



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

EFFECTO DEL CALCIO SOBRE LA ABSORCIÓN DE HIERRO HEMÍNICO EN HUMANOS

PÍA CAROLINA SAAVEDRA DÍAZ

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

PROFESOR GUÍA: FERNANDO PIZARRO AGUIRRE

**SANTIAGO, CHILE
2010**



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

EFECTO DEL CALCIO SOBRE LA ABSORCIÓN DE HIERRO HEMÍNICO EN HUMANOS

PÍA CAROLINA SAAVEDRA DÍAZ

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

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : FERNANDO PIZARRO AGUIRRE
PROFESOR CONSEJERO : MARIA SOL MORALES SILVA
PROFESOR CONSEJERO : ANA MARÍA RAMIREZ KAMANN

SANTIAGO, CHILE
2010

Esta memoria de título fue desarrollada en el Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA) de la Universidad de Chile, bajo la dirección del profesor Fernando Pizarro Aguirre. Su realización fue financiada por el Proyecto Fondecyt 1095038 (2009).

Agradecimientos

A mi profesor guía, Fernando Pizarro por su apoyo para desarrollar esta Memoria de Título. Muchas gracias por la confianza que tuvo en mí, por sus críticas, su tiempo y paciencia.

A Angélica Letelier, Sebastián Flores, Diego Gaitán, y a todos los integrantes del Laboratorio de Micronutrientes del INTA.

A mi mamá que siento presente a cada momento. A mi papá por estar conmigo durante todo este camino y por la preocupación que demuestra día a día. Agradezco a mi familia y mis amigos que sin duda son pilares fundamentales para lograr todo lo que me propongo.

ÍNDICE

1.-INTRODUCCIÓN	1
2.-REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. Hierro	2
2.2. Deficiencia de hierro	5
2.3. Calcio	6
2.4. Calcio y hierro hemínico	8
3.-HIPÓTESIS	10
4.-OBJETIVO GENERAL	10
5.-OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
6.-MATERIALES Y MÉTODOS	11
6.1. Cálculo de la muestra	11
6.2. Sujetos participantes	11
6.3. Protocolo de los estudios	12
6.4. Biodisponibilidad de hierro	14
6.5. Análisis estadístico	15
7.-RESULTADOS	17
8.-DISCUSIÓN	24
9.-CONCLUSIONES	27
10.-ANEXOS	28
ANEXO 1: Acta de aprobación del Comité ético del INTA	28
ANEXO 2: Consentimiento de participación en el Proyecto "Rol del calcio sobre	

la biodisponibilidad del hierro hemínico y hierro no-hemínico de la dieta”	29
ANEXO 3: Técnica de doble marcaje isotópico de Eakins y Brown	32
ANEXO 4: Obtención de hierro hemínico	35
11.-BIBLIOGRAFÍA	36

RESUMEN

En los alimentos, el hierro se encuentra en dos formas químicas: hierro hemínico (Fe-hem) y hierro no hemínico (Fe no-hem). El Fe-hem tiene muy buena biodisponibilidad ya que el Fe se encuentra protegido por un anillo porfirínico, por tanto es poco afectado por otros factores presentes en la dieta. Hasta hoy, se ha descrito que el calcio interactuaría con el Fe-hem provocando una disminución en su absorción. Sin embargo, esta afirmación se basa en un estudio donde el Fe-hem fue administrado en un alimento que contenía otros factores que participan en la absorción del Fe-hem.

Objetivo: Establecer el efecto del calcio como cloruro de calcio sobre la absorción de hierro hemínico en humanos.

Hipótesis: El calcio en dosis de hasta 800 mg no inhibe la absorción de hierro hemínico en humanos.

Sujetos y Métodos: Participaron 26 mujeres (34 a 45 años), aparentemente sanas en dos estudios de absorción. En el estudio 1 se midió la biodisponibilidad de 5 mg Fe-hem como concentrado de glóbulos rojos (CGR) más 200, 400 y 800 mg de calcio como cloruro de calcio. El estudio 2 fue diseñado una vez realizado el estudio 1. Si se rechazaba la hipótesis se estudiaría con más precisión el nivel de inhibición del calcio.

Conejos fueron marcados con isótopos radiactivos de hierro (^{55}Fe ó ^{59}Fe), a partir de su sangre se obtuvo Fe-hem marcado intrínsecamente, este se utilizó como CGR liofilizados. En los días 1 y 2; y 14 y 15 los sujetos recibieron el Fe-hem marcado junto a dosis crecientes de Ca como cloruro de calcio. A los días 14 y 28 se obtuvo una muestra de sangre para medir la biodisponibilidad de Fe-hem.

Resultados: En el estudio 1, las biodisponibilidades de Fe-hem para dosis de 0, 200, 400 y 800 mg de Ca fueron 13,9; 11,5; 11,6 y 8,6% respectivamente (ANOVA para muestras repetidas, $F= 5,72$; $p<0,003$; Test post-hoc de Dunnett Fe-hem 0 mg Ca vs. Fe-hem más 800 mg Ca, $p<0,0001$). Como se rechazó la hipótesis se diseñó el estudio 2 con dosis entre 400 y 800 mg. Las biodisponibilidades de Fe-hem para dosis de 0, 500, 600 y 700 mg de Ca fueron de 11,1; 9,0; 9,6 y 10,1% respectivamente (ANOVA para muestras repetidas, $F= 1,09$, $p=0,36$; N.S).

Conclusión: El calcio como cloruro de calcio en dosis iguales o menores a los 700 mg, no inhibe la absorción del hierro hemínico.

SUMMARY

In food, iron is found in two chemical forms: hem iron (Fe-hem) and non-hem iron (Fe non-hem). Fe-hem is more bioavailable than the non-hem iron form, because this is protected by a porphirin ring, therefore it is hardly affected by other factors in the diet. At present, it has been described that the calcium would interact with Fe-hem producing a reduction in its absorption. However, this affirmation it is based on a research where Fe-hem was administrated in one meal that contained other factors which participates in Fe-hem absorption.

Objective: Establish the effect of calcium, as calcium chloride, regarding the absorption of Fe-hem in humans.

Hypothesis: A calcium dose under 800 mg does not inhibit the absorption of Fe-hem in humans

Subjects and methods: 26 apparently healthy women between 34 to 45 year old participated in two absorption research. In the 1st study, the bioavailability of 5 mg of Fe-hem was measured as a red blood cell concentrate (RBCC) plus 200, 400 and 800 mg of calcium as calcium chloride. The second study was designed once the first study was completed. If the assumption was rejected, the level of calcium inhibition will be studied with more precision.

