es capaz de liberar el hierro de la ferritina y movilizar el hierro de las células del retículo endotelial a la transferrina, dando lugar a un aumento en la disponibilidad del hierro y prevenir la sobrecarga de hierro en los tejidos (Bienfait y Van del briel., 1980; Targ y Huang., 1998).

En el 3^{er} periodo de repleción, el aumento en la *ingesta de hierro* resultó en un aumento en la concentración de hierro en la mayoría de las piezas anatómicas. En el bazo, riñón e intestino delgado la concentración de hierro en el grupo SF + Vits B (4,47; 0,20 y 0,31 mg Fe/g p.s,

respectivamente) fue significativamente inferior ($p < 0,05$) al grupo SF + Vits B + C (8,95; 1,42 y 1,90 mg Fe/g p.s, respectivamente). En cuanto a los grupos con la fuente de hierro PFM, no se observaron diferencias en las concentraciones de hierro de las distintas piezas anatómicas.

En general, podemos asegurar que los niveles de hierro en el hígado no se vieron afectados por la presencia o ausencia de la vitamina C en los grupos suplementados con las fuentes de hierro SF ó PFM junto con las vitaminas B. En cambio, la concentración de hierro en el bazo si se vio afectada, incrementándose los valores de hierro, especialmente en los grupos con la fuente de hierro SF.

4.6. Efecto pro-oxidante del SF + Vits B + C y PFM + Vits B + C añadidos al néctar.

La Figura 4.9 representa la producción de radicales libres en heces determinadas por la cuantificación del ácido bencenosulfínico (ABS) en los grupos PFM + Vits B + C y SF + Vits B + C durante los periodos de tiempo especificados.

La producción de ABS al final del 1^{er} periodo de repleción para los grupos SF + Vits B + C (1,70 $\mu\text{mol/g}$ heces totales) y PFM + Vits B + C (2,33 $\mu\text{mol/g}$ heces totales) fue muy similar. Además, la producción de radicales hidroxilo cuantificados por el ABS, por parte de los grupos SF + Vits B + C y PFM + Vits B + C no mostraron diferencias con respecto a los grupos SF y PFM. Por tanto, la presencia de las vitaminas B y C en el néctar enriquecido con las diferentes fuentes de hierro no influyó de manera positiva ó negativa en la producción de los radicales hidroxilos.

En el 3^{er} periodo de repleción, se observaron diferencias entre los distintos grupos. El aumento de la *ingesta de hierro* provocó en el grupo SF + Vits B + C un aumento en la producción de radicales hidroxilo, estando ambos parámetros correlacionados ($r = 0,920$; $p < 0,01$). Sin embargo, para el grupo PFM + Vits B + C, no hubo correlación entre los parámetros anteriormente mencionados. Además, el valor del ABS para el grupo SF + Vits B + C (3,63 $\mu\text{mol/g}$ heces totales) fue significativamente superior ($p < 0,05$) al grupo PFM + Vits B + C (1,96 $\mu\text{mol/g}$ heces totales) y al grupo SF (2,03 $\mu\text{mol/g}$ heces totales).

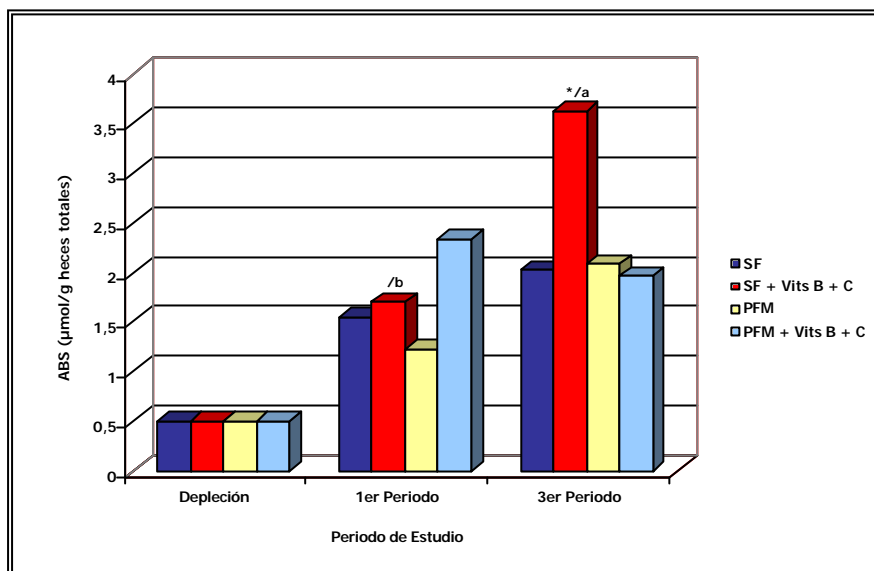


Figura 4.9. Efecto de la administración del néctar con los dos compuestos de hierro con/sin las vitaminas B y C en la generación de radicales libres en heces, determinado por la cuantificación del ácido bencenosulfínico (ABS) como producto final en un ensayo *in vitro*. La presencia de asterisco indica diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto a los grupos control (SF y PFM) en cada periodo de estudio. /a-b Diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los dos periodos de repleción para un mismo compuesto de hierro con/sin las vitaminas B y C.

En general, aunque si hubo un aumento en la concentración de hierro en las heces desde el 1^{er} periodo al 3^{er} periodo de repleción, lo cual podría desencadenar la reacción Fenton, la *excreción fecal* no estuvo correlacionada con la producción de ABS en los grupos SF y PFM con/sin Vits B + C. Por tanto, desconocemos si el aumento en la producción de ABS (sin correlación significativa con la ingesta de hierro) es consecuencia de la presencia de las vitaminas B y C ó solamente fue debido al propio compuesto de hierro.

4.6.1. ¿Afecta la adición de la vitamina C ó la mezcla de vitaminas B en la producción de radicales hidroxilo?

Para conocer el efecto de la mezcla de las vitaminas B, en los grupos suplementados con la fuente de hierro SF ó PFM, compararemos los estudios II y IV.

Durante el 1^{er} periodo, observamos que los valores de ABS no mostraron diferencias significativas entre los distintos grupos. Sin embargo, en el 3^{er} periodo, únicamente la concentración de ABS del grupo PFM + Vits B + C (1,96 μmol/g heces totales) fue significativamente inferior ($p < 0,05$) al grupo PFM + Vit C (4,54 μmol/g heces totales), mientras que los grupos SF + Vit C con/sin Vits B presentaron valores similares.

En el 3^{er} periodo se observaron diferencias en la concentración de ABS entre el grupo PFM + Vits B + C y el grupo PFM + Vit C, este hecho lo podíamos relacionar con la *ingesta de hierro*, debido a que en este periodo sí hubo diferencias entre ellos, siendo para el grupo PFM + Vit C (7,12 mg Fe) y para el grupo PFM + Vits B + C (11,30 mg Fe). Sin embargo, en el 1^{er} periodo esta situación no se cumplió, es decir, a pesar de existir diferencias en la *ingesta de hierro*, no las hubo en la generación de radicales libres, por lo que no se estableció ninguna correlación

entre ambas variables. Por tanto, y en función de los resultados obtenidos, la presencia de la mezcla de las vitaminas B no incrementó la generación de los radicales hidroxilos, lo cual resulta positivo.

Para ver si la adición de la vitamina C en los grupos con las fuentes de hierro SF ó PFM y Vits B tuvo un efecto pro-oxidante, comparamos los estudio III y IV.

Durante el 1^{er} y 3^{er} periodo, los grupos SF + Vits B + C y PFM + Vits B + C presentaron concentraciones de ABS similares a los obtenidos por los grupos SF + mezcla Vits B y PFM + mezcla Vits B. En general y de acuerdo con los resultados obtenidos no se observó ningún aumento en la generación de los radicales hidroxilos, en ninguno de los periodos analizados. En ensayos *in vitro*, la vitamina C puede mantener al hierro y a otros metales de transición en un estado reducido, dando lugar a la producción de radicales hidroxilos (Buettner y Jurkiewicz, 1996; Halliwell y col., 1996). Al comparar los estudios I-II (SF ó PFM con/sin Vit C) encontramos un aumento significativo ($p < 0,05$) en la generación de radicales hidroxilos por parte de los grupos SF + Vit C y PFM + Vit C frente a los grupos SF y PFM, lo que podría venir justificado por los ensayos de Beuttner y Halliwell. Pero cuando está presente la mezcla de vitamina B, la adición de vitamina C no parece tener ningún efecto pro-oxidante en ninguno de los grupos estudiados.

5º ESTUDIO

5. Efecto de la vitamina C, mezcla de vitaminas B (B₆, B₁₂ y ácido fólico) y fructo-oligosacáridos (FOS) sobre la biodisponibilidad del pirofosfato férrico micronizado (PFM) en el néctar de frutas enriquecido. Método de la Eficiencia de Regeneración de la Hemoglobina (ERH).

5.1. Crecimiento y consumo de alimento

En la Tabla 5.1, se muestran los valores medios y el error típico de los parámetros relacionados con el crecimiento y el consumo de alimento (dieta + néctar), en ratas alimentadas con el néctar SF + Vits B, C + FOS; PFM + Vits B, C + FOS y BF + Vits B, C + FOS durante los tres periodos de balance. Como se puede apreciar en este estudio se incorporó una tercera fuente de hierro, bis-glicinato ferroso (BF) con el objetivo de evaluar su biodisponibilidad relativa junto con la del PFM frente a la del SF (sal de referencia).

Tabla 5.1. Crecimiento e ingesta total de alimento en ratas, tras la administración del SF, PFM o BF junto con las vitaminas B, C y FOS añadidos a un néctar de frutas durante el periodo de depleción – repleción.

Néctar		Peso inicial (g)	Peso final (g)	Ganancia de peso (g)	Ingesta total de alimento (g)
Depleción		152,57 ± 26,48	161,90 ± 26,79	9,33 ± 4,37	37,00 ± 8,53
Repleción					
1 ^{er} Periodo	SF + Vits ¹ + FOS	109,66 ± 6,74 ^{/c}	119,52 ± 6,61 ^{/c}	9,86 ± 1,54	104,62 ± 9,97 ^{b/b}
	PFM + Vits ¹ + FOS	105,18 ± 7,18 ^{/c}	111,63 ± 7,07 ^{/c}	6,45 ± 2,19 ^{/b}	112,31 ± 9,06 ^{b/b}
	BF + Vits ¹ + FOS	114,43 ± 16,94 ^{/c}	127,17 ± 17,66 ^{/c}	12,93 ± 2,1	164,26 ± 7,76 ^{a/}
2 ^o Periodo	SF + Vits ¹ + FOS	187,66 ± 5,79 ^{/b}	203,04 ± 7,12 ^{/b}	15,38 ± 2,95 ^b	149,73 ± 20,14 ^{/ab}
	PFM + Vits ¹ + FOS	186,92 ± 4,34 ^{/b}	212,72 ± 5,90 ^{/b}	25,80 ± 2,86 ^{a/a}	179,91 ± 13,65 ^{/ab}
	BF + Vits ¹ + FOS	189,84 ± 10,42 ^{/b}	203,82 ± 9,95 ^{/b}	14,70 ± 2,56 ^b	183,14 ± 13,56
3 ^{er} Periodo	SF + Vits ¹ + FOS	248,13 ± 10,19 ^{/a}	257,57 ± 6,73 ^{/a}	12,50 ± 2,96	221,78 ± 27,89 ^{/a}
	PFM + Vits ¹ + FOS	228,75 ± 9,83 ^{/a}	246,95 ± 8,40 ^{/a}	18,20 ± 3,04 ^{/a}	261,24 ± 32,24 ^{/a}
	BF + Vits ¹ + FOS	239,47 ± 5,29 ^{/a}	249,08 ± 5,71 ^{/a}	9,61 ± 1,76	236,48 ± 31,82

Cada valor es la media ± error típico, n=6. Vits¹: Vitamina C + Vitaminas B₆, B₁₂ y ácido fólico; FOS: Fructo-oligosacáridos

^{a-b/} Diferentes letras dentro de la misma columna y para cada uno de los tres periodos de repleción indica diferencias significativas (p<0,05) entre los grupos SF + Vits B, C + FOS; PFM + Vits B, C + FOS y BF + Vits B, C y FOS.

^{/a-b} Diferentes letras dentro de la misma columna y para cada grupo suplementado con la fuente de hierro correspondiente, indican diferencias significativas (p < 0.05) entre los tres periodos de repleción.

La ausencia de superíndices indica que no existen diferencias estadísticamente significativas.

Durante el 1^{er} periodo de balance, los tres grupos mostraron un crecimiento muy similar de acuerdo con los valores de la *ganancia de peso*, mientras que la *ingesta total de alimento* en ambos grupos de ratas presentaron diferencias significativas (p<0,05) entre ellos, siendo los datos del grupo BF + Vits B, C + FOS (164,26 g) superiores a los grupos SF y PFM + Vits B, C + FOS (104,62 y 112,31 g, respectivamente) y semejantes entre ellos.

En el 2^o periodo de balance, la tasa de crecimiento fue significativamente superior (p<0,05) al grupo en depleción. En este periodo los tres grupos de ratas presentaron una *ingesta total de alimento* y *peso inicial* muy similar, pero en cambio la *ganancia de peso* fue diferente en los tres

grupos, siendo el grupo PFM + Vits B, C + FOS (25,80 g) significativamente superior ($p < 0,05$) a los grupos SF y BF + Vits B, C + FOS (15,38 y 14,70 g, respectivamente). Destacar entonces, que el aprovechamiento de la dieta y el néctar por parte del grupo PFM + Vits B, C + FOS fue superior frente a los otros grupos. Por último, en el 3^{er} periodo de balance, la tasa crecimiento en los tres grupos fue similar y significativamente superior ($p < 0,05$) al grupo en depleción.

5.1.1. Efecto de la adición de la mezcla de vitaminas B, vitamina C y FOS en el crecimiento y el consumo de alimento

En este apartado, únicamente se discutirán los grupos alimentados con las fuentes de hierro SF + Vits B, C + FOS y PFM + Vits B, C + FOS frente a los grupos SF y PFM, debido a que la fuente de hierro BF no fue incluida en los anteriores estudios. En la Tabla 5.2 se representan los parámetros relacionados con el crecimiento y el consumo de alimento para los grupos SF y PFM con/sin Vits B, C + FOS en cada uno de los tres periodos de balance.

Tabla 5.2. Crecimiento e ingesta total de alimento en ratas, tras la administración del SF o PFM con/sin Vits B, C y FOS añadidos a un néctar de frutas durante el periodo de depleción – repleción.

	Néctar	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Ganancia de peso (g)	Ingesta total de alimento (g)
Depleción	-	152,57 ± 10,81	161,90 ± 10,94	9,33 ± 1,78	28,00 ± 2,65
Repleción					
1^{er} Periodo	SF	155,03 ± 17,67 ^{/b}	167,20 ± 17,20 ^{/b}	10,30 ± 4,33	177,66 ± 18,57 ^{/b}
	SF + Vits + FOS	109,66 ± 6,74 ^{*/c}	119,52 ± 6,61 ^{*/c}	9,86 ± 1,54 ^{/a}	104,62 ± 9,97 ^{*/b}
	PFM	158,00 ± 10,79	172,85 ± 10,94	12,47 ± 2,65	226,57 ± 41,28
	PFM + Vits + FOS	105,18 ± 7,18 ^{*/c}	111,63 ± 7,07 ^{*/c}	6,45 ± 2,19 ^{/b}	112,31 ± 9,06 ^{*/b}
2^o Periodo	SF	229,75 ± 7,14 ^{/a}	243,45 ± 3,43 ^{/a}	13,70 ± 6,43	282,20 ± 13,24 ^{/a}
	SF + Vits + FOS	187,66 ± 5,79 ^{*/b}	203,04 ± 7,12 ^{*/b}	15,38 ± 2,95 ^{/a}	149,73 ± 20,14 ^{*/ab}
	PFM	197,95 ± 10,29	215,30 ± 9,30	17,35 ± 2,40	306,23 ± 20,72
	PFM + Vits + FOS	186,92 ± 4,34 ^{/b}	212,72 ± 5,90 ^{/b}	25,80 ± 2,86 ^{*/a}	179,91 ± 13,65 ^{*/ab}
3^{er} Periodo	SF	225,55 ± 16,04 ^{/a}	248,33 ± 15,67 ^{/a}	22,78 ± 4,22	256,58 ± 48,12 ^{/ab}
	SF + Vits + FOS	248,13 ± 10,19 ^{/a}	257,57 ± 6,73 ^{/a}	12,50 ± 2,96 ^{*/a}	221,78 ± 27,89 ^{/a}
	PFM	195,83 ± 20,43	208,05 ± 24,19	12,23 ± 4,68	253,86 ± 69,50
	PFM + Vits + FOS	228,75 ± 9,83 ^{/a}	246,95 ± 8,40 ^{/a}	18,20 ± 3,04 ^{/a}	261,24 ± 32,24 ^{/a}

Cada valor es la media ± error típico, n=6. Vits: Vitamina C + Vitaminas B₆, B₁₂ y ácido fólico; FOS: Fructo-oligosacáridos

^{*/} La presencia de asterisco dentro de la misma columna y para cada uno de los tres periodos de repleción indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos SF con/sin Vits B, C + FOS y PFM con/sin Vits B, C + FOS.

^{/a-b} Diferentes letras dentro de la misma columna y para cada grupo suplementado con la fuente de hierro correspondiente, indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tres periodos de repleción.

La ausencia de superíndices indica que no existen diferencias estadísticamente significativas.

Al comienzo del 1^{er} periodo de balance, los pesos *iniciales* de los grupos SF + Vits B, C + FOS y PFM + Vits B, C + FOS (109,66 y 105,18 g, respectivamente) fueron significativamente inferiores ($p < 0,05$) al de los grupos SF y PFM (155,03 y 158 g, respectivamente). Esta diferencia no influyó en la *ganancia de peso*, a pesar de que la *ingesta total de alimento* fuera significativamente inferior ($p < 0,05$) para los grupos SF + Vits B, C + FOS y PFM + Vits B, C + FOS (104,62 y 112,31 g, respectivamente) frente a los grupos SF y PFM (177,66 y 226,57 g, respectivamente).

Al comienzo del 2º periodo de balance, los grupos PFM con/sin Vits B, C + FOS presentaron *pesos iniciales* similares, mientras que los grupos SF con/sin Vits B, C + FOS (187,66 y 229,75 g, respectivamente) si mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$). La *ingesta total de alimento* del grupo SF + Vits B, C + FOS (149,73 g) fue significativamente inferior ($p < 0,05$) al grupo SF (282,20 g), sin embargo, a pesar de la baja ingesta la *ganancia de peso* fue similar a la del grupo SF. Para el grupo PFM + Vits B, C + FOS, la *ingesta total de alimento* (179,91 g) fue significativamente inferior ($p < 0,05$) a la del grupo PFM (306,23 g), sin embargo, la *ganancia de peso* del grupo PFM + Vits B, C + FOS (25,80 g) fue significativamente superior ($p < 0,05$) a la del grupo PFM (17,35 g). Por tanto, los grupos SF o PFM + Vits B, C + FOS mostraron un mejor aprovechamiento del néctar y de la dieta en comparación con los grupos SF y PFM.

Al comparar el ritmo de crecimiento y la *ingesta total de alimento* en los grupos suplementados con las fuentes de hierro SF y PFM con/sin vitaminas B, C y FOS durante el 3º periodo de balance, observamos que los *pesos iniciales* fueron semejantes, que la *ingesta total de alimento* y la *ganancia de peso* fue similar, a excepción del grupo SF + Vits B, C + FOS cuya *ganancia de peso* (12,50 g) fue significativamente inferior ($p < 0,05$) al grupo SF (22,78 g).

5.1.2. Efecto de los FOS en el crecimiento y consumo de alimento

Para discutir este apartado compararemos el 4º Estudio (adición de las vitaminas B y C) con el 5º Estudio (adición de las vitaminas B, C y FOS).

Al comienzo del 1º periodo de balance, los pesos de los grupos SF + Vits B, C + FOS y PFM + Vits B, C + FOS (109,66 y 105,18 g, respectivamente) eran significativamente inferiores ($p < 0,05$) a los grupos SF + Vits B + C y PFM + Vits B + C (202,20 y 210,88 g, respectivamente). Esta diferencia influyó en los demás parámetros (*peso final*, *ganancia de peso* e *ingesta total de alimento*), siendo en todos los casos, los grupos SF + Vits B, C + FOS y PFM + Vits B, C + FOS los que presentaban los valores más bajos.

En el 2º periodo de balance, nos encontramos con una situación muy similar a la anterior. Pero en este caso, se observó que a pesar de que los grupos SF + Vits B, C + FOS y PFM + Vits B, C + FOS mostraban una *ingesta total de alimento* (149,73 y 179,91 g, respectivamente) significativamente inferior ($p < 0,05$) a los grupos SF + Vits B + C y PFM + Vits B + C (246,26 y 351,35 g, respectivamente), éstos alcanzaron una ganancia de peso similar.

En el 3º periodo de balance, los *pesos iniciales* y la *ingesta total de alimento* fueron similares en todos los grupos, pero en cambio la *ganancia de peso* de los grupos SF + Vits B, C + FOS y PFM + Vits B, C + FOS (12,50 y 18,20 g, respectivamente) fue significativamente

inferior ($p < 0,05$) al de los grupos SF + Vits B + C y PFM + Vits B + C (23,17 y 33,75 g respectivamente). Esta misma situación fue observada por Gudiel-Urbano y Goñi (2002), cuando utilizaron una dieta para ratas AIN-93M suplementada con FOS (5 g/Kg dieta). Otros autores también observaron una disminución en la ganancia de peso en ratas alimentadas con dietas que contenían mayores dosis: 10% (Tokunaga y col., 1989) y 20% (Sakaguchi y col., 1998). Según Gudiel-Urbano y Goñi (2002) los animales alimentados con FOS producían heces blandas, y con una elevada incidencia de diarrea persistente, situación que también se dio en nuestro caso. Además, la fermentación colónica de los FOS puede conducir a la producción de un exceso de gas y diarrea, que resultaría en flatulencia, hinchazón e incomodidad abdominal (Grizar y Barthelemy, 1999).

En general, la adición de los FOS al néctar enriquecido con SF o PFM junto con las vitaminas B y C, no tuvo un efecto positivo sobre el crecimiento.

5.2. Balance mineral

La Tabla 5.3, representa las medias y el error típico de las variables utilizadas para el cálculo del balance mineral en los grupos de ratas alimentadas con el néctar enriquecido con PFM + Vits B, C + FOS, SF + Vits B, C + FOS y BF + Vits B, C + FOS en los tres periodos de balance.

Durante el 1^{er} periodo de balance, el grupo BF + Vits B, C + FOS presentó una *ingesta de hierro* (6,74 mg Fe) estadísticamente superior ($p < 0,05$) al grupo SF + Vits B, C + FOS (4,29 mg Fe), mientras que el grupo PFM + Vits B, C + FOS (4,60 mg Fe) no mostró diferencias con ninguno de los otros grupos. Sin embargo, la *excreción fecal* fue similar en cada uno de los grupos. Las mismas diferencias encontradas en la *ingesta de hierro* se presentaron en el *balance del hierro*, donde el grupo BF + Vits B, C + FOS (5,56 mg Fe) fue significativamente superior ($p < 0,05$) al grupo SF + Vits B, C + FOS (3,32 mg Fe), mientras que el grupo PFM + Vits B, C + FOS (3,61 mg Fe) fue semejante a los otros dos grupos. Los *porcentajes de absorción y retención aparente* similares en los tres grupos, se encontraban elevados en este periodo de balance, esto nos indica que las reservas de hierro se encontraban por debajo de lo normal (Benito y col., 1997).

Durante el 2^o periodo de balance, y al igual que en el periodo anterior, la *ingesta de hierro* por parte del grupo BF + Vits B, C + FOS (7,76 mg Fe) fue significativamente superior ($p < 0,05$) al grupo SF + Vits B, C + FOS (4,89 mg Fe), mientras que el grupo PFM + Vits B, C + FOS (6,97 mg Fe) fue semejante a los otros dos grupos. En cuanto a la *excreción fecal*, ésta fue similar en los tres grupos. Destacar que la *ingesta de hierro* y la *excreción fecal* no varió de manera

significativa con respecto al periodo anterior. La variabilidad en los valores de la *excreción fecal* en este 2º periodo de balance, compensó las diferencias en el *balance del hierro* de los tres grupos. Los *porcentajes de absorción y retención aparente* no mostraron diferencias significativas entre los tres grupos. Además, presentaron una ligera disminución con respecto al periodo anterior, pero esta disminución únicamente fue significativa para el grupo BF + Vits B, C + FOS (65,17 y 65,00%, respectivamente) con respecto al 1º periodo (83,00 y 82,91%, respectivamente). Según Wienk y col., (1997) un aumento en el estatus del hierro lleva a un descenso en la absorción del hierro (*balance del hierro*), el cual se refleja en una absorción aparente más baja. En este caso, el *balance del hierro* no presentó diferencias significativas con respecto al periodo anterior, y aunque los *porcentajes de absorción aparente* disminuyeron, tampoco fueron significativos, salvo para el grupo BF + Vits B, C + FOS. Por tanto, podríamos pensar que la disminución de los *porcentajes de absorción aparente* indica una recuperación en el estatus del hierro para los tres grupos.

Tabla 5.3. Absorción y retención del hierro, tras la administración del SF, PFM o BF junto con las Vitaminas B, C y FOS en un néctar de frutas, durante los tres periodos de repleción

Néctar		Ingesta (mg Fe)	Excreción fecal (mg Fe)	Excreción urinaria (mg Fe)	Balance del hierro ¹ (mg)	Absorción aparente ² (%)	Retención ³ (%)	Retención x 100 / Absorción
1^{er} Periodo	SF + Vits + FOS	4,29 ± 0,56 ^{b/b}	0,97 ± 0,36 ^b	18,21 ± 10,28	3,32 ± 0,56 ^b	82,42 ± 8,30 ^{/a}	82,02 ± 8,51 ^{/a}	99,35 ± 0,45
	PFM + Vits + FOS	4,60 ± 0,61 ^{ab/b}	0,98 ± 0,40	9,92 ± 3,39	3,61 ± 0,52 ^{ab}	81,81 ± 12,40 ^{/a}	79,49 ± 7,34 ^{/a}	98,97 ± 0,56
	BF + Vits + FOS	6,74 ± 0,36 ^{a/b}	1,18 ± 0,42	6,54 ± 1,21	5,56 ± 0,17 ^a	83,00 ± 5,45 ^{/a}	82,91 ± 5,46 ^{/a}	99,88 ± 0,02
2^o Periodo	SF + Vits + FOS	4,89 ± 0,54 ^{b/b}	1,35 ± 0,35 ^b	8,84 ± 1,94	3,54 ± 0,60	71,27 ± 7,27 ^{/ab}	71,13 ± 7,27 ^{/ab}	99,79 ± 0,03
	PFM + Vits + FOS	6,97 ± 0,69 ^{ab/ab}	2,29 ± 0,44	7,28 ± 1,09	4,68 ± 0,85	65,81 ± 7,31 ^{/ab}	65,70 ± 7,30 ^{/ab}	99,83 ± 0,03
	BF + Vits + FOS	7,76 ± 0,40 ^{a/b}	2,65 ± 0,31	11,02 ± 3,40	5,11 ± 0,64	65,17 ± 5,22 ^{/b}	65,00 ± 5,24 ^{/b}	99,74 ± 0,05
3^{er} Periodo	SF + Vits + FOS	10,20 ± 1,84 ^{/a}	5,19 ± 0,96 ^{/a}	13,81 ± 2,11	5,18 ± 0,72	49,31 ± 1,58 ^{/b}	49,00 ± 1,58 ^{/b}	99,38 ± 0,16
	PFM + Vits + FOS	10,66 ± 1,72 ^{/a}	3,68 ± 1,12	13,05 ± 0,17	6,98 ± 1,86	55,36 ± 7,11 ^{/b}	55,19 ± 7,11 ^{/b}	99,71 ± 0,04
	BF + Vits + FOS	10,71 ± 1,31 ^{/a}	3,32 ± 1,14	10,07 ± 1,51	7,39 ± 1,22	60,89 ± 6,00 ^{/b}	60,56 ± 6,02 ^{/b}	99,43 ± 0,22

Cada valor es la media ± error típico, n=6. Vits: Vitamina C + Vitaminas B₆, B₁₂ y ácido fólico; FOS: Fructo-oligosacáridos

^{a-b/} Diferentes letras dentro de la misma columna y para cada uno de los tres periodos de repleción indica diferencias significativas (p<0,05) entre los grupos SF, PFM y BF + Vits B, C + FOS.

^{/a-b} Diferentes letras dentro de la misma columna y para cada grupo suplementado con la fuente de hierro correspondiente, indican diferencias significativas (p < 0.05) entre los tres periodos de repleción.

La ausencia de superíndices indica que no existen diferencias estadísticamente significativas

¹Balance del hierro = Ingesta de hierro (mg) – Excreción fecal (mg)

²Absorción aparente (%) = [Ingesta de hierro (mg) – Excreción fecal (mg)] x 100 / Ingesta de hierro (mg).

³Retención (%) = [Ingesta de hierro (mg) – (Excreción fecal (mg) + Excreción urinaria (mg))] x 100 / Ingesta de hierro (mg).

La ausencia de superíndices indica que no existen diferencias estadísticamente significativas.

En el último periodo de balance, los tres grupos se comportaron de manera similar, no existiendo diferencias significativas para cada uno de los parámetros relacionados con el balance del hierro (Tabla 5.3). Sin embargo, si hubo diferencias con respecto al periodo anterior. Para el grupo SF + Vits B, C + FOS, la *ingesta de hierro* (10,20 mg Fe) fue significativamente superior al obtenido en el 1^{er} y 2^o periodo de balance (4,29 y 4,89 mg Fe, respectivamente). Este aumento en la ingesta posiblemente se deba a la correlación positiva con el *peso inicial* ($r = 0,815$; $p < 0,001$), ya que en este último periodo de balance el *peso inicial* fue significativamente superior a las etapas anteriores (ver Tabla 5.1). Además, este aumento en la *ingesta de hierro* estuvo correlacionado con la *excreción fecal* ($r = 0,947$; $p < 0,001$), siendo en el último periodo de balance (5,19 mg Fe) significativamente superior ($p < 0,05$) a los obtenidos en el 1^{er} y 2^o periodo de balance (0,97 y 1,35 mg Fe). En cuanto a los *porcentajes de absorción y retención aparente*, éstos disminuyeron con respecto al 2^o periodo de balance, pero esta disminución no fue significativa. En varios estudios llevados a cabo por Buchowski y col. (1989), Layrisse y col (1997) y Sánchez-Morito y col. (2000), observaron que el porcentaje de hierro absorbido disminuía a medida que la ingesta de hierro aumentaba, pero en cambio el hierro total absorbido ó balance del hierro aumentaba. En nuestro estudio, sí hubo una correlación inversa entre la *ingesta de hierro* y el *porcentaje de absorción aparente* ($r = - 0,570$; $p < 0,05$), y una correlación positiva entre la *ingesta de hierro* y el *balance del hierro* ($r = 0,870$; $p < 0,001$), esto nos sugiere que hubo una recuperación en el estatus del hierro a lo largo del periodo de repleción.

Para el grupo PFM + Vits B, C + FOS, la *ingesta de hierro* en el 3^{er} periodo de balance (10,66 mg Fe) solamente fue estadísticamente superior al 1^{er} periodo de balance (4,60 mg Fe). Este aumento en la *ingesta de hierro* estuvo correlacionada positivamente con el *peso inicial* ($r = 0,817$; $p < 0,001$), de manera que a mayor *peso inicial*, mayor será la ingesta de alimento y por tanto de hierro. En cuanto a la *excreción fecal*, aunque aumentó ligeramente desde el 1^{er} al 3^{er} periodo, no se observaron diferencias significativas. La ausencia de diferencias significativas entre los tres periodos de balance para la *excreción fecal* puede sugerirnos una posible acumulación del hierro, coincidiendo con una débil correlación entre la *ingesta de hierro* y la *excreción fecal* ($r = 0,605$; $p < 0,05$). Pero una acumulación excesiva de hierro en el cuerpo se vería reflejada en un aumento del *porcentaje de absorción aparente*, y en nuestro caso esta situación no se observó, ya que fue disminuyendo a lo largo de los tres periodos de balance. Esta disminución en el *porcentaje de absorción aparente* únicamente fue significativa ($p < 0,05$) entre el 3^{er} y 1^{er} periodo (55,36 y 81,81%). La correlación inversa existente entre la *excreción fecal* y el *porcentaje de absorción aparente* ($r = - 0,679$; $p < 0,05$), nos sugiere una situación normal en el metabolismo del hierro.

El balance mineral del hierro del grupo BF + Vits B, C + FOS, fue muy similar a la del PFM + Vits B, C + FOS. La *ingesta de hierro* en el 3^{er} periodo de balance (10,71 mg Fe) fue significativamente superior ($p < 0,05$) a la obtenida en el 1^{er} y 2^o periodo de balance (6,74 y 7,76 mg Fe, respectivamente). La *excreción fecal* y el *balance del hierro* no mostraron diferencias significativas en cada uno de los tres periodos, pero si en el *porcentaje de absorción aparente*. En este periodo, el *porcentaje de absorción aparente* (60,89%) fue similar al 2^o periodo (65,17%) y significativamente inferior al 1^{er} periodo (83,00%). Al igual que en las otras fuentes de hierro, se observaron correlaciones entre la *ingesta de hierro* y el *peso inicial* ($r = 0,637$; $p < 0,05$). También se observaron correlaciones entre la *ingesta de hierro* y la *excreción fecal* ($r = 0,611$; $p < 0,05$) muy similar a la del grupo PFM + Vits B, C + FOS, entre la *ingesta de hierro* y el *balance de hierro* ($r = 0,726$; $p < 0,01$) indicando que a medida que aumentaba la *ingesta de hierro* la absorción total de hierro aumentaba, y una correlación inversa entre la *excreción fecal* y el *porcentaje de absorción aparente* ($r = - 0,834$; $p < 0,01$), es decir, a medida que el hierro se va reponiendo el *porcentaje de absorción aparente* tiende a disminuir hasta alcanzar un valor constante.

