



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**IMPLEMENTACIÓN DE UNA TÉCNICA DE ABSORCIÓN DE
HIERRO *EX VIVO* EN INTESTINO DE CERDOS POST-FAENA
PARA EL ESTUDIO DE MATRICES CARGADAS CON HIERRO**

Claudia del Carmen Villalobos Zamora

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Fomento de la
Producción Animal

PROFESOR GUÍA: CAROLINA PAZ VALENZUELA VENEGAS
Universidad de Chile

FONDECYT 11140249

SANTIAGO, CHILE
2018



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**IMPLEMENTACIÓN DE UNA TÉCNICA DE ABSORCIÓN DE
HIERRO *EX VIVO* EN INTESTINO DE CERDOS POST-FAENA
PARA EL ESTUDIO DE MATRICES CARGADAS CON HIERRO**

Claudia del Carmen Villalobos Zamora

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico
Veterinario
Departamento de Fomento de la
Producción Animal

Nota Final:

FIRMA

Profesor Guía: Dra. Carolina Valenzuela V.

Profesor Corrector: María Sol Morales S.

Profesor Corrector: Federico Cifuentes R.

SANTIAGO, CHILE
2018

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por su infinita paciencia y apoyo durante todo este proceso, e incluso desde antes, gracias a ustedes, sus enseñanzas y valores, soy quien soy hoy.

A mis hermanos, por siempre cuidarme, aconsejarme y acompañarme con todas esas buenas energías.

A mi profesora guía la Doctora Carolina Valenzuela, por su constante ayuda y todo lo que me enseñó, gracias por confiar en mí.

A Vanina y Osmaly, que me ayudaron todos los días a preparar los incontables “saquitos”.

A mis amigos, que me apoyaron y le dieron alegría a toda esta etapa.

RESUMEN

El objetivo fue implementar el método del intestino evertido en intestino de cerdos post-faena para estudiar la absorción de hierro desde matrices cargadas con hierro. Se elaboró una matriz control (C, sin hierro), con alginato de sodio (2% p/v) y suero de leche (40% p/v) y mezclas de matriz control con diferentes tipos de hierro hemo (H) al 1% y no hemo (NH) al 1% p/v. Se formaron 5 matrices: I: 100%H, II: 100%NH, III: 25%H:75%NH, IV: 50%H:50%NH y V: 75%H:25%NH. Las matrices se caracterizaron según contenido de hierro. Para realizar el método del intestino evertido se utilizaron segmentos de 10 cm de duodeno de cerdos adultos post-faena. Los trozos de intestinos se incubaron con 3g de cada matriz y se cuantificó el hierro absorbido en los sacos intestinales por espectrofotometría de absorción atómica. Las matrices presentaron un contenido de hierro (mg/g) de: C ($0,09 \pm 0,01$), I ($0,37 \pm 0,02$), II ($4,3 \pm 0,16$), III ($3,16 \pm 0,45$), IV ($2,14 \pm 0,14$) y V ($1,08 \pm 0,03$). La mayor absorción de hierro se produjo desde la matriz V (26,3%), que fue superior a la IV (7,8%), la cual no presentó diferencias con la III (3,7%) y I (2,0%), y éstas a su vez no mostraron diferencias con la II (1,3%) y C (0,8%). Fue posible implementar y validar el modelo del intestino evertido para estudios de absorción de hierro *ex vivo* en cerdos post-faena, observándose la mejor absorción para la matriz V, que contenía la mezcla con mayor porcentaje de hierro hemo.

Palabras claves: intestino evertido, hierro, cerdos post-faena.

ABSTRACT

The objective was to implement the everted intestine method in intestine of post-slaughter pigs to study the absorption of iron from matrices loaded with iron. A control matrix (C, without iron), with sodium alginate (2% w/v) and whey (40% w/v), and mixtures of control matrix with different types of iron heme (H) at 1 % and not heme (NH) at 1% w/v were made. Five matrices were formed: I: 100% H, II: 100% NH, III: 25% H: 75% NH, IV: 50% H: 50% NH and V: 75% H: 25% NH. The matrices were characterized according to iron content. To perform the everted gut sac method, 10 cm segments of duodenum of post-slaughter adult pigs were used. The pieces of intestines were incubated with 3g of each matrix and the iron absorbed in the intestinal sacs was quantified by atomic absorption spectrophotometry. The matrices had an iron content (mg/g) of: C ($0,09 \pm 0,01$), I ($0,37 \pm 0,02$), II ($4,3 \pm 0,16$), III ($3,16 \pm 0,45$), IV ($2,14 \pm 0,14$) y V ($1,08 \pm 0,03$). The highest iron absorption occurred from matrix V (26.3%), which was higher than IV (7.8%), which in turn did not present differences with III (3.7%) and I (2, 0%), and these showed no differences with II (1.3%) and C (0.8%). It was possible to implement and validate the everted intestine model for *ex vivo* iron absorption studies in post-slaughter pigs, observing the best absorption for the matrix, which contained the mixture with the highest percentage of heme iron.

Keywords: everted gut sac, iron, post-slaughter pigs.

INTRODUCCIÓN

En los alimentos el hierro se encuentra de dos formas: hierro hemo y no hemo. El hierro hemo es absorbido de forma más eficiente y deriva de alimentos de origen animal que contengan hemoglobina y mioglobina. El hierro no hemo se encuentra en vegetales y lácteos, y su biodisponibilidad es baja porque se ve afectada por componentes dietarios que reducen su absorción (Lipinski *et al.*, 2013). Ambos se absorben por mecanismos diferentes a nivel de duodeno principalmente (Hentze *et al.*, 2010; Lipinski *et al.*, 2013). El cerdo es un animal muy adecuado, para su uso como modelo en el estudio de estrategias de suplementación y fortificación con hierro, porque en condiciones de cría intensiva, en sus primeras etapas de vida, presenta anemia por deficiencia de hierro, debido a causas multifactoriales (Hentze *et al.*, 2010; Ishaya e Ishaya, 2012; Lipinski *et al.*, 2010; Lipinski *et al.*, 2013).

En la actualidad se estudian nuevas formas de suplementación de hierro oral, para reducir los estados de depleción, deficiencia y anemia de los cerdos en lactancia y destete, utilizando tecnologías emergentes en Medicina Veterinaria, como la encapsulación. Esta tecnología consiste en el micro-empaquetamiento de diferentes moléculas recubiertas por una capa de polímeros (Nazzaro *et al.*, 2012). Con su uso para el caso del hierro, se ha mejorado la aceptabilidad de los suplementos de hierro y su biodisponibilidad (Jackson y Lee, 1991; Mehansho, 2006). Una de las técnicas con gran potencial para elaborar suplementos orales con hierro encapsulado es la gelificación iónica con alginato de sodio (Valenzuela *et al.*, 2014; 2016a). Si bien hay varios trabajos realizados en humanos y roedores (Boccio *et al.*, 1996; Lysionek *et al.*, 2002; Contreras *et al.*, 2014), en el cerdo son escasos (Antileo *et al.*, 2016; Valenzuela *et al.*, 2016b). Actualmente se han diseñado varios tipos de compuestos encapsulados de hierro para tratar la anemia en cerdos (Antileo *et al.*, 2016; Carrillo *et al.*, 2014; Valenzuela *et al.*, 2014; Valenzuela *et al.*, 2016a). Sin embargo, se requieren más estudios sobre su biodisponibilidad para su aplicación.