Rabbits were labeled with Fe-hem radioiron isotopes (⁵⁵Fe or ⁵⁹Fe); intrinsically labeled Fe-hem was obtained from its blood, this was used as lyophilized RBCC. In day 1, 2, 14 and 15, the subjects received Fe-hem labeled with increasing doses on calcium as calcium chloride. In day 14 and 28, samples of blood were obtained in order to measure Fe-hem bioavailability.

Results: In study 1, heme-iron bioavailability for calcium dose of 0, 200, 400 and 800 mg was 13.9; 11.5; 11.6 and 8.6% respectively (One way ANOVA for repeated measures $F= 5.72$; $p<0.003$; Dunnett post-hoc test heme-iron 0 mg Ca vs. heme-iron 800 mg Ca, $p<0,0001$). As the hypothesis was rejected, a second study was designed with doses between 400 and 800 mg. The bioavailabilities of heme-iron for calcium doses of 0, 500, 600 and 700 mg was 11.1, 9.0, 9.6 and 10.1% respectively (One way ANOVA for repeated measures $F= 1.09$, $p=0.36$; N.S).

Conclusion: The calcium as calcium chloride in doses equal or lower than 700 mg does not inhibit heme-iron absorption.

1.-INTRODUCCIÓN

Una de las enfermedades nutricionales más prevalentes a nivel mundial es la deficiencia de hierro, es por ello que continúa siendo prioridad de trabajo en salud pública, aún en países desarrollados. Su principal consecuencia es la anemia, debido a que el hierro es un componente esencial para la formación de la hemoglobina.

El hierro es considerado un micronutriente esencial para la vida, ya que participa en una diversidad de procesos biológicos. Por esa razón, nuestra dieta debe incluir un aporte de hierro suficiente para cubrir pérdidas basales propias del organismo.

La homeostasis del hierro está regulada principalmente por su absorción, sin embargo, la biodisponibilidad del hierro está en función de su forma química y su interacción con otros componentes alimentarios.

El hierro, dependiendo de su fuente alimenticia puede clasificarse de dos formas, hierro no hemínico y hierro hemínico. El primero es muy susceptible a interactuar con otros factores de la dieta a diferencia del segundo. El calcio es uno de los factores que interactúa con ambos tipos de hierro.

Si bien, la mayoría de los estudios señalan que el calcio inhibe la absorción de hierro, aún no es conocido el mecanismo por el cual esto se produce y sólo se han generado especulaciones. En cuanto a la inhibición específica para hierro hemínico, hay sólo un estudio que demuestra una disminución en su absorción y a partir de esta información se ha establecido que el calcio es un inhibidor de la absorción de hierro hemínico.

El propósito de este estudio es generar antecedentes para dilucidar el efecto que tiene el calcio sobre la absorción del hierro hemínico.

2.-REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Hierro

El hierro es un elemento esencial para los organismos vivos. En soluciones acuosas puede encontrarse en dos estados de oxidación estables: ferroso (Fe^{2+}) y férrico (Fe^{3+}), propiedad que le permite participar en amplia gama de reacciones (Aisen y Listowsky, 1980). Es cofactor de muchas enzimas, hemoproteínas y proteínas no hemínicas, que cumplen funciones biológicas cruciales como la síntesis de ADN, síntesis de ARN, transporte de oxígeno, metabolismo del oxígeno, transporte de electrones y en el ciclo de Krebs (Palomo *et al.*, 2005).

En cuanto a su distribución, un 70% de este micronutriente se encuentra en la hemoglobina, otro 25% como reserva (ferritina y hemosiderina), un 4% como mioglobina y el 1% restante unido a transferrina o como componente de diversas enzimas (Bothwell y Finch, 1962).

Un hombre adulto posee alrededor de 4 gr. de hierro repartidos en su organismo, de esta cantidad, pierde aproximadamente 1 mg/día (0,025%), la cual debe ser reemplazada por la dieta (Conrad y Umbreit, 2002). En condiciones normales, una persona ingiere de 10 a 14 mg de hierro al día, de los cuales dependiendo de diferentes factores se absorben desde 0,5 a 2 mg. Así por ejemplo, la absorción en un hombre adulto alcanza 1 mg por día y unos 2 mg por día en una mujer en edad reproductiva, ya que sus requerimientos son superiores como consecuencia de las mayores pérdidas ocasionadas por los sangrados menstruales (Beard y Piñero, 1997).

Puesto que el organismo carece de un mecanismo eficiente para su excreción desde la circulación sistémica, la homeostasis del hierro está regulada fundamentalmente por la absorción intestinal en el duodeno y yeyuno superior (Muñoz y Molina, 2005; Palomo *et al.*, 2005; Beard y Piñero, 1997).

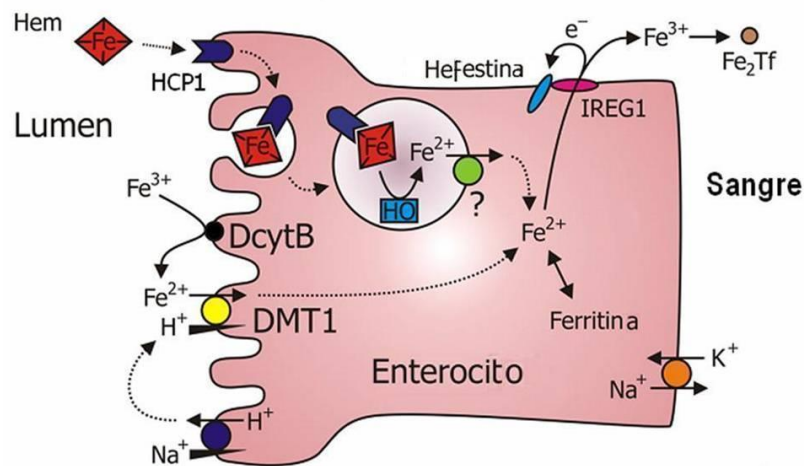
La absorción se realiza por vías diferentes dependiendo si la fuente dietética de hierro (Palomo *et al.*, 2005) es no hemínica, proveniente de alimentos vegetales y sales minerales, o bien, hierro hemínico, derivado de carnes y sangre (Pizarro *et al.*, 2005).

El hierro no hemínico se presenta como complejos férricos en los alimentos (Palomo *et al.*, 2005). En el estómago, es liberado de estos complejos quedando soluble en el lumen. Una vez en el intestino, se absorbe preferentemente en la porción proximal del duodeno, puesto que el pH bajo favorece la solubilidad del hierro mejorando su biodisponibilidad (Miret *et al.*, 2003). El citocromo

duodenal b (Dcytb) presente en el borde en cepillo, reduce el hierro de su estado férrico a ferroso, para así ser capturado por el transportador de metales divalentes (DMT1) (Latunde-Dada *et al.*, 2002).