En general, la biodisponibilidad del hierro está influenciada por las propiedades del compuesto de hierro, la cantidad total de hierro en la dieta, el estatus del hierro del individuo, la tasa de la eritropoyésis y la presencia de los inhibidores y favorecedores de la absorción del hierro presentes en el lumen intestinal o en la dieta (Bothwell, 1983; Cook y Bothwell, 1984). Son numerosos los estudios que han demostrado que el bis-glicinato ferroso tiene una mejor biodisponibilidad que el sulfato ferroso, especialmente cuando es añadido a alimentos con un elevado contenido en inhibidores de la absorción del hierro (Olivares y col., 1997; Bovell-Benjamin y col., 2000; Layrisse y col., 2000). También estudios en ratas han demostrado el mismo efecto (Langini y col., 1988; Fairweather-Tait y col., 1992). La principal ventaja de este compuesto es su elevada absorción en alimentos con un elevado contenido en inhibidores de la absorción del hierro. Si se adiciona al agua, o en alimentos con un bajo contenido en inhibidores, la absorción del bis-glicinato ferroso no puede proporcionar tal ventaja (Allen, 2002). En nuestro estudio, los resultados confirman lo expuesto por Allen (2002b), donde el bis-glicinato ferroso no fue significativamente superior al sulfato ferroso, sin embargo presentó un porcentaje de absorción aparente muy similar al de este compuesto.

5.2.1. Efecto de la adición de la mezcla de vitaminas B, vitamina C y FOS en el balance mineral del hierro.

La Tabla 5.4, representa las medias y el error típico de las variables utilizadas para el cálculo del balance mineral en los grupos de ratas alimentadas con el néctar enriquecido con SF y PFM con/sin Vits B, C + FOS en cada uno de los tres periodos de balance.

En el 1^{er} periodo de balance, la *ingesta de hierro* de los grupos SF + Vits B, C + FOS y PFM + Vits B, C y FOS (4,29 y 4,60 mg Fe, respectivamente) fue significativamente inferior ($p < 0,05$) al de los grupos SF y PFM (7,93 y 11,16 mg Fe, respectivamente). En cambio, La *excreción fecal* de los grupos SF con/sin Vits B, C + FOS (0,97 y 1,47 mg Fe, respectivamente) y los grupos PFM con/sin Vits B, C + FOS (0,98 y 1,54 mg Fe, respectivamente) mostraron valores similares. En cuanto al *balance del hierro*, observamos que los grupos SF + Vits B, C + FOS y PFM + Vits B, C + FOS (3,32 y 3,61 mg Fe, respectivamente) fueron muy inferiores estadísticamente ($p < 0,05$) a los grupos SF y PFM (6,45 y 9,92 mg Fe, respectivamente).

Sin embargo estas diferencias fueron proporcionales, es decir, la *ingesta de hierro* y el *balance del hierro* de los grupos SF + Vits B, C + FOS y PFM + Vits B, C + FOS fueron aproximadamente 2 y 3 veces inferior a los grupos SF y PFM, respectivamente. Por este motivo, los *porcentajes de absorción y retención aparente* fueron similares y sin diferencias significativas. Por tanto, tras un periodo de repleción de 3 días, la adición de las vitaminas B, C y FOS al néctar enriquecido con las diferentes fuentes de hierro no afectó de manera significativa a la absorción del hierro, cuando lo comparamos con el néctar enriquecido sin las vitaminas B, C y FOS.

Durante el 2^o periodo de balance, la *ingesta de hierro*, la *excreción fecal y urinaria*, y el *balance del hierro* del grupo SF + Vits B, C + FOS (4,89 mg, 1,35 mg, 8,84 μ g y 3,54 mg Fe, respectivamente) fueron significativamente inferiores a los obtenidos por el grupo SF (12,09 mg, 3,89 mg, 42,40 μ g y 8,20 mg Fe, respectivamente). De igual manera, ocurrió para el grupo PFM + Vits B, C + FOS (6,97 mg, 2,29 mg, 7,28 μ g y 4,68 mg Fe, respectivamente) con respecto al grupo PFM (13,67 mg, 4,20 mg, 22,91 μ g y 9,47 mg Fe, respectivamente). En ambos casos, y al igual que en el periodo anterior, los resultados fueron proporcionales, dando lugar a *porcentajes de absorción y retención aparente* muy similares.

Tabla 5.4. Absorción y retención del hierro, tras la administración del SF o PFM con/sin Vits B, C y FOS en un néctar de frutas, durante los tres periodos de replación.

	Néctar	Ingesta (mg Fe)	Excreción fecal (mg Fe)	Excreción urinaria (mg Fe)	Balance del hierro ¹ (mg)	Absorción aparente ² (%)	Retención ³ (%)	Retención x 100 / Absorción
Replación								
1^{er} Periodo	SF	7,93 ± 0,95 ^{/b}	1,47 ± 0,15 ^{/b}	22,21 ± 5,90	6,45 ± 0,97 ^{/ab}	80,33 ± 3,85 ^{/a}	80,04 ± 3,84 ^{/a}	99,65 ± 0,08 ^{/a}
	SF + Vits + FOS	4,29 ± 0,56 ^{*/b}	0,97 ± 0,36 ^{/b}	18,21 ± 10,28	3,32 ± 0,56 [*]	82,42 ± 8,30 ^{/a}	82,02 ± 8,51 ^{/a}	99,35 ± 0,45
	PFM	11,16 ± 3,58	1,54 ± 0,68 ^{/c}	4,21 ± 1,63 ^{/b}	9,62 ± 1,77	85,65 ± 3,43 ^{/a}	85,50 ± 3,40 ^{/a}	99,82 ± 0,08
	PFM + Vits + FOS	4,60 ± 0,61 ^{*/b}	0,98 ± 0,40	9,92 ± 3,39	3,61 ± 0,52 [*]	81,81 ± 12,40 ^{/a}	79,49 ± 7,34 ^{/a}	98,97 ± 0,56
2^o Periodo	SF	12,09 ± 0,60 ^{/a}	3,89 ± 0,39 ^{/ab}	42,40 ± 12,80	8,20 ± 0,61 ^{/a}	67,74 ± 3,33 ^{/b}	67,32 ± 3,25 ^{/b}	99,40 ± 0,12 ^{/ab}
	SF + Vits + FOS	4,89 ± 0,54 [*]	1,35 ± 0,33 ^{*/b}	8,84 ± 1,94 [*]	3,54 ± 0,60 [*]	71,27 ± 7,27 ^{/ab}	71,13 ± 7,27 ^{/ab}	99,80 ± 0,04
	PFM	13,67 ± 1,13	4,20 ± 0,61 ^{/b}	22,91 ± 3,93 ^{/a}	9,47 ± 0,95	69,25 ± 3,24 ^{/b}	69,06 ± 3,23 ^{/b}	99,72 ± 0,05
	PFM + Vits + FOS	6,97 ± 0,69 ^{*/ab}	2,29 ± 0,44 [*]	7,28 ± 1,09 [*]	4,68 ± 0,85 [*]	65,81 ± 7,31 ^{/ab}	65,70 ± 7,30 ^{/ab}	99,83 ± 0,03
3^{er} Periodo	SF	10,81 ± 2,29 ^{/ab}	6,27 ± 1,31 ^{/a}	29,92 ± 5,28	4,54 ± 1,01	41,90 ± 1,34 ^{/c}	41,60 ± 1,31 ^{/c}	99,29 ± 0,12 ^{/b}
	SF + Vits + FOS	10,20 ± 1,84 ^{/a}	5,19 ± 0,96 ^{/a}	13,81 ± 2,11	5,18 ± 0,72 ^{/b}	49,31 ± 1,58 ^{/b}	49,00 ± 1,58 ^{/b}	99,38 ± 0,16
	PFM	12,46 ± 1,99	6,66 ± 0,45 ^{/a}	19,09 ± 3,69 ^{/a}	5,81 ± 1,62	44,88 ± 6,06	44,70 ± 6,06	99,23 ± 0,41
	PFM + Vits + FOS	10,66 ± 1,72 ^{/a}	3,68 ± 1,12	13,05 ± 0,17	6,98 ± 1,86	55,36 ± 7,11 ^{/b}	55,19 ± 7,11 ^{/b}	99,71 ± 0,04

Cada valor es la media ± error típico, n=6. Vits¹: Vitamina C + Vitaminas B₆, B₁₂ y ácido fólico; FOS: Fructo-oligosacáridos

[/] La presencia de asterisco dentro de la misma columna y para cada uno de los tres periodos de replación indica diferencias significativas (p<0,05) entre los grupos SF con/sin Vits B, C + FOS y PFM con/sin Vits B, C + FOS.

^{/a-b} Diferentes letras dentro de la misma columna y para cada grupo suplementado con la fuente de hierro correspondiente, indican diferencias significativas (p < 0.05) entre los tres periodos de replación.

La ausencia de superíndices indica que no existen diferencias estadísticamente significativas

¹Balance del hierro = Ingesta de hierro (mg) – Excreción fecal (mg)

²Absorción aparente (%) = [Ingesta de hierro (mg) – Excreción fecal (mg)] x 100 / Ingesta de hierro (mg).

³Retención (%) = [Ingesta de hierro (mg) – (Excreción fecal (mg) + Excreción urinaria (mg))] x 100 / Ingesta de hierro (mg).

La ausencia de superíndices indica que no existen diferencias estadísticamente significativas.

Al inicio del 3^{er} periodo de balance, los *pesos iniciales* de los grupos SF y PFM con/sin Vits B, C y FOS fueron similares, por lo que las conclusiones obtenidas pueden ser más claras ya que se trataba de grupos homogéneos, de hecho los parámetros relacionados con el cálculo del balance mineral del hierro de los grupos SF y PFM con/sin Vits B, C y FOS fueron similares.

5.2.2. Efecto de los FOS en el balance mineral del hierro

Durante el 1^{er} periodo de balance, la *ingesta de hierro* de los grupos SF + Vits B, C + FOS y PFM + Vits B, C + FOS (4,29 y 4,60 mg Fe, respectivamente) fue significativamente inferior ($p < 0,01$) al de los grupos SF + Vits B + C y PFM + Vits B + C (7,77 y 9,13 mg Fe, respectivamente). Sin embargo, esta diferencia en la *ingesta de hierro* no influyó en la *excreción fecal*, no apreciándose ninguna diferencia entre los grupos, siendo en todos los casos = 1 mg Fe. En cuanto al balance del hierro, lógicamente fueron los grupos SF + Vits B + C y PFM + Vits B + C (7,10 y 8,10 mg Fe, respectivamente) los que mostraron valores significativamente superiores ($p < 0,01$) a los grupos SF + Vits B, C + FOS y PFM + Vits B, C + FOS (3,32 y 3,61 mg Fe, respectivamente). Pero si relacionamos la *absorción total del hierro* con la *ingesta de hierro*, no existieron diferencias significativas entre los grupos, es decir, los *porcentajes de absorción aparente* fueron similares en todos los casos. Por tanto durante este periodo de balance, podemos sugerir que la adición de los FOS no mejoró la absorción del hierro.

En el 2^o periodo de balance, se pudo apreciar el mismo patrón de conducta que en el periodo anterior. La *ingesta de hierro* para los grupos SF + Vits B, C + FOS y PFM + Vits B, C + FOS (4,89 y 6,97 mg Fe, respectivamente) fue significativamente inferior ($p < 0,01$) al de los grupos SF + Vits B + C y PFM + Vits B + C (9,89 y 14,75 mg Fe, respectivamente). La *excreción fecal* fue muy similar en todos grupos, mientras que el *balance del hierro* por parte de los grupos SF + Vits B, C + FOS y PFM + Vits B, C + FOS (3,54 y 4,68 mg Fe, respectivamente) fue significativamente inferior ($p < 0,001$) al de los grupos SF + Vits B + C y PFM + Vits B + C (8,71 y 12,36 mg Fe). En este periodo, los *porcentajes de absorción aparente* de los grupos SF + Vits B, C + FOS y PFM + Vits B, C + FOS (71,27 y 65,81%, respectivamente) fueron significativamente inferiores ($p < 0,05$) a los grupos SF + Vits B + C y PFM + Vits B + C (87,31 y 82,74%, respectivamente). Está demostrado que los FOS estimula la absorción del hierro en ratas (Ohta y col., 1995 y 1998) y además, es difícil evaluar el efecto de los FOS en la recuperación de la anemia, ya que en ratas anémicas, la absorción del hierro es elevada (Zhang, y col., 1989) y las ratas anémicas deficientes en hierro se recuperan de la anemia muy rápidamente tras una dieta con hierro (Ohta y col., 1995). Aunque, en los grupos SF + Vits B, C + FOS y PFM + Vits B, C + FOS, llevan vitamina C, sus *porcentajes de absorción aparente* fueron muy próximos a los obtenidos por Ohta y col (1995) (~ 60%). Ohta y col (1995)

concluyó que la adición de los FOS (50 g/Kg dieta) aumentó la absorción aparente del hierro. En nuestro caso, la cantidad añadida al néctar fue inferior (6,34 g/Kg dieta), por lo que podríamos pensar que fuera insuficiente para producir un efecto claro sobre la absorción aparente del hierro, sin embargo, según Gudiel-Urbano y Goñi (2002), la ingesta de FOS en una baja dosis (5 g/Kg dieta) fue suficiente para proporcionar un efecto deseable en la biodisponibilidad mineral en ratas sin ninguna modificación de los parámetros nutricionales. Además, según Yeung y col. (2005) el efecto de los prebióticos (FOS) puede ser aparente solamente cuando se añade a una comida donde el hierro tiene una baja biodisponibilidad, pero no cuando se añade a una comida donde el hierro es altamente biodisponible. De acuerdo con lo expuesto por Yeung y col. (2005), al emplear dos fuentes de hierro con una elevada biodisponibilidad, el efecto de los FOS supuestamente no sería apreciable ya que es posible que los requerimientos del hierro para los diferentes grupos fueran alcanzados y si hay un posible aumento en el *porcentaje de absorción aparente*, éste no sería detectable. Por lo tanto podemos deducir que la adición de FOS durante este periodo, no afectó a la absorción del hierro.

En el último periodo de balance, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros relacionados con el balance mineral del hierro para los grupos SF + Vits B y C con/sin FOS. Sin embargo, en los grupos PFM + Vits B y C con/sin FOS, el *porcentaje de absorción aparente* (55,36%) fue significativamente inferior ($p < 0,05$) al grupo PFM + Vits B y C (74,51%).

En general, se sabe que el hierro es absorbido predominantemente en el duodeno y cantidades insignificantes son absorbidas en el colon. Este hecho está relacionado con el bajo pH del duodeno, resultado de la entrada del quimo desde el estómago que favorece la solubilidad del hierro y por tanto su absorción (Cook y col., 1964). Por tanto, es razonable esperar que la absorción del hierro más allá del intestino delgado proximal disminuya debido al incremento en el pH del contenido intestinal que transita a lo largo del tracto gastrointestinal (Schumann y col., 1990). Bougle y col. (2002) observaron que el ritmo de absorción en el duodeno de ratas era de 1.7, 1.3, y 1.9 más elevado que en el yeyuno, ileon, y ciego, respectivamente. Existen escasas medidas directas de la absorción del hierro en el colon, pero los estudios que están disponibles demuestran una considerable absorción (Ohkawara y col., 1963; Chernelch y col., 1970). De acuerdo con esto, es lógico esperar que la adición de los FOS favorezca de alguna manera la absorción del hierro en el colon, aunque como hemos comentado anteriormente, el efecto parece estar ligado a la dosis de FOS y a la biodisponibilidad de la sal de hierro administrada. Actualmente no hay información sobre los efectos de los prebióticos sobre la absorción del hierro en individuos deficientes en hierro o anémicos (Yeung y col., 2005).

5.3. Biodisponibilidad y utilización del hierro

5.3.1. Comparación entre los grupos PFM, BF y SF con vitaminas B, C y FOS.

La Tabla 5.5, muestra los valores obtenidos para cada una de las variables empleadas para el cálculo de la biodisponibilidad relativa y la utilización del hierro del PFM + Vits B, C + FOS, y BF + Vits B, C + FOS respecto a los grupos suplementados con la fuente de hierro SF + Vits B, C + FOS, en cada uno de los tres periodos de repleción.

El hecho de que los *pesos iniciales*, Hb_i , $FeHb_i$ de los tres grupos no presentaran diferencias significativas entre ellos, demuestra que su estatus de hierro era homogéneo y útil en la comparación de los parámetros durante el 1^{er} periodo de repleción. Al finalizar el 1^{er} periodo, únicamente el grupo PFM + Vits B, C + FOS alcanzó valores de hemoglobina $>11,1$ g/dl, de acuerdo con los valores de referencia de la Tabla 1.5, y significativamente superior ($p < 0,05$) al grupo SF + Vits B, C + FOS (9,72 g/dl), mientras que con el grupo BF + Vits B, C + FOS (10,81 g/dl) no hubo diferencias significativas. En cuanto a la *ERH*, se pudo observar que el hierro proporcionado por ambas fuentes de hierro tuvo una biodisponibilidad similar, de igual modo, la *utilización del hierro* por parte de los tres grupos también fue similar. El VBR, relativo al grupo SF, nos indica la biodisponibilidad del hierro de los compuestos PFM y BF expresada como porcentaje de la biodisponibilidad del SF, cuyo valor es del 100%, fue muy similar en los tres grupos: SF + Vits B, C + FOS (138%), PFM + Vits B, C + FOS (142%) y BF + Vits B, C + FOS (115%).

Al igual que en el 1^{er} periodo, en el 2^o periodo de repleción los grupos SF, PFM y BF + Vits B, C + FOS mostraron *pesos iniciales* semejantes (154,06; 151,45 y 152,50 g, respectivamente), Hb_i (6,15; 5,76 y 6,63 g/dl, respectivamente) y $FeHb_i$ (2,12; 2,01 y 2,26 mg, respectivamente), presentando un estatus para el hierro muy homogéneo. La *ingesta de hierro* del grupo PFM y BF + Vits B, C + FOS (22,98 y 24,64 g, respectivamente) fue significativamente superior ($p < 0,05$) al grupo SF + Vits B, C + FOS (17,91 g), esta diferencia no supuso ningún cambio en los parámetros Hb_f y $FeHb_f$, no mostraron diferencias entre los tres grupos.

Tabla 5.5. Eficiencia de regeneración de la hemoglobina (ERH), utilización del hierro y valor biológico relativo (VBR) en ratas anémicas, tras la administración del SF, PFM o BF junto con las Vitaminas B, C y FOS en un néctar de frutas, durante los tres periodos de repleción.

Néctar		Ganancia de peso (g)	Ingesta de hierro (mg)	Hb inicial (g/dL)	Hb final (g/dL)	Fe Hgb inicial ¹ (mg)	Fe Hgb final ¹ (mg)	ERH ² (%)	Utilización del hierro ³ (mg)	VBR ⁴
Repleción 1 ^{er} Periodo	SF + Vits + FOS	9,86 ± 1,54 ^{/c}	4,02 ± 0,51 ^{/c}	6,00 ± 0,36	9,72 ± 0,47 ^{b/c}	1,51 ± 0,18 ^{/b}	2,62 ± 0,12 ^{/c}	28,36 ± 4,40 ^{/a}	1,40 ± 0,22 ^{/a}	138
	PFM + Vits + FOS	7,77 ± 2,47 ^{/c}	4,40 ± 0,82 ^{/c}	6,77 ± 0,95	11,60 ± 0,00 ^{a/b}	1,71 ± 0,24 ^{/b}	3,00 ± 0,13 ^{/c}	29,12 ± 2,23 ^{/a}	1,43 ± 0,11 ^{/a}	142
	BF + Vits + FOS	12,93 ± 2,11 ^{/c}	5,95 ± 0,97 ^{/c}	5,75 ± 0,34	10,81 ± 0,43 ^{ab/c}	1,52 ± 0,22 ^{/b}	3,01 ± 0,47 ^{/c}	23,65 ± 4,46 ^{/a}	1,16 ± 0,22 ^{/a}	115
2 ^o Periodo	SF + Vits + FOS	48,98 ± 6,41 ^{/b}	17,91 ± 0,90 ^{b/b}	6,15 ± 0,89	13,32 ± 0,47 ^{/b}	2,12 ± 0,31 ^{/ab}	6,07 ± 0,30 ^{/b}	21,52 ± 2,75 ^{a/ab}	1,06 ± 0,14 ^{a/ab}	128
	PFM + Vits + FOS	61,23 ± 4,25 ^{/a}	22,98 ± 0,64 ^{a/b}	5,76 ± 0,67	13,93 ± 0,24 ^{/a}	2,01 ± 0,24 ^{/ab}	6,65 ± 0,18 ^{/b}	20,35 ± 1,37 ^{a/b}	1,00 ± 0,07 ^{a/b}	121
	BF + Vits + FOS	51,32 ± 5,27 ^{/a}	24,64 ± 0,54 ^{a/b}	6,63 ± 0,21	13,21 ± 0,31 ^{/b}	2,26 ± 0,04 ^{/ab}	6,02 ± 0,21 ^{/b}	14,81 ± 0,74 ^{b/b}	0,73 ± 0,04 ^{b/b}	88
3 ^{er} Periodo	SF + Vits + FOS	75,88 ± 4,85 ^{/a}	43,53 ± 1,41 ^{b/a}	6,70 ± 0,45	15,23 ± 0,24 ^{a/a}	2,91 ± 0,26 ^{/a}	8,93 ± 0,21 ^{a/a}	13,91 ± 0,93 ^{/b}	0,68 ± 0,05 ^{/b}	139
	PFM + Vits + FOS	70,97 ± 9,03 ^{/a}	51,60 ± 1,58 ^{a/a}	6,34 ± 0,52	14,42 ± 0,24 ^{b/a}	2,66 ± 0,20 ^{/a}	8,09 ± 0,21 ^{b/a}	11,08 ± 0,62 ^{/c}	0,52 ± 0,03 ^{/c}	111
	BF + Vits + FOS	71,80 ± 6,37 ^{/a}	47,93 ± 1,60 ^{ab/a}	5,25 ± 1,19	14,70 ± 0,13 ^{ab/a}	2,94 ± 0,31 ^{/a}	8,34 ± 0,20 ^{ab/a}	13,00 ± 1,17 ^{/b}	0,60 ± 0,06 ^{/b}	130

Cada valor es la media ± error típico, n=6. Vits¹: Vitamina C + Vitaminas B₆, B₁₂ y ácido fólico; FOS: Fructo-oligosacáridos

² La presencia de asterisco dentro de la misma columna y para cada uno de los tres periodos de repleción indica diferencias significativas (p<0,05) entre los grupos SF con/sin Vits B, C + FOS y PFM con/sin Vits B, C + FOS.

^{/a-b} Diferentes letras dentro de la misma columna y para cada grupo suplementado con la fuente de hierro correspondiente, indican diferencias significativas (p < 0.05) entre los tres periodos de repleción.

La ausencia de superíndices indica que no existen diferencias estadísticamente significativas

¹ Fe en Hb se describe en la sección de material y métodos: mg Fe en Hb = (peso x Hb x 0,067 x 3,4).

² ERH (%) = [Fe Hb (final) – Fe Hb (inicial) x 100] / mg Fe consumido.

³ Utilización del hierro (mg) = ERH (%) x Fe en la dieta (%) / 100.

⁴ VBR = ERH (SF, PFM o BF) con Vits B, C + FOS / ERH (SF)

La ausencia de superíndices indica que no existen diferencias estadísticamente significativas.

En cuanto a la *ERH*, los grupos SF y PFM + Vits B, C + FOS (21,52 y 20,35%, respectivamente) fueron significativamente superiores ($p < 0,05$) al grupo BF + Vits B, C + FOS (14,81%), esta diferencia se debió a que este último grupo necesitó una mayor *ingesta de hierro* para obtener una ganancia de hierro en la Hb similar a los tres grupos. De igual modo, la *utilización del hierro* se vio afectada en el grupo BF + Vits B, C + FOS (0,73 mg Fe) siendo significativamente inferior ($p < 0,05$) a los grupos SF y PFM + Vits B, C + FOS (1,06 y 1,00 mg Fe, respectivamente). Los VBR de los grupos SF y PFM + Vits B, C + FOS (128 y 121%, respectivamente) fueron muy similares y significativamente superiores al grupo BF + Vits B, C + FOS (88%). Al comparar el 2º periodo de repleción con el anterior y poder establecer una comparación entre los grupos, observamos que únicamente los *pesos iniciales* mostraban diferencias significativas ($p < 0,01$), mientras que la Hb_i y $FeHb_i$ no se diferenciaban con respecto al periodo anterior. Lógicamente la *ingesta total de hierro* de los grupos SF, PFM y BF + Vits B, C + FOS (17,91; 22,98 y 24,64 g, respectivamente) en el 2º periodo fueron estadísticamente superiores ($p < 0,01$) al 1º periodo (4,02; 4,40 y 5,95 g, respectivamente), al igual que en la Hb_f y $FeHb_f$. La *ERH* y la *utilización del hierro* disminuyeron de manera significativa para los grupos PFM y BF + Vits B, C + FOS (20,35 y 14,81%, respectivamente) con respecto al periodo anterior (29,12 y 23,65%, respectivamente). Por tanto, durante los diez días que duró el 2º periodo de repleción, la incorporación del hierro a la Hb se mantuvo sin cambios para el grupo SF + Vits B, C + FOS, mientras que en los grupos PFM y BF + Vits B, C + FOS disminuyó. Además, según Buchowski y col. (1989), la *ERH* y la *absorción aparente del hierro* en ratas anémicas están inversamente relacionadas con la *ingesta de hierro*. Situación que coincide en este periodo, ingesta de hierro elevada y una *ERH* disminuida.

En el 3º periodo de repleción, los grupos SF, PFM y BF + Vits B, C + FOS partieron de *pesos iniciales* (181,68; 175,98 y 177,28 g, respectivamente), Hb_i (6,70; 6,34 y 5,25 g/dl, respectivamente) y $FeHb_i$ (2,91; 2,66 y 2,94 mg, respectivamente) muy homogéneos. La *ingesta total de hierro* para el grupo PFM + Vits B, C + FOS (51,60 g) fue significativamente superior ($p < 0,05$) a los grupos SF y BF + Vits B, C + FOS (43,53 y 47,93 g, respectivamente). A pesar de esta diferencia, la Hb_f y $FeHb_f$ del grupo SF + Vits B, C + FOS (15,23 g/dl y 8,93 mg Fe, respectivamente) y del grupo BF + Vits B, C + FOS (14,70 g/dl y 8,34 mg Fe, respectivamente) fueron significativamente superiores ($p < 0,05$) al grupo PFM + Vits B, C + FOS (14,42 g/dl y 8,09 mg Fe, respectivamente). Sin embargo, la *ERH* y la *utilización del hierro* no se vieron afectadas significativamente y tampoco el VBR. En resumen, la biodisponibilidad del hierro de las diferentes fuentes de hierro BF, SF y PFM con vitaminas B, C y FOS durante un periodo de suplementación de 17 días, no mostró diferencias significativas.

Al evaluar el comportamiento de cada compuesto de hierro junto con las vitaminas B, C y FOS sobre cada una de las variables empleadas en el cálculo de la biodisponibilidad del hierro,

podimos observar que desde el punto de vista hematológico 3 días de suplementación (1^{er} periodo) no fueron suficientes para alcanzar niveles $Hb_f > 11,1$ g/dl (Tabla 1.5), salvo para el grupo PFM + Vits B, C + FOS. Periodos más largos (2^o y 3^{er} periodo), permitieron alcanzar niveles Hb_f más elevados. Este aumento en la Hb_f estuvo favorecida por la *ingesta de hierro*, existiendo una correlación positiva entre ambas variables, por lo que una mayor ingesta de hierro permitió un aumento en la síntesis de la hemoglobina, siendo para el grupo SF + Vits B, C + FOS ($r = 0,877$), grupo PFM + Vits B, C + FOS ($r = 0,758$) y el grupo BF + Vits B, C + FOS ($r = 0,901$), todos ellos con un nivel de significación de $p < 0,001$. Al igual que Wienk y col., (1999), observamos que la *ingesta de hierro* estuvo correlacionada con la *ganancia de peso*, siendo para el grupo PFM + Vits B, C + FOS ($r = 0,700$; $p < 0,01$), el grupo SF + Vits B, C + FOS ($r = 0,924$; $p < 0,001$) y para el grupo BF + Vits B, C + FOS ($r = 0,769$; $p < 0,01$), es decir, un aumento en la *ganancia de peso* estuvo directamente relacionada con un aumento en el volumen de sangre y en los niveles de Hb.

La *ganancia en peso* y la *ingesta de hierro* estuvieron correlacionadas con la ganancia de hierro en la Hb, tanto para el grupo SF + Vits B, C + FOS ($r = 0,920$; $p < 0,001$ y $r = 0,932$; $p < 0,001$, respectivamente), para el grupo PFM + Vits B, C + FOS ($r = 0,884$; $p < 0,001$, y $r = 0,794$; $p < 0,001$, respectivamente) y para el grupo BF + Vits B, C + FOS ($r = 0,958$; $p < 0,001$ y $r = 0,886$; $p < 0,001$, respectivamente). Esto nos sugiere que el hierro suministrado por el SF, PFM y BF se incorporó de manera eficiente a la Hb. Además, la *ERH* fue disminuyendo en cada periodo de repleción, siendo esta disminución significativa en el 3^{er} periodo para el grupo SF y PFM + Vits B, C + FOS (13,91 y 11,08%, respectivamente) con respecto a los dos periodos anteriores.

En el caso del grupo BF + Vits B, C + FOS, la disminución fue significativa ($p < 0,05$) en el 2^o periodo de repleción, manteniéndose sin cambios en el 3^{er} periodo. Al mismo tiempo, la *ingesta de hierro* fue aumentando en cada periodo de repleción encontrando una correlación inversa entre la *ingesta de hierro* y la *ERH*, siendo para el grupo SF + Vits B, C + FOS ($r = - 0,743$; $p < 0,01$), el grupo PFM + Vits B, C + FOS ($r = - 0,948$; $p < 0,001$) y para el grupo BF + Vits B, C + FOS ($r = - 0,736$; $p < 0,01$).

5.3.2. Efecto de las vitaminas B, C y FOS en la biodisponibilidad y utilización del hierro

El estatus de hierro al inicio de cada periodo de repleción (Tabla 5.6) debe ser lo más homogéneo para cada uno de los grupos en estudio, para ello nos fijamos en el *peso inicial* Hb_i y $FeHb_i$. En el 1^{er} periodo de repleción, el *peso inicial* la Hb_i y el $FeHb_i$ del grupo SF + Vits B, C + FOS (109,66 g, 6,00 g/dl y 1,51 mg Fe, respectivamente) fue significativamente inferior ($p < 0,05$) al grupo SF (155,03 g, 7,88 g/dl y 2,82 mg Fe, respectivamente). También se

observaron diferencias en la *ingesta de hierro*, siendo el grupo SF + Vits B, C + FOS (4,02 mg Fe) significativamente inferior ($p < 0,05$) al grupo SF (7,42 mg Fe), sin embargo la *ganancia de peso* en ambos grupos fue muy similar. Aunque la Hb_f , y el $FeHb_f$ fueron para el grupo SF + Vits B, C + FOS (9,72 g/dl y 2,62 mg Fe, respectivamente) significativamente inferiores al grupos SF (11,68 g/dl y 4,21 mg Fe, respectivamente), la ganancia en la Hb y en el contenido de hierro en la Hb no mostraron diferencias significativas. Respecto a la biodisponibilidad del hierro, medida como *ERH*, y la *utilización del hierro*, ambos grupos presentaron la misma biodisponibilidad y *utilización del hierro*. En cuanto al VBR, la adición de las vitaminas B, C y FOS supuso un aumento, pero este aumento no fue significativo. La interpretación de estos resultados, puede llevar a confusión si no tenemos en cuenta que ambos grupos partieron con un estatus para el hierro diferentes. Aunque confirmaron una mejora en la biodisponibilidad del SF con la adición de las vitaminas B, C y FOS, esto puede deberse a unas necesidades para el hierro más acusadas para este grupo.

En cuanto a los grupos PFM con/sin Vits B, C + FOS, presentaron al inicio del 1^{er} periodo diferencias significativas ($p < 0,05$) en el *peso inicial* y la $FeHb_i$, siendo el grupo PFM + Vits B, C + FOS (109,90 g y 1,71 mg Fe, respectivamente) significativamente inferiores al grupo PFM (158,00 g y 2,79 mg Fe, respectivamente). En cuanto a la *ingesta de hierro* y a la *ganancia de peso* fueron muy similares. La ganancia de la Hb y en el contenido de hierro en la Hb fue muy similar entre ambos grupos. Sin embargo, la *ERH* y la *utilización del hierro* para el grupo PFM + Vits B, C + FOS (29,12% y 1,43 mg Fe, respectivamente) fue significativamente superior ($p < 0,05$) al grupo PFM (14,80% y 0,73 mg Fe, respectivamente). Por tanto el VBR del PFM + Vits B, C + FOS (142%) fue significativamente superior al del SF (100%) y al grupo PFM (72%). Esto nos indicó que la adición de las vitaminas B, C y FOS al néctar con la fuente de hierro PFM favoreció significativamente la biodisponibilidad del PFM.

En el 2^o periodo de repleción, el estatus del hierro para los grupos SF con/sin + Vits B, C + FOS fue homogéneo, partiendo de valores en el *peso inicial* Hb_i y $FeHb_i$ muy similares. La *ingesta total de hierro* en el grupo SF + Vits B, C + FOS (17,91 g) fue significativamente inferior ($p < 0,05$) a la del grupo SF (27,47 g), diferencia que se vio reflejada en el $FeHb_f$, donde el grupo SF + Vits B, C + FOS (6,07 mg Fe) fue significativamente inferior ($p < 0,05$) al grupo SF (7,55 mg Fe), y no la Hb_f (13,322 y 14,12 g/dl, respectivamente). La adición de las vitaminas B, C y FOS en este periodo de repleción no afectó a la *ERH* del SF ni tampoco a la *utilización del hierro*. Por consiguiente, el VBR del grupo SF + Vits B, C + FOS (128%) aunque fue ligeramente superior, no fue estadísticamente diferente al grupo SF (100%).