Uno de los aspectos más importantes que se debe estudiar es la biodisponibilidad de estos productos, y para eso es necesario establecer un sistema fiable *in vitro* o *ex vivo* que permita seleccionar los mejores prototipos para luego escalar a una prueba *in vivo*.

Existe una gran variedad de métodos *in vitro* disponibles para estudiar la absorción de hierro, los más utilizados se basan en el uso de cultivos celulares como el modelo caco-2, obtenido desde células de adenocarcinoma de colon (Follett *et al.*, 2002; Villarroel *et al.*, 2011). Otros métodos usan tejido intestinal (llamados preferentemente estudios *ex vivo*); cada uno con sus ventajas y desventajas (Le Ferrec *et al.*, 2001; Van de Kerkhof *et al.*, 2007). Los cultivos celulares son un buen modelo para estudiar el mecanismo de absorción del hierro, sin embargo, presenta ciertas desventajas como: dificultad de cultivar células epiteliales intestinales, viabilidad celular limitada, se requiere de un equipamiento costoso a nivel de laboratorio para implementarlo, no es posible medir la absorción de hierro desde cualquier tipo de matriz, y carecen de las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas del epitelio intestinal (Le Ferrec *et al.*, 2001; Rozehnal *et al.*, 2012). Entre los métodos que utilizan tejido intestinal, el del intestino evertido que fue descrito por Wilson y Wiseman (1954) para estudiar el transporte de sustancias desde la mucosa a la serosa en intestino delgado de ratas y hámster dorado, ha sido bastante utilizado debido a la simple y rápida implementación de su técnica, fácil de reproducir y de bajo costo y alta precisión de los resultados. Desde su introducción, se han presentado modificaciones a la técnica, con el fin de mejorar la viabilidad de los tejidos y mantener la integridad de la mucosa intestinal (Barthe *et al.*, 1998). Además intestinos de otras especies han sido utilizados en esta técnica, tales como conejos, pollos, cerdos, ovejas y peces (Clauss y Hörnicke, 1984; Panichkriangkrai, 1982; Scharrer *et al.*, 1984; Turner *et al.*, 1990; Viana *et al.*, 2008).

La técnica del intestino evertido se ha utilizado para realizar estudios de absorción de distintas moléculas, principalmente para el estudio farmacocinético de medicamentos (Alam *et al.*, 2012). Existen también diferentes estudios sobre la absorción de hierro y de otros minerales que han utilizado la técnica del intestino evertido (Khemiss *et al.*, 2006; Moshtaghie *et al.*, 2006). Se ha establecido en esta técnica en rata que entre los 15 a 30 minutos de incubación se llega al punto máximo de absorción de hierro (Khemiss *et al.*, 2006;

Moshtaghie *et al.*, 2006). No obstante, estos estudios han utilizado intestino de rata, y según nuestro conocimiento no hay investigaciones que usen esta técnica con intestino de cerdo para estudiar la absorción de hierro. En todos estos estudios se usaron animales vivos, que fueron sacrificados e inmediatamente después se obtuvieron los trozos de intestinos para realizar el método, sin embargo, esto en animales mayores como el cerdo es más complejo por las instalaciones que se requieren, el personal para el manejo de los animales, y los mayores costos que esto conlleva. Por tanto, una propuesta interesante es estudiar si el método del intestino evertido podría tener buenos resultados con intestinos obtenidos desde cerdos recientemente faenados. Así, el objetivo de esta memoria de título fue implementar el método del intestino evertido en intestino de cerdos post-faena para estudiar la absorción de hierro desde matrices cargadas con mezclas en diferentes proporciones de hierro hemo y no hemo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la implementación del método del intestino evertido se siguieron las siguientes etapas:

A) revisión de literatura y selección de la metodología más acorde para la adaptación del método en condiciones locales, y B) práctica del método de intestino evertido de cerdo.

1. Implementación del método del intestino evertido

A) Búsqueda de información para establecer las condiciones necesarias para implementar la técnica del intestino evertido en modelo cerdo

Se realizó una búsqueda de publicaciones científicas, tesis y/o libros que describieran la técnica del intestino evertido y que la hayan utilizado para estudios de absorción de alguna molécula. Para esto se utilizaron bases de datos como Google Scholar, PubMed y ScienceDirect, entre las principales. En base a la información recopilada se elaboró una lista de materiales y equipos necesarios para realizar la técnica (Tabla 1), y en segundo lugar se establecieron las condiciones necesarias para llevar a cabo la técnica. Para este último punto sólo se consideraron las publicaciones que hayan utilizado esta técnica para estudios de absorción de hierro que se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Materiales y equipos necesarios para la implementación del método del intestino evertido

Autores	Materiales y/o equipos
Wilson y Wiseman (1954); Hamilton y Butt (2013)	Técnica: los autores realizan una leve descripción de como formar los sacos de intestino utilizando, pinzas, varilla de vidrio e hilo.
Dowdle <i>et al.</i> (1960); Moshtaghie y Taher (1993); Moshtaghie <i>et al.</i> (2006)	Incubación: un equipo de baño de agua termoregulado con agitación para mantener la temperatura a 37°C.
Dowdle <i>et al.</i> (1960)	Medio de incubación: NaCl + Fructosa + buffer fosfato de sodio
Manis y Schachter (1962)	Medio de incubación: NaCl + CaCl ₂ + manosa + ascorbato de sodio + buffer tris
Moshtaghie y Taher (1993)	Medio de incubación: medio Earl
Moshtaghie <i>et al.</i> (2006)	Medio de incubación: Krebs ringer fosfato
Khemiss <i>et al.</i> (2006)	Medio de incubación: al interior solución ringer y al exterior HEPES + glucosa + KCl + MgSO ₄ + CaCl ₂ + NaCl
Moshtaghie y Taher (1993); Moshtaghie <i>et al.</i> (2006); Khemiss <i>et al.</i> (2006)	Gases: Medio de incubación gasificado en concentración de 95% de O ₂ y 5% de CO ₂
Moshtaghie y Taher (1993); Moshtaghie <i>et al.</i> (2006); Khemiss <i>et al.</i> (2006)	Lectura de hierro: Espectrofotometría de absorción atómica

B) Práctica del método de intestino evertido de cerdo.

Luego de recopilada la información se practicó la elaboración del saco evertido para adquirir habilidad y perfeccionar la técnica. Así se trabajó con secciones de duodeno proporcionados por el Departamento de Patología Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias

de la Universidad de Chile (FAVET). Estas secciones correspondían a cerdos de varios tamaños y edades. Luego las muestras obtenidas se rotularon y almacenaron a -18°C . Los intestinos fueron descongelados a temperatura de refrigeración ($4-5^{\circ}\text{C}$) y almacenados en frascos de toma de muestra plásticos, en tamaños de 10 cm de largo. Luego se realizó la técnica del intestino evertido en las muestras descrita por Wilson y Wiseman (1954).