A diferencia del hierro no hemínico, el mecanismo por el cual se absorbe el hierro hemínico no está del todo dilucidado (Palomo *et al.*, 2005), sin embargo, se sabe que el hem ingresa al enterocito como una metaloporfirina intacta (Uzel y Conrad, 1998) y que su absorción es saturable (Pizarro *et al.*, 2003). Un reciente estudio discute dos hipótesis para el transporte del hierro hemínico. Por un lado se postula que su captación estaría mediada por un proceso de endocitosis en la que participa un receptor y por otro, el actual descubrimiento de un transportador directo hacia el enterocito (West y Oates, 2008). Cualquiera sea el mecanismo de absorción, una vez dentro del enterocito el hem es degradado por la enzima microsomal hem-oxigenasa, la cual produce monóxido de carbono, biliverdina y hierro, así este último se incorpora al “pool” de hierro del enterocito (Pizarro *et al.*, 2005).

Una vez dentro del enterocito, el hierro puede almacenarse como ferritina para posteriormente ser removido del cuerpo cuando las células epiteliales son exfoliadas, o bien, ser conducido hasta la membrana basolateral a través de la proteína transportadora transmembrana ferroportina. (Conrad *et al.*, 1999; Abboud y Haile, 2000; Donovan *et al.*, 2000; McKie *et al.*, 2001). La ferroportina se encuentra asociada a la hefestina (proteína semejante a la ceruloplasmina), ésta, oxida el hierro de su estado ferroso a férrico para que se una a la transferrina plasmática y así enviarlo a circulación (Palomo *et al.*, 2005).



El plasma, el sistema retículoendotelial y la médula ósea son los principales compartimientos entre los que se distribuye e intercambia el hierro (Boccio *et al.*, 2003). La transferrina plasmática entrega el hierro a los precursores eritroides de la médula ósea para la síntesis de hemoglobina. Cuando los eritrocitos llevan 120 días en circulación son fagocitados por el sistema retículoendotelial y el hierro se libera en el plasma, donde se enlaza de nuevo a la transferrina y es puesto a disposición para la síntesis de hem (Conrad *et al.*, 1999). En condiciones normales, el sistema retículoendotelial proporciona la mayor parte del hierro necesario para la eritropoyesis (Fillet *et al.*, 1989).

En países como el nuestro, la mayor fuente de hierro en la dieta es no hemínica (Gaitán *et al.*, 2006), sin embargo, este es pobremente absorbido en contraste con el hierro hemínico. De hecho, aun cuando este último representa no más allá del 10% del hierro de la dieta, nos puede otorgar hasta un tercio del total de hierro absorbido (Beard y Piñero, 1997). Lo anterior, está estrechamente relacionado con el hecho de que el hierro no hemínico es muy influenciado por distintos componentes de la dieta, a diferencia del hierro hemínico el cual no es mayormente afectado (Muñoz y Molina, 2005).

Dentro de los factores que inhiben la absorción del hierro no hemínico se encuentran los fitatos, polifenoles, productos de digestión proteica, el calcio y la fibra, y dentro de los que favorecen su absorción está el ácido ascórbico, los ácidos orgánicos y tejidos animales (Lynch, 1997).

En contraste, el hierro hemínico parece ser afectado solamente por dos factores. Las proteínas, que favorecen su absorción, y el calcio, que la inhibe (Beard y Piñero, 1997). De hecho se ha demostrado que el hem es pobremente absorbido cuando es consumido solo (Conrad *et al.*, 1966), que su absorción aumenta cuando es ingerido como hemoglobina (Layrisse y Martínez-Torres 1972) y que su biodisponibilidad aumenta de dos a tres veces más cuando la hemoglobina se combina con carne (Heinrich *et al.*, 1971). También se ha descrito que la polimerización del hem disminuye su absorción, sin embargo, esta se ve reducida en condiciones alcalinas (Turnbull *et al.*, 1962).

La absorción de hierro hemínico y no hemínico se relaciona inversamente con la reservas de hierro (Hallberg *et al.*, 1997; Roughead y Hunt, 2000), no obstante, cuando existen deficiencias de hierro en el organismo, la absorción de hierro hemínico no puede regularse en la misma medida que la de hierro no hemínico, esto puede deberse a las limitaciones en velocidad para catabolizar el hem (West y Oates, 2008). También se ha descrito una hormona proteica secretada por el hígado denominada hepcidina, la cual controla los niveles plasmáticos de hierro regulando su absorción.

Su mecanismo de acción consiste en unirse a la ferroportina induciendo su internalización y posterior degradación, impidiendo por lo tanto la salida del micronutriente desde el enterocito hacia el plasma (Nemeth *et al.*, 2004).

2.2. Deficiencia de hierro

La deficiencia de hierro es uno de los trastornos nutricionales más comunes y extendidos en el mundo. Además de afectar a un gran número de niños y mujeres de países en desarrollo, es la única deficiencia nutricional significativamente prevalente en países industrializados (WHO, 2009). La menstruación y el embarazo de mujeres en edad fértil y el crecimiento en los niños, determina que este grupo tenga mayores requerimientos de hierro y por lo tanto sea más vulnerable a sufrir deficiencia. Éste aumento de las necesidades no va acompañado de una dieta adecuada, ya sea porque posee cantidades insuficientes de hierro y/o presenta una baja biodisponibilidad del nutriente (Olivares *et al.*, 1999).

La consecuencia fisiológica más evidente de la deficiencia de hierro es la anemia (Siimes *et al.*, 1980). Según la OMS, alrededor de 1,62 billones de personas en el mundo son anémicas y la causa principal se debe a deficiencia de hierro (WHO, 2008). La anemia se produce una vez que los niveles del mineral son tan bajos que la concentración de hemoglobina cae por debajo de los valores de corte específicos para edad y sexo (Dallman *et al.*, 1980; Cook *et al.*, 1994). Sin embargo, para llegar a esta condición se producen etapas graduales en el organismo. Primero hay una caída en las reservas corporales, que se caracteriza por una disminución en la ferritina sérica. Si el déficit persiste hay una menor disponibilidad de hierro hacia los tejidos (eritropoyesis deficiente en hierro). En esta etapa hay un aumento progresivo de la concentración sérica del receptor de transferrina, seguido de un aumento de la protoporfirina libre eritrocitaria y una disminución de la saturación de la transferrina. Cuando esto ocurre comienza la lenta caída de la concentración de hemoglobina. Finalmente se llega a la etapa más severa de la deficiencia en la cual se constata una anemia microcítica hipocrómica (Skikne *et al.*, 1990; Olivares y Walter, 2003).