Para los grupos suplementados con la fuente de hierro PFM con/sin las vitaminas B, C + FOS, la Hb_i (5,76 y 7,50 g/dl, respectivamente) y el $FeHb_i$ (2,01 y 2,96 mg Fe, respectivamente)

fueron significativamente diferentes ($p < 0,05$), sin embargo los *pesos iniciales* (151,45 y 173,18 g, respectivamente) fueron semejantes. La *ingesta de hierro* del grupo PFM + Vits B, C + FOS (22,98 mg) fue significativamente inferior ($p < 0,05$) a la del grupo PFM (30,33 mg). A pesar de esta diferencia, la Hb_f y el $FeHb_f$ fueron muy similares. En este caso, la adición de las vitaminas B, C y FOS sí mejoró la *ERH* del PFM y la *utilización del hierro*, siendo para el grupo PFM + Vits B, C + FOS (20,35% y 1,00 mg Fe, respectivamente) significativamente superior ($p < 0,05$) al grupo PFM (13,79% y 0,68 mg Fe, respectivamente). Comparando el VBR del PFM + Vits B y C (121%) con la del PFM (82%), observamos que la biodisponibilidad del PFM está claramente favorecida cuando se adicionan las vitaminas B, C y FOS. No obstante, no debemos olvidar que estos grupos partieron de un estatus del hierro diferentes.

En el 3^{er} periodo de repleción, los grupos suplementados con la fuente de hierro SF con/sin las vitaminas B, C + FOS mostraron un estatus del hierro homogéneo. Destacar que la *ingesta total de hierro* para los grupos SF con/sin Vits B, C + FOS (43,53 y 56,78 g, respectivamente) si varió estadísticamente ($p < 0,05$), reflejándose únicamente en la Hb_f (15,23 y 14,00 g/dl, respectivamente). A diferencia de los dos periodos de repleción anteriores, la *ERH* y la *utilización del hierro* del grupo SF + Vits B, C + FOS (13,91% y 0,68 mg, respectivamente) fue significativamente diferente ($p < 0,05$) al grupo SF (10,02% y 0,49 mg, respectivamente). En este caso, el VBR del grupo SF + Vits B, C + FOS (139%) fue significativamente superior ($p < 0,05$) al del grupo SF (100%). En este caso si podemos asegurar que la adición de las vitaminas B, C y FOS favoreció la biodisponibilidad del SF.

En los grupos suplementados con la fuente de hierro PFM con/sin las vitaminas B, C y FOS, los *pesos iniciales* (175,98 y 174,18 g, respectivamente), la Hb_i (6,34 y 6,35 g/dl, respectivamente) y el $FeHb_i$ (2,66 y 2,56 mg, respectivamente) no mostraron diferencias entre ellos, por lo que ambos grupos presentaron un estatus del hierro muy homogéneo. Al final del periodo, únicamente se observaron diferencias en la *ERH* y la *utilización del hierro*, siendo para el grupo PFM + Vits B, C + FOS (11,08% y 0,52 mg Fe, respectivamente) significativamente superiores al grupo PFM (8,09% y 0,40 mg Fe, respectivamente). En cierta manera, el efecto de las vitaminas B, C y FOS sobre la biodisponibilidad del PFM fue claramente significativo, esto se refleja en los valores del VBR, siendo para el grupo PFM + Vits B y C (111%) y para el grupo PFM (82%) en relación al SF (100%).

En general, si nos fijamos en la recuperación de la anemia observando la Hb_f en cada periodo de repleción, observamos que desde el 1^{er} periodo los niveles de Hb_f fueron $> 11,1$ g/dl, a excepción del grupo SF + Vits B, C + FOS cuyo valor fue $< 11,1$ g/dl. Para el grupo PFM + Vits B, C + FOS, la Hb_f aumentó significativamente ($p < 0,05$) durante el 2^o y 3^{er} periodo, y en el caso del grupo SF + Vits B, C + FOS no fue hasta el 3^{er} periodo, cuando alcanzó los niveles más

elevados en relación a los dos periodos anteriores. En el caso de la *ERH* y la *utilización del hierro*, los valores más elevados tuvieron lugar en el 1^{er} periodo de repleción, coincidiendo con la etapa donde las necesidades para el hierro eran las más elevadas, mientras que el 2^o y 3^{er} periodo estos valores disminuyeron de manera significativa ($p < 0,05$), coincidiendo con los periodos donde la *ingesta de hierro* fue mayor. Por tanto, la adición de las vitaminas B, C y FOS, favoreció la biodisponibilidad de los compuesto de hierro, aunque únicamente lo podemos afirmar tras un periodo de repleción de 17 días, ya que en periodos más cortos de tiempo los grupos no presentaban un estado nutricional del hierro homogéneo, a excepción del 2^o Periodo de repleción, donde los grupos SF con/sin Vits B, C + FOS, con un estado nutricional del hierro muy similar, la biodisponibilidad del SF no se vio favorecida por la adición de las vitaminas B, C y los FOS.

Tabla 5.6. Eficiencia de regeneración de la hemoglobina (ERH), utilización del hierro y valor biológico relativo (VBR) en ratas anémicas, tras la administración del SF o PFM con/sin Vits B, C y FOS en un néctar de frutas, durante los tres periodos de repleción.

Néctar		Ganancia de peso (g)	Ingesta Fe (mg)	Hgb inicial (g/dL)	Hgb final (g/dL)	Fe Hgb inicial ¹ (mg)	Fe Hgb final ¹ (mg)	ERH ² (%)	Utilización del hierro ³ (mg)	VBR ⁴
Repleción										
1er Periodo	SF	10,30 ± 4,33	7,42 ± 1,98	7,88 ± 0,81	11,68 ± 0,98	2,82 ± 0,91	4,21 ± 1,23	20,55 ± 4,27	1,01 ± 0,21	100
	SF + Vits ¹ + FOS	9,86 ± 1,54	4,02 ± 0,51*	6,00 ± 0,36*	9,72 ± 0,47*	1,51 ± 0,18*	2,62 ± 0,12*	28,36 ± 4,40	1,40 ± 0,22	138
	PFM	12,47 ± 2,65	9,88 ± 4,21	7,75 ± 0,78	11,35 ± 1,91	2,79 ± 0,57	4,22 ± 1,06	14,80 ± 3,17	0,73 ± 0,16	72
	PFM + Vits ¹ + FOS	9,15 ± 3,55	4,40 ± 0,82	6,77 ± 0,95	11,60 ± 0,00	1,71 ± 0,24*	3,00 ± 0,13	29,12 ± 2,23*	1,43 ± 0,11*	142
2º Periodo	SF	38,05 ± 3,96	27,47 ± 4,78	7,62 ± 0,16	14,12 ± 0,37	3,05 ± 0,76	7,55 ± 0,77	16,85 ± 5,06	0,83 ± 0,25	100
	SF + Vits ¹ + FOS	48,98 ± 6,41	17,91 ± 0,90*	6,15 ± 0,89	13,32 ± 0,47	2,12 ± 0,31	6,07 ± 0,30*	21,52 ± 2,75	1,06 ± 0,14	128
	PFM	42,12 ± 6,97	30,33 ± 2,72	7,50 ± 0,37	14,47 ± 0,61	2,96 ± 0,50	7,09 ± 0,78	13,79 ± 2,79	0,68 ± 0,14	82
	PFM + Vits ¹ + FOS	61,23 ± 4,25*	22,98 ± 0,64*	5,76 ± 0,67	13,93 ± 0,24	2,01 ± 0,24*	6,65 ± 0,18	20,35 ± 1,37*	1,00 ± 0,07*	121
3er Periodo	SF	80,50 ± 15,73	56,78 ± 4,58	6,33 ± 0,40	14,00 ± 0,42	2,30 ± 1,13	7,94 ± 1,19	10,02 ± 1,96	0,49 ± 0,09	100
	SF + Vits ¹ + FOS	75,88 ± 4,85	43,53 ± 1,41*	6,70 ± 0,45	15,23 ± 0,24*	2,91 ± 0,26	8,93 ± 0,21	13,91 ± 0,93*	0,68 ± 0,05*	139
	PFM	64,30 ± 7,21	53,04 ± 5,95	6,35 ± 0,53	14,60 ± 0,51	2,56 ± 0,77	6,88 ± 1,45	8,09 ± 0,88	0,40 ± 0,04	82
	PFM + Vits ¹ + FOS	70,97 ± 9,03	51,60 ± 1,58	6,34 ± 0,52	14,42 ± 0,24	2,66 ± 0,20	8,09 ± 0,21	11,08 ± 0,62*	0,52 ± 0,03*	111

Cada valor es la media ± error típico, n=6. Vits¹: Vitamina C + Vitaminas B₆, B₁₂ y ácido fólico; FOS: Fructo-oligosacáridos

* La presencia de asterisco dentro de la misma columna y para cada uno de los tres periodos de repleción indica diferencias significativas (p<0,05) entre los grupos SF con/sin Vits B, C + FOS y PFM con/sin Vits B, C + FOS.

^{1/a-b} Diferentes letras dentro de la misma columna y para cada grupo suplementada con la fuente de hierro correspondiente, indican diferencias significativas (p < 0.05) entre los tres periodos de repleción.

La ausencia de superíndices indica que no existen diferencias estadísticamente significativas

¹ Fe en Hb se describe en la sección de material y métodos: mg Fe en Hb = (peso x Hb x 0,067 x 3,4).

² ERH (%) = [Fe Hb (final) – Fe Hb (inicial) x 100] / mg Fe consumido.

³ Utilización del hierro (mg) = ERH (%) x Fe en la dieta (%) / 100.

⁴ VBR = ERH (SF o PFM) con/sin Vits B + C + FOS / ERH (SF)

La ausencia de superíndices indica que no existen diferencias estadísticamente significativas.

5.3.3. Efecto de los FOS en la Biodisponibilidad y utilización del hierro

Al comparar los grupos suplementados con la fuente de hierro SF + Vits B, C con/sin FOS en el 1^{er} periodo de repleción, observamos grandes diferencias en cuanto a los *pesos iniciales*, siendo el grupo SF + Vits B, C + FOS (109,66 g) significativamente inferior ($p < 0,05$) al grupo SF + Vits B + C (202,20 g), mientras que la Hb_i fue similar ($\sim 6,00$ g/dl) en ambos grupos. La *ingesta total de hierro* por parte del grupo SF + Vits B + C (7,77 mg Fe) fue significativamente superior ($p < 0,05$) al grupos SF + Vits B, C + FOS (4,02 mg Fe). Este aumento en la ingesta, favoreció que la ganancia de la Hb y en el contenido de hierro en la Hb para el grupo SF + Vits B + C (5,74 g/dl y 3,52 mg Fe, respectivamente) fuera significativamente superior al grupo SF + Vits B, C + FOS (3,72 g/dl y 1,11 mg Fe, respectivamente). Por tanto, la *ERH* para el grupo SF + Vits B y C (51,68%) resultó significativamente superior ($p < 0,05$) al grupo SF + Vits B, C + FOS (28,36%).

Los grupos PFM + Vits B y C con/sin FOS, presentaron una Hb_i similar (6,77 y 6,50 g/dl, respectivamente), *pesos iniciales* diferentes ($p < 0,05$) (109,90 y 210,88 g, respectivamente) y el $FeHb_i$ para el grupo PFM + Vits B, C + FOS (1,71 mg Fe) significativamente inferior ($p < 0,05$) al grupo PFM + Vits B y C (3,12 mg Fe). La *ingesta de hierro* por parte del grupo PFM + Vits B + C (8,43 mg Fe) fue significativamente superior ($p < 0,05$) al grupo PFM + Vits B, C + FOS (4,40 mg Fe). Esta diferencia aunque no afectó a la Hb_f , si afectó al $FeHb_f$, siendo para el grupo PFM + Vits B + C (6,49 mg Fe) significativamente superior ($p < 0,05$) al grupo PFM + Vits B, C + FOS (3,00 mg Fe). Por tanto, la *ERH* del grupo PFM + Vits B, C + FOS (29,12%) fue significativamente inferior ($p < 0,05$) al grupo PFM + Vits B y C (44,02%). En resumen, la adición de los FOS no favoreció la *ERH* en el 1^{er} periodo de repleción.

Tras un periodo de repleción de 10 días (2^o periodo), los grupos SF + Vits B, C con/sin FOS mostraron valores muy similares en las variables: Hb_i , $FeHb_i$, *peso inicial* Hb_f , $FeHb_f$ y *ganancia de peso*. Excepto en la *ingesta total de hierro*, donde el grupo SF + Vits B, C + FOS (17,91 mg Fe) fue significativamente inferior ($p < 0,001$) al grupo SF + Vits B y C (24,49 mg Fe). La *ERH* no mostró diferencias entre ambos grupos, variando de 21,52 a 21,78%, respectivamente. La misma situación se observó en los grupos PFM + Vits B, C con/sin FOS, con una *ERH* que variaba de 20,35 a 19,96 %, respectivamente. Por tanto, podemos sugerir que tras 10 días de suplementación, la adición de los FOS no mejoró la biodisponibilidad del hierro, medido como *ERH*.

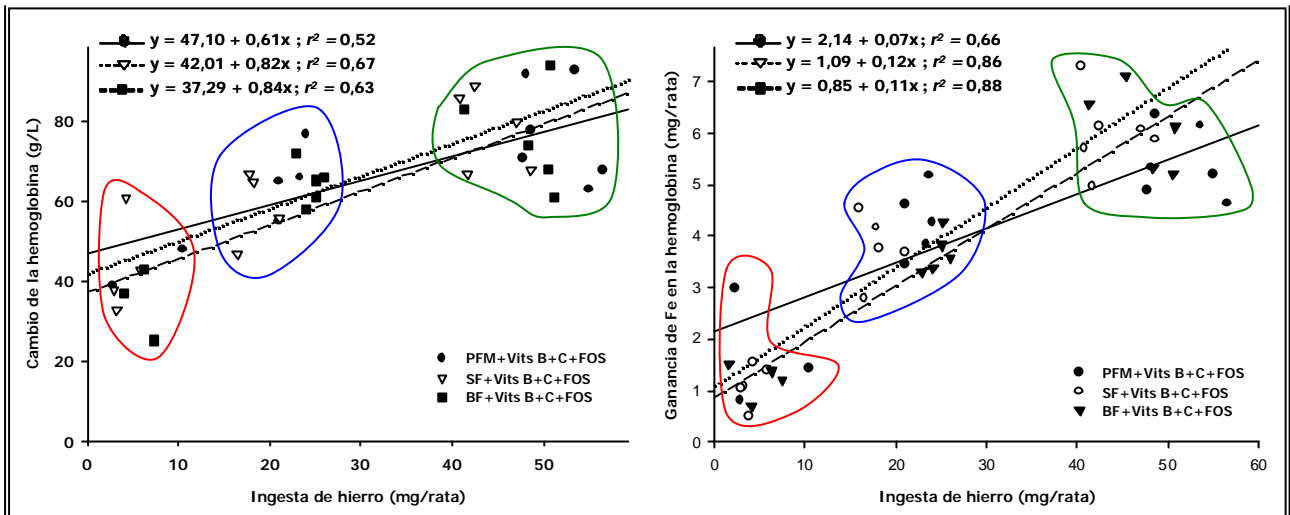
En el 3^{er} periodo de repleción, los grupos SF + Vits B, C con/sin FOS claramente se recuperaron de la anemia deficiente en hierro al alcanzar valores de $Hb_f > 11,1$ g/dl, según

valores de referencia. A pesar de que la *ingesta total de hierro* en el grupo SF + Vits B, C + FOS (43,53 g) fue significativamente superior ($p < 0,05$) al grupo SF + Vits B y C (35,23 g), el FeHb_r (8,93 mg Fe) fue significativamente inferior ($p < 0,05$) al grupo SF + Vits B y C (9,73 mg Fe). Sin embargo, la ganancia de hierro en la Hb no mostró diferencias entre los grupos, pero si en la ERH, siendo el grupo SF + Vits B, C + FOS (13,91%) el que necesitó una mayor cantidad de hierro para alcanzar la misma ganancia de hierro en la Hb que en el grupo SF + Vits B y C, cuyo valor de ERH fue 18,57%. En cambio, esta situación no se dio en los grupos PFM + Vits B y C con/sin FOS, cuyos valores de la ERH no presentaron diferencias significativas.

Estudios realizados en ratas han confirmado que la adición de los FOS a la dieta mejora la recuperación del estado nutricional del hierro en ratas anémicas (Ohta y col., 1995), y en ratas gastrectomizadas (Ohta y col., 1998 y 1999). Sin embargo, la presencia o ausencia de los FOS no marcó ninguna diferencia en los estudios citados, posiblemente debido a la baja cantidad de FOS que fue administrada (50 g/kg y 75 g/kg respectivamente), además el efecto de los prebióticos puede ser aparente, solamente cuando se añade a alimentos con un compuesto de hierro con baja biodisponibilidad, pero no cuando el compuesto de hierro tiene una alta biodisponibilidad (Yeung y col., 2005). Los estudios anteriormente mencionados y realizados en ratas emplearon un compuesto de baja biodisponibilidad, el pirofosfato férrico. En nuestro estudio los compuestos de hierro son en teoría, de elevada biodisponibilidad, en concreto el SF. En cuanto al PFM numerosos estudios han confirmado tener una biodisponibilidad similar a la del SF (Juneja y col., 2003; Sakaguchi y col., 2004; Wegmüller y col., 2004; Fidler y col., 2004b). No hemos encontrado en la literatura científica estudios en los que se haya empleado el PFM junto con los FOS, y de acuerdo con los resultados obtenidos no se observó un efecto significativo en la ERH. Por tanto, estudios posteriores deben ser realizados para poder confirmar tales resultados, en concreto aumentando la cantidad de FOS en el alimento.

5.3.4. *Relación entre las modificaciones en la hemoglobina y la ingesta de hierro.*

Siguiendo el mismo patrón que en los estudios anteriores, se realizó el análisis de regresión lineal entre las variables *ingesta de hierro* y las dos medidas de la regeneración de la Hb, ganancia ó cambio en la Hb y ganancia de hierro en la Hb (Figuras 5.1 y 5.2, respectivamente).



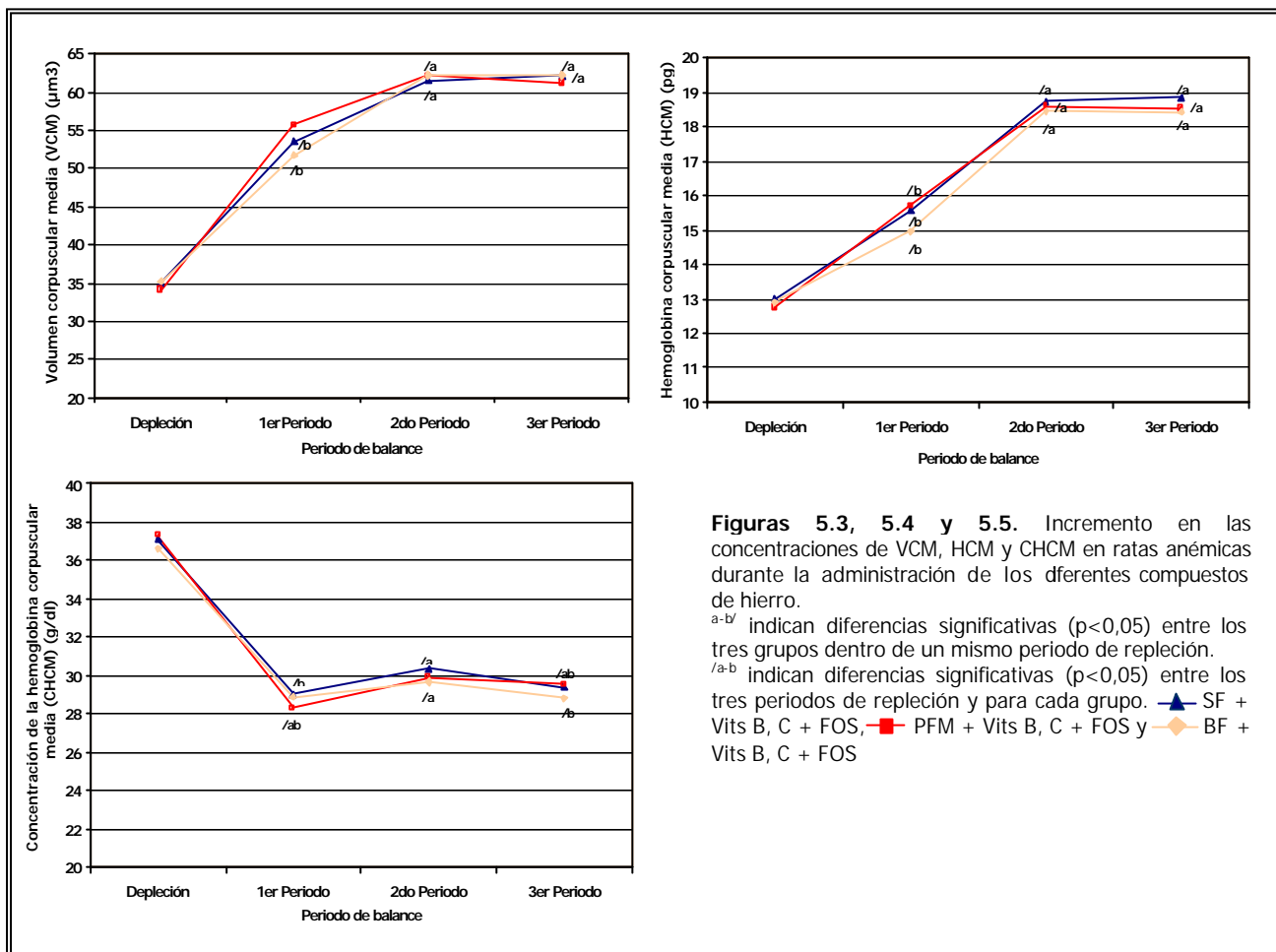
Figuras 5.1 y 5.2. Análisis de regresión lineal entre las dos medidas de la regeneración de la hemoglobina y la ingesta de hierro durante los periodos de repleción. □ 1^{er} Periodo de repleción; □ 2^o Periodo de repleción; □ 3^{er} Periodo de repleción

Entre las dos medidas de la regeneración de la hemoglobina; la ganancia de hierro en la Hb (Figura 5.2, parte derecha) mostró una mejor correlación con la ingesta que la ganancia de la Hb (Figura 5.1) para los grupos SF, PFM y BF + Vits B, C + FOS, debido a que para la ganancia de hierro en la Hb se ha tenido en cuenta las diferencias en el peso ganado, así como la expansión en el volumen de sangre durante el periodo de regeneración. En ambas Figuras (5.1 y 5.2), las dos fuentes de hierro ferrosas, SF y BF se comportaron de manera similar, mostrando un coeficiente de regresión lineal muy parecido, tanto en la Figura 5.1 ($r^2 = 0,67$ y $r^2 = 0,63$, respectivamente) con un nivel de significación de $p < 0,01$, como en la Figura 5.2 ($r^2 = 0,86$ y $r^2 = 0,88$, respectivamente) con un nivel de significación de $p < 0,0001$. Sin embargo, el grupo con la fuente de hierro PFM mostró un comportamiento muy distinto al de los otros dos grupos. No hubo una dependencia entre ambas variables.

Aunque no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos para la ganancia de hierro en la Hb, en la *ingesta total de hierro* sí las hubo. En el 2^o periodo de repleción, la *ingesta total de hierro* varió en un rango de 20 a 30 mg, mientras que en el 3^{er} periodo de repleción la *ingesta total de hierro* varió de 40 a 60 mg, para alcanzar una ganancia de hierro en la Hb muy similar (Figura 5.2). Esto nos sugiere que la incorporación del hierro por parte del SF y BF, fue progresiva en el tiempo y dependiente de la *ingesta de hierro*.

5.4. Índices hematológicos y bioquímicos

Las Figuras 5.3, 5.4 y 5.5, muestran los cambios producidos en los parámetros VCM, HCM y CHCM, respectivamente desde un estado de anemia deficiente en hierro a un estado nutricional de hierro adecuado durante los tres periodos de repleción.



Los niveles de VCM (Figura 5.3, superior izquierda) y HCM (Figura 5.4 superior derecha) en depleción fueron significativamente inferiores ($p < 0,05$) a los encontrados en repleción, en cada uno de los tres periodos y para cada grupo: PFM + Vits B, C + FOS, SF + Vits B, C + FOS y BF + Vits B, C + FOS. En el caso de los valores de la CHCM (Figura 5.5, inferior izquierda) en depleción, estos fueron significativamente superiores ($p < 0,05$) a los valores obtenidos para cada grupo y en cada periodo de repleción, aunque estos valores en depleción se encontraban dentro del rango normal (Tabla 1.5).

Los índices eritrocitarios al final del 1^{er} periodo, estaban dentro de la normalidad: VCM $> 44 \mu\text{m}^3$, HCM $> 12,0 \text{ pg}$ y para CHCM $> 21,6 \text{ g/dl}$, no observándose ninguna diferencia significativa entre los tres grupos. Al final del 2^o periodo de repleción, tampoco se observaron diferencias significativas entre los tres grupos, sin embargo, con respecto al periodo anterior si hubo diferencias. El VCM y CHCM del grupo SF + Vits B, C + FOS ($61,60 \mu\text{m}^3$ y $30,36 \text{ g/dl}$) y BF + Vits B, C + FOS ($62,20 \mu\text{m}^3$ y $29,68 \text{ g/dl}$) aumentó significativamente con respecto al periodo anterior, siendo para el grupo SF + Vits B, C + FOS ($53,60 \mu\text{m}^3$ y $29,04 \text{ g/dl}$, respectivamente) y grupo BF + Vits B, C + FOS ($51,75 \mu\text{m}^3$ y $28,87 \text{ g/dl}$, respectivamente). Con respecto al grupo PFM + Vits B, C + FOS no se observaron diferencias en el VCM y CHCM, con respecto al periodo anterior. En

cuanto a la HCM, los grupos SF, PFM y BF + Vits B, C + FOS (18,72; 18,60 y 18,44 pg, respectivamente) aumentaron significativamente ($p < 0,05$) con respecto al periodo anterior (15,56; 15,70 y 14,95 pg, respectivamente). Al finalizar el 3^{er} periodo de repleción, los tres grupos mostraban valores muy similares entre ellos en los tres parámetros, no existiendo diferencias con respecto al periodo anterior.

En general, los índices eritrocitarios se recuperaron desde el 1^{er} periodo de repleción para ambos grupos. Como se ha comentado en apartados anteriores, los parámetros relacionados con la regeneración de la Hb, como la ganancia de la Hb y la ganancia del hierro en la Hb no mostraron diferencias entre los grupos en cada periodo de repleción, por lo que la incorporación del hierro para la síntesis de la hemoglobina fue regular para ambas fuentes de hierro, no observándose ninguna alteración morfológica en los eritrocitos, de acuerdo con los parámetros analizados. Además, la recuperación de un estado de anemia deficiente en hierro, desde el punto de vista hematológico, ocurrió tras 3 días de suplementación, pero los valores más elevados tuvieron lugar entre los 10 y 17 días de suplementación.

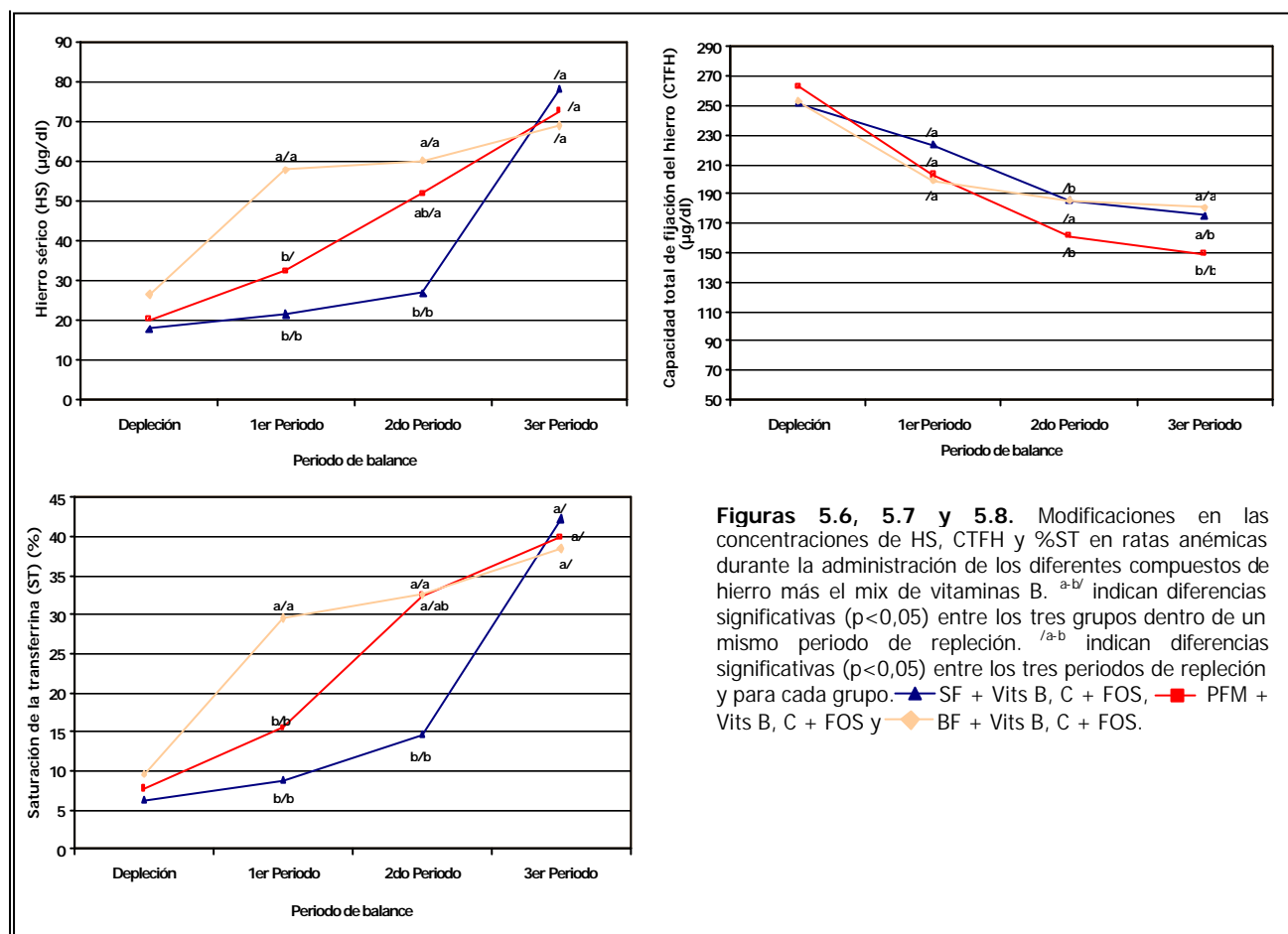
En las Figuras 5.6, 5.7 y 5.8, se representan los parámetros relacionados con el transporte del hierro: HS, CTFH y %ST respectivamente, para cada grupo suplementado con SF, PFM y BF + Vits B, C + FOS en cada uno de los tres periodos de repleción.

Fue evidente que la deficiencia en hierro (periodo de depleción) contribuyó a la anemia, observándose los típicos síntomas de la anemia deficiente en hierro tales como el descenso de la hemoglobina (Tabla 5.5), la concentración del hierro sérico (Figura 5.6), y el aumento en la capacidad total de fijación del hierro (Figura 5.7) (Baynes y Bothwell, 1990).

La Figura 5.6 (superior izquierda), representa las concentraciones de HS de los tres grupos SF, PFM y BF + Vits B, C + FOS, en cada uno de los periodos de repleción. Al final del 1^{er} periodo de repleción, los niveles de HS en los grupos PFM y BF + Vits B, C + FOS (32,50 y 58,00 $\mu\text{g/dl}$, respectivamente) aumentaron significativamente con respecto al periodo de depleción, en cambio, el grupo SF + Vits B, C + FOS, presentó un valor muy próximo al periodo de depleción (21,50 $\mu\text{g/dl}$).

Dentro de los niveles tan bajos, el grupo BF + Vits B, C + FOS fue significativamente superior ($p < 0,05$) a los otros dos grupos. Tras un periodo de 10 días (2^o periodo de repleción), los niveles de HS aumentaron significativamente para el grupo PFM + Vits B, C + FOS (52,00 $\mu\text{g/dl}$) y para el grupo BF + Vits B, C + FOS (60,33 $\mu\text{g/dl}$), con respecto al periodo anterior, sin embargo el grupo SF + Vits B, C (27,00 $\mu\text{g/dl}$) no mostró diferencias significativas. Después de 17 días de repleción (3^{er} periodo de repleción), los niveles de HS para el grupo SF + Vits B y C (78,25 $\mu\text{g/dl}$)

experimentaron un notable aumento con respecto al periodo anterior, al igual que el grupo PFM + Vits B, C + FOS (72,75 µg/dl). En el caso del grupo BF + Vits B, C + FOS, los valores de HS (69,17 µg/dl) no aumentaron significativamente.



Es importante destacar, que todos los grupos, al final del periodo de depleción, mostraron valores para la CTFH normales, esto nos llevó a pensar que pudo haber existido un fallo en la utilización del hierro sin haber llegado a una anemia por deficiencia de hierro, situación que tiene lugar tras una anemia por enfermedad crónica. En este tipo de anemia, los eritrocitos son generalmente normocrómicos y normocíticos pero pueden ser ligeramente hipocrómicos y microcíticos debido a la deficiencia de hierro (Ganz, 2006). En nuestro caso, los eritrocitos fueron normocíticos (VCM normal) y normocrómicos (CHCM normal), pero los valores de HS y CTFH fueron bajos, en cada uno de los periodos de repliación. En cuanto a los valores de la CTFH (Figura 5.7, superior derecha) al final del 1^{er} periodo de repliación, fueron para el grupo SF + Vits B, C + FOS (223,50 µg/dl), para el grupo PFM + Vits B, C + FOS (202,67 µg/dl) y para el grupo BF Vits B, C + FOS (199,25 µg/dl), no existiendo diferencias significativas entre ellos.