2. Prototipos de suplementos orales (matrices comestibles cargadas con hierro)

Se utilizaron diferentes prototipos de matrices cargadas con diferentes tipos de hierro (Tabla 2), las cuales habían sido elaboradas con anterioridad en el Laboratorio de Encapsulación de FAVET. Las matrices están elaboradas de una mezcla base de alginato de sodio (2% p/v) (Sigma-Aldrich, USA) y suero de leche (40% p/v) (Prinal S.A, Chile) (matriz control). Para elaborar las matrices, se solubilizó el alginato de sodio en agua destilada, luego se agregó el suero de leche, cuando ambos compuestos estaban homogenizados, la solución de mezcla fue vertida en un molde de silicona redondo de 3 cm de diámetro aprox, se refrigeró por 24 h, luego se desmoldaron las matrices, que tenían consistencia de gel, se sumergieron en una solución de cloruro de calcio al 5% p/v por 30 min, y luego se secaron en estufa a 50°C por 48 h. Para elaborar las matrices cargadas con hierro hemo (matriz I), a la mezcla formadora de matriz control líquida se le agregaron eritrocitos bovinos atomizados (hierro hemo, H) (Lican Cell Ltda, Chile) al 1% p/v. De igual manera se elaboraron las matrices de hierro no hemo (NH) (matriz II), agregando a la mezcla de matriz control, sulfato ferroso heptahidratado (Merk S.A) al 1% p/v. Luego con las mezclas líquidas formadoras de matrices H y NH se generaron otras mezclas (v/v) en las proporciones descritas en la Tabla 2 (matrices III-V). Obteniendo finalmente 6 tipos de matrices. Para observar la apariencia de las matrices comestibles se les tomaron fotografías digitales.

Tabla 2. Tipos de matrices cargadas con hierro hemo (H), no hemo (NH) y sus mezclas.

Tipo	H (%)	NH (%)
C (control)	-	-
I	100	-
II	-	100
III	25	75
IV	50	50
V	75	25

A las matrices se les determinó en contenido total de hierro por espectrofotometría de absorción atómica (GBC, 905AA, Australia). Las medidas espectrofotométricas se realizaron de acuerdo con una curva estándar evaluada a $\lambda = 248,3$ nm, usando un estándar de hierro comercial, 1.000 $\mu\text{g/mL}$ (J.T. Baker, USA).

3. Estudios de absorción de hierro con la técnica de intestino evertido

Para estudiar la absorción de hierro se utilizaron los prototipos de suplementos orales antes descritos en la Tabla 2, además se consideró dejar un preparado de intestino evertido sin muestras y solo con su medio de incubación como control de la incubación.

Las muestras de intestinos fueron obtenidos en el Frigorífico y Planta Faenadora Cordillera, Santiago, Chile, desde cerdos adultos en edad de faena que provenían de diferentes granjas comerciales de la Región Metropolitana. A partir de las vísceras completas obtenidas desde los animales inmediatamente después de su faena, se obtuvieron segmentos de duodeno de 70 a 90 cm. Los cuales se guardaron en cajas térmicas de poliestireno expandido con hielo en escamas y se trasladaron al Laboratorio de Encapsulación de FAVET. Se obtuvieron trozos de 10 cm de duodeno, que fueron lavados con solución fisiológica (NaCl al 0,9%) a temperatura de refrigeración ($4 \pm 2^\circ\text{C}$), 3 veces. Posteriormente se evertieron los duodenos según la metodología planteada por Wilson y Wiseman (1954). Luego los sacos intestinales evertidos se depositaron en un vaso precipitado de 250 mL y fueron bañados con 100 mL de solución ringer (6,5 g de NaCl, 0,42 g de KCl, 0,25 g de CaCl_2 , y 0,2 g de bicarbonato de sodio en un litro de agua destilada, a pH 6 ajustado con HCl 1N) a temperatura ambiente.

Luego se añadieron las matrices molidas (3 g), en el medio de incubación y se homogenizaron. Estos se incubaron en una estufa de incubación de CO₂ (Mettler INCO 108, Alemania) a 37°C, con oxígeno ambiental y 5% de CO₂ (Indura S.A, Santiago, Chile) por un periodo de 30 min.

Cuantificación del hierro absorbido

La determinación del hierro absorbido por los sacos intestinales fue analizada al final de la incubación. Para este fin, los sacos fueron removidos del medio de incubación, y desde el interior de los sacos se tomaron 5 mL de contenido líquido que fue depositado en un tubo de muestra de vidrio de 10 mL. En este líquido se determinó el hierro por espectrofotometría de absorción atómica (GBC, 905AA, Australia). También se determinó el contenido de hierro de la solución ringer.

Análisis estadístico

Para analizar los datos del contenido de hierro de las matrices y el hierro absorbido desde los sacos intestinales evertidos se realizó una prueba de ANOVA y luego de Tukey, previa constatación de la normalidad de los datos con una prueba de Shapiro-Wilk. El nivel de significancia usado fue de $p < 0,05$. Las pruebas se procesaron con el programa Statistix 8.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Implementación de la técnica del intestino evertido

Del total de la bibliografía recopilada, sólo se encontraron 5 estudios que investigaron la absorción de hierro en duodeno por el método de intestino evertido, todos los estudios fueron realizados en rata (Dowdle *et al.*, 1960; Manis y Schachter, 1962; Moshtaghie y Taher, 1993; Khemiss *et al.*, 2006; Moshtaghie *et al.*, 2006). También se consideraron 2 estudios que describen la técnica de eversión del saco intestinal con más detalle (Wilson y Wiseman, 1954; Hamilton y Butt, 2013). En términos generales, los materiales, equipos y las técnicas usadas se describen en la Tabla 1. La técnica del intestino evertido requiere de los siguientes pasos: 1) preparación de las soluciones a utilizar (solución para lavado de los intestinos y de incubación) y preparación de los materiales para evertir el intestino, 2) obtención de los segmentos de intestinos para ser evertidos y depositados en su medio de incubación, 3) incubación con una temperatura y tiempos determinados, y 4) medición del hierro absorbido por el saco intestinal.

La selección de la técnica del intestino evertido para ser utilizada en la presente investigación se basó en su bajo costo, ya que los materiales a utilizar y las muestras biológicas son poco costosas. También debido a la simplicidad de llevarla a cabo en el laboratorio como ha sido descrita por numerosos autores (Barthe *et al.*, 1998; Qiu *et al.*, 2009; Alam *et al.*, 2012). Para el presente estudio de todas las soluciones propuestas por los autores se seleccionó como medio de incubación y de llenado del saco intestinal una solución ringer, esta solución de fácil preparación y bajo costo fue utilizada por Khemiss *et al.* (2006) e igualmente por Wilson y Wiseman (1954), quienes postularon la técnica del intestino evertido. Además contiene cloruro de calcio, mineral que en la literatura ha sido estudiado por disminuir la absorción del hierro no hemo, sin embargo, los estudios son controversiales. Thompson *et al.* (2010) observó que compiten por el mismo receptor, el transportador de metales divalentes (DMT1) a nivel de la zona apical de los enterocitos. En contraste se ha visto en lechones que una dieta alta en calcio no afecta la absorción de hierro (Wauben y Atkinson, 1999). Por lo tanto, la

condición de tener el calcio en el medio de incubación podría simular la posible interacción entre el calcio y el hierro en el animal *in vivo*, ya que los prototipos de matrices fueron diseñados para su uso en la etapa de lactancia del cerdo, donde el principal alimento es la leche, la cual es alta en calcio.