La anemia por deficiencia de hierro es un problema de salud pública que trae consigo diversas consecuencias. En las mujeres embarazadas aumenta el riesgo de padecer partos prematuros y bajo peso al nacimiento, perjudica el desarrollo psicomotor y la actividad física en los individuos, reducen la productividad de trabajo en los adultos y disminuyen la supervivencia infantil y materna (Scholl *et al.*, 1992; de Benoist, 2001; WHO, 2009).

La deficiencia del micronutriente puede prevenirse mediante el consumo de una dieta adecuada, fortificación de los alimentos con hierro y suplementación con hierro medicinal. Aunque ninguna de las estrategias nombradas son excluyentes, la forma ideal de prevenir la carencia de hierro es mediante una dieta adecuada, lo que no siempre es posible de lograr por limitaciones económicas o hábitos muy arraigados. Estas modificaciones en la dieta incluyen aumentar el consumo de alimentos ricos en sustancias que favorecen la absorción del hierro no hemínico, disminuir el consumo de inhibidores de la absorción y aumentar el consumo de hierro hemínico. Por otro lado, la fortificación de los alimentos con hierro es una de las formas más prácticas para prevenir la carencia de hierro, puesto que el consumo de estos productos no requiere de una conducta activa del sujeto. Cuando no se está consumiendo alimentos fortificados con hierro o se requiere proveer una gran cantidad de hierro en un período se recomienda la suplementación con hierro medicinal (Olivares y Walter, 2003).

2.3. Calcio

El calcio es el catión más abundante en el organismo. Un adulto posee 1,2 a 1,5 kilos, representando el 1,5 - 2% del peso total del cuerpo. La mayor parte del calcio corporal se encuentra en el tejido óseo y en los dientes (99,1%), mientras que el porcentaje restante (0,9%) se encuentra disuelto en el líquido extracelular y en los tejidos blandos del organismo, donde regula y participa en multitud de reacciones metabólicas (Pérez *et al.*, 2005).

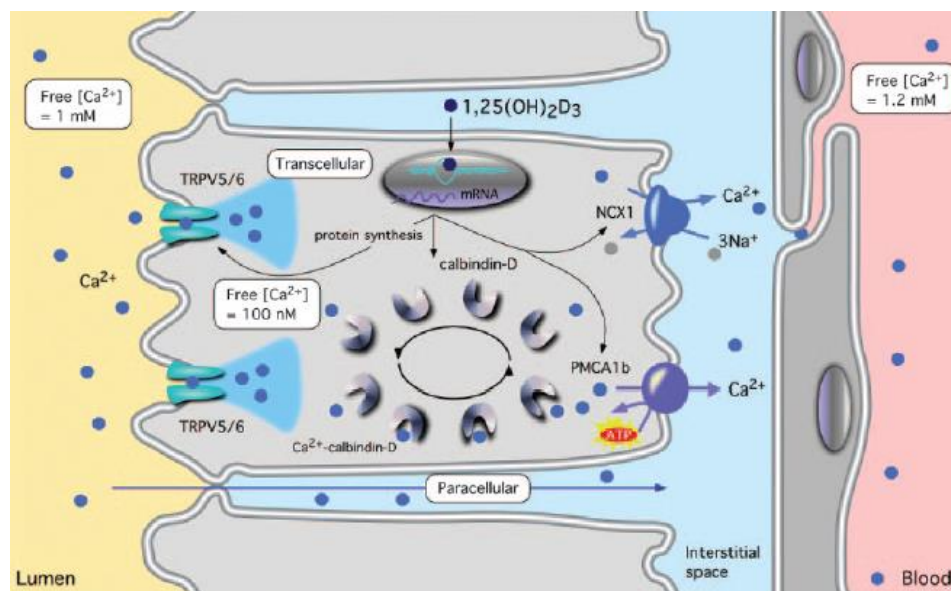
El calcio juega un rol biológico desde el momento de la fertilización. Todo el transporte de calcio que se produce en la placenta y glándula mamaria está influenciada por el balance de calcio de la madre (Belkacemi *et al.*, 2002; Shennan y Peaker, 2000). Luego del nacimiento, el niño demanda grandes cantidades destinadas al crecimiento óseo, esta demanda va disminuyendo a medida que avanza la edad. Factores como el pH, concentración de calcio extracelular y varias hormonas han demostrado tener mucha influencia en el movimiento del calcio a través del epitelio renal (Bindels *et al.*, 1994; Friedman y Gesek, 1995; Hoenderop *et al.*, 2002.). En general, el transporte de calcio es mediado por una compleja cadena de procesos que son regulados por factores fisiológicos, hormonales y de desarrollo.

Respecto a la ingesta óptima de calcio, en hombres y mujeres adultos se recomienda una dosis de 1000 mg de calcio diario. En niños la dosis oscila entre 400 y 1200 mg dependiendo de la edad, en mujeres embarazadas o lactantes entre 1200 y 1500 mg/día y en posmenopáusicas 1500 mg/día. (NIH, 1994)

La absorción intestinal de calcio se puede llevar a cabo mediante dos mecanismos: uno transcelular, proceso activo saturable que tiene lugar en el duodeno, y uno paracelular, proceso pasivo no saturable que tiene lugar en todo el intestino delgado (Bronner, 1998).

La vía transcelular se encuentra sujeta a regulación fisiológica y nutricional vía vitamina D (Pérez *et al.*, 2005). El calcio ingresa en la membrana apical del enterocito a favor de un gradiente de potencial electroquímico mediante los canales de calcio TRPV5 y TRPV6 (Hoenderop *et al.*, 2005). Una vez en el citosol, el calcio se une a las calbindinas que permiten su traslado hasta la membrana basolateral, o bien, se traslada en vesículas. Para expulsar el calcio fuera del enterocito se necesita ir en contra de su gradiente electroquímico, para ello existe una Ca^{+2} -ATPasa en la membrana basolateral, una cantidad menor lo hace a través de un intercambiador $\text{Na}^{+}\text{Ca}^{+2}$ y las vesículas se fusionan con la membrana por exocitosis (Levy *et al.*, 2006; Larsson y Nemere, 2002).