En el 2^o periodo de repliación, la CTFH de los grupos SF + Vits B, C + FOS (185,50 µg/dl) y PFM + Vits B, C + FOS (161,20 µg/dl) disminuyeron de manera significativa ($p < 0,05$) con respecto al periodo anterior. Sin embargo, el grupo BF + Vits B, C + FOS (185,67 µg/dl) su

disminución no fue significativa con respecto al 1^{er} periodo. En el último periodo de repleción, la CTFH siguió disminuyendo pero sin presentar diferencias significativas. Sin embargo, si hubo diferencias entre ellos, siendo el grupo PFM + Vits B, C + FOS (149,00 µg/dl) significativamente inferior ($p < 0,05$) a los otros dos grupos; SF + Vits B, C + FOS (175,25 µg/dl) y BF + Vits B, C + FOS (180,50 µg/dl).

De acuerdo con lo comentado anteriormente, cuando el HS y la CTFH están reducidas por una posible anemia por enfermedad crónica, la saturación de la transferrina se encuentra normal o disminuida. En la Figura 5.8 (inferior izquierda) se muestran los %ST para los grupos SF, PFM y BF + Vits B, C + FOS al final de cada periodo de repleción. Como se puede observar al final del 1^{er} periodo, el %ST para el grupo BF + Vits B, C + FOS (29,62%) fue significativamente superior ($p < 0,05$) al de los grupos SF y PFM + Vits B, C + FOS (8,81 y 15,57%, respectivamente). Peter y Wang (1981), determinaron que la saturación de la transferrina era un buen indicador en la detección de la deficiencia en hierro frente a la determinación de la ferritina, cuando los niveles de HS son bajos y la CTFH normal. Por lo tanto, el grupo SF + Vits B, C + FOS fue el único grupo que prevaleció con una anemia deficiente en hierro, ya que valores $< 15\%$ en el %ST indican que la síntesis de la hemoglobina está dañada (NCCLS, 1995), coincidiendo con una $Hb_f < 11,1$ g/dl (Tabla 1.5).

En el 2^o periodo de repleción, el grupo PFM + Vits B, C + FOS experimentó un aumento considerable (32,47%) muy similar al del grupo BF + Vits B, C + FOS (32,57%). Sin embargo, el grupo SF + Vits B, C + FOS siguió mostrando valores $< 15\%$ (14,64%) y significativamente inferior ($p < 0,05$) a los otros dos grupos.

En el último periodo de repleción, los %ST aumentaron con respecto al 2^o periodo de repleción, pero este aumento solamente fue significativo para el grupo SF + Vits B, C + FOS (41,32%). Además, en este periodo de repleción los tres grupos no mostraron diferencias significativas entre ellos.

5.4.1. Efecto de la adición de las vitaminas B, C y FOS en los índices hematológicos y bioquímicos

En este apartado, para poder observar si la adición de las vitaminas B, C y FOS al néctar con las fuentes de hierro (SF y PFM) mejoraban los índices hematológicos y bioquímicos, comparamos el 1^{er} Estudio frente al 5^o Estudio. La fuente de hierro BF no se estudió, debido a que no se utilizó en el 1^{er} Estudio.

Durante el 1^{er} periodo de repleción, únicamente el VCM y CHCM del grupo PFM + Vits B, C + FOS (55,64 µm³ y 28,30 g/dl, respectivamente) mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) con

respecto al grupo PFM (44,50 μm^3 y 30,33 g/dl, respectivamente), mientras que los grupos SF con/sin Vits B, C + FOS obtuvieron valores muy similares. Los valores de HS en los grupos PFM con/sin Vits B, C + FOS y SF con/sin Vits B, C + FOS fueron inferiores al valor de referencia (Tabla 1.5). En cuanto a la CTFH, los grupos PFM + Vits B, C + FOS y SF + Vits B, C + FOS (202,67 y 223,50 $\mu\text{g/dl}$, respectivamente) fueron significativamente inferior ($p < 0,05$) a los obtenidos por los grupos PFM y SF (588,33 y 513,40 $\mu\text{g/dl}$, respectivamente). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el %ST.

En el 2º periodo de repleción, el VCM en los grupos PFM + Vits B, C + FOS y SF + Vits B, C + FOS (62,17 y 61,60 μm^3 , respectivamente) fue significativamente superior a los grupos PFM y SF (55,67 y 58,00 μm^3 , respectivamente). Por algún motivo, los niveles de HS y CTFH para los grupos PFM + Vits B, C + FOS (52,00 μm^3 y 161,20 g/dl, respectivamente) y SF + Vits B, C + FOS (27,00 μm^3 y 185,50 g/dl, respectivamente) no variaron con respecto al periodo anterior, siendo significativamente inferiores ($p < 0,05$) a los grupos PFM (118,40 μm^3 y 333,80 g/dl, respectivamente) y SF (148,00 μm^3 y 354,00 g/dl, respectivamente). A pesar de estas diferencias, el %ST para el grupo PFM + Vits B, C + FOS (32,47%) no varió con respecto al grupo PFM (42,25%), pero en cambio, si hubo diferencias claramente significativas ($p < 0,05$) para los otros grupos, SF + Vits B, C + FOS (14,64%) y SF (44,77%).

En el 3º periodo de repleción, el VCM y HCM para el grupo PFM + Vits B, C + FOS (61,20 μm^3 y 18,52 g/dl, respectivamente) fueron significativamente superiores ($p < 0,05$) al grupo PFM (55,00 μm^3 y 16,73 g/dl, respectivamente). Sin embargo, para el HS, CTFH y %ST el grupo PFM + Vits B, C + FOS (83,60 $\mu\text{g/dl}$, 149,00 $\mu\text{g/dl}$ y 39,90%, respectivamente) obtuvo valores significativamente inferiores ($p < 0,05$) al grupo PFM (182,33 $\mu\text{g/dl}$, 322,00 $\mu\text{g/dl}$ y 57,25%, respectivamente). Una situación diferente tuvo lugar para el grupo SF + Vits B, C + FOS, el cual presentó valores muy similares a los alcanzados por el grupo SF, excepto para el parámetro CTFH, donde el grupo SF + Vits B, C + FOS (175,25 $\mu\text{g/dl}$) fue significativamente inferior ($p < 0,05$) al grupo SF (310,50 $\mu\text{g/dl}$). Esta situación puede estar relacionada con una alteración en el transporte del hierro.

En general, la adición de las vitaminas B, C y FOS al néctar enriquecido con las diferentes fuentes de hierro (SF y PFM) mejoró los índices eritrocitarios, en especial el VCM. Sin embargo, no mejoraron los parámetros de HS y CTFH, los cuales fueron en todos los periodos de repleción significativamente inferiores a los dos grupos sin las vitaminas B, C y FOS.

5.4.2. Efecto de los FOS en los índices hematológicos y bioquímicos

Al comparar los grupos PFM + Vits B, C con/sin FOS durante los tres periodos de repleción, únicamente se observaron diferencias significativas en los parámetros HS y CTFH, mientras que los índices eritrocitarios mostraron valores semejantes. Es decir, durante el 1^{er} periodo de repleción, los valores de HS y CTFH para el grupo PFM + Vits B, C + FOS (32,50 y 202,67 µg/dl, respectivamente) fueron significativamente inferiores ($p < 0,05$) a los obtenidos por el grupo PFM + Vits B + C (99,50 y 702,75 µg/dl, respectivamente). Sin embargo, el %ST fue muy similar en ambos grupos.

En el 2^o periodo de repleción, se mantuvieron las mismas diferencias en los valores de HS y CTFH, siendo para el grupo PFM + Vits B, C + FOS (52,00 y 161,20 µg/dl, respectivamente) significativamente inferior ($p < 0,05$) al grupo PFM + Vits B + C (144,33 y 330,40 µg/dl, respectivamente). La misma situación tuvo lugar en el 3^{er} periodo de repleción, donde el grupo PFM + Vits B, C + FOS (83,60 y 149,00 µg/dl, respectivamente) mostraron valores significativamente inferiores ($p < 0,05$) al grupo PFM + Vits B + C (145,60 y 371,00 µg/dl, respectivamente). En condiciones normales, un tercio de la transferrina está saturada con hierro, por tanto los valores normales estarían entre un 30-35%, coincidiendo con los %ST de ambos grupos.

Por otro lado, en los grupos SF + Vits B y C con/sin FOS se observaron más diferencias entre los parámetros analizados. En el 1^{er} periodo de repleción, la HCM y CHCM del grupo SF + Vits B, C + FOS (15,56 pg y 29,04 g/dl, respectivamente) fueron significativamente inferiores ($p < 0,05$) al grupo SF + Vits B y C (18,08 pg y 30,60 g/dl, respectivamente). Además, el HS y la CTFH del grupo SF + Vits B, C + FOS (21,50 y 223,50 µg/dl, respectivamente) fueron significativamente inferiores ($p < 0,05$) al grupo SF + Vits B y C (104,00 y 398,25 µg/dl, respectivamente).

En el 2^o periodo de repleción, el VCM, HCM, CHCM, HS, CTFH y %ST del grupo SF + Vits B, C + FOS (61,60 µm³, 18,72 pg, 30,36 g/dl, 27,00 µg/dl, 185,50 µg/dl y 14,64%, respectivamente) fueron significativamente inferiores ($p < 0,05$) al grupo SF + Vits B y C (65,50 µm³, 20,97 pg, 31,35 g/dl, 148,20 µg/dl, 331,83 µg/dl 34,31%, respectivamente). Y en el último periodo de repleción, solamente el HS y la CTFH para el grupo SF + Vits B, C + FOS (90,60 y 175,25 µg/dl, respectivamente) alcanzaron valores significativamente inferiores ($p < 0,05$) al grupo SF + Vits B y C (164,00 y 377,75 µg/dl, respectivamente).

Tradicionalmente, los marcadores bioquímicos estándar del metabolismo del hierro han sido el hierro sérico (HS), la transferrina ó CTFH, la saturación de la transferrina (%ST), ferritina, y más recientemente el receptor de la transferrina sérica. Además, para el diagnóstico de la anemia deficiente en hierro, se basa en los niveles de hemoglobina bajos y los cambios en la morfología

de los eritrocitos (hipocromía y microcitos) en conjunción con la baja ferritina sérica, el % ST disminuido, o el aumento en los niveles de los receptores de la transferrina sérica (Thomas y Thomas., 2002). Por tanto, pudimos observar que los grupos suplementados con la fuente de hierro PFM + Vits B y C con/sin FOS, recuperan su morfología normal desde el 1^{er} periodo de repleción, mientras que los parámetros que evalúan el transporte del hierro mostraron notables diferencias y, sin embargo el %ST, que es un indicativo del suministro del hierro a la médula ósea, indicó valores normales. De acuerdo con este hecho, la adición de los FOS no supuso ningún efecto desde el punto de vista bioquímico. Al igual que los otros dos grupos, SF + Vits B y C con/sin FOS, mostraron el mismo comportamiento para los índices eritrocitarios, pero para los otros parámetros y en concreto para el %ST, no fue hasta el 3^{er} periodo de repleción cuando alcanzó un valor normal. Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Ohta y col (1995), los cuales observaron que la adición de los FOS no afecta a los niveles de HS, CTFH y por tanto al %ST.

5.5. Almacenamiento del hierro.

La Tabla 5.7 muestra las concentraciones de hierro en las diferentes piezas anatómicas durante el 1^{er} y 3^{er} periodo de repleción entre los grupos suplementados con SF, PFM y BF + Vits B, C y FOS.

Tal y como se muestra en la Tabla 5.7, al final del 1^{er} periodo de repleción únicamente se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en la concentración de hierro del hígado, siendo el grupo PFM + Vits B, C + FOS (0,62 mg Fe/g p.s.) significativamente superior ($p < 0,05$) a los grupos SF + Vits B, C + FOS y BF + Vits B, C + FOS (0,18 y 0,49 mg Fe/g p.s, respectivamente). Para el resto de las piezas anatómicas, la concentración de hierro fue similar entre los grupos.

Tabla 5.7. Concentración de hierro en los distintos órganos de las ratas alimentadas con SF, PFM o BF + Vits B, C + FOS, añadidos a un néctar de frutas. Los resultados se expresan en mg / g peso seco (p.s).

Néctar		Hígado	Bazo	Riñón	Corazón	Intestino delgado
Repleción						
1 ^{er} Balance	SF + Vits + FOS	0,18 ± 0,04 ^{c/b}	2,88 ± 0,70 ^{/b}	1,97 ± 0,31 ^{/b}	3,47 ± 1,11	0,24 ± 0,04
	PFM + Vits + FOS	0,62 ± 0,09 ^a	1,55 ± 0,24 ^{/b}	2,23 ± 0,54	2,77 ± 0,98	0,32 ± 0,07
	BF + Vits + FOS	0,49 ± 0,01 ^{b/b}	4,26 ± 1,46 ^{/b}	3,37 ± 0,78 ^{/a}	2,73 ± 0,16 ^{/a}	0,16 ± 0,06
3 ^{er} Balance	SF + Vits + FOS	0,95 ± 0,05 ^{/a}	11,35 ± 2,55 ^{/a}	3,72 ± 0,54 ^{a/a}	1,59 ± 0,16	0,39 ± 0,09 ^a
	PFM + Vits + FOS	0,94 ± 0,11	13,17 ± 3,65 ^{/a}	1,69 ± 0,14 ^b	1,54 ± 0,06	0,25 ± 0,04 ^b
	BF + Vits + FOS	1,03 ± 0,01 ^{/a}	11,89 ± 3,22 ^{/a}	1,13 ± 0,37 ^{b/b}	1,23 ± 0,08 ^{/b}	0,10 ± 0,01 ^c

Cada valor es la media ± error típico, n=6. Vits: Vitamina C + Vitaminas B₆, B₁₂ y ácido fólico; FOS: Fructo-oligosacáridos

^{a-b} Diferentes letras dentro de la misma columna y para cada uno de los tres periodos de repleción indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos SF, PFM y BF + Vits B, C + FOS.

^{/a-b} Diferentes letras dentro de la misma columna y para cada grupo suplementado con la fuente de hierro correspondiente, indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tres periodos de repleción.

La ausencia de superíndices indica que no existen diferencias estadísticamente significativas

En el 3^{er} periodo de repleción, la concentración de hierro en el riñón e intestino delgado del grupo SF + Vits B, C + FOS (3,72 y 0,39 mg Fe/g p.s, respectivamente) fue significativamente superior ($p < 0,05$) a los grupos PFM + Vits B, C + FOS (1,69 y 0,25 mg Fe/g p.s, respectivamente) y BF + Vits B, C + FOS (1,13 y 0,10 mg Fe/g p.s, respectivamente). Además, hubo un aumento en la concentración de hierro en ciertas piezas anatómicas a medida que aumentaba el periodo de repleción. Analizando de manera independiente cada uno de los grupos, pudimos observar que en el caso del grupo SF + Vits B, C + FOS, la concentración de hierro en el hígado, bazo y riñón en el 3^{er} periodo de repleción (0,95; 11,35 y 3,72 mg Fe/g p.s, respectivamente) aumentó significativamente ($p < 0,05$) con respecto al 1^{er} periodo (0,18; 2,88 y 1,97 mg Fe/g p.s, respectivamente), este aumento estuvo correlacionado de manera inversa con el *porcentaje de la absorción aparente*, siendo para el caso del hígado ($r = - 0,981$; $p < 0,001$), bazo ($r = - 0,760$; $p < 0,05$) y riñón ($r = -0,778$; $p < 0,05$).

En el caso del grupo PFM + Vits B, C + FOS, únicamente hubo diferencias en la concentración de hierro en el bazo, siendo en el 1^{er} periodo (1,55 mg Fe/g p.s) significativamente inferior ($p < 0,05$) al 3^{er} periodo (13,17 mg Fe/g p.s). En el grupo BF + Vits B, C + FOS, la concentración de hierro en el hígado y bazo en el 1^{er} periodo (0,49 y 4,26 mg Fe/g p.s, respectivamente) fue significativamente inferior ($p < 0,05$) a los valores obtenidos en el 3^{er} periodo (1,03 y 11,89 mg Fe/g p.s, respectivamente), en cambio en el caso del riñón y corazón tuvo lugar un efecto contrario, es decir, en el 1^{er} periodo (3,37 y 2,73 mg Fe/g p.s, respectivamente) la concentración de hierro del riñón y corazón fue significativamente superior ($p < 0,05$) al 3^{er} periodo (1,13 y 1,23 mg Fe/g p.s, respectivamente). El aumento en la concentración de hierro en el hígado y bazo estuvo correlacionado inversamente con el *porcentaje de la absorción aparente*, siendo en el caso del hígado ($r = - 0,802$; $p < 0,05$) y para el bazo ($r = - 0,844$; $p < 0,01$). Este efecto puede estar relacionado con el hecho de que la tasa de absorción está inversamente relacionada con la concentración de la ferritina sérica, un índice de las reservas corporales (Magnusson y col., 1981; Taylor y col., 1988; Lynch y col., 1989; Hallberg y col., 1997).

Como conclusión, durante el 1^{er} periodo de repleción, y tomando como referencia el grupo SF + Vits B, C + FOS, los grupos PFM + Vits B, C + FOS y BF + Vits B, C + FOS fueron más eficaces incrementando las reservas de hierro, incluso cuando los *porcentajes de absorción aparente* eran similares. Sin embargo esta situación no se dio en 3^{er} periodo, donde las concentraciones de hierro en el hígado fueron similares al igual que los *porcentajes de absorción aparente*.

5.5.1. Efecto de las vitaminas B, C y FOS en el almacenamiento del hierro.

Para observar si la adición de las vitaminas B, C y FOS en el néctar enriquecido con las diferentes fuentes de hierro (SF y PFM) tienen algún efecto en el almacenamiento del hierro en las distintas piezas anatómicas, compararemos las concentraciones de hierro en los órganos analizados de los grupos SF y PFM con/sin Vits B, C y FOS (Tabla 5.8).

Tabla 5.8. Concentración de hierro en los distintos órganos de las ratas alimentadas con SF o PFM con/sin Vits B, C + FOS añadidos a un néctar de frutas. Los resultados se expresan en mg / g peso seco.

Néctar		Hígado	Bazo	Riñón	Corazón	Intestino delgado
Repleción						
1^{er} Balance	SF	1,60 ± 0,66	6,54 ± 2,68	1,40 ± 0,35	1,51 ± 0,30	0,85 ± 0,31
	SF + Vits ¹ + FOS	0,18 ± 0,04*	2,88 ± 0,70*	1,97 ± 0,31	3,47 ± 1,11	0,24 ± 0,04
	PFM	0,52 ± 0,27	9,04 ± 1,65	2,14 ± 0,24	2,83 ± 0,52	0,96 ± 0,35
	PFM + Vits ¹ + FOS	0,62 ± 0,09	1,55 ± 0,24*	2,23 ± 0,54	2,77 ± 0,98	0,32 ± 0,07
3^{er} Balance	SF	1,08 ± 0,15	5,40 ± 1,68	1,36 ± 0,03	1,63 ± 0,17	0,56 ± 0,22
	SF + Vits ¹ + FOS	0,95 ± 0,05	11,35 ± 2,55*	3,72 ± 0,54*	1,59 ± 0,16	0,39 ± 0,09
	PFM	0,69 ± 0,17	7,10 ± 1,57	1,70 ± 0,45	2,15 ± 0,46	0,91 ± 0,19
	PFM + Vits ¹ + FOS	0,94 ± 0,11	13,17 ± 3,65*	1,69 ± 0,14	1,54 ± 0,06	0,25 ± 0,04

Cada valor es la media ± error típico, n=6. Vits: Vitamina C + Vitaminas B₆, B₁₂ y ácido fólico; FOS: Fructo-oligosacáridos

* La presencia de asteriscos indican diferencias significativas (p<0,05) entre los grupos SF y PFM + Vits B, C + FOS con los grupos SF y PFM, en cada periodo de balance.

Al finalizar el 1^{er} periodo de repleción, la concentración de hierro en el hígado y bazo del grupo SF + Vits B, C + FOS (0,18 y 2,88 mg Fe/g p.s, respectivamente) fue significativamente inferior (p<0,05) al grupo SF (1,60 y 6,54 mg Fe/g p.s, respectivamente), mientras que para el grupo PFM + Vits B, C + FOS, la concentración de hierro en el bazo (1,55 mg Fe/g p.s) fue significativamente inferior (p<0,05) al grupo PFM (9,04 mg Fe/g p.s).

Sin embargo, en el 3^{er} periodo de repleción la concentración de hierro en el bazo en los grupos SF + Vits B, C + FOS y PFM + Vits B, C + FOS (11,35 y 13,17 mg Fe/g p.s, respectivamente) fueron significativamente superiores (p<0,05) a los obtenidos por los grupos SF y PFM (5,40 y 7,10 mg Fe/g p.s, respectivamente). Por lo tanto, podemos sugerir que la adición conjunta de las vitaminas B, C y FOS produjo un notable aumento en la concentración de hierro en el bazo, mientras que en el hígado no se observó tal efecto.

5.5.2. Efecto de los FOS en el almacenamiento del hierro.

Numerosos estudios han demostrado que el consumo de prebióticos tiene un efecto favorecedor en la absorción del hierro (Delzenne y col., 1995; Ohta y col. 1995, 1998). Teniendo en cuenta la relación inversa existente entre la absorción del hierro y las reservas de hierro, en un estado de deficiencia en hierro las reservas de hierro se encuentran agotadas y por tanto la absorción del hierro estaría elevada, pero tras un periodo de repleción esta situación se invierte y

es en este punto donde nosotros queremos valorar los compuestos de hierro (SF y PFM) junto con las vitaminas B y C con/sin FOS.

Tanto en el 1^{er} como en el 3^{er} periodo de repleción, las concentraciones de hierro en el hígado y bazo, que son los órganos utilizados como indicadores del estatus del hierro corporal de la rata, no presentaron diferencias significativas entre los grupos SF + Vits B, C con/sin FOS y PFM + Vits B, C + FOS. De acuerdo con esto podemos deducir que la adición de los FOS no tuvo ningún efecto en la asimilación del hierro por parte de los órganos.

5.6. Efecto pro-oxidante del SF, PFM Y BF en combinación con las Vits B, C y FOS añadidos al néctar

La Figura 5.9 representa la producción de radicales libres en heces determinadas por la cuantificación del ácido bencenosulfínico (ABS) en los tres grupos: SF, PFM y BF + Vits B, C + FOS durante el 1^{er} y 3^{er} periodo de balance.

La producción de ABS al final del 1^{er} periodo de repleción en los grupos SF, PFM y BF + Vits B, C + FOS (0,98; 0,94 y 0,94 $\mu\text{mol/g}$ heces totales, respectivamente) no mostró diferencias significativas entre ellos. De igual manera, en el 3^{er} periodo de repleción los grupos SF, PFM y BF + Vits B, C + FOS (3,87; 2,28 y 2,97 $\mu\text{mol/g}$ heces totales, respectivamente) obtuvieron valores similares en la producción de radicales libres.

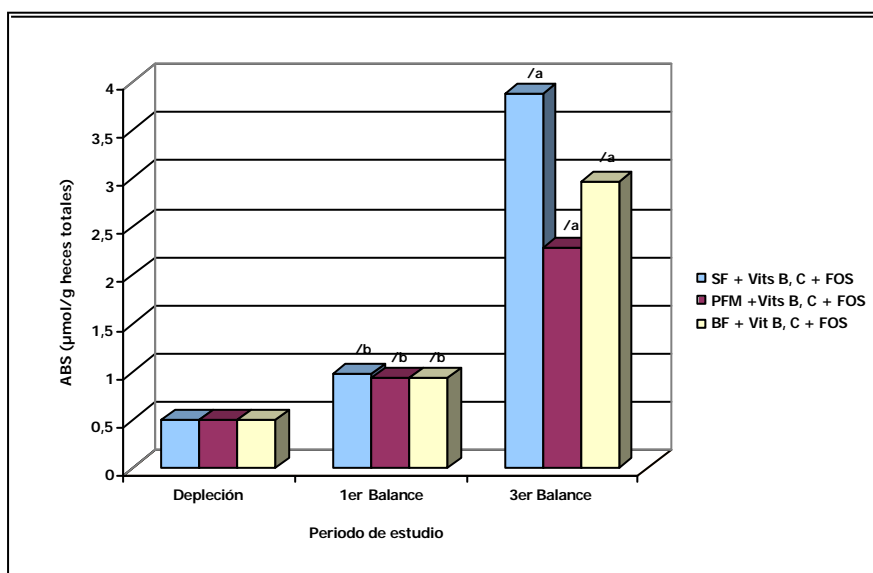


Figura 5.9. Efecto de la administración del néctar con los tres compuestos de hierro con las vitaminas B, C y FOS en la generación de radicales libres en heces, determinado por la cuantificación del ácido bencenosulfínico (ABS) como producto final en un ensayo *in vitro*.
* La presencia de asterisco muestra diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto a los grupos control (SF y PFM) en cada periodo de estudio.
/a-b Diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los dos periodos de repleción para un mismo compuesto de hierro con las vitaminas B, C y FOS.

Sin embargo, si relacionamos la producción de ABS a lo largo del tiempo, observamos que hubo una correlación positiva entre la *ingesta de hierro* y la *generación de radicales hidroxilo*, siendo para el grupo SF + Vits B, C + FOS ($r = 0,903$; $p < 0,01$), para el grupo PFM + Vits B, C + FOS ($r = 0,907$; $p < 0,01$) y para el grupo BF + Vits B, C + FOS ($r = 0,795$; $p < 0,05$). Además, se

observó una correlación positiva entre la *ingesta de hierro* y la *excreción fecal* para el grupo SF + Vits B, C + FOS ($r = 0,947$; $p < 0,001$), para el grupo PFM + Vits B, C + FOS ($r = 0,605$; $p < 0,05$) y para el grupo BF + Vits B, C + FOS ($r = 0,611$; $p < 0,05$). Por tanto, estos resultados nos indican que una elevada *ingesta de hierro* aumentó la concentración de hierro en las heces, de manera que fuera potencialmente disponible para la generación de radicales libres, aunque no se estableciera una correlación entre la *excreción fecal* y la producción de radicales hidroxilo.

5.6.1. Efecto de las vitaminas B, C y FOS en la producción de radicales libres

La Figura 5.10 representa la producción de radicales libres en heces determinadas por la cuantificación del ácido bencenosulfínico (ABS) en los grupos SF con/sin vitaminas B, C + FOS, y los grupos PFM con/sin vitaminas B, C + FOS durante el 1^{er} y 3^{er} periodo de balance.

Claramente se pudo observar que la producción del ABS (Figura 5.10) en los grupos SF con/sin Vits B, C + FOS (0,98 y 1,55 $\mu\text{mol/g}$ heces totales, respectivamente) durante el 1^{er} periodo fue muy similar, al igual que los grupos PFM con/sin Vits B, C + FOS (0,94 y 1,23 $\mu\text{mol/g}$ heces totales, respectivamente). En el 3^{er} periodo de balance, los grupos SF con/sin Vits B, C + FOS si mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) (3,87 y 2,03 $\mu\text{mol/g}$ heces totales, respectivamente), mientras que en los grupos PFM con/sin Vits B, C + FOS los resultados fueron similares.

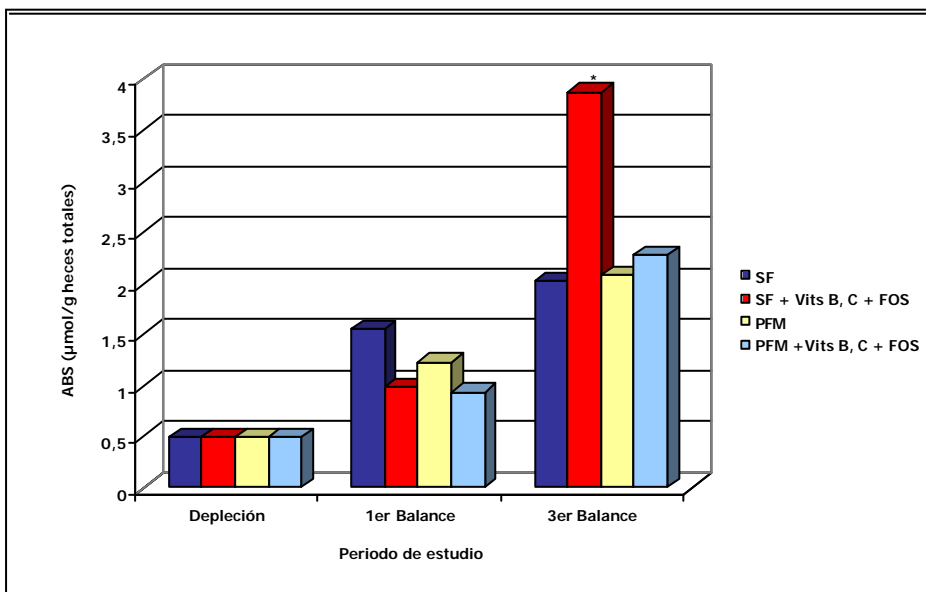


Figura 5.10. Efecto de la administración del néctar con los dos compuestos de hierro con/sin las vitaminas B, C y FOS en la generación de radicales libres en heces, determinado por la cuantificación del ácido bencenosulfínico (ABS) como producto final en un ensayo *in vitro*.

* La presencia de asterisco muestra diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto a los grupos control (SF y PFM) en cada periodo de estudio.

Como se ha comentado anteriormente, existieron correlaciones entre la *ingesta de hierro* y la producción de ABS en los grupos SF + Vits B, C + FOS y PFM + Vits B, C + FOS, en cambio en los grupos SF y PFM no se observó tal correlación. Además, el grupo SF + Vits B, C + FOS fue el único grupo en el que observamos una correlación entre la concentración de hierro en heces y la

producción de ABS ($r = 0,890$; $p < 0,01$). Este hecho nos sugiere que la administración del néctar con SF + Vits B, C + FOS, aumentó la concentración de hierro en las heces en una forma potencialmente disponible para la generación de radicales libres, relación que fue descrita por Lund y col (1999). Sin embargo, desconocemos si este aumento pudo ser debido a la acción individual de las vitaminas, a la combinación de las vitaminas B y C ó a la presencia de los FOS, este último caso será discutido en el punto posterior.

5.6.2. Efecto de los FOS en la generación de radicales hidroxilo.

La producción de ABS en los grupos SF + Vits B y C con/sin FOS (0,98 y 1,70 $\mu\text{mol/g}$ heces totales, respectivamente) fue semejante durante el 1^{er} periodo de repleción. En cambio, los grupos PFM + Vits B y C con/sin FOS (0,94 y 2,33 $\mu\text{mol/g}$ heces totales, respectivamente) si mostraron diferencias ($p < 0,05$) entre ellos.

En el 3^{er} periodo de balance, la producción de ABS por parte de los grupos SF + Vits B, C + FOS y PFM + Vits B, C + FOS (3,87 y 2,28 $\mu\text{mol/g}$ heces totales, respectivamente) aumentó de manera significativa ($p < 0,05$) con respecto al periodo anterior, mientras que en los grupos SF + Vits B + C y PFM + Vits B + C, la producción de ABS no varió. Por tanto, durante el 1^{er} y 3^{er} Periodo no observamos ningún efecto en la adición de los FOS.

Se sabe que los ácidos orgánicos producidos por la fermentación de los prebióticos (FOS) en el colon pueden facilitar la absorción del hierro por un descenso del pH y favorecer la solubilidad del hierro mediante la reducción del Fe (III) a Fe (II). Pero en cambio, un incremento en el contenido de hierro soluble (Fe^{+2}), podría aumentar la producción de radicales libres en el colon llegando a causar un daño en las células de la mucosa (Lund y col., 1999). Además, Lee y col. (2004) sugirieron que los suplementos de hierro podrían aumentar el riesgo de cáncer de colon en poblaciones donde el consumo de fibra y almidón resistente fueran elevadas, ya que la fermentación de estos substratos incrementaría las concentraciones de hierro ferroso en el colon. Sin embargo, estudios realizados en ratones con sobrecarga de hierro demostraron que la ingesta de probióticos, *Bifidobacteria* y bacterias ácido lácticas (2×10^8 UFC/animal/día), ejercen un efecto antioxidante sobre la mucosa del colon de los ratones con sobrecarga de hierro sin reducir la concentración de hierro soluble en el contenido del ciego (Ito y col., 2001; 2003). Estos resultados sugieren que el consumo de los prebióticos, los cuales favorecen la proliferación de la microflora beneficiosa intestinal en el colon, protegen a la mucosa del colon del daño oxidativo mediante un mecanismo desconocido, y sin producir un descenso en la cantidad de hierro disponible en el colon (Yeung y col., 2005). Actualmente, desconocemos las cantidades de FOS, que añadidas a la dieta podrían producir un efecto beneficioso protegiendo la mucosa del colon.

Posiblemente las dosis añadidas al néctar fueron insuficientes para poder apreciar diferencias con respecto al néctar sin FOS.

5.7. Biodisponibilidad del hierro. Método de la curva de la concentración del hierro sérico.

Los cambios en las concentraciones de hierro sérico después de la administración de los compuestos de hierro, sulfato ferroso, pirofosfato férrico micronizado y bis-glicinato ferroso junto con las vitaminas B, C y FOS se muestran en la Figura 5.11.