Para simular la temperatura fisiológica y la mezcla de gases necesaria para mantener la viabilidad del tejido intestinal se utilizó en el presente estudio la incubación en estufa de CO₂, la cual además de proveer ambos factores mencionados anteriormente, reduce el tiempo de experimentación porque permite realizar varios experimentos a la vez.

Aunque los prototipos de matrices fueron diseñados para cerdos lactantes, se probaron en cerdos a edad de faena ya que es muy difícil conseguir cerdos lactantes que sean faenados.

La técnica usada para medir el hierro presente al interior de los sacos intestinales fue la espectrofotometría de absorción atómica, debido a su alta precisión y por ser la técnica más utilizada en estudios de cuantificación de hierro (Khopkar, 2008).

La implementación de la técnica se presenta en la Figura 1. Los intestinos seccionados se evertieron introduciendo cuidadosamente una pinza anatómica dejando expuesta la mucosa (Figura 1A y 1B), uno de los extremos del saco fue atado firmemente con nylon N° 0,3 (Figura 1C), mientras que el otro extremo se introdujo una jeringa de 50 mL, la cual fue levemente atada (Figura 1D). Posteriormente los sacos se llenaron con 15 mL de medio de incubación (Figura 1E) y luego la jeringa fue retirada cuidadosamente mientras la atadura sin terminar se cerraba dejando un saco de intestino con ambos lados atados (Figura 1F). A continuación se procedió a verificar que no había filtración levantando el saco de intestino con las pinzas por ambos extremos por separado, una vez verificado el saco de intestino fue depositado en el vaso precipitado de 200 mL con 100 mL de medio de incubación y la matriz molida (Figura 1G). Una vez listos todos los sacos de intestinos en medio de incubación se dejaron en la estufa de incubación de CO₂ (Figura 1H). Terminado el tiempo de incubación se extrajeron 5 mL del interior del saco de intestino (Figura 1I) y se depositaron en un tubo de ensayo para cuantificar la cantidad de hierro mediante espectrofotometría de absorción atómica.

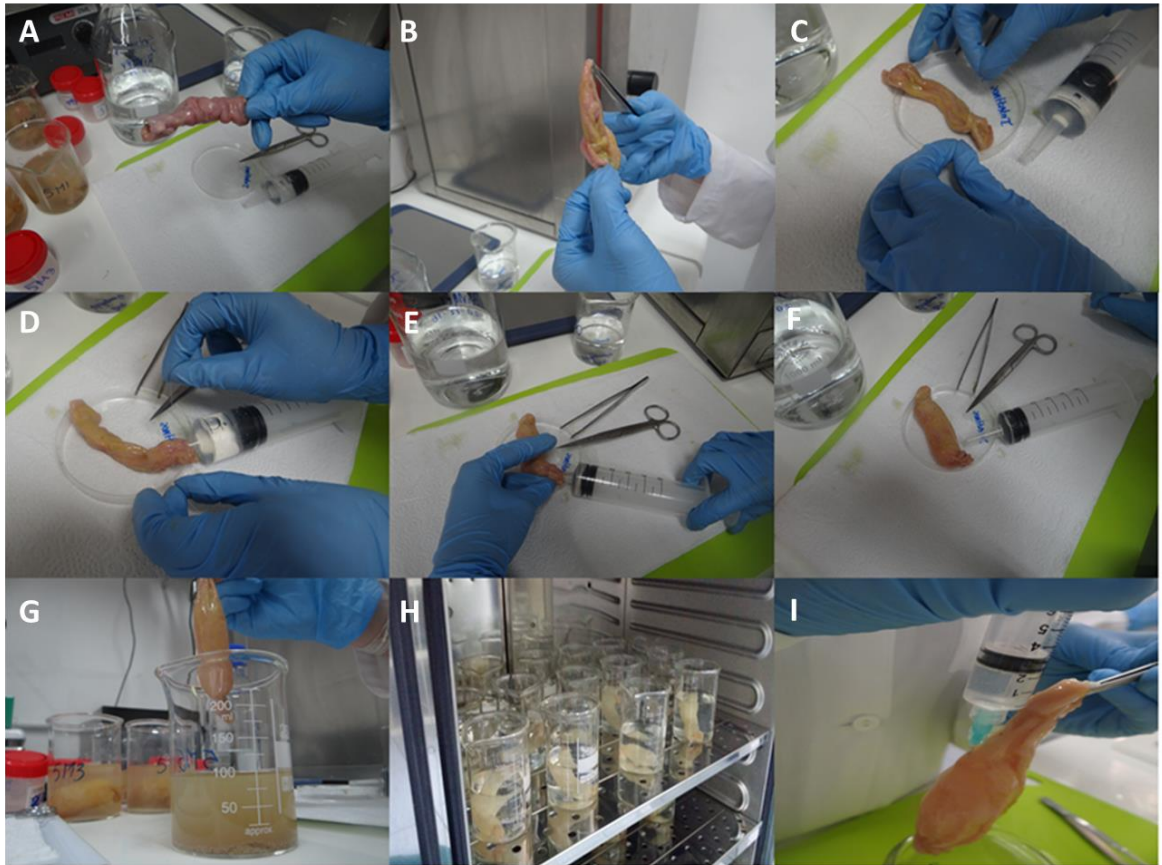


Figura 1. Implementación de la técnica del intestino evertido planteada por Wilson y Wiseman (1954).

Para realizar la eversión de los segmentos de intestinos era necesario realizarlo con la ayuda de algún material que no dañara la mucosa y que permitiera efectuarlo de forma relativamente rápida, por esta razón primero se intentó con varillas de vidrio, sin embargo, al utilizarlas se necesitaba atar el intestino a la varilla de vidrio y además cortarlo luego de evertirlo, agregando un paso más a la técnica, resultando en tiempos de realización más prolongados. Finalmente se decidió utilizar una pinza anatómica de punta redonda. Una segunda dificultad observada al realizar la implementación se presentó al momento de extraer la solución desde el interior de los sacos intestinales (Figura 1I), ya que el calibre de la aguja usado (21 G), era muy pequeño y se obstruía. Por lo tanto, fue necesario utilizar agujas de calibre 18 G.

2. Caracterización de las matrices comestibles

En la Figura 2 se muestra la apariencia de las matrices comestibles, donde se pueden observar tres tipos diferentes de colores predominantes, la matriz control (Figura 2C) es de color amarillo debido a la alta concentración de suero de leche en su formulación. La matriz II fue de color verdoso por la adición de sulfato ferroso heptahidratado, el cual presenta un color azul-verdoso. Finalmente en las matrices I y III a la V el color que predomina son distintas tonalidades marrones por la adición de eritrocitos bovinos atomizados en su preparación.

Antes del proceso de secado como se observa en la Figura 2 las matrices presentaron una consistencia de gel, y la forma lograda fue por la disposición de la mezcla en moldes de silicona de esas características. Después del proceso de secado las matrices fueron sólidas.