La vía paracelular se lleva a cabo a través del espacio intercelular que existe entre los enterocitos. A pesar de que este espacio es muy estrecho, se permite la difusión de pequeñas moléculas e iones como el calcio. La mayor parte de este proceso depende de la gradiente de concentración y cargas eléctricas de los iones (Hoenderop *et al.*, 2005).



Cuando las ingestas de calcio son bajas la vía transcelular es funcionalmente importante, sin embargo, cuando las ingestas de calcio son altas el transporte paracelular es predominante (Bronner, 2003).

2.4. Hierro hemínico y Calcio

Estudios en animales han planteado que el calcio interfiere sobre la absorción de hierro e incluso que la adición de éste en la dieta podría inducir deficiencias de hierro (Hallberg, 1998). También se han realizado una diversidad de estudios para evaluar el efecto del calcio en la absorción de hierro en humanos, sin embargo, estos estudios indicarían que el efecto sería menos consistente en humanos que en animales (Hallberg *et al.*, 1991).

Aun cuando se ha desarrollado una gran cantidad de estudios con el objetivo de establecer si el calcio interfiere o no sobre la absorción de hierro, la mayoría de estos se han realizado evaluando en hierro no hemínico. Un estudio citado frecuentemente en la literatura realizado por Hallberg *et al.*, (1991) indaga sobre un posible efecto del calcio sobre ambos tipos de hierro. Para hierro no hemínico, se evaluó la adición de dosis crecientes de calcio como cloruro de calcio a una comida experimental basada en panes de harina de trigo con mantequilla que contenía hierro como sulfato ferroso. Para evaluar el efecto del calcio sobre la absorción de hierro hemínico se utilizaron hamburguesas marcadas con hemoglobina de sangre de conejo y se añadieron 165 mg de calcio a panes de harina de trigo. Los autores concluyeron que hay una asociación dosis dependiente con una inhibición máxima de 60% en dosis de calcio mayores a 300 mg para hierro no hemínico y que al adicionar 165 mg de calcio también hay una inhibición para la absorción de hierro hemínico. El grupo también propone que la inhibición de calcio en ambos tipos de hierro no se produce en el paso desde el lumen intestinal hacia la mucosa del enterocito, sino que una vez dentro de este impide el proceso de transferencia hacia la serosa (Hallberg *et al.*, 1992b).

Un año después este mismo grupo de investigadores (Hallberg *et al.*, 1992a) realizó un segundo estudio para evaluar el efecto del calcio sobre el hierro hemínico. Este fue planteado con el objeto de establecer si el calcio inhibía directamente la absorción de Fe-hem, o bien, contrarrestaba el efecto favorecedor que tiene la carne sobre su absorción. Para ello diseñaron dos estudios, uno agregando la hemoglobina marcada a carne y otro agregándola a panes de trigo. En ambos estudios la ingesta de hierro hemínico fue de 3 mg añadiendo 165 mg de calcio. El grupo nuevamente determinó que hay una inhibición significativa al adicionar esa cantidad de calcio y que la inhibición se produce con o sin carne.

Por otro lado hay estudios que revelan lo contrario, Roughead *et al.* (2002) demostró que las biodisponibilidades para hierro hemínico y no hemínico no eran afectadas al añadir queso que contenía 127 mg de calcio. En un segundo estudio se demuestra que la captación de hierro hemínico a través de la mucosa del enterocito, se ve reducida al añadir 450 mg de calcio como citrato de calcio a una comida con baja biodisponibilidad de hierro, sin embargo, no afecta la captación de hierro no

hemínico. La misma situación fue observada al añadir 450 mg de calcio a una comida con alta biodisponibilidad de hierro. No obstante, la reducción en la captación a través de la mucosa no fue suficiente para producir una disminución significativa en el porcentaje de absorción de hierro hemínico (Rougead *et al.*, 2005).

3.-HIPÓTESIS

El calcio en dosis de hasta 800 mg no inhibe la absorción de hierro hemínico en humanos.

4.-OBJETIVO GENERAL

Establecer el efecto del calcio como cloruro de calcio sobre la absorción de hierro hemínico en humanos.

5.-OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto de concentraciones crecientes de calcio hasta 800 mg por dosis (CaCl_2) sobre la absorción hierro hemínico en humanos.
2. Si se rechaza la hipótesis, determinar de manera más precisa a que concentración de calcio se inhibe la absorción de hierro hemínico.

6.-MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio fue realizado en el Laboratorio de Micronutrientes del INTA (Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos).

6.1. Cálculo de la muestra

Las causas de la variabilidad fisiológica o variación día a día que presenta la absorción de hierro en un mismo individuo (intra-sujeto) se asocian con cambios en la motilidad gastrointestinal y las cantidades de secreción gástrica, pancreáticas o biliar (Layrisse y Martínez-Torres, 1972), sin embargo, es posible controlarla incluyendo grupos de entre 12 y 13 sujetos, con un mínimo de 8, por estudio de absorción (Cook y Lipschild, 1977). Por otro lado, se postuló encontrar diferencias de un 5% de hierro absorbido entre las pruebas y la dosis de hierro hemínico solo, el n calculado para un análisis de varianzas (ANOVA) fue de 9 voluntarios (error $\alpha=0.05$ y poder=80%). Se determinó realizar el estudio en 15 sujetos para cubrir posibles pérdidas por rechazo a la ingesta, diarrea y/o vómito.

6.2. Sujetos participantes

En el primer estudio participaron 15 mujeres y en el segundo solo 11 por razones de financiamiento, sin embargo, esto no afecta el análisis de estadística comparativa debido a que el tamaño de muestra calculado fue de 9 sujetos por grupo. Las mujeres tenían entre 34 y 45 años, se encontraban clínicamente sanas, no presentaban patologías del tracto gastrointestinal. Seis meses antes del estudio y mientras este duró no consumieron fármacos ni suplementos minerales o multivitamínicos. El protocolo a seguir estaba previamente aprobado por el Comité de Ética del INTA (Anexo 1). Antes de iniciarse cada estudio, los individuos fueron citados a una reunión informativa para aclarar sus dudas, donde se hizo firmar un consentimiento de participación en el proyecto (Anexo 2). Dado que se utilizaron isótopos radioactivos, las mujeres que participaron en el estudio estaban utilizando algún método anticonceptivo (DIU, anticonceptivos orales o ligadura de trompas). Además se les realizó una prueba de embarazo (hCG Combo Cassette for urine, serum and plasma, inmunoensayo cromatográfico, sensibilidad del test: 25 mIU hCG/mL orina).