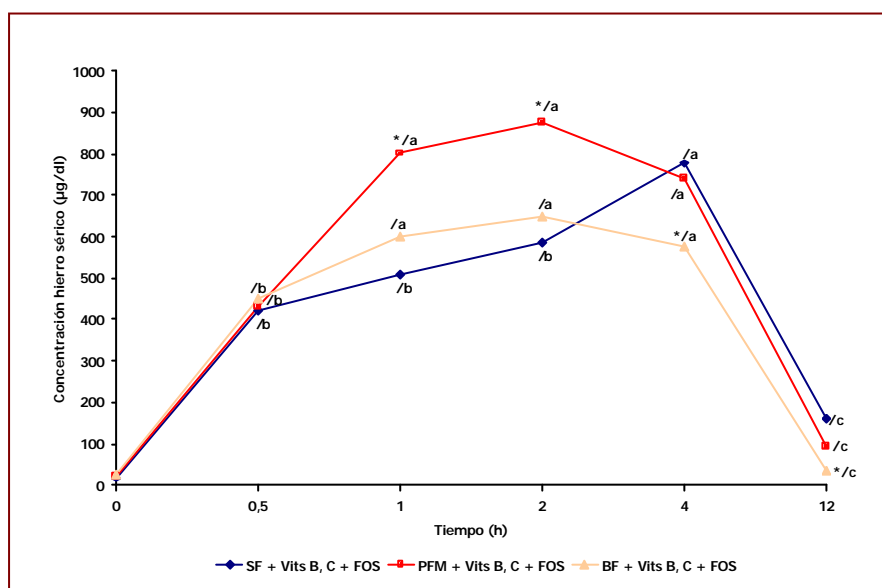


Figura 5.11. Concentración de hierro sérico después de la administración oral de 2 mg Fe/Kg como SF, PFM y BF junto con las vitaminas B, C y FOS en ratas anémicas (n = 3)
 * La presencia del asterisco en cada periodo de tiempo indica la presencia de diferencias significativas ($p < 0,05$) de los compuestos de hierro con respecto al sulfato ferroso.
 /a-c Diferencias significativas ($p < 0,05$) para un mismo grupo suplementado con la fuente de hierro correspondiente en cada periodo de tiempo.

Los niveles de hierro sérico en las ratas anémicas antes de la ingesta del sulfato ferroso, pirofosfato férrico micronizado y bis-glicinato ferroso junto con las vitaminas B, C y FOS fueron, 18.00, 20.25 y 26.57 µg/dl, respectivamente ($p > 0,05$). La concentración de hierro sérico alcanzó su pico máximo, 777 µg/dl a las 4 h para el grupo SF + Vits B, C y FOS, en cambio en los grupos PFM y BF + Vits B, C y FOS (874 y 649 µg/dl, respectivamente) el pico máximo se alcanzó a las 2 h. A los 30 minutos, la concentración de hierro sérico en los tres grupos fue similar, sin embargo, después de 1 h el grupo PFM + Vits B, C y FOS (801 µg/dl) aumentó significativamente ($p < 0,05$) con respecto a los grupos SF y BF + Vits B, C y FOS (510 y 600 µg/dl, respectivamente). Esta diferencia se mantuvo durante las 2 h, siendo el grupo PFM + Vits B, C y FOS (874 µg/dl) significativamente superior ($p < 0,05$) a los grupos SF y BF + Vits B, C + FOS (584 y 649 µg/dl, respectivamente). A las 4 h de la administración oral, la concentración del hierro sérico del grupo SF + Vits B, C + FOS (777 µg/dl) experimentó un notable aumento ($p < 0,05$) con respecto a los periodos anteriores, pero este aumento solamente fue similar al obtenido por el grupo PFM + Vits B, C + FOS (740 µg/dl) y significativamente superior ($p < 0,05$) al grupo BF + Vits B, C + FOS (576 µg/dl). A las 12 h, las concentraciones de hierro sérico en ambos grupos disminuyeron de

manera significativa con respecto al intervalo de tiempo de 0,5 – 4 h, hasta alcanzar valores muy próximos a los iniciales (tiempo 0 h).

La biodisponibilidad del hierro de los diferentes compuestos de hierro fue determinada por el método de la curva de la concentración del hierro sérico (Ekenved y col., 1976; Dietzfelbinger, 1987). Los valores del área bajo la curva (ABC) para los diferentes compuestos de hierro fueron calculados utilizando el programa WinNonlin Professional 5.0 (Pharsight Corporation, USA), mediante un análisis no compartimental. El VBR para cada compuesto de hierro fue calculado en relación al SF. Los valores medios del ABC para cada compuesto de hierro se muestran en la Tabla 5.9.

Tabla 5.9. Valor biológico relativo (VBR) de los tres compuestos de hierro medidos por el método de la curva de la concentración del hierro sérico.

Compuesto de hierro	Valor máximo ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	ABC ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	VBR (%)
SF + Vits B, C + FOS	777 \pm 28,91 ^b	5998,50 \pm 32,51 ^a	100 ^a
PFM + Vits B, C + FOS	874 \pm 29,16 ^a	6207,81 \pm 40,12 ^a	103 ^a
BF + Vits B, C + FOS	649 \pm 17,77 ^c	4679,64 \pm 29,71 ^b	78 ^b

Valor medio \pm error típico, n=4

Valor máximo es el pico de hierro sérico alcanzado por cada compuesto de hierro.

ABC (Área bajo la curva)

VBR es el ABC de cada compuesto de hierro relativo al del Sulfato ferroso.

^{a-c} Diferentes letra dentro de una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

El periodo de liberación para el grupo PFM + Vits B, C + FOS fue prolongado, mostrando elevadas concentraciones de hierro sérico durante las cuatro primeras horas, aunque no se determinaron los valores de hierro sérico a las 8h, probablemente en ese tiempo mostrara también elevadas concentraciones. Por tanto, esto sugiere una liberación continuada del hierro al suero. Además, el elevado valor de ABC confirma la elevada absorción y biodisponibilidad del PFM. Esta situación probablemente se deba a las características físico-químicas del compuesto, es decir, a su encapsulación con emulsificadores y a su reducido tamaño de partícula. En cuanto al BF + Vits B, C + FOS, presentó un patrón muy similar al del PFM + Vits B, C + FOS, pero con la diferencia de que sus valores de hierro sérico en cada periodo de tiempo fueron inferiores. La absorción y biodisponibilidad del hierro, para este compuesto, fue inferior a la del PFM + Vits B, C + FOS, tal y como se representa por el valor del ABC. Con respecto al SF + Vits B, C + FOS, la cinética del hierro sérico fue diferente a los otros dos grupos, presentando una liberación del hierro sérico más escalonada en el tiempo y alcanzando su pico máximo a las 4 h. El valor del ABC fue muy similar (Tabla 5.9) al del grupo PFM + Vits B, C + FOS.

Estos valores fueron similares a los obtenidos por Sakaguchi y col. (2004), empleando este método, pero con la diferencia de que las ratas utilizadas no fueron anémicas. Como en nuestro estudio, el compuesto de hierro PFM fue el que mostró una mejor biodisponibilidad frente a otros

compuestos como el sulfato ferroso, pirofosfato férrico y citrato ferroso sódico. Destacar que en nuestro caso, los grupos estaban suplementados con las fuentes de hierro y vitaminas B, C y FOS por lo que los resultados podrían no ser realmente comparables a los reflejados en el estudio de Sakaguchi y col. (2004). Aunque hay algunas cuestiones relacionadas con el significado real de los niveles de hierro sérico, éstos representan la absorción, transporte y liberación del hierro desde el torrente sanguíneo. En cualquier momento, la cantidad de hierro encontrada en el suero es considerada una función del hierro que entra y sale del torrente sanguíneo (Da Silva y col., 2004) y depende no solamente del hierro absorbido sino también de la tasa de liberación en sangre (Hallberg y Solvell, 1965; Heindrich, 1970).

En general, el PFM alcanzó niveles de hierro sérico significativamente más elevados ($p < 0,05$) entre el intervalo de 1 – 2 h y el máximo valor, cuando lo comparamos con el SF. Esto podría significar una mayor absorción y/o más elevada biodisponibilidad y/o elevado suministro de hierro a los tejidos desde el PFM que los otros compuestos de hierro (Da Silva y col., 2004). El BF, presentó un comportamiento muy similar al del SF durante las primeras 4 h, pero a partir de ese periodo de tiempo, mostró valores significativamente inferiores al SF, por lo que podemos suponer que su liberación a los tejidos fue más lenta.

VI. DISCUSIÓN GENERAL

Análisis de Conglomerados (CLUSTER)

El término *análisis de conglomerados*, o *análisis cluster* tiene como objetivo lograr una clasificación o agrupamiento de los individuos en grupos homogéneos, según el comportamiento de éstos en una serie de variables. De esta manera, los elementos que forman parte de estos grupos deben ser muy similares (alta homogeneidad interna) y, a su vez, muy diferentes con relación al resto de agrupamientos (alta heterogeneidad entre grupos). En definitiva, se trata de clasificar una población (definida por unas características determinadas) en el menor número posible de grupos (conglomerados) mutuamente exclusivos y exhaustivos.

En nuestro caso, pretendemos clasificar los diferentes tipos de néctar en grupos homogéneos, en función de una serie de variables que hemos considerado las más idóneas y las que resumen los principales objetivos del presente trabajo. Estas variables fueron: el *porcentaje de absorción y retención aparente*, y la *eficiencia de regeneración de la hemoglobina*, medida como porcentaje (*ERH*). Así mismo, para un mejor entendimiento y siguiendo las pautas que hemos establecido en este trabajo, el análisis de conglomerados se desarrolló para cada uno de los tres periodos de repleción.

En la Tabla 6.1 se muestra los centros de los conglomerados finales para cada uno de los tres periodos de repleción, es decir, la media de los resultados obtenidos en cada una de las variables consideradas. La información mostrada en la Tabla 6.1 será utilizada para conocer las características definitorias de cada agrupamiento, considerando las puntuaciones medias de cada variable en los distintos clusters y en cada periodo de repleción.

Como se puede apreciar, en el 1^{er} periodo de repleción el conglomerado número dos fue el seleccionado como el más idóneo, ya que obtuvo de manera conjunta las máximas puntuaciones para las variables elegidas en el estudio *in vivo* con ratas. En el 2^o periodo de repleción destacaron los conglomerados uno y cinco, y en el 3^{er} periodo de repleción el conglomerado número uno. Estos conglomerados mostraron los porcentajes más elevados durante cada uno de los tres periodos de repleción, condición que deben de reunir ambas variables para un mejor aprovechamiento en el organismo, en nuestro caso de las ratas, durante un estado anémico. Además, el nivel de significación obtenido para cada una de las variables en cada periodo de repleción, nos indica que la variabilidad entre los grupos es mayor que la variabilidad intragrupos. Es decir, los conglomerados seleccionados son homogéneos y significativamente superiores al resto de los conglomerados, para cada periodo de repleción.

Tabla 6.1. Centros de los conglomerados finales en los tres periodos de repleción

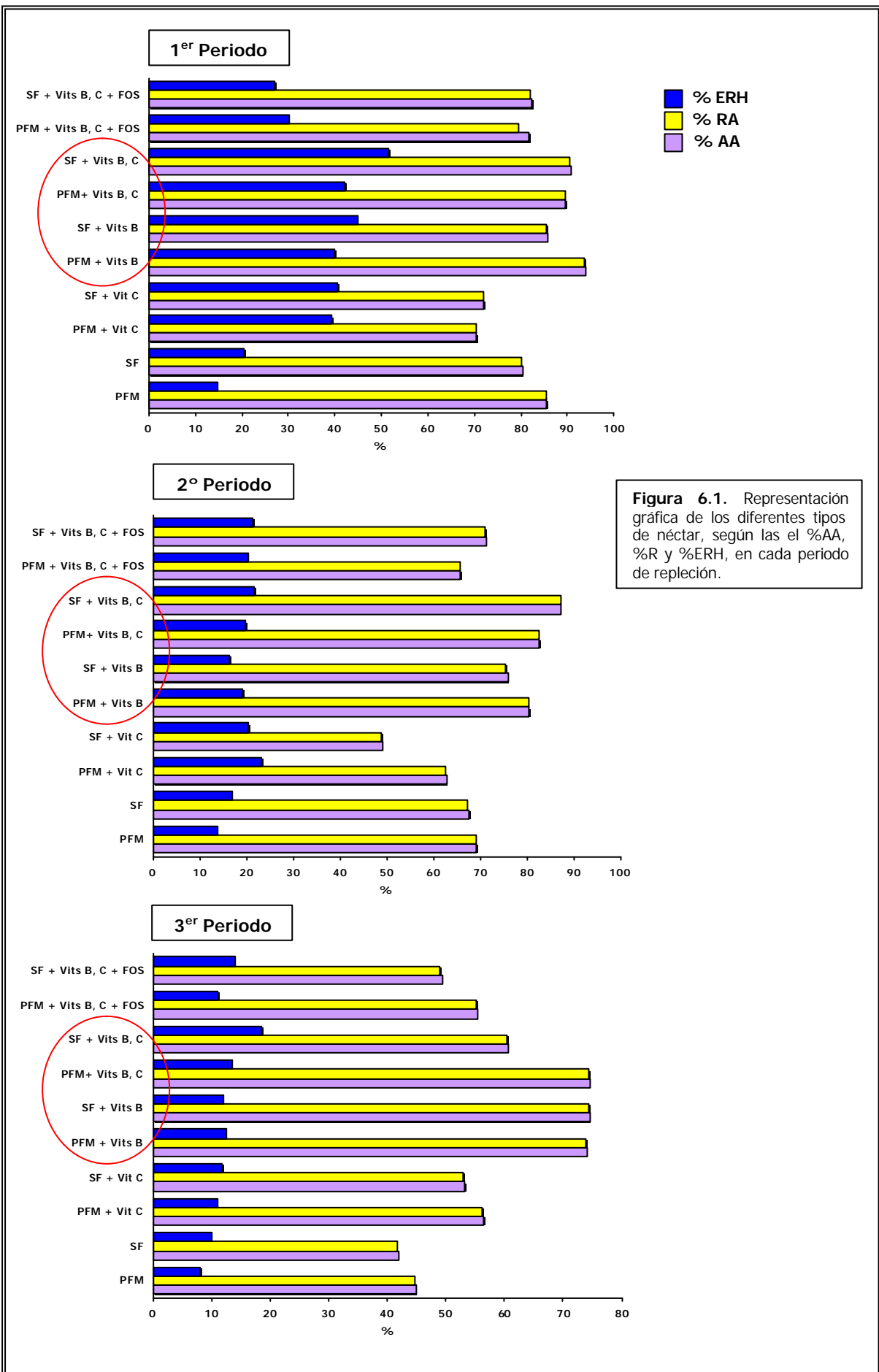
		Conglomerado					Sig.
		1	2	3	4	5	
1 ^{er} Periodo	%AA	82,99	90,01	71,28	82,12	-	0,002
	%R	82,78	89,83	71,08	80,76	-	0,002
	%ERH	17,68	44,72	40,05	28,65	-	0,001
2 ^o Periodo	%AA	78,25	68,52	62,79	49,21	85,03	0,001
	%R	77,91	68,30	62,51	49,02	49,02	0,001
	%ERH	17,88	18,13	23,36	20,51	20,87	0,507
3 ^{er} Periodo	%AA	74,43	43,39	60,58	53,59	-	0,000
	%R	74,26	43,15	60,47	53,36	-	0,000
	%ERH	12,62	9,06	18,57	11,94	-	0,004

Sig.: Nivel de significación

Destacar en el 2^o periodo de repleción, que la variable %ERH no mostró diferencias significativas entre los grupos o conglomerados. Además, el hecho de que en el 2^o periodo de repleción hayamos seleccionado cinco conglomerados y no cuatro, fue porque los valores de F, los cuales maximizan la distancia entre los conglomerados y minimizan la distancia entre los elementos de cada conglomerado, fue mayor para los cinco conglomerados comparados con los cuatro conglomerados.

Sin embargo, y pese a los resultados obtenidos, este análisis solamente debe utilizarse con una finalidad descriptiva, ya que los conglomerados han sido previamente elegidos para maximizar las diferencias entre los casos en diferentes conglomerados. En cualquier caso, nos permite valorar la relevancia de las variables seleccionadas y comparar las diferentes agrupaciones. De acuerdo con esto, nos permite optimizar el tipo de néctar o néctares según el tipo de compuesto de hierro (SF o PFM), vitaminas y presencia ó ausencia de los FOS.

En la Figura 6.1 se representan los diferentes tipos de néctar que pertenecen a los conglomerados seleccionados (circulo de color rojo) presentes en la Tabla 6.1.



De acuerdo con los resultados obtenidos tras el análisis de conglomerados y su representación gráfica, podemos observar que en los tres periodos de repleción coinciden los mismos resultados, es decir, se muestran como más idóneos por la absorción y biodisponibilidad elevadas, el néctar con los compuestos de hierro SF + Vits B, PFM + Vits B, SF + Vits B + C y PFM + Vits B + C (representados en la Figura 6. 1 en un círculo de color rojo). Por lo tanto, la utilización de un compuesto de hierro u otro junto con las vitaminas del grupo B o en combinación con la vitamina C sería similar desde un punto de vista nutricional, ejerciendo por tanto un efecto favorable en la recuperación del estado nutricional del hierro en ratas anémicas, y presumiblemente podría contribuir de manera semejante en el hombre.

Es necesario plantear las dificultades que existen a la hora de extrapolar las conclusiones de los trabajos de investigación realizados en animales de experimentación a lo que pudiera ocurrir en el organismo humano. La utilización de ratas como modelo ofrece algunas ventajas: su fácil manejo, se pueden utilizar un número elevado de animales para el estudio, y las respuestas al tratamiento son uniformes. Pero en cambio presentan una serie de limitaciones: la biodisponibilidad del hierro *hemo* y *no hemo* en ratas es similar, mientras que el hombre absorbe preferiblemente el hierro *hemo*; el hombre es capaz de aumentar la absorción del hierro en un 40% de un compuesto de hierro *no hemo* en situaciones de deficiencia, mientras que las ratas son capaces de absorber el doble. Además, las ratas son capaces de sintetizar el ácido ascórbico, y poseen actividad fitasa presente en el intestino, mientras que el hombre carece de ambas situaciones (Wienk y col., 1999).

Sin embargo, los estudios de biodisponibilidad han de plantearse en individuos con deficiencia en hierro ya que en estados nutricionales normales para este elemento la absorción es mínima y por tanto es difícil comparar esta variable entre diferentes compuestos de hierro. Este hecho supone una dificultad añadida para la realización de ensayos en humanos.

El estudio de biodisponibilidad del hierro mediante ensayos de repleción de la hemoglobina en ratas sigue siendo una de las metodologías actuales más empleadas para evaluar los compuestos disponibles en el mercado y su aplicación para el enriquecimiento de alimentos y bebidas (Swain y col., 2003; Hernández y col., 2003; Sakaguchi y col., 2003; Wegmüller y col., 2004;). No obstante los resultados obtenidos han de completarse con la información obtenida en humanos, e incluso con otros aspectos tecnológicos y económicos relacionados con dichos compuestos de hierro.

Es importante destacar que en este estudio pretendemos incorporar al néctar de frutas un compuesto de hierro con el potencial de absorción más elevado y que cause el menor cambio organoléptico en el alimento. A menudo, los compuestos de hierro con una elevada biodisponibilidad causan modificaciones sensoriales en los alimentos como es el caso del sulfato ferroso. Por otro lado, los compuestos de menor biodisponibilidad son más estables cuando se añaden a los alimentos. Una estrategia para vencer este problema, es la reducción del tamaño de partícula en los compuestos de hierro poco solubles en agua, con el fin de aumentar su disolución y por tanto mejorar su biodisponibilidad. Este es el caso del PFM, su reducido tamaño de partícula y su envoltura de monoglicéridos y diglicéridos para reducir su agregación, fue aplicado en un ensayo en humanos (Nambu y col., 2000) y mostró tener una biodisponibilidad relativa del 82% y 92% en cereales infantiles de trigo con leche y en una bebida de yogurt, respectivamente (Fidler y col., 2004). Su elevada biodisponibilidad lo hace potencialmente útil para otros alimentos (arroz, cereales infantiles y sal) que rápidamente sufren cambios sensoriales cuando son enriquecidos con compuestos de hierro solubles. Sin embargo, aunque es un compuesto de hierro prometedor, el efecto sobre la matriz del alimento, el procesado del alimento y los favorecedores de la absorción sobre la biodisponibilidad son inciertos.

Los resultados de este estudio muestran que la absorción y la biodisponibilidad del PFM frente a la del SF es similar en combinación con las vitaminas del grupo B y C, o sólo con las vitaminas del grupo B. Curiosamente, la vitamina C no tuvo un efecto favorecedor en la absorción del hierro en ninguno de los compuestos empleados. Este hecho podría ser debido, como hemos comentado anteriormente, a la capacidad que presentan los roedores para sintetizar dicha vitamina. Sin embargo, mejoró los resultados de las variables estudiadas cuando se administró en combinación con las vitaminas del grupo B.

En resumen, considerando los resultados obtenidos, la fuente de hierro PFM sería el más indicado como compuesto de selección en el enriquecimiento del néctar de frutas, primero por su absorción y biodisponibilidad similar a la del SF, y segundo porque no confiere sabores ni aromas extraños a la bebida durante su vida comercial. En cuanto a la adición de vitaminas, sería aconsejable el empleo de la vitamina C, principalmente debido a sus propiedades reductoras y quelantes, el cual le hace ser el favorecedor más eficaz en la absorción del hierro *no hemo* siempre y cuando su estabilidad en el alimento esté asegurada, tal como es el caso del presente néctar. Además, el efecto sobre la absorción y biodisponibilidad del hierro que ejercen las vitaminas del grupo B ha sido uno de los resultados más significativos de este estudio, ya que no hay referencias anteriores descritas. Resulta evidente la recomendación de adicionarlas junto al hierro y vitamina C para mejorar el estado nutricional del mineral. En este sentido los resultados

obtenidos en ratas confirman los alcanzados al emplear el método in vitro de diálisis utilizado en nuestra Tesis de Licenciatura (Haro-Vicente y col., 2006).

Por último debemos tener en cuenta que muchas personas no alcanzan los requerimientos nutricionales de hierro y vitaminas necesarios para mantener sus funciones fisiológicas, bien por restricción voluntaria de ciertos alimentos, falta de apetito, problemas de absorción o por diversos problemas de salud. Para este tipo de individuos, el néctar de frutas enriquecido con hierro y vitaminas del grupo B y C, puede ser un complemento esencial de la dieta, en especial, durante la infancia, el embarazo, y en personas de edad avanzada, debido a su elevada aceptabilidad y digestibilidad.

VII. CONCLUSIONES

Conclusiones del primer objetivo:

1.1. La absorción del hierro procedente del pirofosfato férrico micronizado añadido al néctar de frutas es similar a la del sulfato ferroso, empleado como control, siendo mejorada en ambos casos con la adición de las vitaminas B₆, B₁₂, ácido fólico y vitamina C. No obstante, el efecto de esta última sólo se aprecia a largo plazo, es decir, tras 17 días de ingesta del néctar.

1.2. El balance de hierro de los compuestos pirofosfato férrico micronizado, bis-glicinato ferroso y sulfato ferroso añadidos al néctar de frutas junto a las vitaminas B₆, B₁₂, ácido fólico y fructo-oligosacáridos son semejantes, por otro lado, la adición de fructo-oligosacáridos en una proporción de 0,6% no ejerce efecto alguno sobre la absorción de dichos compuestos de hierro.

Conclusiones del segundo objetivo:

2.1. La biodisponibilidad relativa del pirofosfato férrico micronizado añadido al néctar de frutas es inferior al sulfato ferroso a corto plazo (72%), mientras que a largo plazo ambos compuestos muestran una biodisponibilidad similar. Ambas sales de hierro favorecen la recuperación de los parámetros hematológicos y bioquímicos en ratas anémicas desde el comienzo de la administración del néctar.

2.2. La administración de vitamina C tiene un efecto más acusado en la mejora de la biodisponibilidad del pirofosfato férrico micronizado y parámetros relacionados con la hemoglobina y transporte del hierro que sobre el sulfato ferroso.

2.3. La adición de las vitaminas B₆, B₁₂, y ácido fólico solamente afecta a la biodisponibilidad del pirofosfato férrico micronizado añadido al néctar de frutas, a largo plazo (17 días). Sin embargo, no modifica los índices hematológicos y bioquímicos. No obstante, al incorporar la vitamina C junto con las vitaminas B₆, B₁₂, y ácido fólico aumenta notablemente la biodisponibilidad de ambas sales de hierro, mejorando el tamaño de los eritrocitos y el contenido de hemoglobina en los mismos.

2.4. La biodisponibilidad del pirofosfato férrico micronizado, sulfato ferroso o bis-glicinato ferroso utilizados en el enriquecimiento del néctar de frutas junto con las vitaminas del grupo B, C y fructo-oligosacáridos es similar, favoreciendo las tres sales de hierro la recuperación de los índices eritrocitarios desde el comienzo de su administración. La presencia de fructo-oligosacáridos en un 0,6%, no afecta a la biodisponibilidad del hierro ni a los índices hematológicos y bioquímicos.

Conclusiones del tercer objetivo:

3.1. El tipo de compuesto de hierro añadido al néctar no influye en la concentración de hierro de los órganos seleccionados para este estudio, y no resulta modificada por la presencia de la vitamina C o de las vitaminas del grupo B. Sin embargo, la adición conjunta de dichas vitaminas incrementa notablemente la concentración de hierro en el bazo.

3.2. La adición de los fructo-oligosacáridos al néctar de frutas no produce ningún efecto en la concentración de hierro de los órganos de las ratas.

Conclusiones del cuarto objetivo:

4.1 La presencia de la vitamina C en el néctar enriquecido con sulfato ferroso favorece la generación de radicales hidroxilo desde el comienzo de su consumo, mientras que en el caso del pirofosfato férrico micronizado sólo se ven incrementados a largo plazo.

4.2 El sulfato ferroso añadido al néctar es el compuesto más susceptible a la generación de radicales hidroxilo, en presencia de las vitaminas B, C y fructo-oligosacáridos, estando correlacionado este efecto con la ingesta de hierro.

Conclusión del quinto objetivo:

5.1. La adición del pirofosfato férrico micronizado junto con las vitaminas del grupo B o las vitaminas del grupo B y C mejora considerablemente el estado nutricional del hierro en ratas anémicas, por lo que la combinación de estos micronutrientes puede ser considerada para su utilización en el enriquecimiento de bebidas de frutas destinadas a grupos de población susceptibles de padecer estados carenciales de dichos elementos.

VIII. RESUMEN

Según la OMS, la deficiencia en hierro es el desorden nutricional más común en el mundo, afectando a más de 2 billones de personas, siendo aproximadamente la mitad de ellos anémicos, principalmente mujeres jóvenes, recién nacidos y niños. El enriquecimiento de los alimentos con hierro ha sido considerado como la solución más práctica a largo plazo para combatir la anemia por deficiencia en hierro. Sin embargo, el éxito del enriquecimiento de los alimentos generalmente depende de una elección cuidadosa del compuesto de hierro. El pirofosfato férrico es un compuesto de hierro insoluble utilizado para enriquecer cereales infantiles y bebidas de chocolate en polvo, su principal ventaja es que no causa cambios sensoriales en el alimento, sin embargo, su pobre solubilidad en el jugo gástrico hace que tenga una biodisponibilidad mediocre. Recientemente, se ha desarrollado un pirofosfato férrico micronizado, de fácil dispersión, para enriquecer los alimentos. Su reducido tamaño de partícula ($\sim 0,3 \mu\text{m}$) y su envoltura de monoglicéridos y diglicéridos minimiza la formación de agregados insolubles, haciéndolo útil para ser añadido a alimentos líquidos.

Debido a la escasez de resultados referentes a la adición de compuestos de hierro a bebidas a base frutas, se ha desarrollado para este estudio un néctar con pirofosfato férrico micronizado (PFM), y bisglicinato ferroso (BF) (en la última parte del ensayo), al que se ha añadido vitamina C, B₆, B₁₂ y ácido fólico y fructo-oligosacáridos (FOS) con el fin de evaluar el efecto de la adición de dichos micronutrientes de forma individual o conjunta sobre la absorción y biodisponibilidad del hierro, comparándolo frente a un estándar de referencia como es el sulfato ferroso (SF). Para la realización de este estudio se ha utilizado un modelo de repleción de la hemoglobina en ratas anémicas. Así mismo, se han evaluado otros parámetros hematológicos y bioquímicos con el objetivo de confirmar la recuperación de un estado de anemia por deficiencia en hierro. También, se ha valorado la deposición del hierro en órganos, como el hígado, bazo, riñón, corazón e intestino delgado proximal, para determinar si la ingesta de hierro durante la repleción causa una acumulación en la concentración del mineral de los mismos. Además, teniendo en cuenta la sugerencia de que el hierro puede incrementar el riesgo de cáncer debido a su naturaleza pro-oxidante, hemos estudiado si la ingesta de hierro del PFM, BF o SF en una concentración constante (4,92 mg/100ml) provoca un aumento en la producción de radicales hidroxilo a través de las heces de los animales en estudio.

Mediante un análisis de conglomerados, se ha pretendido agrupar los diferentes tipos de néctar en grupos homogéneos, en función de una serie de variables que hemos considerado las más idóneas y las que resumen los principales objetivos del presente trabajo. Estas variables han sido: el *porcentaje de absorción y retención aparente*, y la *eficiencia de regeneración de la*

hemoglobina, medida como porcentaje (*ERH*). El análisis de conglomerados nos ha permitido seleccionar los tipos de néctar más idóneos según la combinación del tipo de compuesto de hierro, vitaminas o mezcla de vitaminas y la presencia o ausencia de los FOS. Los néctares seleccionados son los que presentan en su composición las fuentes de hierro SF o PFM junto con la mezcla de vitaminas B y la vitamina C, y las mismas fuentes de hierro junto con la mezcla de vitaminas B. No se ha encontrado ningún efecto de los FOS en la absorción o biodisponibilidad del hierro cuando se añade al néctar en las condiciones del estudio. El SF, aunque presenta una absorción y biodisponibilidad elevada (de ahí su utilización como control) tiene el inconveniente de provocar cambios sensoriales en los alimentos. Este ensayo sensorial fue realizado en un estudio anterior por nuestro grupo de investigación ratificándose que el SF confiere un sabor metálico muy acentuado a las bebidas que lo contienen.

Por tanto, los resultados del presente trabajo muestran que el PFM es un compuesto ideal para ser utilizado en el enriquecimiento de bebidas a base de frutas, ya que presenta una biodisponibilidad semejante al sulfato ferroso, no produce cambios organolépticos en el producto y favorece el estado nutricional del hierro en animales de experimentación con una elevada deficiencia en hierro. Además, la presencia de las vitaminas del grupo B y C mejoran significativamente el efecto de dicho compuesto en la recuperación de la anemia, por lo que su utilización conjunta sería recomendable en bebidas a base de frutas destinadas a grupos de población susceptibles de sufrir estados carenciales de estos micronutrientes.

IX. SUMMARY

According to WHO, iron deficiency is the most common nutritional disorders in the world affecting more than 2 billion people, roughly half of them are anemic, chiefly young women and children. Food iron fortification has been considered the most useful method to alleviate iron-deficiency anemia. However, the success with food fortification usually depends on a close selection of the iron component. Ferric pyrophosphate is an insoluble iron compound used to fortify infant cereals and powder chocolate beverages, its main advantage lies in the fact that the sensory properties of food remain unchanged. Nevertheless, the poor solubility of ferric pyrophosphate in the gastric juice makes it weakly bioavailable. Recently, micronized ferric pyrophosphate, compound of easy diffusion, has been developed for food supplementation. The small particle size ($\sim 0.3 \mu\text{m}$) and its monoglycerols and diglycerols coat diminish the formation of insoluble aggregates, making it suitable for liquid-based food.

Due to the lack of studies regarding the supplementation of iron compounds to fruit-based beverages, we developed a sweetened fruit drink containing micronized ferric pyrophosphate (MFP) and ferrous bisglycinate (FB) (in the last part of the study). Vitamin C, B₆, B₁₂ and folic acid and fructo-oligosaccharides (FOS) were also added in order to assess the effect of these micronutrients singly and jointly on the iron absorption and bio-availability, compared to the reference compound ferrous sulphate (FS). The present study was carried out by means of a repletion model of hemoglobin in anemic rats. Hematological and biochemical parameters were also measured to ascertain the recovery from an iron-deficiency anemic status. In addition, the content of iron in the liver, spleen, kidney, heart and proximal small intestine was measured to ascertain whether the intake of iron during the depletion period increases the iron concentration in those organs. Taking into account the fact that iron might increase the risk of cancer due to its pro-oxidant nature, we studied if the intake of iron from MFP, FB or FS (at 4.92 mg/ml) increases the formation of hydroxyl radicals in the feces of the rats.

The different type of sweetened fruit drinks were grouped into homogeneous groups by means of a conglomerate analysis, according to the following variables: apparent absorption and retention percentages and hemoglobin regeneration efficiency (measured as HRE). The conglomerate analysis enabled us to select the most suitable sweetened fruit drinks based on the combination of type of iron compound, mixture of vitamins and presence or absence of FOS. The sweetened fruit drinks selected in this study were those containing SF and MFP as iron source along with either the mixture of vitamins B and C or only the mixture of vitamins B. No effect of the FOS added to the sweetened fruit drinks on the iron bioavailability was found under the conditions of this study. Although SF has the drawback of altering the sensory properties of the

food, it shows a high absorption and bioavailability (hence its use as a control). Previously, we reported a thick metallic taste in beverages containing SF in a sensory trial.