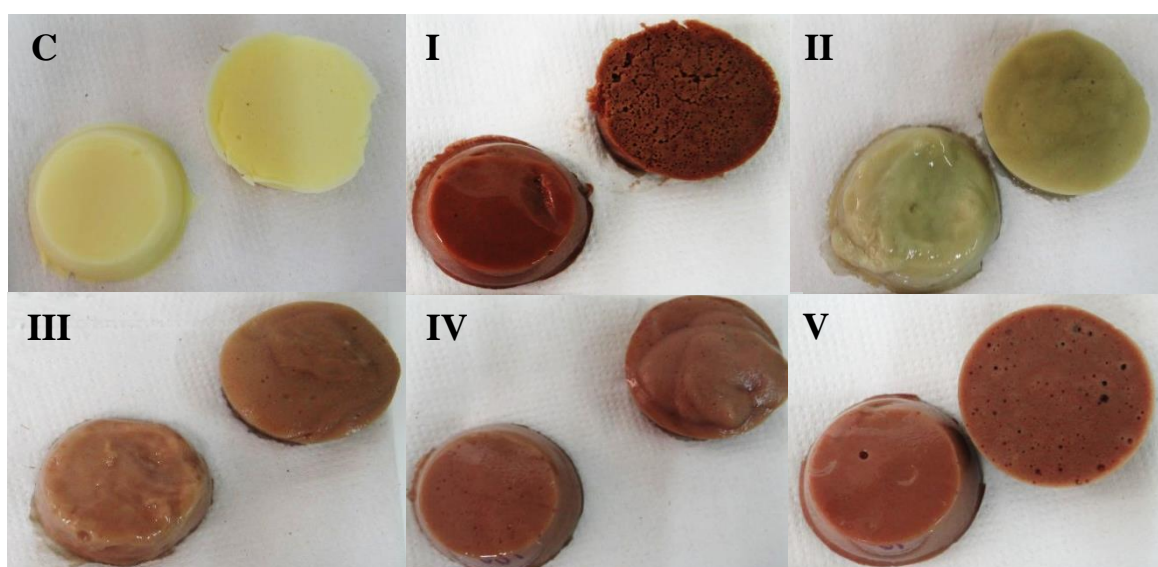


Figura 2. Apariencia de las matrices. Contenido de hierro hemo (H): no hemo (NH) de las matrices: C (sin hierro), I: 100H, II: 100NH, III:25H:75NH, IV: 50H:50NH y V: 75H:25NH.

En la Figura 3 se presenta el contenido de hierro de las distintas matrices. El hierro no hemo (sulfato ferroso) usado contiene 179 ± 5 mg/g debido a que esta fuente de hierro es altamente puro por ser una sal ferrosa, en cambio el hierro hemo proviene de eritrocitos bovinos que contienen $2,49 \pm 0,07$ mg de hierro/g, valor bastante inferior al hierro no hemo (Valenzuela *et al.*, 2014). Debido a esto la matriz II tiene el mayor contenido de hierro, ya que está

elaborada en un 100% con hierro no hemo, además se puede observar que el contenido de hierro desciende desde la matriz III a la matriz V, ya que el porcentaje de hierro no hemo adherido disminuye y el hierro hemo aumenta (Tabla 2).

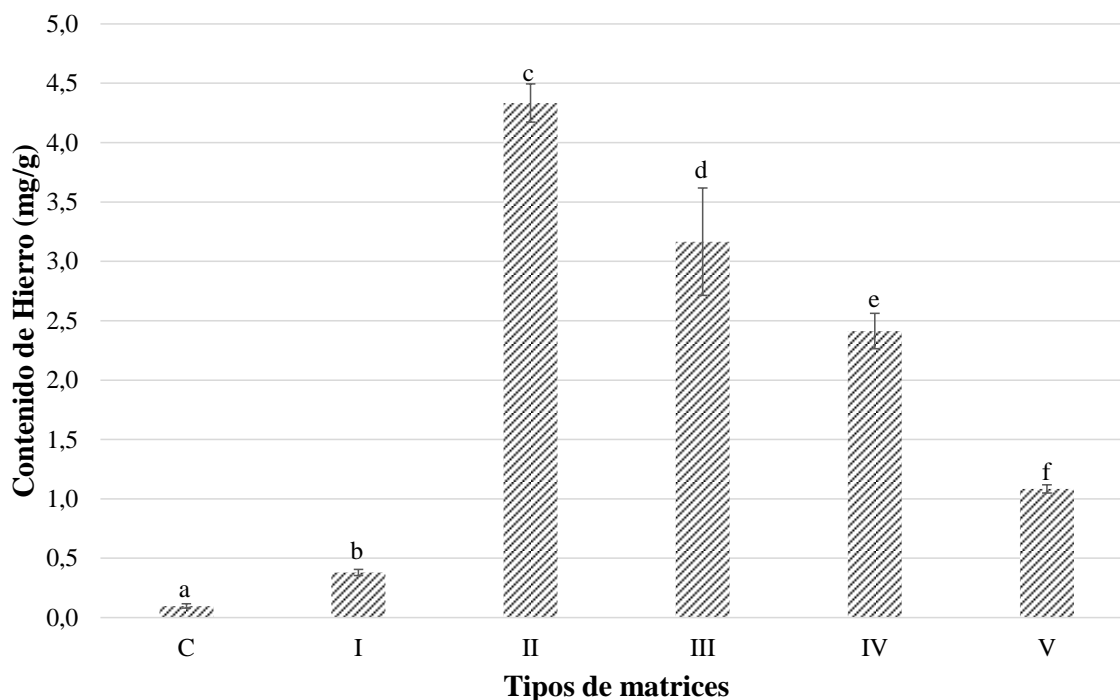


Figura 3. Contenido de hierro de las matrices comestibles. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Contenido de hierro hemo (H): no hemo (NH) de las matrices: C (sin hierro), I: 100H, II: 100NH, III:25H:75NH, IV: 50H:50NH y V: 75H:25NH.

3. Absorción del hierro en modelo de intestino evertido de cerdos post-faena

La absorción del hierro medida mediante el método del intestino evertido desde las matrices se presenta en la Figura 4. Los resultados se presentan como porcentaje de lo absorbido según una dosis fija de 3 g de matrices. La mayor absorción de hierro se produjo desde la matriz V (26,3%), que fue superior a la IV (7,8%), la cual no presentó diferencias con la III (3,7%) y I (2,0%), y éstas a su vez no mostraron diferencias con la II (1,3%) y C (0,8%).