6.3. Protocolo de los estudios

El día de la reunión informativa se obtuvo los pesos y las tallas de las mujeres con el fin de establecer sus volemias a partir de las tablas de Tulane (Nadler *et al.*, 1962).

Los días 1, 2, 14, 15 y 28 del protocolo, las participantes llegaron a las 8 de la mañana al Laboratorio de Micronutrientes del INTA con un ayuno de 8 horas. Dos protocolos de biodisponibilidad de hierro fueron diseñados.

Protocolo 1: Efecto de dosis crecientes de calcio (de 0 a 800 mg de Ca) sobre la biodisponibilidad de Fe hemínico.

Día 1: Cada sujeto ingirió 5 mg de hierro hemínico como concentrado de glóbulo rojo (CGR) marcado con 3 uCi de ^{55}Fe .

Día 2: Cada sujeto ingirió 5 mg de hierro hemínico como CGR marcado con 1 uCi de ^{59}Fe junto a 200 mg de calcio.

Día 14: Con ayuno previo, se tomó una muestra de 30 mL de sangre, 10 mL fueron utilizados para establecer el estado nutricional y 20 mL para determinar la biodisponibilidad de hierro de los sujetos. Luego cada individuo ingirió 5 mg de hierro hemínico como CGR marcado con 3 uCi de ^{55}Fe junto a 400 mg de calcio.

Día 15: Cada sujeto ingirió 5 mg de hierro hemínico marcado con 1 uCi de ^{59}Fe junto a 800 mg de calcio.

Día 28: Con ayuno previo, se tomó una muestra de 20 mL de sangre para determinar la biodisponibilidad de hierro de los sujetos.

Protocolo 2: Efecto de dosis crecientes de calcio (de 500 a 700 mg de Ca) sobre la biodisponibilidad de Fe hemínico.

Día 1: Cada sujeto ingirió 5 mg de hierro hemínico como concentrado de glóbulo rojo (CGR) marcado con 1 uCi de ^{59}Fe .

Día 2: Cada sujeto ingirió 5 mg de hierro hemínico como CGR marcado con 3 uCi de ^{55}Fe junto a

500 mg de calcio.

Día 14: Con ayuno previo, se tomó una muestra de 30 mL de sangre, 10 mL fueron utilizados para establecer el estado nutricional y 20 mL para determinar la biodisponibilidad de hierro de los sujetos. Luego cada individuo ingirió 5 mg de hierro hemínico como CGR marcado con 1 uCi de ^{59}Fe junto a 600 mg de calcio.

Día 15: Cada sujeto ingirió 5 mg de hierro hemínico marcado con 3 uCi de ^{55}Fe junto a 700 mg de calcio.

Día 28: Con ayuno previo, se tomó una muestra de 20 mL de sangre para determinar la biodisponibilidad de hierro de los sujetos.

Las cantidades tanto para hierro hemínico como para calcio en ambos protocolos fueron administradas en cápsulas a los sujetos junto a agua desionizada. Posterior a la ingesta de dichas cápsulas, el ayuno se mantuvo por cuatro horas más.

La obtención de hierro hemínico marcado con isótopos radioactivos se hizo a partir de sangre de conejos a través de la técnica de Layrisse y Martínez-Torres (1972) (Anexo 4).

Estado nutricional de hierro

Con 10 mL de sangre extraídos los días 14 de cada protocolo, se determinó el estado nutricional de cada individuo. Los exámenes realizados fueron los siguientes:

Hemoglobina (Hb) y volumen corpuscular medio (VCM): Determinadas en un contador electrónico de células (CELL-DYN 1700, ABBOTT Diagnostics, Abbott Park, IL).

Hierro sérico (Fe): Se realizó mediante fotolorimetría, utilizando el cromógeno TPTZ.

Capacidad total de unión a hierro (TIBC): Según la metodología propuesta por Fischer y Price, 1964.

Porcentaje de saturación de la transferrina (% Sat): Se calculó mediante la fórmula de hierro en suero / TIBC (Fischer y Price, 1964).

Protoporfirina libre eritrocitaria (Zpp): (ZP-M206D, AVIV Biomedical Inc., Lakewood, NJ)

Ferritina sérica (FS): Se realizó mediante una prueba de ELISA en sándwich, para lo cual, se utilizó como anticuerpo primario anti-ferritina (Ref: A0362) y como secundario anti-ferritina conjugado con peroxidasa (Ref: A0031), ambos de marca Dako Corporation.

Receptor de transferrina (rTf): Se realizó mediante una prueba de ELISA (Human sTrF, BioVendor, Laboratorní Medicina AS, Modrice, República Checa).

6.4. Biodisponibilidad de hierro

Para calcular la biodisponibilidad de hierro se utilizó la técnica de doble marcaje isotópico (Eakins y Brown, 1966), usando isótopos radioactivos de hierro como trazadores de su absorción, ^{55}Fe y ^{59}Fe (NEN, Life Science Products, Inc., Boston, MA). La técnica consiste a grandes rasgos en tomar cada una de las muestras de sangre y digerirlas en un medio ácido para así precipitar el contenido total de hierro. Luego, se determina la radioactividad emitida en un contador de centelleo líquido (Packard 1600TR Tri-Carb Scintillation Counter System, Meriden CT), para esto se utilizaron 2 muestras blanco, cuadruplicados de dos estándares (^{55}Fe y ^{59}Fe) y duplicados de las muestras de cada sujeto. Las muestras permanecieron en el contador el tiempo necesario para tener un error menor al 3%; el equipo reportó las cuentas por minuto (cpm) de radioactividad emitida de ^{55}Fe (carril A) y de ^{59}Fe (carril B). Los pasos para desarrollar esta técnica se describen más detalladamente en el Anexo 3 (Técnica de doble marcaje isotópico de Eakins y Brown).

Una vez realizado el conteo de la marca radioactiva para cada muestra, los resultados se resumieron en una planilla Excel. Debido a que existe un traslape de las cuentas en cada uno de los carriles del contador de centelleo, es decir, hay una cantidad de cuentas que se cuentan del carril A como B y viceversa, es necesario establecer la magnitud de este traslape, corregir las cpm y calcular a partir de esto la biodisponibilidad de Fe de la siguiente manera:

- 1) Corrección de las cpm totales en cada carril por las muestras blanco.
- 2) Corrección de las cpm para cada isótopo según el traslape.
- 3) Cálculo de las cpm por mL de sangre para cada isótopo.
- 4) Cálculo de las cpm de cada isótopo por gr de CGR ingerido.
- 5) Cálculo del total de cuentas ingeridas de cada isótopo.
- 6) Cálculo del total de cpm circulantes de cada uno de los isótopos.
- 7) Cálculo del porcentaje de absorción de cada isótopo.
- 8) Cálculo de la biodisponibilidad de los isótopos. Esto asumiendo que el 80% del hierro absorbido es destinado a la síntesis de hemoglobina de los eritrocitos circulantes.