Therefore, the results of the present work showed that MFP is an ideal compound to be used as a fortifier in fruit-based beverages since to its bioavailability is similar to FS, it does not modify the taste of the product and enhances the iron nutritional status in laboratory animals with highly iron-deficiency anemia. Furthermore, vitamins B and C significantly improved the effect of MFP in the recovery of anemia. We recommend the addition of these three compounds simultaneously in the fruit-based beverages, especially when they are aimed to groups of the population who are deficient in these micronutrients.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Abarbanel, J., Benet, A.E., Lask, D., Kimche, D. 1990.** Sports hematuria. *J. Urol.* 143: 887-890.
- Abboud, S., Haile, D.J. 2000.** A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J. Biol. Chem.* 275: 19906-19912.
- Ablin, J., Shalev, O., Okon, E., Karmeli, F., Rachmilewitz, D. 1999.** Deferiprone, an oral iron chelator, ameliorates experimental colitis and gastric ulceration in rats. *Bowel Dis.* 5: 253-261.
- Aggett, P.J., Antoine, J.M., Asp, N.G., Bellisle, F., Contor, L., Cummings, J.H., Muller, D.J., Persin, G., Pijls, L.T., Rechkemmer, G., Tuijelaars, S., Verhagen, H. 2005.** PASSCLAIM: consensus on criteria. *Eur. J. Nutr.* 44 (Suppl 1): 5-30
- Aghdassy, E., Carrier, J., cullen, J., Allard, J.P. 2001.** Effect of iron supplementation on oxidative stress and intestinal inflammation in rats with acute colitis. *Dig. Dis. Sci.* 46: 1088-1094.
- Ahmed, F., Barua, S., Mohiduzzaman, M., Shaheen, N., Margetts, B.M., Jackson, A.A. 1993.** Interaction between growth and nutrient status in school-age children of urban Bangladesh. *Am. J. Clin. Nutr.* 58: 334-338.
- Ahmed, F., Khan, M.R., Karim, R., et al. 1996.** Serum retinol and biochemical measures of iron status in adolescent schoolgirls in urban Bangladesh. *Eur. J. Clin. Nutr.* 50: 346-351.
- Alexander, D., Ball, M.J., Mann, J. 1994.** Nutrient intake and hematological status of vegetarians and age-sex matched omnivores. *Eur. J. Clin. Nutr.* 48: 538.
- Allen, L. H. 1995.** Malnutrition and human function: a comparison of conclusions from the INCAP and nutrition CRSP studies. *J. Nutr.* 125 (Suppl. 4): 1119S-1126S.
- Allen, L. H. 1993.** The nutrition CRSP: what is marginal malnutrition, and does it affect human function?. *Nutr. Rev.* 51: 255-267.
- Allen, L. H. 1994.** Vitamin B₁₂ metabolism and status during pregnancy, lactation and infancy. In: Allen, L.H., Lonnerdal, B, eds. *Nutrient Regulation During Pregnancy, Lactation, and Infant Growth.* New York: Plenum Press; 173-186.
- Allen, L. H. 2002b.** Advantages and limitations of iron amino chelates as iron fortificants. *Nutrition Reviews.* 60, S18-S21.
- Allen, L. H. 2002a.** Iron Supplements: Scientific Issues Concerning Efficacy and Implications for Research and Programs. *J. Nutr.* 132: 813S-819S.
- Allen, L. H., Backstrand, J. R., Chavez, A., Pelto, G. H. 1992.** Functional Implications of Malnutrition. Mexico Project Final Report. Storrs, CT: University of Connecticut.
- Allen, L. H., Casterline-Sabel, J. 2001.** Prevalence and causes of nutritional anemias. In *Nutritional Anemias*, pp. 7-21. Boca Raton: CRC Press LLC.
- Allen, L. H. 2000.** Anemia and iron deficiency: effects on pregnancy outcome. *Am. J. Clin. Nutr.* 71: 1280S-1284S.
- Allen, L.H. 2001.** Biological mechanisms that might underlie iron's effects on fetal growth and preterm birth. *J. Nutr.* 131: 581S-589S.
- Allen, L.H., Ahluvalia, N. 1997.** Improving iron status through diet: the application of knowledge concerning dietary iron in human populations. Washington, DC: US Agency for International Development and Opportunities for Micronutrient Interventions.
- Alles, M. S., Katan, M. B., Salemans, J. M., Van Laere, K. M., Gerichhausen, M. J., Rozendaal, M. J., Nagengast, F. M. 1997.** Bacterial fermentation of fructooligosaccharides and resistant starch in patients with an ileal pouch-anal anastomosis. *Am. J. Clin. Nutr.* 66: 1286-1292.

- Almaas, R., Rootwelt, T., Oyaseter, O., Saugstad, D. 1997.** Ascorbic acid enhances hydroxyl radical formation in iron-fortified infant cereals and infant formulas. *Eur. J. Pediatr.* 156: 488-492.
- Al-Momen, A.K., Al-Meshari, A., Al-Nuaim, L., Saddique, A., Abotalib, Z., Khashogji, T., Abbas, M. 1996.** Free radical generating mechanisms in the colon: their role in the induction and promotion of colorectal cancer?. *Free Radic. Res. Commun.* 6: 359-367.
- Anderson, T.A., Kim, I., Fomon, S.J. 1972.** Iron status of anemic rats fed iron-fortified cereal-milk diets. *Nutr. Metabol.* 14: 355-361.
- Andrews, N.C., 1999a.** Disorders of iron metabolism. *N. Engl. J. Med.* 341, 1986-1995.
- Andrews, N.C., 1999b.** The iron transporter DMT1. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 31, 991-994.
- Andrews, N.C., 2005.** Molecular control of iron metabolism. *Best Practice & Research Clinical Haematology.* 18 (2), 159-169.
- Angelucci, E., Brittenham, G. M., McLaren, C. E., Ripalti, M., Baronciani, D., Giardini, C., Galimberti, M., Polchi, P., Lucarelli, G. 2000.** Hepatic iron concentration and total body iron stores in thalassemia major. *N. Engl. J. Med.* 3431.
- Antony, A. C. 1991.** Megaloblastic anemias. In: Hoffman, R., Benz, E. J., Shattil, S. J., y col., eds. *Hematology: Basic Principles and Practice.* New York: Churchill Livingstone; 392-422.
- AOAC. 1990.** Bioavailability of iron. Rat Hemoglobin Repletion Bioassay. In: *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists.* 15th ed.; Helrich K, (ed) Association of Official Analytical Chemists Inc., Arlington, VA, 16. 1098-1099.
- AOAC. 1998.** Official Method 974.31. Bioavailability of iron. Rat Hemoglobin Repletion Bioassay.
- AOAC. 1999.** Official methods of analysis (16th edition). Association of Official Analytical Chemist, Washington D.C. USA.
- Appel, M.J., Kuper, C.F., Woutersen, R.A. 2001.** Disposition, accumulation and toxicity of iron fed as iron (II) sulfate or as sodium iron EDTA in rats. *Food Chem. Toxicol.* 39: 261-269.
- Argiratos, V., Samman, S. 1994.** The effect of calcium carbonate and calcium citrate on the absorption of zinc in healthy female subjects. *Eur. J. Clin. Nutr.* 48: 198-204.
- Arosio, P., Yokota, M., Drysdale, J.W. 1976.** Structural and immunological relationships of isoferritins in normal and malignant cells. *Cancer Res.* 36: 1735-1739.
- Babbs, C. F. 1990.** Free radicals and the etiology of colon cancer. *Free Radical Biol. Med.* 8: 191-200.
- Babbs, C. F., Gale, M. J. 1987.** Colorimetric assay for methane sulfinic acid in biological samples. *Anal. Biochem.* 163: 67-73.
- Babbs, C. F., Gale, +M. J. 1990.** Detection and quantitation of hydroxyl radical using dimethyl sulfoxide as molecular probe. *Methods Enzymol.* 186: 137-147.
- Baek, H. Y., Lim, J. W., Kim, J. M., Kim, J. S., jung, H. C et al. 2004.** Oxidative-stress-related proteome changes in *Helicobacter Pylori*-infected human gastric mucosa. *Biochem. J.* 379: 291-299.
- Baker, E. N., Lindley, P. F. 1992.** New perspectives on the structure and function of transferrins. *J. Inorg. Biochem.* 47, 147-160.
- Baker, W. 2000.** Iron deficiency in pregnancy, obstetrics and gynecology, *Hematology/Oncology Clinics of North America.* 14(5): 1061-1077.
- Ball, M.J., Bartlett, M.A. 1999.** Dietary intake and iron status of Australian vegetarian women. *Am. J. Clin. Nutr.* 70: 353.
- Ballot, D. E., MacPhail, A. P., Bothwell, T. H., Gillooly, M., Mayet, F. G. 1989.** Fortification of curry powder with NaFe(III)EDTA: report of a controlled iron fortification trial. *Am. J. Clin. Nutr.* 49: 162-169.
- Bannerman, R.M. O'Brien, J.R.P., Witts, L.J. 1962.** Iron absorption in experimental iron deficiency. *Blood,* 20: 532.

- Barberá, R., Farré, R. 1992.** Biodisponibilidad de los elementos traza. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de los Alimentos*. 32(4): 381-399.
- Barclay, D. 2003.** Nestec Ltd., personal communication.
- Barr, S.I., Broughton, T.M. 2000.** Relative weight, weight loss efforts and nutrient intakes among health-conscious vegetarian, past vegetarian and nonvegetarian women ages 18 to 50. *J. Am. Coll. Nutr.* 19: 781.
- Barrett, J. F. R., Whittaker, P. G., Fenwick, J. D., Williams, J. G and Lind, T. 1994.** Comparison of stable isotopes and radioisotopes in the measurement of iron absorption in healthy women. *Clin. Sci.* 87: 91-95.
- Baynes, R. D. 1994.** Iron deficiency. In *Iron Metabolism in Health and Disease*, pp. 190-225 [JH Brock, JW Halliday, MJ Pippard and AK Powell, editors]. London: W. B. Saunders Company Ltd.
- Baynes, R. D., Bothwell, T, H. 1990.** Iron deficiency. *Annu. Rev. Nutr.* 10: 133-148.
- Beard, J. L. 2000.** Iron requirements in adolescents females. *J. Nutr.* 130: 440S-442S.
- Beaton, G.H., Corey, P.N., Steele, C. 1989.** Conceptual and methodological issues regarding the epidemiology of iron deficiency and their implications for studies of the functional consequences of iron deficiency. *Am. J. Clin. Nutr.* 50, 575-588.
- Becker, K., Tilley, L., Vennerstrom, J. L., Roberts, D., Rogerson, S., Ginsburg, H. 2004.** Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. *Int. J. Parasitol.* 34: 163-189.
- Ben-Shachar, D., Riederer, P., Youdim, M.B., 1991.** Iron-melanin interaction and lipid peroxidation: implications for Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 57, 1609-1614.
- Beveridge, B. R., Bannerman, R. M., Evanson, J.M., y Witts, L. J. 1965.** Hydrochromic anaemia. A retrospective study and follow-up of 378 in-patients. *Quarterly Journal of Medicine* 34, 145-161.
- Beynen, A.C., Sijtsma, K.W., Van den Berg, G.J., Lemmens, A.G., West, C.E., 1992.** Iron status in rats fed a purified diet without vitamina A. *Biol. Trace Elem. Res.* 35: 81-84.
- Bienfait, H.V., Van Del Briel, M.L. 1980.** Rapid mobilization of ferritin iron by ascorbate in the presence of oxygen. *Biochem Biophys Acta* 631: 5078-5100.
- Blakeborough, M. H., Owen, R. W., Bilton, R.F. 1989.** Free radical generating mechanism in the colon: their role in the induction and promotion of colorectal cancer. *Free Radical Res. Commun.* 6: 359-367.
- Bloem, M.W., Wendel, M., Egger, R.J., et al. 1989.** Iron metabolism and vitamina A deficiency in children in northeast Thailand. *Am. J. Clin. Nutr.* 50: 332-338.
- Blundell, J.E., Green, S. Y Burley, V.J. 1994.** Carbohydrates and human appetite. *Am. J. Clin. Nutr.* 59 (Suppl.3): 728S-734S.
- Boldt, D.H., 1999.** New perspectives on iron: an introduction. *Am. J. Med. Sci.* 318, 207-212.
- Bothwell, T. H., Baynes, R.D., MacFarlane, B. J., MacPhail, A.P. 1989.** Nutritional iron requirements and food iron absorption. *Journal of Internal Medicine* 226, 357-365.
- Bothwell, T. H., Bradlow, B. A., Jacobs, P y col. 1964.** Iron metabolism in scurvy with special reference to erythropoiesis. *Br. J. Haematol.* 10: 50-58.
- Bothwell, T.H. 1970.** Total iron loss and relative importance of different sources. In *Iron Deficiency, Pathogenesis, Clinical Aspects, Therapy*, ed. L. Hallberg, H-G Harwerth, A Vanotti, pp. 151-161. London: Academic
- Bothwell, T. H., Finch, C.A. 1962.** *Iron metabolism.* London: J. & A. Churchill Ltd.
- Bothwell, T. H., Pirzio-Biroli, G., Finch, C.A. 1958.** Iron absorption. I. Factors influencing absorption. *J. Lab. Clin. Med.* 51: 24-36.
- Bothwell, T.H. 1983.** Iron absorption. *Annu. Rev. Med.* 34: 55-68
- Bothwell, T.H. 1999.** Iron fortification in special reference to the role of iron EDTA. *Archivoa*

- Latinoamericanos de Nutrition, 49 (Suppl.2): 23S-33S.
- Bothwell, T.H. 2000.** Iron requirements in pregnancy and strategies to meet them. *Am. J. Clin. Nutr.* 72 Suppl.: 257S-264S.
- Bothwell, T.H., Charlton, R.W., Cook, J.D., Finch, C.A. 1979.** *Iron Metabolism in Man*, pp. 7-81. Blackwell Scientific Publications., Oxford.
- Bougle, D., Vaghefi-Vaezzadek, N., Roland, N., Bouvard, G., Arhan, P., Bureau, E., Neuville, D., Maubois, J. L. 2002.** Influence of short-chain fatty acids on iron absorption by proximal colon. *Scand. J. Gastroenterol.* 37: 1008-1011.
- Bouhnik, Y., Flourie, B. L., D`Agay-Abensour, P., Pochart, G., Gramet, M., Durand, M., Rambaud, J. C. 1997.** Administration of transgalactooligosaccharides increases fecal bifidobacteria and modifies colonic fermentation metabolism in healthy humans. *J. Nutr.* 127: 444-448.
- Bovell-Benjamin, A. C., Viteri, F. E., Allen, L. H. 2000.** Iron absorption from ferrous bis-glycinate and ferric tris-glycinate in whole maize is regulated by iron status. *Am. J. Clin. Nutr.* 71: 1563-1569.
- Bradfield, R.B., Jensen, M.V., Gonzales, L., Garrayar, C. 1968.** Effect of low-level iron and vitamin supplementation on a tropical anemia. *Am. J. Clin. Nutr.* 21: 57-67.
- Breymann, C. 2005.** Iron deficiency and anemia in pregnancy: Modern aspects of diagnosis and therapy. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology.* 123: 3S-11S.
- Brise, H., Hallberg, L. 1962.** Absorbability of different iron compounds. *Acta Medica Scandinavica* 171, 23-38.
- Brise, H., Hallberg, L. 1962a.** A method for comparative studies on iron absorption in man using two radioiron isotopes. *Acta Med. Scand. Suppl.* 59: 7-22.
- British Nutrition Foundation. 1996.** *Iron. Nutritional and physiological significance.* Chapman y Hall (Eds.), London, UK.
- Brittenham, G.M., Danish, E.H., Harris, J.W. 1981.** Assessment of bone marrow and body iron stores: old techniques and new technologies. *Semin. Hematol.* 18:194-221.
- Britton, R., Ferrali, M., Magiera, C., Recknagel, R., Bacon, B. 1990.** Increased prooxidant action of hepatic cytosolic low-molecular-weight iron in experimental iron overload. *Hepatology.* 11: 1038-1043.
- Brody, T. 1999.** *Nutritional biochemistry*, Second ed. San Diego [etc.]: Academic Press.
- Brune, M., Magnusson, B., Persson, H., Hallberg, L. 1986.** Iron losses in sweat. *Am. J. Clin. Nutr.* 43: 438-443.
- Brune, M., Rossander, L., Hallberg, L. 1989.** Iron absorption and phenolic compounds: importance of different phenolic structures. *Eur. J. Clin. Nutr.* 43: 547-558.
- Buchowski, M.S., Mahoney, A.W., Kalpalathika, P.V. 1989.** Nonheme iron absorption, apparent iron absorption and hemoglobin regeneration efficiency in anemic and normal rats fed with dietary heme and nonheme iron at various levels. *Nutrition Research.* 9, 773-783.
- Buettner, G.R., Jurkiewicz, B.A. 1996.** Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. *Radiat. Res.* 145: 532-541.
- Burns, J. J., Mosbach, E. H., Schulenberg, S. 1954.** Ascorbic acid synthesis in normal and drug-treated rats, studied with L-ascorbic-1-C14 acid. *J. Biol. Chem.* 207(2):679-87.
- Buzina, R., Grgic, Z., Jusic, M., Sapunar, J., Milanovic, N., Brubacher, G. 1982.** Nutritional status and physical working capacity. *Hum. Nutr. Clin. Nutr.* 36C: 429-438.
- Carrier, J., Aghdassy, E., Cullen, J., Allard, J.P. 2002.** Iron supplementation increases disease activity and vitamin E ameliorates the effect in rats with dextran sulfate and sodium-induced colitis. *J. Nutr.* 132: 3146-3150.

- Charlton, R.W., Jacobs, P., Torrance, J.D., Bothwell, T.H. 1965.** The role of the intestinal mucosa in iron absorption. *J. Clin. Invest.* 44: 543-554.
- Chattopadhyay, D., Akiba, J., Ueno, N., Chakrabarti, B. 1992.** Metal ion catalyzed liquefaction of vitreous by ascorbic acid: role of radicals and radical ions. *Ophthalmic. Res.* 24: 1-7.
- Chernelch, M., Fawwaz, R., Sargent, T., Winchell, H. S. 1970.** Effect of phlebotomy and pH on iron absorption from the colon. *J. Nucl. Med.* 11: 25-27.
- Chow, C. K. 1979.** Nutritional influence on cellular antioxidant defence systems. *Am. J. Clin. Nutr.* 32: 1066.
- Christian, O., Khatri, S.K., Katz, J., Pradhan, E.K., LeClerq, S.C., Shrestha, S.R., Adhikari, R.K., Sommer, A., West, K.P., Jr. 2003a.** Effects of alternative maternal micronutrient supplements on low birth weight in rural Nepal: double blind randomized community trial. *Br. Med. J.* 326: 571-579.
- Christian, O., Shrestha, S.R., LeClerq, S.C., Khatri, S.K., Jiang, T., Wagner, T., Katz, J., West, K.P. 2003b.** Supplementation with micronutrients in addition to iron and folic acid does not further improve the hematologic status of pregnancy women in rural Nepal. *J. Nutr.* 133: 1492-1498.
- Clark, N. G., Sheard, N. F., Kelleher, J. F. 1992.** Treatment of iron deficiency anemia complicated by scurvy and folic acid deficiency. *Nutr. Rev.* 50: 134-137.
- Connor, S.L., Gustafson, J.R., Sexton, G., Becker, N., Artaud-Wild, S., Connor, W.E., 1992.** The diet habit survey: a new method of dietary assessment that relates to plasma cholesterol changes. *J. Am. Dietetic Assoc.* 92, 41-47.
- Conrad, M.E., Crosby, W.H. 1963.** Intestinal mucosa mechanisms controlling iron absorption. *Blood.* 22: 406-415.
- Conrad, M. E., Weintraub, L. R., Crosby, W. H. 1964.** The role of the intestine in iron kinetics. *J. Clin. Invest.* 43: 963-974.
- Conrad, M.E., Schade, S.G. 1968.** Ascorbic acid chelates in iron absorption: a role for hydrochloric acid and bile. *Gastroenterology*, 55: 35-45.
- Conrad, M.E., Parmley, R.T., Osterloh, K., 1987.** Small intestinal regulation of iron absorption in the rat. *J. Lab. Clin. Med.* 110, 418-426.
- Conrad, M.E., Umbreit, J.N., Moore, E.G., 1999.** Iron absorption and transport. *Am. J. Med. Sci.* 318, 213-229.
- Conrad, M.E., Umbreit, J.N. 2000.** Iron absorption and transport. An update. *Am. J. Hematol.* 64: 287-298.
- Conrad, M.E., Weintraub, L.R., Crosby, W.H. 1963.** The role of the intestine in iron kinetics. *J. Clin. Invest.* 43: 963-974.
- Conrad, M.E., Weintraub, L.R., Sears, D.A., Crosby, W. H. 1966.** Absorption of hemoglobin iron. *Am. J. Physiol.* 211: 1123-1130.
- Cook, J. D., Bothwell, T. H. 1984.** Availability of iron from infant foods. In: *Iron Nutrition in Infancy and Childhood* (Stekel, A., ed.), pp. 119-145. Nestlé/Raven Press, Vevey/New York.
- Cook, J. D., Brown, G. M., Valberg, L. S. 1964.** The effect of achylia gastrica on iron absorption. *J. Clin. Invest.* 43: 1185-1191.
- Cook, J. D., Finch, C.A. 1979.** Assessing iron status of a population. *Am. J. Clin. Nutr.* 32: 2115-2119.
- Cook, J. D., Minnich, V., Moore, C. V., Rasmussen, A., Bradley, W. B., Finch, C.A. 1973.** Absorption of fortification iron in bread. *Am. J. Clin. Nutr.* 26, 861-872.
- Cook, J. D., Monsen, E. R. 1977.** Vitamin C, the common cold, and iron absorption. *Am. J. Clin. Nutr.* 30: 235-241.
- Cook, J. D., Reusser, M. E. 1983.** Iron fortification: an update. *Am. J. Clin. Nutr.* 38, 648-659.

- Cook, J.D., Dassenko, S.A., Whittaker, P. 1991.** Calcium supplementation: effect on iron absorption. *Am. J. Clin. Nutr.* 53: 106-111.
- Cook, J. D. 1994.** The effect of endurance training on iron metabolism. *Semin. Hematol.* 31: 146-154.
- Coudray, C., Bellange, J., Castiglia-Delahaut, C., Rémésy, C., Vermorel, M. Y Demigné, C. 1997.** Effect of soluble and partly soluble dietary fibres supplementatbn on absorption and balance of calcium, magnesium, iron and zinc in healthy young men. *Eur. J. Clin. Nutr.* 51: 375-380.
- Crichton, R. 2001.** Inorganic Biochemistry of iron Metabolism: From Molecular Mechanism to Clinical Consequences. 2e. 191-206
- Crittenden, R. G. y Playne, M. J. 1996.** Production, properties, and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends Food Sci. Technol.* 7: 353-361.
- Cummings, J.H., Roberfroid, M.B. and members of the Paris Carbohydrate Group, Anderson, H., Barth, C., Ferro-Luzzi, A., Ghoss, Y., Gibney, M., Hermosen, K., James, W.P.T., Korver, O., Lairon, D., pascal, G. Y Voragen, A.G.S. 1997.** A new look at dietary carbohydrate: chemistry, physiology and health. *Eur. J. Clin. Nutr.* 51: 417-423.
- Da Silva, L. F., Dutra-de-Oliveira, J. E., Marchini, J. S. 2004.** Serum iron analysis of adults receiving three different iron compounds. *Nutrition Research.* 24: 603-611.
- Dallman P. 1990.** Iron. Present knowledge in nutrition. Sixth edition. International Life Sciences Institute. ILSI. North America.
- Darnton-Hill, I. 1998.** Overview: rationale and elements of a successful food-fortification programme. *Food and Nutrition Bulletin* 19, 92-100.
- Darnton-Hill, I., Nalubola, R. 2002.** Fortification strategies to meet micronutrient needs: successes and failures. *Proceedings of the Nutrition Society*, 61, 231-241.
- Das, B. K., Bal, M.S., Tripathi, A. M., Singla, P.N., Agarwal, D. K., Agarwal, K. N. 1984.** Evaluation of frequency and dose of iron and other hematinics – an alternative strategy for anemia prophylaxis in rural preschoolers. *Indian J. Pediatr.* 21: 933-938.
- Davidsson, L., Cederblad, A., Lonnerdal, B., Sandstrom, B., 1989a.** Manganese retention in man: a method for estimating manganese absorption in man. *Am. J. Clin. Nutr.* 49, 170-179.
- Davidsson, L., Kastenmayer, P., Szajewska, H., Hurrell, R. F., Barclay, D. 2000.** Iron bioavailability in infants from an infant cereal fortified with ferric pyrophosphate or ferrous fumarate. *Am. J. Clin. Nutr.* 71:1597-1602.
- Davidsson, L., Lonnerdal, B., Sandstrom, B., Kunz, C., Keen, C.L., 1989b.** Identification of transferrin as the major plasma carrier protein for manganese introduced orally or intravenously or after in vitro addition in the rat. *J.Nutr.* 119, 1461-1464.
- Davidsson, L., Sarker, S. A., Funchs, G. J., Walczyk, T., Hurrell, R. F. 2001.** Helicobacter Pylori infection and iron absorption in Bangladeshi children (abstract). Bioavailability of micronutrient in relation to public health. Interlaken, Suiza, 30 Mayo – 1 Junio de 2001.
- De Bruyn, A., Álvarez, A. P., Sandra, P. y DeLeenheer, L. 1992.** Isolation and identification of β -D-fructosyl-(2,1)-D-fructose, a product of the enzymatic hydrolysis of the inulin from *Chicorium intybus*. *Carbohydr. Res.* 235: 303-308.
- Deehr, M.S., Dallal, G.E., Smith, K.T., Taulbee, J.D., Dawson-Hughes, B. 1990. **Effects of different calcium sources on iron absorption in postmenopausal women. Am. J. Clin. Nutr.** 51: 95-99.
- Delzenne, N., Aertssens, J., Verplaetse, H., Roccara, M., Roberfroid, M. 1995.** Effect of fermentable fructo-oligosaccharides on mineral,

nitrogen and energy digestible balance in the rat. *Life Sci.*; 57: 1579-1587.

Delzenne, N.M. y Roberfroid, M. B. 1994. Physiological effects of non-digestible oligosaccharides. *Lebens. M. Wiss. a. Technol.* 27: 1-6.

Demott, B. J. 1971. Effects on flavor of fortifying milk with iron and absorption of the iron from intestinal tract of rats. *J. Dairy Sci.* 54: 1609-1614.

Derman, D.P., Bothwell, T.H., Torrance, J.D., Bezwoda, W.R., MacPhail, A. P., Kew, M.C., Sayers, M.H., Disler, P.B. y Charlton, R.W. 1980. Iron absorption from maize (*Zea Mays*) and sorghum (*Sorghum vulgare*) beer. *Br. J. Nutr.* 43: 271-279.

Dexter, D.T., Carayon, A., Javoy-Agid, F., Agid, Y., Wells, F.R., Daniel, S.E., Lees, A.J., Jenner, P., Marsden, C.D., 1991. Alterations in the levels of iron, ferritin and other trace metals in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. *Brain* 114, 1953-1975.

Diaz, M., Rosado, J.L., Allen, L.H., Abrams, S., garcia, O.P. 2003. The efficacy of a local ascorbic acid-rich food in improving iron absorption from Mexican diets: a field study using stable isotopes. *Am. J. Clin. Nutr.* 78: 436-440.

Dickson, P.W., Aldred, A.R., Marley, P.D., Tu, G.F., Howlett, G.J., Schreiber, G., 1985. High prealbumin and transferrin mRNA levels in the choroid plexus of rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 127, 890-895.

Dietzfelbinger, H. 1987. Bioavailability of bi- and trivalent oral iron preparations. Investigations of iron absorption by postabsorption serum iron concentrations curves. *Arzneimittelforschung.* 37(1A):107-12.

Diplock, A. T., Aggett, P.J., Ashwell, M., Borner, F., Fern, E. B y Roberfroid, M. 1999. Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. *Br. J. Nutr.* 81(Suppl.): 1S-27S.

Djouzi, Z., Andrieux, C. 1997. Compared effects of three oligosaccharides on metabolism of intestinal microflora in rats inoculated with a human faecal flora. *Br. J. Nutr.* 78: 313-324.

Donovan, A., Brownlie, A., Zhou, Y., Shepard, J., Pratt, S.J., Moynihan, J., Paw, B.H., Drejer, A., Barut, B., Zapata, A., Law., T.C., Brugnarall, C., Lux, S.E., Pinkus, J.L., Kingsley, P.D., Palis, J., Fleming, M.D., Andrews, N.C., Zon, L.I., 2000. Positional cloning of zebrafish ferroportin identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* 403, 776-781.

Donovan, U.M., Gibson, R.S. 1995. Iron and zinc status of young women aged 14 to 19 years consuming vegetarian and omnivorous diets. *J. Am. Coll. Nutr.* 14: 463.

Douer D, Koeffler HP. 1982. Retinoic acid enhances growth of human early erythroid progenitor cells in vitro. *J Clin Invest.* 69:1039-41

Douglas, F. W., Rainey, N. H., Wong, N. P., Edmondson, L. F., La Croix, D. E. 1981. Color, flavor, and iron bioavailability in iron-fortified chocolate milk. *J. Dairy Sci.* 64: 1785-1793.

Dwyer, J. T., Garcea, A. O., Evans, M., Li, D., Lytle, L., Hoelscher, D., Nicklas, T. A., Zive, M. 2001. Do adolescent vitamin-mineral supplement users have better nutrient intakes than nonusers? Observations from the CATCH tracking study. *Journal of the American Dietetic Association* 101, 1340-1346.

Ebihara, K. y Okano, J. 1995. Comparison of bioavailability and hemoglobin repletion of ferric and ferrous iron infused into the cecum in anemic rats. *Nutr.Res.* 15: 889- 897.

Edmondson, L. F., Douglas, F. W Jr., Avants, J. K. 1971. Enrichment of pasteurized whole milk with iron. *J. Dairy Sci.* 54: 1422-1426.

Ekenved, G., Norrby, A., Sölvell, L.1976. Serum iron increase as a measure of iron absorption – studies on the correlation with total absorption. *Scand. J. Haematol. Suppl* 28: 31-49.

- Englyst, H.N. y Hudson, G.J. 1996.** The classification and measurement of dietary carbohydrates. *Food Chemistry*. 57 (1): 15-21.
- Fairbanks, V.F., Beutler, E. 1995.** Iron metabolism. In: Beutler, E, Lichtman, M.A, Coller, B.S., Kipps, T.J, eds. *Williams Hematology*. 5th ed. New York, NY: McGraw-Hill; 369-380.
- Fairbanks, V.F., Klee, G.G. 1994.** Biochemical aspects of haematology. In: Burtis CA, Ashwood, ER, eds. *Tietz textbook of clinical chemistry*, 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders: 1974-2072.
- Fairweather-Tait, S. J. 1987.** The concept of bioavailability as it relates to iron nutrition. *Nutr. Res.* 7: 319-325.
- Fairweather-Tait, S. J., Piper, Z., Fatemi, S. J., Moore, G. R. 1991.** The effect of tea on iron and aluminium metabolism in the rat. *Br. J. Nutr.* 65: 61-68.
- Fairweather-Tait, S. J. 1992.** Bioavailability of trace elements. *Food Chem.* 43: 213-217.
- Fairweather-Tait, S. J. 1997.** Iron fortification in the UK: how necessary and effective is it? In: *Trace Elements in Man and Animals* (Fisher, P. W. F., L`Abbe, M.R., Cockell, K. A and Gilson, R. S., eds.), pp. 392-396, NCR Research Press, Ottawa, Canada)
- Fairweather-Tait, S. J. 2001.** *Iron*. *J. Nutr.* 131: 1383S-1386S.
- Fairweather-Tait, S. J., fox, T. E., Wharf, S. G., Ghani, N. A. 1992.** A preliminary study of the bioavailability of iron - and zinc-glycinate. *Food Addit. Contam.* 9: 91-101.
- FAO/WHO. 1988.** Requiriments of vitamin A, iron, folate and vitamna B12. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation. Rome: FAO. (FAO Food and Nutririon Series N° 23).
- Fawzie, W.W., Msamanga, G.I., Spiegelamn, D., Urassa, E.J.N, McGrath, N., Mwakagile, D., Antelman, G., Mbise, R., Herrera, G., Kapiga, S., Willet, W., Hunter, D.J. & the Tanzania Vitamin & HIV Infection Trial Team. 1998.** Randomized trial of effects of vitamin supplements on pregnancy outcomes and T cell counts in HIV-1-infected women in Tanzania. *Lancet*, 351: 1477-1482.
- Ferguson, C.J., Wareing, M., Ward, D.T., Green, R., Smith, C.P., Riccardi, D. 2001.** Cellular localization of divalent metal transporter DMT-1 in rat kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 280: F803-F814.
- Fidler, M.C., Davidsson, L., Zeder, C., Walczyk, T., Hurrell, R.F. 2003.** Iron absorption from ferrous fumarate in adult women is inflyenced by ascorbic acid but not by Na₂EDTA. *British Journal of Nutrition.* 90: 1081-1085.
- Fidler, M.C., Davidsson, L., Zeder, C., Walczyk, T., Marti, I., Hurrell, R.F. 2004a.** Effect of ascorbic acid and particle size on iron absorption from ferric pyrophosphate in adult women. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 74: 301-307.
- Fidler, M.C., Walczyk, T., Davidsson, L., Zeder, C., Sakaguchi, N., Juneja, L.R., Hurrell, R.F. 2004b.** A micronised, dispersable ferric pyrophosphate with high relative bioavailability in man. *Br. J. Nutr.* 91: 107-112.
- Finch, C. A., Cook, J. D., Labbe, R. F., y Culala, M. 1977.** Effect of blood donation on iron stores as evaluated by serum ferritin . *Blood* 50, 441-447.
- Finch, C. A., Huebers, H. 1982.** Perspectives in iron metabolism. *New England Journal of Medicine.* 306: 1520-1528.
- Finch, C., 1994.** Regulators of iron balance in humans. *Blood.* 84, 1697-1702.
- Fischer, J. G., Glauert, H. P., Yin, T., Sweeney-Reeves, M. L., Larmonier, N., Black, M. C. 2002.** Moderate iron overload enhances lipid peroxidation in livers of rats, but does not affect NF-KappaB activation induced by the peroxisome proliferator. *J. Nutr.* 132: 2525-2531.
- Fishman, S. M., Christian, P., West, K. P. 2000.** The role of vitamins in the prevention and control of anemia. *Public Health Nutrition:* 3(2), 125-150.