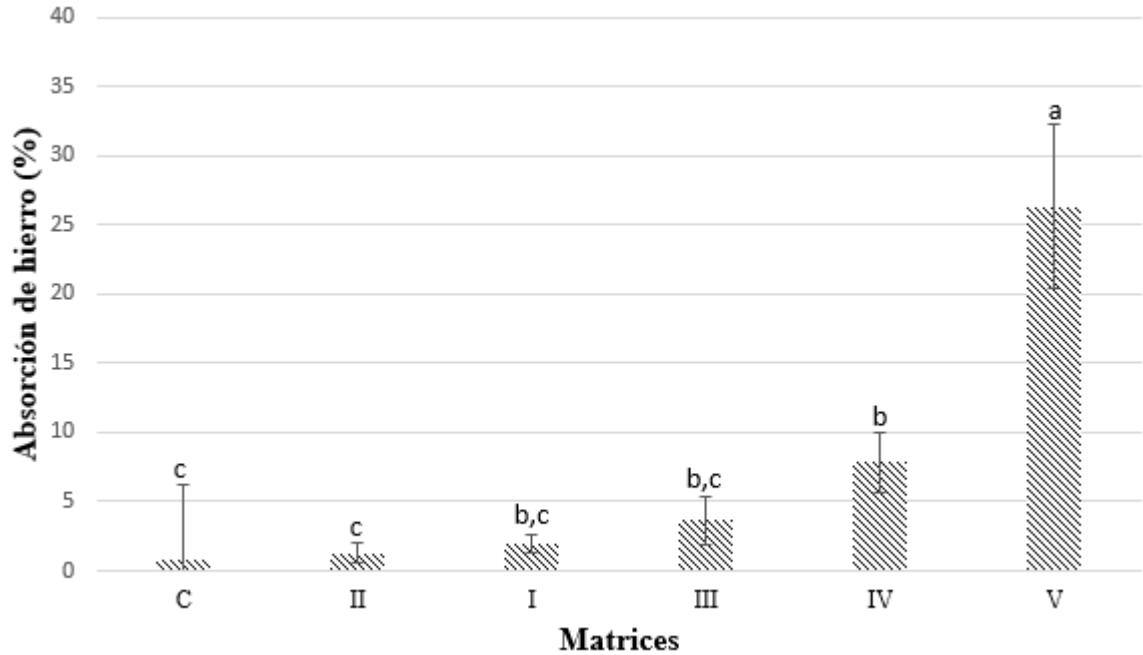


Figura 4. Contenido de hierro dentro de los intestinos evertidos. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Contenido de hierro hemo (H): no hemo (NH) de las matrices: C (sin hierro), I: 100H, II: 100NH, III: 25H:75NH, IV: 50H:50NH y V: 75H:25NH.

En primer lugar en base a estos resultados se puede validar el método del intestino evertido en intestino de cerdos post-faena para estudios de absorción de hierro, ya que las matrices IV y V presentaron una mayor absorción que la matriz control. En cuanto a los resultados de absorción de hierro, era esperable lo observado en la Figura 4, ya que en la medida que las matrices contenían más hierro hemo en su formulación, la absorción aumentaba, como lo han descrito varios autores en humanos, cerdos y ratas (Seligman *et al.*, 2000; Quintero *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2014), debido a que el hierro hemo es más biodisponible. Esta mayor biodisponibilidad del hierro hemo se debe a que es soluble a pH duodenal, por tanto no precipita, quedando la molécula completa para su absorción. Además su absorción no se ve afectada por componentes dietarios, a diferencia del hierro no hemo (Conrad y Umbreit, 2000). Recientemente Pizarro *et al.* (2016) estudiaron el efecto de proteínas de origen animal sobre la absorción de hierro en humanos, en sus resultados observaron una mejor absorción del hierro hemo cuando las dietas contenían los eritrocitos completos, reportando que probablemente algún factor del estroma del eritrocito potencia la absorción del hierro hemo.

Esto también podría explicar la mayor absorción observada en las matrices con mayor cantidad de hierro hemo, ya que en el presente estudio la fuente usada fueron eritrocitos bovinos.

Extrañamente el hierro contenido en la matriz I (100% de hierro hemo) no mostró consistencia con el resto de los tratamientos de hierro hemo, se esperaba una mayor absorción al tratarse de una matriz con un 100% de hierro hemo el cual se sabe que se absorbe de manera más eficiente (Lipinski *et al.*, 2013).

Aún se están estudiando las posibles vías de absorción para el hierro hemo, y hasta el momento se describe que podría ser absorbido como molécula completa por el enterocito, y se ha postulado que la proteína transportadora del grupo hemo 1 (HCP-1) estaría implicada en su absorción en el enterocito (Shayeghi *et al.*, 2005). Una vez en el citoplasma, la molécula de hierro hemo sería degradada por la hemo oxigenasa (HO) liberando hierro no hemo y biliverdina (Han, 2011). A su vez, se ha postulado que el receptor del virus de la leucemia felina subgrupo C (FLVCR) podría estar implicado en el transporte del grupo hemo intacto a la membrana basolateral del enterocito en donde se une a la hemopexina circulante (West y Oates, 2008).

La baja absorción que presentó la matriz tipo II, que estaba compuesta de 100% hierro no hemo se puede explicar por la ampliamente descrita baja disponibilidad que presentan las sales inorgánicas de hierro. Este tipo de hierro, a pH duodenal se encuentra mayormente en su forma férrica (Fe^{+3}), la cual precipita como óxido férrico o forma dímeros de hidróxido de hierro, los cuales no son aprovechables para su absorción por no quedar disponibles para su unión al DMT1 (Conrad y Umbreit, 2000; West y Oates, 2008). Debido a que el hierro férrico precipita en pH mayores a 3, este debe ser quelado para mantenerse soluble y biodisponible, una aclorhidria prolongada puede producir deficiencia de hierro, ya que no ocurrirá la quelación en el estómago, que facilita su absorción en el duodeno. En cambio la forma ferrosa (Fe^{+2}) es soluble a pH duodenal (Conrad y Umbreit, 2002). Luego, el hierro no hemo es transportado a través de la membrana apical del enterocito por el DMT1, y el Fe^{+2} puede ser almacenado en la proteína citoplasmática ferritina o ser transportado hacia la sangre por la

membrana basolateral por medio de la ferroportina y luego oxidado a Fe^{+3} por la proteína hefestina (Han, 2011).

Hasta la fecha no existen otros estudios que permitan comparar la absorción de hierro hemo solo o sus mezclas con no hemo (sulfato ferroso) por el método del intestino evertido en cerdo. Los estudios existentes en rata, mencionados en la Tabla 1, solo utilizaron soluciones con hierro no hemo. Sin embargo, la mayor parte de estos estudios no son comparables ya que no estudian la absorción del hierro no hemo por sí solo, utilizando otros compuestos para observar su efecto en la absorción, que podían aumentarla o disminuirla. Khemiss *et al.* (2006) compararon el efecto de un extracto de la fruta *Grewia tenax* sobre la absorción del sulfato ferroso; describiendo una absorción de hierro mucho mayor que la reportada en esta memoria. Sin embargo, en dicho estudio, además de utilizar un modelo animal distinto, lo que podría llevar a resultados diferentes, las condiciones experimentales también eran diferentes, ya que la manipulación del intestino fue inmediatamente después del sacrificio de los animales, a diferencia del presente estudio en donde el intestino debía ser trasladado desde la planta faenadora hasta el laboratorio, tiempo en el cual pudo disminuir la viabilidad del tejido. La viabilidad del tejido intestinal es uno de los parámetros más importantes de regular, viéndose afectada por factores del animal, del segmento intestinal, e incluso del método de sacrificio del animal (Alam *et al.*, 2012), haciendo difícil replicar lo que trabajos *in vivo* han demostrado. La obtención del segmento de intestino mediante sedación del animal previo a su sacrificio es el método comúnmente utilizado (Wilson y Wiseman, 1954; Dowdle *et al.*, 1960; Manis y Schachter, 1962; Moshtaghie y Taher, 1993; Khemiss *et al.*, 2006; Moshtaghie *et al.*, 2006; Alam *et al.*, 2012). Parsons y Paterson (1960) modificaron el método original removiendo la capa muscular de los segmentos de intestino, por ser una barrera que no se encuentra en el transporte *in vivo* y su presencia es un factor que disminuye sustancialmente el transporte de sustancias (Wolfe *et al.*, 1973), aunque no es una práctica muy utilizada probablemente debido a que en ratas esta capa es muy delgada. No obstante, Panichkriangkrai (1982) en su estudio sobre el efecto de la enterotoxina termoestable de *E. coli* en cerdos, realizó el método del intestino evertido quitando la capa muscular y serosa de los segmentos intestinales.