Las fórmulas utilizadas se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Fórmulas utilizadas para el cálculo de la biodisponibilidad de Fe mediante la utilización de los isótopos ^{55}Fe y ^{59}Fe .

Pasos	Fórmula
1	cpm A = cpm en A – Promedio de las cpm en A de los blancos cpm B = cpm en B – Promedio de las cpm en B de los blancos
2	cpm ^{55}Fe = cpm en A – cpm de traslape de B a A cpm ^{59}Fe = cpm en B – cpm de traslape de A a B
3	cpm $^{55}\text{Fe}/\text{mL}$ sangre = cpm $^{55}\text{Fe}/\text{mL}$ sangre analizada cpm $^{59}\text{Fe}/\text{mL}$ sangre = cpm $^{59}\text{Fe}/\text{mL}$ sangre analizada
4	cpm $^{55}\text{Fe}/\text{gr}$ de CGR = cpm Standard $^{55}\text{Fe}/\text{gr}$ de CGR analizados cpm $^{59}\text{Fe}/\text{gr}$ de CGR = cpm Standard $^{59}\text{Fe}/\text{gr}$ de CGR analizados
5	cpm ingeridas ^{55}Fe = gr de CGR ingeridos * cpm $^{55}\text{Fe}/\text{gr}$ de CGR cpm ingeridas ^{59}Fe = gr de CGR ingeridos * cpm $^{59}\text{Fe}/\text{gr}$ de CGR
6	cpm circulantes ^{55}Fe = cpm $^{55}\text{Fe}/\text{mL}$ sangre * volemia cpm circulantes ^{59}Fe = cpm $^{59}\text{Fe}/\text{mL}$ sangre * volemia
7	% ^{55}Fe absorbidas = cpm circulantes $^{55}\text{Fe}/\text{cpm}$ ingeridas ^{55}Fe * 100 % ^{59}Fe absorbidas = cpm circulantes $^{59}\text{Fe}/\text{cpm}$ ingeridas ^{59}Fe * 100
8	Biodisponibilidad de ^{55}Fe = % ^{55}Fe absorbido/ 0,8 Biodisponibilidad de ^{59}Fe = % ^{59}Fe absorbido/ 0,8

Para evitar sobreposición de la radioactividad circulante, las cpm por mL obtenidas para el día 1 y 2 fueron restadas en los días 14 y 15.

6.5. Análisis estadístico

Las comparaciones estadísticas se realizaron intra grupo en donde cada sujeto fue su propio control. Se realizó estadística descriptiva a cada una de las variables y se describieron como promedio y desviación estándar (DS).

Dado que la variable absorción de hierro presenta una distribución asimétrica con desviación a la izquierda, cada valor se convirtió a logaritmo natural (ln) con el objeto de aplicar estadística

paramétrica. Posteriormente se retransformaron estos resultados mediante el uso del antilogaritmo, con el fin de reportarlos como promedios geométricos y rangos de ± 1 DS en las unidades originales.

Para determinar si había o no diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, los \ln de los porcentajes de biodisponibilidad de Fe fueron sometidos a un análisis de varianza para muestras repetidas. La prueba *pos hoc* de Dunnett fue utilizada para esclarecer cual tratamiento con respecto al control era el responsable de esta diferencia. Ambas pruebas fueron calculadas a través del programa PRISMA (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Las variables hematológicas y bioquímicas que miden estado de nutrición de hierro fueron comparadas entre los dos grupos de estudio. Se utilizó la prueba de *t* de Student para cada variable entre los grupos.

7.-RESULTADOS

El estado de nutrición general de los sujetos para ambos estudios fue normal. Se encontraron tres mujeres con anemia por deficiencia de hierro (Hb<120 g/L, más uno o más de los otros parámetros de nutrición de hierro alterados: VCM<80 fL y/o Zpp>70 ug/dL GR y/o Sat<16% y/o FS<12 ug/dL (Olivares, 2001)), en sólo 2 de éstas, el estado de deficiencia de hierro fue ratificado por receptor de transferrina (rTf>8,3 ug/ml). Otros tres sujetos presentaron deficiencia de hierro sin anemia (Hb normal más dos o más de los otros parámetros de nutrición de hierro alterados) y uno tenía sus depósitos de hierro depletados (FS <12 ug/L) (Tablas 2 y 3).

Tabla 2: Antropometría y estado nutricional de hierro de sujetos del estudio 1.

	Edad (a)	Peso (Kg)	Talla (mt)	IMC (Kg/m ²)	Hb (g/L)	VCM (fL)	Zpp (ug/dL GR)	Fe (ug/dl)	TIBC (ug/dL)	Sat (%)	FS (ug/L)*	rTf (ug/ml)
EVA	37	74	1,59	29,3	135	89,5	47,2	49,7	310,8	16,0	18,4	7,7
PBO	46	65	1,65	23,9	130	86,5	74,2	35,7	400,4	8,9	7,5	9,1
NLP	39	53	1,48	24,4	128	87,0	63,0	61,6	476,0	12,9	11,6	3,9
JFP	41	59	1,48	27,0	130	85,5	55,8	79,1	296,8	26,7	17,2	4,1
RHA	39	80	1,59	31,8	147	87,0	52,9	79,8	302,4	26,4	28,4	6,0
BGM	42	60	1,56	24,7	129	93,5	70,0	64,4	350,0	18,4	23,6	7,0
PFP	37	74	1,57	30,0	140	85,5	57,2	52,5	375,2	14,0	38,9	6,3
CMS	34	71	1,61	27,4	133	88,5	58,7	43,4	302,4	14,4	18,1	3,4
IAM	39	74	1,67	26,3	127	82,0	67,0	45,5	420,0	10,8	4,6	4,3
EMA	45	67	1,52	29,1	129	91,5	51,5	60,9	280,0	21,8	104,8	3,7
GVV	35	73	1,65	26,7	129	92,5	54,2	84,0	291,2	28,8	26,3	3,9
MPA	41	74	1,59	29,3	117	70,0	97,1	11,9	408,8	29,1	5,9	11,0
IRC	40	62	1,53	26,4	142	91,5	64,3	135,1	355,6	38,0	30,3	5,2
HCC	46	61	1,49	27,6	121	91,0	59,9	37,1	347,2	10,7	9,8	4,0
JAG	36	47	1,53	20,2	126	83,5	61,4	53,2	330,4	16,1	12,8	3,7
Media	40	66	1,57	26,9	131	87,0	62,3	59,6	349,8	19,5	17,3	5,6
DE	4	9	0,06	2,9	7,7	5,78	12,03	28,18	56,75	8,52	7,8 - 38,4	2,3

*Promedio Geométrico y rango ± 1 DE.