- Flanagan, P.R. 1989.** Mechanisms and regulation of intestinal uptake and transfer of iron. *Acta Paediatric. Scand.* 361: 21S-30S.
- Fleming, A. F. 1981.** Haematological manifestations of malaria and other parasitic diseases. *Clinics in Haematology* 10, 983-1011.
- Fleming, A. F. 1989.** The aetiology of severe anaemia in pregnancy in Ndola, Zambia. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 83: 37-49.
- Fleming, M.D., Trenor, C.C., Su, M.A., Foernzler, D., Beier, D.R., Dietrich, W.F., Andrews, N.C., 1997.** Microcytic anemia mice have a mutation in Nramp2 a candidate iron transporter gene. *Nat. Genet.* 16, 383-386.
- FAO. 1996.** Food Fortification: Technology and Quality Control. Report of an FAO Technical Meeting, Rome, 20-23 November 1995. FAO Food and Nutrition Paper. Rome: FAO.
- Forbes, A. L., Arnaud, M. J., Chichester, C. O., Cook, J. D., Harrinson, B. N., Hurrell, R. F., Kahn, S. G., Morris, E. R., Tanner, J. T., Whittaker, P y col. 1989.** Comparison of in vitro, animal, and clinical determinations of iron bioavailability: Interernational Nutritional Anemia Consultative Group Task Force report on iron bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 49, 225-238.
- Ford, G. C., Harrison, P. M., Rice, D. W., et al. 1984.** Ferritin: design and information of an iron storage molecule. *Phil. Trans. R. Soc. London Ser. B.* 304: 551-565.
- Fox, T.E., Eagles, J., Fairweather-Tait, S.J. 1998.** Bioavailability of iron glycine as a fortificant in infant food. *Am. J. Clin. Nutr.* 67: 664-668.
- Fransson, G.B., Lönnerdal, B. 1980.** Iron in human milk. *J. Paediatr.* 96: 380-384.
- Frassinelli-Gunderson, E. P., Margen, S., Brown, J. R. 1985.** Iron stores in users of oral contraceptive agents. *Am. J. Clin. Nutr.* 41(4): 703-712.
- Freddy, J.T., Win, H.M.S., Guido, R.M.M., et al. 2003.** New method to study oxidative damage and antioxidants in the human small bowel: effects of iron application. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 285: G354-G359.
- Frewin, R., Henson, A., Provan, D. 1997.** ABC of clinical haematology. Iron deficiency anaemia. *BMJ.* 314: 360-363.
- Fritz, J. C., Pla, G. W., Harrison, B. N., Clark, G. A. 1975.** Estimation of the bioavailability of iron. *Journal Association of Official Analytical Chemists* 58, 902-905.
- Fritz, J. C., Pla, G. W., Roberts, T., Boehne, J. W., Hove, E. L. 1970.** Biological availability in animals of iron from common dietary sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 18, 647-651.
- Gallagher, P. G., Ehrenkranz, R. A. 1995.** Nutritional anemia in infancy. *Clin. Perinatol.* 22: 671-692.
- Galleano, M., Puntarulo, S. 1997.** Dietary alpha-tocopherol supplementation on antioxidant defenses after in vivo iron overload in rats. *Toxicology.* 124: 73-81
- Ganz, T. 2003.** Hpcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood.* 102: 783-788.
- Ganz, T. 2006.** Molecular pathogenesis of anemia chronic disease. *Pediatr. Blood Cancer.* 46: 554-557.
- Garby, L., Areekul, S. 1974.** Iron supplementation in Thai fish sauce. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 68: 467-476.
- García-Casal, M. N., Layrisse, M. 2002.** Iron fortification of flours in Venezuela. *Nutrition Reviews* 60, S26-29.
- García-Casal, M. N., Layrisse, M., Peña-Rosas, J. P., Ramírez, J., Leets, I., Matus, P. 2003.** Iron absorption from elemental iron-fortified corn flakes in humans. Role of vitamins A and C. *Nutrition Research* 23, 451-463.
- Geerling, B.J., Badart-Smook, A., Stockbrugger, R.W., Brummer, R.J. 1998.** Comprehensive nutritional status in patients with long-standing Crohn disease currently in remission. *Am. J. Clin. Nutr.* 67: 919-926.
- Gerlach, M., Ben-Shachar, D., Riederer, P., Youdim, M.B., 1994.** Altered brain metabolism of iron as a cause of

neurodegenerative diseases?. *J. Neurochem.* 63, 793-807.

Gibson, G. R. 1999. Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin. *J. Nutr.* 129 (Suppl.): 1438S-1441S.

Gibson, G. R. Y Roberfroid, M. B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 125: 1401-1412.

Gonzalez, H., Mendoza, C., Viteri, F. E. 2001. Absorption of unlabeled reduced iron of small particle size from a commercial source. A method to predict absorption of unlabeled iron compound in humans. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 51, 217-224.

Gordon, N. 2003. Iron deficiency and the intellect. *Brain & Development.* 25: 3-8.

Goyer R. 1995. Nutrition and metal toxicity. *Am J Clin Nutr.* 61: 646S-650S.

Graf, E., Eaton, J. W. 1993. Suppression of colonic cancer by dietary phytic acid. *Nutr. Cancer;* 19: 11-19.

Grebe, G., Martinez.Torres, C., Layrisse, M. 1975. Effect of meals and ascorbic acid on the absorption of a therapeutic dose of iron as ferrous and ferric salts. *Current Therapeutic Research. Clinical and Experimental* 17, 382-397.

Grizar, D., Barthomeauf, C. 1999. Non-digestible oligosaccharides used as prebiotic agents: mode of protection and beneficial effects on animal and human health. *Rep. Nutr. Develop.* 39: 746-761.

Gudiel-Urbano, M., Goñi, I. 2002. Effect of fructooligosaccharides on nutritional parameters and mineral bioavailability in rats. *J. Sci. Food Agric.* 82: 913-917.

Guillebaud, J., Bonnar, J., Morehead, J., Matthews, A. 1976. Menstrual blood loss with intrauterine devices. *Lancet.* 387-390.

Gunshin, H., MacKenzie, B., Berger, U.V., Gunshin, Y., Romero, M.F., Boron, W.F., Nussberger, S., Gollan, J.I., Hedinger,

M.A., 1997. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 388, 482-488.

Gurzau, E.S., Neagu, C., Gurzau, A.E. 2003. Essential metals – case study on iron. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56, 190-200.

Gutteridge, J., Rowley, D., Halliwell, B. 1982. Superoxide dependent formation of hydroxyl radical and lipid peroxidation in the presence of iron salt: detection of catalytic iron and antioxidant activity in extracellular fluids. *Biochem. J.* 206: 605-609.

Haddad, E.H., Berk, L.S., Kettering, J.D., Hubbard, R.W., Peters, W.R. 1999. Dietary intake and biochemical, hematologic, and immune status of vegans compared with nonvegetarians. *Am. J. Clin. Nutr.* 70: 586S.

Hallberg, L., Solvell, L. 1965. A method for simultaneous determination of iron absorption, plasma volume, and plasma iron turnover in man. *Scand. J. Haematol.* 2: 187-194.

Hallberg, L., Högdahl, A. M., Nilson, L., Rybo, G. 1966. Menstrual blood loss: a population study. Variation at different ages and attempts to define normality. *Acta Obstet. Gynaecol. Scand.* 45: 320-351.

Hallberg, L. 1992. Iron balance in pregnancy and lactation. In: Foman SJ, Zlotkin S, eds. *Nutritional anemias.* New York: Raven Press. 13-28.

Hallberg, L. 1988. Iron balance in pregnancy. In: Berger H, ed. *Vitamins and mineral in pregnancy and lactation.* Nestlé Nutrition Workshop Series Vol. 16. New York: Raven Press. 115-127.

Hallberg, L. 1996. Iron requirements, iron balance and iron deficiency in menstruating and pregnant women. In: *Iron Nutrition in Health and Disease* (Hallberg, L. & Asp, N.-G., eds.) John Libbey & Co., pp 165-182.

Hallberg, L. 2001. Perspectives on nutritional iron deficiency. *Annual Review of Nutrition* 21, 1-21.

- Hallberg, L. 2002.** Advantages and disadvantages of an iron-rich diet. *Eur. J. Clin. Nutr.* 56, Suppl 1: S12-S18.
- Hallberg, L., Hulthén, L. 2002.** Perspectives in iron absorption. *Blood Cells Mol. Dis.* 29(3): 562-573.
- Hallberg, L., Brune, M., Erlandsson, M., Sandberg, A. S. Rossander-Hulten, L. 1991a.** Calcium: effect of different amounts on nonheme- and heme-iron absorption in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 53: 112-119.
- Hallberg, L., Brune, M., Rossander-Hunthen, L. 1987.** Is there a physiological role of vitamin C in iron absorption?. *Ann. NY Acad. Sci.* 498: 324-332.
- Hallberg, L., Brune, M., Rossander-Hunthen, L. 1989.** Iron absorption in man: ascorbic acid and dose-dependent inhibition by phytate. *Am. J. Clin. Nutr.* 49: 140-144.
- Hallberg, L., Hulthén, L., Gramatkovski, E. 1997.** Iron absorption from the whole diet in men: how effective is the regulation of iron absorption?. *Am. J. Clin. Nutr.* 66: 347-356.
- Hallberg, L., Rossander-Hulten, L., Brune, M., Gleerup, A. 1992.** Calcium and iron absorption: mechanism of action and nutritional importance. *Eur. J. Clin. Nutr.* 46: 317-327.
- Hallberg, L., Sandström, B., Aggett, P. J. 1993.** Iron, zinc, and other trace elements. In *Human nutrition and dietetics*, pp. 174-188 [JS Garrow and WPT James, editors]. Edinburgh [etc.]: Churchill Livingstone.
- Halliday, J.W., Ramm, G.A., Powell, L.W. 1995.** Cellular Iron Processing and Storage: The role of Ferritin. *Iron Metabolism in Health and Disease*. W.B. Saunders Company Ltd.
- Halliwell, B., 1992.** Oxygen radicals as key mediators in neurological disease: fact or fiction?. *Ann. Neurol.* 32, 10-15.
- Halliwell, B., Frei, B., England, L., Ames, B.N. 1996.** Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo?. *Free Radic. Res.* 25: 439-454.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M., 1992.** Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Lett.* 307, 108-112.
- Harman, S.K., Parnell, W.R. 1998.** The nutritional health of New Zealand vegetarian and nonvegetarian Seventh-day Adventists: selected vitamin, mineral and lipid levels. *N. Z. Med. J.* 111(1062): 91.
- Haro-Vicente, J.F., Martínez-Graciá, C., Ros, G. 2006.** Optimisation of in vitro measurement of available iron from different fortificants in citrus fruit juices. *Food Chemistry.* 98: 639-648.
- Harrison, B. N., Pla, G. W., Clark, G. A., Fritz, J. C. 1976.** Selection of iron sources for cereal enrichment. *Cereal Chemistry* 53, 78-84.
- Harris, Z.L., Klomp, L.W., Gitlin, J.D., 1998.** Aceruloplasminemia: a inherited neurodegenerative disease with impairment of iron homeostasis. *Am. J. Clin. Nutr.* 67, 972-977.
- Hegsted, D.M. 1976.** Balance studies. *J. Nutr.* 106: 307-311.
- Heinrich, H.C. 1970.** Intestinal iron absorption in man. Methods of measurement, dose relationship, diagnostic and therapeutic applications. In: Hallberg L, Harwerth, H.G, Vannotti, A, editors. *Iron deficiency: pathogenesis, clinical aspects, therapy*. London: Academic Press. P. 213-296.
- Helman, A.D., Darnton-Hill, I. 1987.** Vitamin and iron status in new vegetarians. *Am. J. Clin. Nutr.* 45: 785.
- Herbert, V. 1984.** Vitamin B₂. In: Olsen, R. E., Broquist, H. P., Chichester, C. O., y col., eds *Nutrition Reviews: Present Knowledge in Nutrition*, 5th edn. Washington, DC: The Nutrition Foundation; 347-364.
- Hercberg, S., Preziosi, P., Galan, P. 2001.** Iron deficiency in Europe. *Public Health Nutrition.* 4(2B): 537-545.
- Hernández, M., Sousa, V., Mareno, A., Villapando, S., López-Alarcón, M. 2003.** Iron bioavailability and utilization in rats are lower from lime-treated corn flour than from

wheat flour when they are fortified with different sources of iron. *J. Nutr.* 133: 154-159.

- Hershko, C. 1977.** Storage iron regulation. *Prog. Hematol.* 10: 105-148.
- Hiroshi, M. 2000.** The structural mechanism for iron uptake and release by transferrins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64: 1328-1336.
- Hodges, R.E., Sauberlich, H.E., Canham, J.E., et al. 1978.** Hematopoietic studies in vitamin A deficiency. *Am. J. Clin. Nutr.* 31: 876-885.
- Hoefkens, P., Smit, M.H., deJeu-Jaspars, N.M., Huijskes-Heins, M.I., deJong, G. VanEijk, H.G., 1996.** Isolation, renaturation, and partial characterization of recombinant human transferrin and its half molecules from *Escherichia coli*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 28, 975-982.
- Hoppe, M., Hulthén, L., Hallberg, L. 2006.** The relative bioavailability in humans of elemental iron powders for use in food fortification. *Eur. J. Nutr.* 45: 37-44.
- Hua, N.W., Stoohs, R.A., facchini, F.S. 2001.** Low iron status and enhanced insulin sensitivity in lacto-ovo-vegetarians. *Br. J. Nutr.* 86: 515.
- Hubert, N., Hentze, M.W. 2002.** Previously uncharacterized isoforms of divalent metal transporter (DMT-1): implications for regulation and cellular function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 12345-12350.
- Huebers, H.A., Eng, M.J., Josephson, B.M., Ekpoom, N., Rettmer, R.L., Labbé, R.F y col. 1987.** Plasma iron and transferrin iron-binding capacity evaluated by colorimetric and immunoprecipitation method. *Clin. Chem.* 33: 273-277.
- Huffman, S.L., Baker, J., Shuman, J., Zehmer, E.R. 1998.** The case for promoting multiple vitamin/mineral supplements for women of reproductive age in developing countries. Washington, DC: Linkages Project, Academy for Educational Development.
- Hughes-Jones, N. C., Wickramasinghe, S. N. 1996.** Lecture notes on haematology. Oxford: Blackwell-Science.
- Hunt, J.R. 2003.** Bioavailability of iron, zinc and other trace minerals from vegetarian diets. *Am. J. Clin. Nutr.* 78: 633S-639S.
- Hurrell, R. F. 1984.** Bioavailability of different iron compounds to fortify formulas and cereals: technological problems. In: *Iron Nutrition in Infancy and Childhood* (Stekel, A., ed.), pp. 147-178. Raven Press, New York, NY.
- Hurrell, R. F. 1985.** Nonelemental sources. In: *Iron fortification of Foods* (Clydesdale F.M. and Wiemer, K.L., eds.), pp. 39-53, Academic Press, Orlando, FL.
- Hurrell, R. F. 1997.** Bioavailability of iron. *Eur. J. Clin. Nutr.* 51, Suppl 1: S4- S8.
- Hurrell, R. F. 1997a.** Preventing iron deficiency through food fortification. *Nutrition Reviews*, 55, 210-222.
- Hurrell, R. F. 2002.** Fortification: Overcoming technical and practical barriers. *J. Nutr.* 132: 806S-812S.
- Hurrell, R. F. 2002b.** How to ensure adequate iron absorption from iron-fortified food. *Nutrition Reviews* 60, S7-S15.
- Hurrell, R. F., Bothwell, T., Cook, J. D., Dary, O., Davidsson, L., Fairweather-Tait, S., Hallberg, L., Lynch, S., Rosado, J., Walter, T., Whittaker, P. 2002.** The usefulness of elemental iron for cereal flour fortification: A Sustain Task Force Report. *Nutrition Reviews*, 60, 391-406.
- Hurrell, R. F., Furniss, D. E., Burri, J., Whittaker, P., Lynch, S. R., Cook, J. D. 1989.** Iron fortification of infant cereals: a proposal for the use of ferrous fumarate or ferrous succinate. *Am. J. Clin. Nutr.* 49: 1274-1282.
- Hurrell, R. F., Reddy, M. B., Burri, J., Cook, J. D. 2000.** An evaluation of EDTA compounds for iron fortification of cereal-based foods. *Br. J. Nutr.* 84, 903-910.
- Hurrell, R. F., Reddy, M. B., Dassenko, S. A., Cook, J. D., Shepherd, D. 1991.** Ferrous fumarate fortification of a chocolate drink powder. *Br. J. Nutr.* 65: 271-283.

- Hurrell, R.F. 1999.** Iron. In The mineral fortification of foods, pp. 54-93. [R Hurrell, editor]. Leatherhead, Surrey: Leatherhead Publishing.
- Hurrell, R.F., Lynch, S., Bothwell, T. Cori, H., Glahn, R., Hertrampf, E., Kratky, Z., Miller, D., Rodenstein, M., Streekstra, H., Teucher, B., Turner, E., Yeung, C.K., Zimmermann, M.B. 2004.** Enhancing the absorption of fortification iron. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **74(6)**, 387-401.
- Institute of Medicine. 2000.** Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. Washington, D.C.: National Academy Press (www.nap.edu/catalog/10026.html)
- International Nutritional Anemia Consultative group (INACG). 1983.** Iron EDTA for food fortification. Washington, DC: ILSI-Nutrition Foundation.
- Ito, M., Ohishi, K., Yoshida, Y., Yokoi, W., Sawada, H. 2003.** Antioxidant effects of lactic acid bacteria on the colonic mucosa of iron-overloaded mice. *J. Agric. Food Chem.* **51**: 4456-4460.
- Ito, M., Sawada, H., Ohishi, K., Yoshida, Y., Yokoi, W., Watanabe, T., Yokokura, T. 2001.** Suppressive effects of bifidobacteria on lipid peroxidation in the colonic mucosa of iron-overloaded mice. *J. Dairy Sci.* **84**: 1583-1589.
- Jacobs, A. 1985.** Iron deficiency and iron overload. *Critical Reviews in Oncology / Hematology* **3**: 143-186.
- Jain, N.C. 1993.** Essentials of veterinary haematology. Philadelphia, PA: Lea & Febiger: 173-175.
- Janelle, K.C., Barr, S.I. 1995.** Nutrient intakes and eating behaviour scores of vegetarian and nonvegetarian women. *J. Am. Diet Assoc.* **95**: 180.
- Jenkins, D.J.A., Wolever, T.M.S; Taylor, R.H., Barker, H.M., Fielden, H., Baldwin, J.N., Bowling, A.C., Newman, H.C., Jenkins, A.L. y Goff, D.V. 1981.** Glycemic index of foods: a physiological basis for carbohydrate exchange. *Am. J. Clin. Nutr.* **34**: 362-366.
- Jenner, P., 1991.** Oxidative stress as a cause of Parkinson's disease. *Acta Neurol. Scand.* **136**, 6-15.
- Joeng, S. Y., David, S. 2003.** Glycosylphosphatidylinositol anchored ceruloplasmin is required for iron efflux from cells in the central nervous system. *J. Biol. Chem.* **278**, 27144-27148.
- Johnston, K. L., Johnson, D. M., Marks, J., Srail, S. K., Debnam, E. S., Sharp, P. A. 2006.** Non-haem iron transport in the rat proximal colon. *Eur. J. Clin. Invest.* **36(1)**: 35-40.
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Fifty-third meeting, Rome, June 1-10, 1999.** Internet: <http://www.who.int/pes/jeff/Summary53revised.pdf>.
- Jones, B. M., Worwood, M., Jacobs, A. 1983.** Isoferritins in normal leucocytes. *Br. J. Haematol.* **55**: 73-81.
- Juneja, L. R., Nakata, H., Sakaguchi, N., Nanbu, H. 2003.** A new concept of ferric pyrophosphate fortification in foods (Sunactive FeTM). 2003 INACG Symposium, 41.
- Kaneko, J. J. 1989.** Clinical biochemistry of domestic animals. Academic Press Inc. P. 894.
- Kiely, M., Flynn, A., Harrington, K. E., Robson, P. J., O'Connor, N., Hannon, E. M., O'Brien, M. M., Bell, S., Strain, J. J. 2001.** The efficacy and safety of nutritional supplement use in a representative sample of adults in the North/South Ireland Food Consumption Survey. *Public Health Nutrition* **4**, 1089-1097.
- Kivijarvi, A., Timonen, H., Rajamaki, A., Gronroos, M. 1986.** Iron deficiency in women using modern copper intrauterine devices. *Obstet. Gynecol.* **67(1)**: 95-98.
- Kleessen, B., Sykura, B., Zunift, H. J., Blaut, M. 1997.** Effects of inulin and lactose on faecal microflora, microbial activity, and bowel habit in elderly constipated persons. *Am. J. Clin. Nutr.* **65**: 1397-1402.

- Knekt, P., Reunanen, A., Takkunen, H., Aromaa, A., Heliövaara, M., Hakulinen, T. 1994.** Body iron stores and risk of cancer. *Int. J. Cancer*, 56: 379-382.
- Knutson, M.D., Walter, P.B., Ames, B.N., Viteri, F.E. 2000.** Both iron deficiency and daily iron supplementation increase lipid peroxidation in rats. *J. Nutr.* 130: 621-628.
- Koury, M.J., Ponka, P. 2004.** New insights erithropoiesis: the roles of folate, vitamin B₁₂, and iron. *Annu. Rev. Nutr.* 24: 105-134.
- Kreuzer, M., Kirchgessner, M. 1991.** Endogenous iron excretion. A quantitative means to control iron metabolism?. *Biol. Trace Elem. Res.* 29(2):77-92
- Kurtz, F. E., Tamsma, A., Pallansch, M. J. 1973.** Effect of fortification with iron on susceptibility of skim milk and nonfat dry milk to oxidation. *J. Dairy Sci.* 56: 1139-1143.
- Langini, S., Carbone, N., Galdi, M y col. 1988.** Ferric glycinate iron bioavailability for rats as determined by extrinsic radioisotopic labeling of infanr formulas. *Nutr. Rep. Int.* 38: 729-735.
- Larsson, C.L., Johansson, G.K. 2002.** Dietary intake and nutritonal status of young vegans and omnivores in Sweeden. *Am. J. Clin. Nutr.* 6: 100.
- Layrisse, M., García-Casal, M.N. 1997.** Strategies for the prevention of iron deficiency through foods in the household. *Nutr. Rev.* 55: 233-239.
- Layrisse, M., García-Casal, M.N., Solano, L. 2000.** Bioavailability in humans from breakfast enriched with iron glycine chelate, phytates and polyphenols. *J. Nutr.* 130: 2195-2199.
- Layrisse, M., Martinez-Torres, C., Renzi, M. 1976.** Sugar as a vehicle for iron fortification: further studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 29, 274-279.
- Lee, D.H., Jacobs, D.R., Folsom, A.R. 2004.** A hypothesis: interaction between supplemental iron intake and fermentation affecting the risk of colon cancer. *The Iowa Women´s Health Study. Nutr Cancer.* 48: 1-5.
- Lieu, P.T., Heiskala, M., Peterson, P.A., Yang, Y., 2001.** The roles of iron in health and disease. *Molecular Aspects of Medicine.* 22, 1-87.
- Light, W. R., 3rd, Olson., J. S. 1990.** Transmembrane movement of heme. *J. Biol. Chem.* 265: 15623-15631.
- Lih-Brody, L., Powell, S.R., Collier, K.P., Reddy, G.M., Cerchia, R., Kahn, E., Weissman, G.S., Katz, S., Floyd, R.A., McKinley, M.J., Fisher, S.E., Mullin, G.E. 1996.** Increased oxidative stress and decreased antioxidant defensas in mucosa of inflammatory bowel disease. *Dig. Dis. Sci.* 41: 2078-2086.
- Liu, D. S., Bates, C. J., Yin, T. A., Wang, X. B., Lu, C. Q. 1993.** Nutritional efficacy of a fortified weaning rusk in a rural area near Beijing. *Am. J. Clin. Nutr.* 57: 506-511.
- Liu, D., Peng, Z., Qiu, G., Zhou, C. 2003.** Expression of telomerase activity and oxidative stress in human hepatocellular carcinoma with cirrhosis. *World J. Gastroenterol.* 9: 1859-1862.
- Loftin, M., Mannar, M. G. V., Merx, R. J, H, M., Naber-van den Heuvel, P. 1996.** Micronutrient fortification of foods: Current Practices, Research, and Opportunities. Ottawa, Ont.: MI/IAC.
- Lopez, H. W., Coudray, C., Bellanger, J., Levrat-Verny, M. A., Demigne, C., Rayssiguier, Y., Remesy, C. 2000.** Resistant starch improves mineral assimilation in rats adapted to a wheat bran diet. *Nutr. Res.* 20(1): 141-155.
- Luke, B. 2005.** Nutrition and Multiple gestation. *Semin. Perinatol.* 29: 349-354.
- Lund, E. K., Wharf, S. G., Fairweather-Tait, S. J., Johnson, I. T. 1999.** Oral ferrous sulfate supplements increase the free radical-generating capacity of feces from healthy volunterrs. *Am. J. Clin. Nutr.* 69: 250-255.
- Lynch, S. R., Cook, J. D. 1980.** Interaction of vitamin C and iron. *Ann. NY Acad. Sci;* 355: 32-44.
- Lynch, S. R., Green, A. 2001.** Assessment of nutritional anemias. in *Nutritional Anemias*, pp. 24-43. Boca Raton: CRC Press LLC.

- Lynch, S. R., Skikne, B.S., Cook, J. D. 1989.** Food iron absorption in idiopathic hemochromatosis. *Blood*; 74: 2187-2193.
- Lynch, S. R., Stoltzfus, R.J. 2003.** Iron and ascorbic acid: Proposed fortification levels and recommended iron compound. *J. Nutr.* 133: 2978S-2984S.
- MacPhail, P., Bothwell, T.H., Torrance, J.D., Derman, D.P., Bezwoda, W.R., Charlton, R.W., Mayer, F. 1981.** Factors affecting the absorption of iron from Fe(III)EDTA. *Am. J. Clin. Nutr.* 45: 215-226.
- Magnusson, B., Bjorn-Rasmussen, E., Hallberg, L., Rossander, L. 1981.** Iron absorption in relation to iron status. *Scand. J. Haematol.* 27: 201-208.
- Mahoney, A.W., Hendricks, D.G. 1982.** Efficiency of hemoglobin regeneration as a method of assessing iron bioavailability in food products. In: *Nutritional bioavailability of iron*. ACS Symposium series 203; Kies C (ed.) American Chemical Society, Washington DC, pp. 1-10.
- Mahoney, A.W., VanOrden, C.C., Hendricks, D.G. 1974.** Efficiency of converting food iron into hemoglobin by the anemic rat. *Nutr. Metab.* 20: 222-230.
- Manju, V., Balasubramanian, V., Nalini, N. 2002.** Oxidative stress and tumor markers in cervical cancer patients. *J. Biochem. Mol. Biol. Biophys.* 6: 387-399.
- Marfo, E.K., Simpson, B., Idowu, J.S., Oke, O.L. 1990.** Effect of local food processing on phytate levels in cassava, cocoyam, yam, maize, sorghum, rice, cowpea and soybean. *J. Agr. Food Chem.* 38: 1580-1585.
- Martinez, C., Fox, T., Eagles, J., Fairweather-Tait, S. 1998.** Evaluation of iron bioavailability in infant weaning foods fortified with haem concentrate. *J. Ped. Gastroent. Nutr.* 27: 419-424.
- Martínez, C., Ros, G., Periago, M. J. 2000.** Biodisponibilidad mineral (I): Hierro y Cinc. *Rev. Cién. (IEB).* 25-26: 23-36.
- Marx, JJ., van Asbeck, B.S. 1996.** Use of iron chelators in preventing hydroxyl radical damage: adult respiratory distress syndrome as an experimental model for the pathophysiology and treatment of oxygen-radical-mediated tissue damage. *Acta Haematol.* 95: 49-62.
- McCord, J.M., 1998.** Iron, free radicals, and oxidative injury. *Seminars Hematol.* 35, 5-12.
- McKie, A.T., Barrow, D., Latunde-Dada, G.O., Rolfs, A., Sager, G., Mudaly, E., Richardson, C., Barlow, D., Bomford, A., Peters, T.J., Raja, K.B., Shirali, S., Hedinger, M.A., Farzaneh, F., Simpson, R.J. 2001.** An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science* 291, 1755-1759.
- McKie, A.T., Latunde-Dada, G.O., Miret, S., McGregor, J.A., Anderson, G.J., Vulpe, C.D. 2002.** Molecular evidence for the role of a ferric reductase in iron transport. *Biochemical Society Transactions.* 30, 722-724
- McKie, A.T., Marciani, P., Rolfs, A., Brennan, K., Wehr, K., Barrow, D., Miret, S., Bomford, A., Peters, T.J., Farzaned, F., Hediger, M.A., Hentze, M.W., Simpson, R.J., 2000.** A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol. Cell* 5, 299-309.
- Meier, P. J., Giger, U., Brandli, O., Fehr, J. 1981.** Acquired, vitamin B₆-responsive, primary sideroblastic anemia, an enzyme deficiency in heme synthesis. *Schweiz. Med. Wochenschr;* 111: 1533-1535.
- Mejia LA, Arroyave G. 1982.** The effect of vitamin A fortification of sugar on iron metabolism in preschool children in Guatemala. *Am J Clin Nutr.* 36:87-93.
- Mejia, L.A., Chew, F. 1988.** Hematological effect of supplementing anemic children with vitamin A alone and in combination with iron. *Am .J. Clin. Nutr.* 48: 595-600.
- Mejia, L.A., Hodges, R.E., Arroyave, G. Viteri, F., Torum, B. 1977.** Vitamin A deficiency and

- anemia in Central American children. *Am. J. Clin. Nutr.* 30: 1175-1184.
- Millar, A.D., Rampton, D.S., Blake, R.D. 2000.** Effects of iron and iron chelation in vitro on mucosal oxidant activity in ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 14: 1163-1168.
- Milman, N, y Sondergaard, M. 1984.** Iron stores in male blood donors evaluated by serum ferritin. *Transfusion* 24, 464-468.
- Miret, S., Simpson, R.J., McKie, A.T. 2003.** Physiology and molecular biology of dietary iron absorption. *Ann. Rev. Nutr.* 23: 283-301.
- Mohanram, M., Kulkarni, K.A., Reddy, V. 1977.** Hematological studies in vitamin A deficient children. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 47: 389-393.
- Molis, C., Flourie, F., Ouarne, F., Galling, M.F., Lartigue, S., Guibert, A., Bornet, F y Galmiche, J.P. 1996.** Digestion, excretion and energy value of fructooligosaccharides in healthy human. *Am. J. Clin. Nutr.* 64: 324-328.
- Monsen, E.R. y Cook, J.D. 1976.** Food iron absorption in human subjects IV. The effects of calcium and phosphate salts on the absorption of nonheme iron. *Am. J. Clin. Nutr.* 29: 1142-1148.
- Moos, T., Trinder, D., Morgan, E. H. 2000.** Cellular distribution of iron ferric, ferritin, transferrin and divalent metal transporter 1 DMT 1 in substantia nigra and basal ganglia of normal and beta 2-microglobulin deficient mouse brain. *Cell. Mol. Biol.* 46. 549-561.
- Morgan, E.H., 1983.** Effect of pH and iron content of transferrin on its binding to reticulocyte receptors. *Biochem. Biophys. Acta.* 762, 498-502.
- Morgan, E.H., Oates, P.S. 2002.** Mechanisms and regulation of intestinal iron absorption. *Blood Cells, Molecules, and Diseases.* 29(3): 384-399.
- Myher, E. 1964.** Studies on megaloblasts in vitro. *Scand. J. Clin. Lab. Invest:* 16: 307.
- Nanbu, H., Nakata, K., Sakaguchi, N., Yamazaki, Y. 1998.** Mineral Composition. European Patent EP 0870435A1.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1995.** How to define and determine reference in the clinical laboratory. Approved guidelines. NCCLS document C28-A. Villanova, PA: NCCLS.
- Natta, C. L., Reynolds, R. D. 1984.** Apparent vitamin B₆ deficiency in sickle cell anemia. *Am. J. Clin. Nutr.* 40: 235-239.
- Nelson, R. L. 1992.** Dietary iron and colorectal cancer risk. *Free Rad. Biol. Med.* 12: 161-168.
- Nelson, R. L., Davis, F. G., Sutter, E., Sobin, L. H., Kikendall, J. W., Bowen, P. 1994.** Body iron stores and risk of colonic neoplasia. *J. Nat. Cancer Inst.* 86: 455-460.
- Nestél, P. 1993.** Food fortification in developing countries. New York: USAID/VITAL.
- Nilsson, L., Solvell, L. 1967.** Clinical studies on oral contraceptives – a randomized, double blind, crossover study of four different preparations. *Acta Obstet. Gynaecol. Scand. (Suppl).* 46: 1-31.
- Noyer, C. M., Immenschuh, S., Liem, H. H., Muller-Eberhard, U., Wolkoff, A. W. 1998.** Initial heme uptake from albumin by short-term cultured rat hepatocytes is mediated by a transport mechanism differing from that of other organic anions. *Hepatology.* 28: 150-155.
- Oates, P. S., Morgan, E. H. 1996.** Effects of dietary iron loading with carbonyl iron and of iron depletion on intestinal growth, morphology, and expression of transferrin receptor in the rat. *The anatomical record.* 246: 364-371.
- O`Connell, M. J., Ward, R. J. Baum, H., Treffry, A., Peters, T.J. 1988.** Evidence of a biosynthetic link between ferritin and haemosiderin. *Biochem. Soc. Trans.* 16: 828-829.
- Odetti, P., Valentini, S., Aragno, I., Garibaldi, S., Pronzato, M.A., Rolandi, E., Barreca, T. 1998.** Oxidative stress in subjects affected by celiac disease. *Free Radic. Res.* 29: 17-24.
- Ofori-Nkansah, N., Weissenfels, I., Pribilla, W. 1975.** Vitamin B₆ deficiency anemia. *Schweiz. Med. Wochenschr.;* 105: 1319-1324.