Se debe tener en cuenta que este estudio se diferencia de los otros mostrados en la Tabla 1, ya que las muestras de intestinos se tomaron desde animales faenados y no desde animales sacrificados minutos antes de realizar la técnica como ha sido descrito en los estudios citados. El obtener los intestinos desde animales faenados podría permitir aumentar el número de animales para la experimentación, y reducir los costos que significan la crianza y sacrificio de los animales.

Consideraciones futuras

Algunas consideraciones para futuros estudios son: 1) evaluar utilizar un marcador de pasaje de tránsito intestinal como un colorante como el azul de metileno, el cual se incorpore a la solución de incubación de los sacos evertidos y luego se pueda identificar dentro de los sacos intestinales. 2) Para mantener la viabilidad del intestino, se puede considerar segmentar el intestino en la planta faenadora y transportarlo en un medio de cultivo que entregue una fuente de energía y compuestos que mantengan la viabilidad de los enterocitos por más tiempo. 3) Realizar histología a las muestras de intestino post-incubación y tinción (como la de Perls), que detecte e identifique el hierro en las células. 4) Finalmente, en las muestras de intestino post-incubación también se podría determinar el contenido de hierro por espectrofotometría de absorción atómica. En estas dos últimas consideraciones se debe tener algún mecanismo control, ya que ambas detectan el hierro total presente en el intestino, no haciendo diferencia con el hierro que podría haber estado en la ferritina antes del sacrificio del animal.

CONCLUSIONES

Conforme a los resultados obtenidos fue posible identificar, seleccionar y validar la técnica del intestino evertido para estudiar la absorción de hierro desde matrices cargadas con hierro con cerdos post-faena. Fue posible observar diferencias en la absorción de hierro entre el tratamiento control y matrices cargadas con hierro (IV y V), los cuales presentaron una mayor absorción de hierro. La absorción de hierro aumentó con el incremento del hierro hemo en las matrices con mezcla de hierro hemo/no hemo, pero esta situación no se observó para el tratamiento con 100% de hierro hemo.

Para estudios futuros se debe considerar resguardar la viabilidad de los enterocitos, disminuyendo el tiempo entre la faena y la incubación de los intestinos, analizando otros medios de incubación y de transporte.

BIBLIOGRAFÍA

ALAM, M.; AL-JENOABI, F.; AL-MOHIZEA, A. 2012. Everted gut sac model as a tool in pharmaceutical research: limitations and applications. *J. Pharm. Pharmacol.* 64(3):326-36.

ANTILEO, R.; VALENZUELA, C.; FIGUEROA, J. 2016. Characterization of a novel encapsulated oral iron supplement to prevent iron-deficiency anemia in neonatal piglets. *J. Anim. Sci.* 94:157–160.

BARTHE, L.; BESSOUET, M.; WOODLEY, J.; HOUIN, G. 1998. The improved everted gut sac: a simple method to study intestinal P-glycoprotein. *Int. J. Pharm.* 173(1-2):255-258.

BOCCIO, J.; ZUBILLAGA, M.; CARO, R.; GOTELLI, C.; GOTELLI, M.; WEILL, R. 1996. Bioavailability and stability of microencapsulated ferrous sulfate in fluid milk: studies in mice. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 42(3):233-239.

CARRILLO, R.; VALENZUELA, C.; NEIRA-CARRILLO, A.; ARIAS, J. 2014. Elaboración y caracterización de hemoliposomas como suplemento de hierro hemínico. **In:** XVIII Congreso Chileno de Medicina Veterinaria. Santiago, Chile. 1-3 diciembre 2014. Casa Piedra. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

CLAUSS, W.; HÖRNICKE, H. 1984. Segmental differences in K-transport across rabbit proximal and distal colon *in vivo* and *in vitro*. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 79(2):267-269.

CONTRERAS, C.; BARNUEVO, M.; GUILLÉN, I.; LUQUE, A.; LÁZARO, E.; ESPADALER, J.; LÓPEZ-ROMÁN, J.; VILLEGAS, J. 2014. Comparative study of the oral absorption of microencapsulated ferric saccharate and ferrous sulfate in humans. *Eur. J. Nutr.* 53(2):567-574

CONRAD, M.; UMBREIT, J. 2000. Iron absorption and transport-an update. *Am. J. Hematol.* 64:287-298.

CONRAD, M.; UMBREIT, J. 2002. Pathways of Iron Absorption. *Blood Cells Mol. Dis.* 29(3):336-355.

DOWDLE E.; SCHACHTER D.; SCHENKER H. 1960. Active transport of Fe⁵⁹ by everted segments of rat duodenum. *Am. J. Physiol.* 198:609-613.

FOLLETT, J.; SUZUKI, Y.; LONNERDAL, B. 2002. High specific activity heme-Fe and its application for studying heme-Fe metabolism in Caco-2 cell monolayers. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 283(5):1125-1131.

HAMILTON, K.; BUTT, A. 2013. Glucose transport into everted sacs of the small intestine of mice. *Adv. Physiol. Educ.* 37(4):415-426.

HAN, O. 2011. Molecular mechanism of intestinal iron absorption. *Metallomics.* 3(2):103-109.

HENTZE, M.; MUCHENTHALER, M.; CAMASCHELLA, C. 2010. Two to tango: regulation of mammalian iron metabolism. *Cell.* 142(1):24-38.

ISHAYA, V.; ISHAYA, M. 2012. Iron nutrition and anaemia in piglets: a Review. *J. Vet. Adv.* 2(6):261-265.

JACKSON, L.; LEE, K. 1991. Microencapsulated iron for food fortification. *J. Food Sci.* 56(4):1047-1050.

KHEMISS, F.; GHOUL-MAZGAR, S.; MOSHTAGHIE, A.; SAIDANE, D. 2006. Study of the effect of aqueous extract of *Grewia tenax* fruit on iron absorption by everted gut sac. *J. Ethnopharmacol.* 103(1):90-98.

KHOPKAR, S. 1998. Atomic absorption spectroscopy. **In:** Basic Concepts Of Analytical Chemistry. 2ª edición. New age international. Nueva Deldi, India. pp. 259-272.

LE FERREC, E.; CHESNE, C.; ARTUSSON, P.; BRAYDEN, D.; FABRE, G.; GIRES, P.; GUILLOU, F.; ROUSSET, M.; RUBAS, W.; SCARINO, M. 2001. In vitro models of the intestinal barrier. The report and recommendations of ECVAM Workshop 46. European Centre for the Validation of Alternative methods. *Altern. Lab Anim.* 29(6):649-668.

LIPIŃSKI, P.; STARZYŃSKI, R.; CANONNE-HERGAUX, F.; TUDEK, B.; OLINSKI, R.; KOWALCZYK, P.; DZIAMAN, T.; THILBAUDEAU, O.; GRALAK, M.; SMUDA, E.; WOLINSKI, J.; USINSKA, A.; ZABIELSKI, R. 2010. Benefits and risks of iron supplementation in anemic neonatal pigs. *Am. J. Pathol.* 177(3):1233-1243.

LIPIŃSKI, P.; STYŚ, A.; STARZYŃSKI, R. 2013. Molecular insights into the regulation of iron metabolism during the prenatal and early postnatal periods. *Cell. Mol. Life Sci.* 70(1):23-38.

LYSIONEK, A.; ZUBILLAGA M.; SALGUEIRO M.; PIÑEIRO A.; CARO R.; WEILL R.; BOCCIO J. 2002. Bioavailability of microencapsulated ferrous sulfate in powdered milk produced from fortified fluid milk: a prophylactic study in rats. *Nutrition.* 18(3):279-281.

MANIS, J.; SCHACHTER, D. 1962. Active transport of iron by intestine: features of the two-step mechanism. *Am. J. Physiol.* 203: 73-80.

MEHANSHO, H. 2006. Iron fortification technology development: new approaches. *J. Nutr.* 136:1059-1063.

MOSHTAGHIE, A.; BADI, A.; HASSANZADEH, T. 2006. Investigation of manganese and iron absorption by rat everted gut sac. *Pak. J. Biol. Sci.* 9(7):1346-1349.

MOSHTAGHIE, A.; TAHER, M. 1993. Aluminium interference with iron absorption by everted gut sac. *Med. J. Islamic World Acad. Sci.* 6:277-281.

NAZZARO, F.; ORLANDO, P.; FRATIANNI, F.; COPPOLA, R. 2012. Microencapsulation in food science and biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23:182-186.

PANICKRIANGKRAI, W. 1982. The *in vitro* effects of Escherichia coli heat-stable enterotoxin on porcine small intestine. Dissertation doctor of philosophy. Iowa, USA. Iowa State University. 172 pp.

PARSONS, D.; PATERSON, C. 1960. Movements of fluid and glucose in an everted sac preparation of rat colonic mucosa. *Biochim. Biophys. Acta.* 41:173-175.

PIZARRO, F.; OLIVARES, M.; VALENZUELA, C.; BRITO, A.; WEINBORN, V.; FLORES, S.; ARREDONDO, M. 2016. The effect of proteins from animal source foods on heme iron bioavailability in humans. *Food Chem.* 196:733-738.

QIU, Y.; CHEN, Y.; ZHANG, G.; YU, L.; MANTRI, R. 2016. Developing solid oral dosage forms: pharmaceutical theory and practice. 2^a ed. Academic press. 1176 p.

QUINTERO, A.; GONZÁLEZ, G.; SÁNCHEZ, J.; POLO, J.; RODRÍGUEZ, J. 2008. Bioavailability of heme iron in biscuit filling using piglets as an animal model for humans. *Int. J. Biol. Sci.* 4(1):58-62.

ROZEHNAL, V.; NAKAI, D.; HOEPNER, U.; FISCHER, T.; KAMIYAMA, E.; TAKAHASI, M.; YASUDA, S.; MUELLER, J. 2012. Human small intestinal and colonic tissue mounted in the Ussing chamber as a tool for characterizing the intestinal absorption of drugs. *Eur. J. Pharm. Sci.* 46(5):367–373.

SCHARRER, E.; STUBENHOFER, L.; TIEMEYER, W.; BINDL, C. 1984. Active pyrimidine absorption by chicken colon. *Comp. Biochem. Physiol. A Comp. Physiol.* 77(1):85-88.

SELIGMAN, A.; MOORE, G.; SCHLEICHER, R. 2000. Clinical studies of hip: An oral heme-iron product. *Nutr. Res.* 20(9): 1279-1286.

SHAYEGHI, M.; LATUNDE-DADA, G.; OAKHILL, J.; LAFTAH, A.; TEKEUCHI, K.; HALLIDAY, N.; KHAN, Y.; WARLEY, A.; MCCANN, F.; HIDER, R.; FRAZER, D.; ANDERSON, G.; VULPE, C.; SIMPSON, R.; MCKIE, A. 2005. Identification of an intestinal heme transporter. *Cell.* 122(5):789-801.

TANG, N.; CHEN L.; ZHUANG H. 2014. Effects of heme iron enriched peptide on iron deficiency anemia in rats. *Food Funct.* 5(2):390-399.

THOMPSON, B.; SHARP, P.; ELLIOTT, R.; FAIRWEATHER-TAIT, S. 2010. Inhibitory effect of calcium on non-heme iron absorption may be related to translocation of DMT-1 at the apical membrane of enterocytes. *J. Agric. Food. Chem.* 58(14):8414-8417.

TURNER, J.; OSBORN, P.; MCVEAGH, S. 1990. Studies on selenate and selenite absorption by sheep ileum using an everted sac method and an isolated, vascularly perfused system. *Comp. Biochem. Physiol. A Comp. Physiol.* 95(2):297-301.

VALENZUELA, C.; HERNÁNDEZ, V.; MORALES, M.; NEIRA, A.; PIZARRO, F. 2014. Preparation and characterization of heme iron-alginate beads. *Food Sci. Technol.* 59(2):1283-1289.

VALENZUELA, C.; HERNÁNDEZ, V.; MORALES, M.; PIZARRO, F. 2016a. Heme Iron Release from Alginate Beads at In Vitro Simulated Gastrointestinal Conditions. *Biol. Trace Elem. Res.* 172(1):251-257.

VALENZUELA, C.; LAGOS, G.; FIGUEROA, J.; TADICH, T. 2016b. Behavior of suckling pigs supplemented with an encapsulated iron oral formula. *J. Vet. Behav.* 13: 6-9.

VAN DE KERKHOF, E.; DE GRAAF, I.; GROOTHUIS, G. 2007. In vitro methods to study intestinal drug metabolism. *Curr. Drug Metab.* 8(7):658-675.

VIANA, M.; ROSAS, A.; MARTÍNEZ, E.; PEÑA, E.; SHIMADA, A.; VÁZQUEZ, R.; D'ABRAMO, L. 2008. Uso de la técnica del intestino invertido como un modelo de estudio de digestión y absorción en el atún aleta azul (*thunnus orientalis*). In: Avances en nutrición acuícola IX. IX simposio internacional en nutrición acuícola. Monterrey, México. 24-27 noviembre 2008. Universidad autónoma de Nuevo León. 14pp.

VILLARROEL, P.; FLORES, S.; PIZARRO, F.; DE ROMAÑA, D.; ARREDONDO, M. 2011. Effect of dietary protein on heme iron uptake by Caco-2 cells. *Eur. J. Nutr.* 50(8):637–643.

WAUBEN, I.; ATKINSON, S. 1999. Calcium does not inhibit iron absorption or alter iron status in infant piglets adapted to a high calcium diet. *J. Nutr.* 129(3): 707-711.

WEST, A.; OATES, P. 2008. Mechanisms of heme iron absorption: Current questions and controversies. *World J. Gastroenterol.* 14(26): 4101–4110.

WILSON, T.; WISEMAN, G. 1954. The use of sacs of everted small intestine for the study of the transference of substances from the mucosal to the serosal surface. *J. Physiol.* 123(1):116–125.

WOLFE, D.; FORLAND, S.; BENET, L. 1973. Drug transfer across intact rat intestinal mucosa following surgical removal of serosa and muscularis externa. *J. Pharm. Sci.* 62(2): 200-205.