- Ohkawara, Y., Bamba, M., Nakai, I., Kinjka, S., Masuda, M. 1963.** The absorption of iron from the human large intestine. *Gastroenterology*. 44: 611-614.
- Ohta, A., Ohtsuki, M., Baba, S., Takizawa, T., Adachi, T., Kimura, S. 1995.** Effect of fructooligosaccharides on the absorption of iron, calcium and manganese in iron-deficient anemia rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokio)*; 41: 281-291.
- Ohta, A., Ohtsuki, M., Uehara, M. y col. 1998.** Dietary fructooligosaccharides prevent postgastrectomy anemia and osteopenia in rats. *J. Nutr.*
- Ohta, A., Sakai, K., Takasaki, M., Uehara, M., Tokunaga, T. y Adachi, T. 1999.** Dietary heme iron does not prevent postgastrectomy anemia but fructo-oligosaccharides improve bioavailability of heme iron in rats. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 69(5): 348-355.
- Oldenburg, B., Koningsberger, J.C., Van Berge Henegouwen, G.P., Van Asbeck, B.S., Marx, J.J. 2001.** Review article: iron and inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 15: 429-438.
- Olivares, M., Pizarro, F., Pineda, O., Name, J. J. Hertrampf, E., Walter, T. 1997.** Milk inhibits and ascorbic acid favors ferrous bis-glycinate chelate bioavailability in humans. *J. Nutr.* 127: 1407-1411.
- Organización Panamericana de la Salud (PAHO). 2002.** Compuestos de hierro para la fortificación de alimentos: guías para América Latina y el Caribe. Washington, DC.
- Oski, F. A. 1995.** Anemia due to other nutritional deficiencies. In: Williams, W. J., Beutler, E., eds. *Hematology*. New York: McGraw-Hill, 511-515.
- Panth, M., Shatrugna, V., Yasodhara, P., Sivakumar, B. 1990.** Effect of vitamin A supplementation on haemoglobin and vitamin A levels during pregnancy. *Br. J. Nutr.* 64(2): 351-358.
- Papanastasiou, D.A., Vayenas, D.V., Vassilopoulos, A., Repanti, M. 2000.** Concentration of iron and distribution of iron and transferrin after experimental iron overload in rat tissues in vivo: study of the liver, the spleen, the central nervous system and the other organs. *Pathology: Research and Practice* 196, 47-54.
- Papanokolaou, G., Pantopoulos, K. 2005.** Iron metabolism and toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 202: 199-211.
- Park, C.H., Bacon, B.R., Brittenham, G.M., Tavill, A.S. 1987.** Pathology of dietary carbonyl iron overload in rats. *Lab. Invest.* 57: 555-563.
- Parkkinen, J y col. 2002.** Functional and therapeutic development of apotransferrin. *Vox Sang.* 83 (Suppl. 1), 321-326.
- Parmley, R.T., Barton, J.C., Conrad, M.E., Austin, R.L., Holland, R.M., 1981a.** Ultrastructural cytochemistry and radioautography of hemoglobin-iron absorption. *Exp. Mol. Pathol.* 34. 131-144.
- Peter, F., Wang, S. 1981.** Serum iron and total iron binding capacity compared with serum ferritin in assessment of iron deficiency. *Clin. Chem.* 27(2): 276-279.
- Peters, S. W., Jacobs, A., Fitzsimmons, E. 1983.** Erythrocyte ferritin in normal subjects and patients with abnormal iron metabolism. *Br. J. Haematol.* 30: 47-55
- Picciano, M.F. 2003.** Pregnancy and lactation: Physiological adjustments, nutritional requirements and the role of dietary supplements. *J. Nutr.* 133 Suppl.: 1997S-2002S.
- Pietrangelo, A. 2002.** Physiology of iron transport and the hemochromatosis gene. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 282: G403-G414.
- Pirzio-Biroli, G., Bothwell, t.H., Finch, C.A. 1958.** Iron absorption. II. The absorption of radioiron administered with a standard meal in man. *J. Lab. Clin. Med.* 51: 37-48.
- Ponka, P. 1999.** Iron metabolism: physiology and pathophysiology. *Trace Elem. Res. Hum.* 5, 55-57.

- Powell, L. W., Alpert, E., Drysdale, J. W., Isselbacher, K. J. 1974.** Abnormality in tissue isoferritins in idiopathic hemochromatosis. *Nature*. 250: 333-335.
- Powell, L. W., Alpert, E., Isselbacher, K. J., Drysdale, J. W. 1975.** Human isoferritins: organ specific iron and apoferritin distribution. *Br. J. Haematol.* 30: 47-55.
- Powers, H. J., Bates, C. J., Iamb, W. H., Singh, J., gelman, W., Webb, E. 1985.** Effects of a multivitamin and iron supplement on running performance in Gambian children. *Hum. Nutr. Clin. Nutr.* 39: 427-437.
- Ramakrishnan, U., Huffman, S. 2001.** Multiple micronutrient malnutrition – what can be done? In: *Nutrition and Health in Developing Countries* (Semba, R.D. & Bloem, M., eds.), pp. 365-392. Humana Press, Tatawa, N.J.
- Ramakrishnan, U., Neufeld, L.M., Gonzalez-Cossio, T., Villalpando, S., Garcia-Guerra, A., Rivera, J., Martorell, R. 2004.** Multiple micronutrient supplements during pregnancy do not reduce anemia or improve iron status compared to iron-only supplements in semirural Mexico. *J. Nutr.* 134: 898-903.
- Reddy, M.B., Cook, J.D. 1989.** Assessment of dietary determinants of nonheme-iron absorption in humans and rats. *Am. J. Clin. Nutr.* 54: 723-728.
- Reddy, M.B., Cook, J.D. 1994.** Absorption of nonheme iron in ascorbic acid-deficient rats. *J. Nutr.* 124(6):882-7.
- Reddy, S., Sanders, T.A. 1990.** Haematological studies on pre-menopausal Indian and Caucasian vegetarians compared with Caucasian omnivores. *Br. J. Nutr.* 64: 331.
- Reeves, P.G. 1997.** Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J. Nutr.* 127(5 Suppl):838S-841S.
- Reinken, L., Kurz, R. 1978.** The treatment of anemia due to iron deficiency with iron combined with vitamins (in German). *Klin. Padiatr.* 190: 163-167.
- Richmond, H. 1959.** Induction of sarcoma in the rat by iron dextran complex. *Br. Med. J.* 1: 947-949.
- Rios, E., Hunter, R. E., Cook, J. D., Smith, N. J., Finch, C. A. 1975.** The absorption of iron as supplements in infant cereals and infant formulas. *Paediatrics* 55, 686-693.
- Ritchie, R.F., Palomaki, G.E., Neveux, L.M., Navolotskaia, O., Ledue, T.B., Craig, W.Y. 2002.** Reference distributions of serum iron and transferrin saturation: A practical, simple, and clinically relevant approach in a large cohort. *J. Clin. Lab. Anal.* 16: 237-245.
- Roberfroid, M.B. 2000.** Concepts and strategy of functional food science: the European perspective. *Am. J. Clin. Nutr.* 71 (Suppl.): 1660S-1664S.
- Roberfroid, M.B. 2002.** Global view on functional foods: European perspectives. *Br. J. Nutr.* 88 (Suppl.2): S133-S136.
- Roberfroid, M.B. y Delzenne, N. 1998.** Dietary fructans. *Annual Review Nutrition*, 18 : 117-143.
- Rondanelli, E.G., Gorini, P., Magliulo, E., Fiori, G.P. 1964.** Differences in proliferative activity between normoblast and pernicious anemia megaloblasts. *Blood*; 24: 542.
- Roodenburg AJ, West CE, Beynen AC. 1996.** Does vitamin A deficiency affect erythropoiesis in rats?. *Eur J Clin Nutr.* 50(suppl):S84 (letter).
- Ros, F. M. 1995.** Biodisponibilidad mineral en harinas de cereales infantiles enriquecidas con distintas fuentes de hierro. Tesis Doctoral. Departamento de Ciencias Sociosanitarias, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia.
- Ross, J. S., and Thomas, E. L. 1996.** Iron deficiency anemia and maternal mortality. Profile 3. Working Notes Series no 3. Washington, D.C: Academy for Educational Development.
- Rybo, G.M. 1966.** Plasminogen activators in the endometrium. I. Methodological aspects and II. Clinical aspects. *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.* 45: 411-450.

- Rybo, G.M., y Hallberg, L. 1966.** Influence of heredity and environment on normal menstrual blood loss. A study of twins. *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.* 45: 389-410.
- Saarinen, U. M., Siimes, M. A., Dallman, P. R. 1977.** Iron absorption in infants: high bioavailability of breast milk iron as indicated by the extrinsic tag method of iron absorption and by the concentration of serum ferritin. *J. Pediatr.* 91(1): 36-39.
- Sacks, P.V., Houchin, D.N. 1978.** Comparative bioavailability of elemental iron powders for repair of iron deficiency anemia in rats. Studies of efficacy and toxicology of carbonyl iron. *Am. J. Clin. Nutr.* 31: 566-573.
- Sahu, S. C. 1992.** Dietary iron and cancer: a review. *Environ. Carcinog. Ecotox. Rev.* 10: 205-237.
- Sakaguchi, E., Sakota, G., Toramaru, Y. 1998.** Cecal fermentation and energy accumulation in the rat fed on indigestible oligosaccharides. *Br. J. Nutr.* 80: 469-476.
- Sakaguchi, N., Rao, T.P., Nakata, K., Nanbu, H. Juneja, L.R. 2004.** Iron absorption and bioavailability in rats of micronized dispersible ferric pyrophosphate. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 74: 3-9.
- Sakai, K., Ohta, A., Shiga, K., Takasaki, M., Tokunaga, T. y Hara, H. 2000.** The cecum and dietary short-chain fructooligosaccharides are involved in preventing postgastrectomy anemia in rats. *J. Nutr.* 130(6): 1608-1612.
- Sanchez-Morito, N., Planells, E., Aranda, P., Llopis, J. 2000.** Influence of magnesium deficiency on the bioavailability and tissue distribution of iron in the rat. *J. Nutr. Biochem.* 11(2): 103-108.
- Sandstrom, B. 2001.** Micronutrient interactions: effects on absorption and bioavailability. *Br. J. Nutr.* 85 (suppl. 2): S181-S185.
- Sarriá D., Vaquero, M.P. 2004.** Iron bioavailability from powdered and in bottle sterilized formulas in suckling and weanling rats. *Nutrition* 20: 788-793.
- Saylor, L., Finch, C.A. 1953.** Determination of iron absorption using two isotopes of iron. *Am. J. Physiol.* 172: 372-376.
- Schaich, K.M., 1992.** Metals and lipid oxidation. *Lipids* 27, 209-218.
- Schlemmer, U. 1995.** Bioavailability of nutrients. Conceptual aspects of definition and problems of determination. *Br. J. Nutr.* 73: 150-151.
- Scholl, T.O. 2005.** Iron status during pregnancy: setting the stage for mother and infant. *Am. J. Clin. Nutr.* 81: 1281S-1222S.
- Scholz-Ahrens, K. E., Schaafsma, G., Van Den Heuvel, E. Y Schrezenmeir, J. 2001.** Effects of prebiotics on mineral metabolism. *A. J. Clin. Nutr.* 73(Suppl.): 459S-464S.
- Schroeder C, Gibson L, Zenke M, Beug H. 1992.** Modulation of normal erythroid differentiation by the endogenous thyroid hormone and retinoic acid receptors: a possible target for *v-erbA* oncogene action. *Oncogene.* 7:217-27
- Schumann, K., Elsenhans, B., Ehtechami, C., Forth, W. 1990.** Rat intestinal iron transfer capacity and the longitudinal distribution of its adaptation to iron deficiency. *Digestion.* 46: 35-45.
- Semba, R.D., Muhilal, West, K.P., et al. 1992.** Impact of vitamin A supplementation on hematological indicators of iron metabolism and protein status in children. *Nutr. Res.* 12: 469-478.
- Senthil, K., Aranganathan, S., Nalini, N. 2004.** Evidence of oxidative stress in the circulation of ovarian cancer patients. *Clin. Chim. Acta.* 339: 27-32.
- Seril, D. N., Liao, J., Ho, K. L., Yang, C. S., Yang, G. Y. 2002.** Inhibition of chronic ulcerative colitis-associated colorectal adenocarcinoma development in a murine model by N-acetylcysteine. *Carcinogenesis.* 23(6):993-1001.
- Shaskey, J., Green, G.A. 2000.** Sports haematology. *Sports Med.* 29: 27-38.
- Shaw, N.S., Chin, C.J., Pan, W.H. 1995.** A vegetarian diet rich in soybean products

- compromises iron status in young students. *J. Nutr.* 125: 212.
- Shaw, N., Liu, Y. 2000.** Bioavailability of iron from purple laver (*porphyrya spp.*) estimated in a rats hemoglobin regeneration bioassay. *J. Agric. Food Chem.* 48: 1734-1737.
- Shayeghi, M., Latunde-Dada, G., Oakhill, J. S., Takeuchi, K., Laftah, A., Khan, Y., Warley, A., Halliday, N., McCann, F., Hider, R. C, et al. 2005.** Identification of an intestinal heme transporter. *Cell.* 122: 789-801.
- Siegers, C. P., Burmann, D., Baretton, G., Younes, M. 1998.** Dietary iron enhances the tumor rate in dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in mice. *Cancer Lett.* 41: 251-256
- Sijtsma, K.W., Van der Berg, G.J., Lemmens, A.G., West, C.E., Beynen, A.C. 1993.** Iron status in rats fed on diets containing marginal amounts of vitamin A. *Br. J. Nutr.* 70: 777-785.
- Sikka, S. 2003.** Role of oxidative stress response elements and antioxidants in prostate cancer pathobiology and chemoprevention – a mechanistic approach. *Curr. Med. Chem.* 10: 2679-2692.
- Skikne, B. 1988.** Current concepts in iron deficiency anaemia. *Food Reviews International* 4, 137-173.
- Smith, C., Mitchinson, M.J., Aruoma, O.I. Halliwell, B., 1992.** Stimulation of lipid peroxidation and hydroxyl-radical generation by the contents of human atherosclerotic lesions. *Biochem.J.* 286, 901-905.
- Smith, J.E. 1989.** Iron metabolism and its disease. In: Kaneko JJ, ed. *Clinical Biochemistry of domestic animals.* 4th ed. San Diego, CA: Academic Press; 256-273.
- Smith, N.J., Rios, E. 1974.** Iron metabolism and iron deficiency in infancy and childhood. *Advances in Pediatrics.* 21, 239-280.
- Smuts, C.M., Dhansay, M.A., Faber, M., van Stuijvenberg, M.E., Swaneveider, S., Gross, R., Benadé, S. 2005.** Efficacy of multiple micronutrient supplementation for improving anemia, micronutrient status, and growth in South African infants. *J. Nutr.* 135: 653S-659S.
- Snyder, A.C., Dvorak, L.L., Roepke, J.B. 1989.** Influence of dietary iron source on measures of iron status among female runners. *Med. Sci. Sports Exerc.* 21: 7
- Sofic, E., Riederer, P., Heinsen, H., Beckmann, H., Reynolds, G.P., Hebenstreit, G., Youdim, M.B., 1988.** Increased iron (III) and total iron content in post mortem substantial nigra of parkinsonian brain. *J. Neural transm.* 74, 199-205.
- Spiegel, J.E., Tose, R., Karadell, P., Frankos, V. H. y Schmitt, D.F. 1994.** Safety and benefits of fructooligosaccharides as food ingredients. *Food Technol.* 48(1): 85-89.
- Stadtman, E. R. 1991.** Ascorbic acid and oxidative inactivation of proteins. *Am. J. Clin. Nutr.* 54(6 Suppl):1125S-1128S.
- Steinberg, S. E., Fonda, S., Campbell, C. L., Hillman, R. S. 1983.** Cellular abnormalities of folate deficiency. *Br. J. Haematol.* 54: 605.
- Stewart, J.G., Ahlquist, D.A., McGill, D.B., Ilstrup, D.M., Schwartz, S., Owen, R.A. 1984.** Gastrointestinal blood loss and anemia in runners. *Ann. Intern. Med.* 100: 843-845.
- Stokes, P. L., Melikian, V., Leeming, R. L., Portman-Graham, H., Blair, J. A., Cooke, W. T. 1975.** Folate metabolism in scurvy. *Am. J. Clin. Nutr.* 28: 126-129.
- Suharno, D., West, C. E., Muhilal Karyadi, D., Hautvasy, J. G. 1993.** Supplementation with vitamin A and iron for nutritional anaemia in pregnant women in West Java, Indonesia. *Lancet.* 27; 342(8883):1325-8.
- Sussman, H.H., 1992.** Iron in cancer. *Pathobiology* 60, 2-9.
- SUSTAIN. 2001.** Guidelines for iron fortification of cereal food staples. Washington, DC, May 2001. Available at: <http://www.sustainech.org/pub2.pdf>.
- Swain, J.H., Newman, S.M., Hunt, J.R. 2003.** Bioavailability of elemental iron powders to rats

is less than bakery-grade ferrous sulfate and predicted by iron solubility and particle surface area. *J. Nutr.* 133: 2546-3552.

Takeda, A., Devenyi, A., Connor, J.R., 1998.

Evidence for non-transferrin-mediated uptake and release of iron and manganese in glial cell cultures from hypotransferrinemic mice. *J. Neurosci. Res.* 51, 454-462.

Tandy, S., Williams, M., Leggett, A., Lopez-Jimenez, M., Dedes, M y col. 2000.

Nramp 2 expression is associated with pH-dependent iron uptake across the apical membrane of human intestinal Caco-2 cells. *J. Biol. Chem.* 275: 1023-1029.

Tapia, A., Araya, M. M. 2006. Estrés oxidativo, prooxidantes y enfermedad de Crohn. *Rev. Med. Chile.* 134: 95-100.

Tarng, D.C., Huang, T.P. 1998.

A parallel, comparative study of intravenous iron versus intravenous ascorbic acid for erythropoietin-hyporesponsive anemia in haemodialysis patients with iron overload. *Nephrol. Dial. Transplant.* 13: 2867-2872.

Taylor, P., Martinez-Torres, C., Leets, I.,

Ramirez, J., Garcia-Casal, M. N., Layrisse, M. 1988. Relationships among iron absorption, percent saturation of plasma transferrin and serum ferritin concentration. *J. Nutr.* 118: 1110-1115.

Tell'mann, A. Kh., Saava, M. E., Aasvee, K.E.

1992. Effects of prophylactic vitamin administration to Tallin's schoolchildren on their health and physical development. *Vopr. Pitan.* May-Jun;(3):36-40.

Teucher, B., Olivares, M., Cori, H. 2004.

Enhancers of iron absorption: Ascorbic acid and other organic acids. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 74(6): 403-419.

Theuer, R. C., Kemmerer, K. S., Martin, W. H.,

Zoumas, B. L., Sarett, H. P. 1971. Effect of processing on availability of iron salts in liquid infant formulas products. Experimental soy isolate formulas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 19, 555-558.

Theuer, R. C., Martin, W. H., Wallander, J. F.,

Sarett, H. P. 1973. Effect of processing on availability of iron salts in liquid infant cereal formula products. Experimental milk-based formulas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 21, 482-485.

Thomas, C., Thomas, L. 2002.

Biochemical markers and hematologic indices in the diagnosis of functional iron deficiency. *Clinical Chemistry*, 48 (7): 1066-1076.

Thompson, L. U., Zhang, L. 1991.

Phytic acid and minerals: effect on early markers of risk for mammary and colon carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 12: 2041-2045.

Thu, B. D., Schultink, J.W. Dillon, D., Gross, R.,

Leswara, N. D., Knoi. H.H. 1999. Effect of daily and weekly micronutrient supplementation on micronutrient deficiencies and growth of young Vietnamese children. *Am. J. Clin. Nutr.* 69: 80-86.

Thurnham DI. 1993.

Vitamin A, iron, and haemopoiesis. *Lancet.* 342:1312-3

Thuy, P. V., Berger, J., Davidsson, L., Khan, N. C.,

Nga, T. T., Lam, N. T., Mai, T.T., Flowers, C., Nakanishi, Y., Cook, J. D., Hurrell, R. F., Khoi, H. H. 2001. Regular consumption of NaFeEDTA fortified fish sauce improves iron status os anemmic Vietnamese women. *Ann. Nutr. Metab.* 45 (Suppl.1): 1-16.

Tokunaga, T., Oku, T y Hosoya, N. 1989.

Utilization and excretion of a new sweetener, fructooligosaccharides, in rats. *J. Nutr.* 119: 553-559.

Tontisirin, K., Nantel, G., Bhattacharjee, L. 2002.

Food-based strategies to meet the challenges of micronutrient malnutrition in the developing world. *Proceedings of the Nutrition Society.* 61: 243-250.

Torti, S.V., Kwak, E.L., Miller, S.C et al. 1988.

The molecular cloning and characterization of murine ferritin heavy chain, a tumor necrosis factor-inducible gene. *J. Biol. Chem.* 263: 12638-12644.

- Touyz, R. 2003.** Reactive oxygen species in vascular biology: role in arterial hipertensión. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* 1: 91-106.
- Tsuji, Y., Yamada, K., Hosoya, N. y Moriuchi, S. 1986.** Digestión and absorption of sugars and sugars substitutes in rat small intestine. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 32: 93-100.
- Tukonaga, T., Oku, T., Hosoya, N. 1989.** Influence of chronic intake of new sweetener, fructooligosaccharides (neosugar), on growth and gastrointestinal function in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 32: 111-121.
- UNICEF/WHO/UNU/MI. 1998.** Preventing iron deficiency in women and children: background and consensus on key technical issues and resources for advocacy, planning and implementing national programmes. Ottawa, Canada: International Nutrition Foundation.
- Untoro, J., Karyadi, E., Wibowo, L., Erhardt, M.W., Gross, R. 2005.** Multiple micronutrient supplements improve micronutrient status and anemia but not growth and morbidity of Indonesian infants: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J. Nutr.* 135: 639S-645S.
- Van Den Heuvel, E.G.H.M., Muys, T., Van Dokkum, W. y Schaafsma, G. 1999.** Oligofructose stimulates calcium absorption in adolescents. *Am. J. Clin. Nutr.* 69: 544-548.
- Van Dokkum, W. 1992.** Significance of iron bioavailability for iron recommendations. *Biol. Trace Elem. Res.* 35: 1-11.
- Van Dokkum, W., Van Den Heuvel, E. G. H. M., Havenaar, R., Srikumar, T.S., Van Aken, P. y Wezendonk, B. 1995.** The effect of non digestible oligosaccharides (NDO) on human physiology. Report TNO. Zeist. The Netherlands.
- Van Moorsell, L. 1997.** Improving calcium and iron bioavailability through bioactive proteins. *International Food Ingredients.* 4: 44-46.
- Van Stuijvenberg, M. E., Kvalsvig, J. D., Faber, M., Kruger, M., Kenoyer, D. G., Spinnler Benadé, A. J. 1999.** Effect of iron-, iodine-, and β -carotene-fortified biscuits on the micronutrient status of primary school children: a randomized controlled trial. *Am. J. Clin. Nutr.* Vol. 69, No. 3, 497-503
- Victor, V., Rocha, M., De La Fuente, M. 2004.** Immune cells: free radicals and antioxidants in sepsis. *Int. Immunopharmacol.* 4: 327-347.
- Vijayalakshmi P, Devadas RP. 1987.** Impact of supplementation of vitamin 'A' along with iron to expectant mothers. *Ind J Nutr Diet.* 24:130-5.
- Viteri, F. E., Alvarez, E., Batres, R., Torun, B., Pineda, O., Mejia, L.A., Sylui, J. 1995.** Fortification of sugar with iron sodium ethylenediaminetetraacetate (NaFeEDTA) improves iron status in semirural Guatemalan populations. *Am. J. Clin. Nutr.* 61: 1153-1163.
- Vulpe, C.D., Kuo, Y.-M., Murphy, T.L., Cowley, L., Askwith, C., Libina, N., Gitschier, J., Anderson, G.J., 1999.** Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the *sla* mouse. *Nat. Genet.* 21, 195-199.
- Wagstaff, M., Worwood, M., Jacobs A. 1982.** Iron and isoferritins in iron overload. *Clin. Sci.* 62(5): 529-540.
- Walter, T., Olivares, M., Pizarro, F., Hertrampf, E. 2001.** Fortification. In *Nutritional Anemia*, pp. 153-183.
- Wang, C. F., King, R. L. 1973.** Chemical and sensory evaluation of iron-fortified milk. *J. Food Sci.* 38: 938-940.
- Ward, R. J., O'Connell, M. J., Mann, S. et al. 1988.** Heterogeneity of the iron cores in hepatic haemosiderins from primary and secondary haemochromatosis. *Biochem. Soc. Trans.* 16: 830-831.
- Ward, R. J., O'Connell, M. J., Dickson, D. P. E et al. 1989.** Biochemical studies of the iron cores and polypeptide shells of haemosiderin isolated from patients with primary or secondary

- hamochromatosis. *Biochim. Biophys. Acta.* 993: 131-133.
- Wauben I, Wainwright P. 1999.** The influence of neonatal nutrition on behavioural development: a critical appraisal. *Nutr Rev*; 57:35-44
- Weaver, C. M., y Rajaram, S. 1992.** Exercise and iron status. *Journal of Nutrition* 122, 782-787.
- Weaver, C. M. 1998.** Use of calcium tracers and biomarkers to determine calcium kinetics and bone turnover. *Bone.* 22: 103S-104S.
- Wegmüller, R., Zimmerman, M.B., Moretti, D., Arnold, M., Langhans, W., Hurrell, R.F. 2004.** Particle size reduction and encapsulation affect the bioavailability of ferric pyrophosphate in rats. *J. Nutr.* 134: 3301-3304.
- Weight, L.M., Bytne, M.J., Jacobs, P. 1991.** Haemolytic effects of exercise. *Clin. Sci.* 81: 147-142.
- Weinberg, E. D. 1996.** The role of iron in cancer. *Eur. J. Cancer Prev.* 56: 19-36.
- Weintraub, L.R., Conrad, M.E., Crosby, W.H. 1965.** Absorption of hemoglobin iron by the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 120: 840-843.
- Weintraub, L.R., Conrad, M.E., Crosby, W.H. 1965a.** Regulation of the intestinal absorption of iron by the rate of erythropoiesis. *Br. J. Haematol.* 11:432-438.
- Wessling-Resnick, M., 1999.** Biochemistry of iron uptake. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 34,285-314.
- West, T. S., Sykes, A. S. 1960.** Diamino-ethane-tetra-acetic acid. In: *Analytical applications of diamino-ethane-tetra-acetic acid.* Poole, UK: British Drug Houses Ltd, 9-22.
- Wheby, M.S., Crosby, W.H. 1964.** The gastrointestinal tract and iron absorption. *Blood.* 22: 416-428.
- Wheby, M.S., Suttle, G.E., Ford, K.T. III. 1970.** Intestinal absorption of hemoglobin iron. *Gastroenterology.* 58: 647-654.
- Whittaker, P.G., Hines, F., Robi, M.G., Dunkel, V.C., 1996.** Histopathological evaluation of liver, pancreas, spleen, and heart from iron-overloaded Sprague-Dawley rats. *Toxicologic Pathology* 24: 558-563.
- Whittaker, P.G., Dunkel, V. C., Bucci, T. J., Kusewitt, D. F., Thurman, J. D., Warbritton, A., Wolff, G. L. 1997.** Genome-linked toxic responses to dietary iron overload. *Toxicol. Pathol.* 25: 556-564.
- Whittaker, P.G., Mahoney, A.W., Hendricks, D.G. 1984.** Effect of iron-deficiency anemia on percent blood volume in growing rats. *J. Nutr.* 114: 1137-1142.
- WHO Global Database on Iron Deficiency and Anaemia, Micronutrient Deficiency Information System, World Health Organization (in publication).**
- WHO. 2004.** On Food Fortification with Micronutrients for the Control of Micronutrient Malnutrition. Geneva: World Health Organization.
- Widdowson, E. M., Spray, C. M. 1951.** Chemical development in utero. *Arch. Dis. Child.* 26: 205-214.
- Wienk, K.J.H., Marx, J.J.M., Beynen, A.C. 1999.** The concept of iron bioavailability and its assessment. *Eur. J. Nutr.* 38: 51-75.
- Wienk, K.J.H., Marx, J.J.M., Santos, M., Lemmens, A.G., Brink, E.J., Van Der Meer, R., Beynen, A.C. 1997.** Dietary ascorbic acid raises iron absorption in anaemic rats through enhancing mucosal iron uptake independent of iron solubility in the digesta. *British journal of Nutrition.* 77, 123-131.
- Wilson, A.K., Ball, M.J. 1999.** Nutrient intake and iron status of Australian male vegetarians. *Eur. J. Clin. Nutr.* 53: 189.
- Wolde-Gabriel, Z., Gebru, H., Fisseha, T, west, C.E. 1993.** Severe vitamin A deficiency in a rural village in the Hararge region of Ethiopia. *Eur. J. Clin. Nutr.* 47: 104-114.
- Wood, R.J., Han, O., 1998.** Recently identified molecular aspects of intestinal iron absorption. *J. Nutr.* 128, 1841-1844.
- WHO/UNICEF/UNU. 2001.** Iron Deficiency Anaemia, Assessment, Prevention, and Control. WHO, Geneva.

- WHO.** Guidelines for food fortification. Geneva, Switzerland: WHO (in press).
- Worthington, M. T., Cohn, S. M., Miller, S. K., Luo, R. Q., Berg, C. L. 2001.** Characterization of a human plasma membrane heme transporter in intestinal and hepatocyte cell lines. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 280: G1172-G1177.
- Wurzelmaun, J. I., Silver, A., Schreinemachers, D. M., Sandler, R. S., Everson, R. B. 1996.** Iron intake and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 5: 503-507.
- Wyllie, J. C., Kaufman, N. 1982.** An electron microscopic study of heme uptake by rat duodenum. *Lab. Invest.* 47: 471-476
- Yamada, T., Grisham, M.B. 1991.** Role of neutrophil-derived oxidants in the pathogenesis of intestinal inflammation. *Klin. Wochenschr.* 69: 988-994.
- Yamaguchi, F., Shimizu, N. y Hatanaka, C. 1994.** Preparation and physiological effect of low-molecular-weight pectin. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58: 679.
- Yehuda, S., Youdim, M.B., 1989.** Brain iron: a lesson from animal models. *Am. J. Clin. Nutr.* 50, 618-629.
- Yeung, C.K., Zhu, L., Glanh, R.P., Miller, D.D. 2004.** Iron absorption from NaFeEDTA is downregulated in iron-loaded rats. *Am. J. Clin. Nutr.* 134: 2270-2274.
- Yip, R., Dallmann, P. R. 1988.** The roles of inflammation and iron deficiency as causes of anemia. *Am. J. Clin. Nutr.* 48(5):1295-300.
- Yip, R. 1998.** Iron Fortification: Prevention of iron deficiency anemia for developing countries. In: Forum on Iron Fortification. SUSTAIN. Annual meeting, Atlanta, Georgia.
- Yip, R. 2002.** Iron. Present knowledge in nutrition. Sixth edition. International Life Sciences Institute. ILSI. North America.
- Youdim, M.B. Ben-Shachar, D., Riederer, P., 1991.** Iron in brain function and dysfunction with emphasis on Parkinson´s disease. *Eur. Neurol.* 31, 34-40.
- Youdim, M.B. Ben-Shachar, D., Yehuda, S., 1989.** Putative biological mechanisms of the effect of iron deficiency on brain biochemistry and behaviour. *Am. J. Clin. Nutr.* 50, 607-617.
- Youdim, M.B. Ben-Shachar, D., Yehuda, S., Riederer, P., 1990.** The role of iron in the basal ganglion. *Adv. Neurol.* 53, 155-162.
- Youdim, M.B., 1988.** Iron in the brain: implications for Parkinson´s and Alzheimer´s. *Mount Sinai J. Med.* 55, 97-101.
- Younes, M., trepkau, H. D., Siegers, C. P. 1990.** Enhancement by dietary iron of lipid peroxidation in mouse colon. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 70: 349-354.
- Zhang, D., Hendricks, D.G., Mahoney, A.W. 1989.** Bioavailability of total iron from meat, spinach (*Spinacea oleracea L.*) and meat-spinach mixture by anemic and non-anemic rats. *Br. J. Nutr.* 61. 331-343.
- Zimmermann, M.B. 2004.** The potential of encapsulated iron compounds in food fortification: a review. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 74(6): 453-461.
- Zimmermann, M.B., Wegmueller, R., Zeder, C., Chaouki, N., Rohner, F., Saïssi, M., Torresani, T., Hurrell, R.F. 2004.** Dual fortification of salt and micronized ferric pyrophosphate: a randomized, double-blind, controlled trial. *Am. J. Clin. Nutr.* 80: 952-959.
- Zimmermann, M.B., Winichagoon, P., Gowachirapant, S., Hess, S.Y., Harrington, M., Chavasit, V., Lynch, S.R., Hurrell, R.F. 2005.** Comparison of efficacy of wheat-based snacks fortified with ferrous sulfate, electrolytic iron, or hydrogen-reduced elemental iron: randomized, double-blind, controlled trial in Thai women. *Am. J. Clin. Nutr.* 82: 1276-1282.
- Zimmermann, M.B., Zeder, C., Chaouki, N., Saad, A., Torresani, T., Hurrell, R.F. 2003.** Dual fortification of salt with iodine and microencapsulated iron: a randomized, double-blind, controlled trial in Moroccan schoolchildren. *Am. J. Clin. Nutr.* 77: 425-432.

Zlotkin, S., Arthur, P., Yeboah Antwi, K., Yeung, G. 2001. Treatment of anemia with microencapsulated ferrous fumarate plus ascorbic acid supplied as sprinkles to complementary (weaning)foods. *Am. J. Clin. Nutr.* 74: 791-795.