Tabla 3: Antropometría y estado nutricional de hierro de sujetos del estudio 2.

	Edad (a)	Peso (Kg)	Talla (mt)	IMC (Kg/m ²)	Hb (g/L)	VCM (fL)	Zpp (ug/dL GR)	Fe (ug/dl)	TIBC (ug/dL)	Sat (%)	FS (ug/L)*	rTf (ug/ml)
SMA	35	84	1,66	30,5	145	99,5	71,4	126,4	343,6	36,8	61,0	3,0
MPP	34	54	1,52	23,5	147	93,0	57,1	132,1	355,0	37,2	11,7	4,5
NMC	40	70	1,59	27,7	143	93,5	72,8	95,1	315,2	30,2	87,8	5,3
MRG	36	62	1,61	24,1	140	90,5	71,5	55,4	303,9	18,2	22,3	4,8
MVR	35	57	1,57	22,9	130	88,5	63,0	104,4	349,3	29,9	9,3	3,4
CVR	36	53	1,46	24,7	121	90,0	65,8	104,4	349,3	29,9	26,3	3,5
YVM	35	58	1,50	25,7	145	94,5	52,8	74,6	389,1	19,2	37,5	3,4
BJP	41	57	1,52	24,9	105	71,5	98,7	36,9	431,7	8,5	1,6	10,9
CCC	36	58	1,48	26,3	139	94,0	61,5	122,8	315,2	39,0	40,0	4,8
JCS	43	67	1,55	27,6	112	78,5	59,3	44,7	437,4	10,2	2,3	7,5
MCC	34	63	1,60	24,5	133	89,5	60,1	53,3	320,9	16,6	16,7	5,2
Media	37	62	1,55	25,7	132	89,4	66,7	86,4	355,5	25,1	16,9	5,1
DE	3	9	0,06	2,2	14,3	7,88	12,38	34,82	45,79	10,96	4,8 – 59,7	2,3

*Promedio Geométrico y rango \pm 1 DE

En el estudio 1, el promedio de edad de las 15 participantes fue de 40 ± 4 años. El índice de masa corporal (IMC) promedio fue de $26,9 \pm 2,9$ Kg/m² y el estado nutricional de la muestra, valorado por este índice fue de 4 normales (IMC 18,5 – 24,9), 9 con sobrepeso (IMC entre 25 a 29,9) y 2 obesas (IMC \geq 30).

Con respecto al estudio 2, el promedio de edad de las 11 participantes fue 37 ± 3 años. El índice de masa corporal (IMC) promedio fue de $25,7 \pm 2,2$ Kg/m² y el estado nutricional de la muestra, valorado por este índice fue de 6 normales, 4 con sobrepeso y 1 obesa.

Los promedios de los parámetros que miden estado de nutrición de hierro: Hemoglobina (Hb), Volumen corpuscular medio (VCM), Protoporfirina libre eritrocitaria (Zpp), Capacidad total de unión a hierro (TIBC), Saturación de la transferrina (%Sat), Ferritina sérica (FS) y Receptor de transferrina (rTf) no presentaron diferencias significativas al utilizar la prueba de *t* de Student para

cada uno de ellos. Por lo que los dos grupos de estudio presentan un estado nutricional de hierro comparable.

En la tabla 4 y 5 se entregan los valores de biodisponibilidad de hierro de cada sujeto para ambos estudios, calculadas a partir de las cpm de radioactividad emitidas por el contador de centelleo líquido y la volemia, utilizando las fórmulas detalladas en la tabla 1.

Como los valores de biodisponibilidad de hierro se distribuyen asimétricamente, los datos individuales se transformaron a su logaritmo natural y se calculó el promedio geométrico.

Tabla 4: Porcentajes de biodisponibilidad de hierro de cada sujeto en el estudio 1.

	Biodisponibilidad de Fe (%)				Razones de biodisponibilidad		
	Fe-hem	Fe-hem	Fe-hem	Fe-hem	A/c	B/c	C/c
	⁵⁵Fe	⁵⁹Fe	⁵⁵Fe	⁵⁹Fe			
(c)	(A)	(B)	(C)				
EVA	16,7	15,0	20,8	11,0	0,90	1,24	0,66
PBO	22,7	14,1	20,0	12,8	0,62	0,88	0,56
NLP	5,4	4,3	3,3	1,0	0,81	0,61	0,19
JFP	20,9	9,2	17,1	7,2	0,44	0,82	0,34
RHA	20,8	11,1	19,7	9,9	0,53	0,95	0,47
BGM	15,4	16,0	13,1	9,3	1,04	0,85	0,60
PFP	9,2	9,2	8,4	8,7	1,00	0,92	0,95
CMS	7,6	13,0	9,0	14,1	1,71	1,19	1,85
IAM	33,0	29,2	17,5	13,2	0,88	0,53	0,40
EMA	13,5	4,5	8,0	8,5	0,33	0,59	0,62
GVV	8,8	7,6	5,4	6,1	0,87	0,62	0,69
MPA	14,5	18,7	17,2	22,8	1,29	1,19	1,57
IRC	13,6	15,2	8,7	4,5	1,12	0,64	0,33
HCC	13,5	15,7	16,4	15,2	1,16	1,21	1,13
JAG	14,0	10,1	10,8	7,8	0,72	0,77	0,55
PG *	13,9	11,5	11,6	8,6	0,83	0,83	0,62
- 1 DE	8,7	6,9	6,8	4,2	0,54	0,63	0,34
+1 DE	22,1	19,1	19,9	17,4	1,27	1,11	1,12

* Promedio Geométrico y rango \pm 1 DE

En el primer estudio, el promedio geométrico de biodisponibilidad del Fe-hem solo fue de 13,9% y al ser administrado junto con 200, 400 y 800 mg de Ca, las biodisponibilidades se redujeron a 11,5%; 11,6% y 8,6% respectivamente (Figura 1). Sin embargo, al aplicar el ANOVA para muestras repetidas junto al test *pos hoc* de Dunnett sólo se detectó diferencia estadística entre los tratamientos Fe-hem solo y Fe-hem más 800 mg (F=5,72, p<0,003; Dunnett p<0,0001). Al calcular las razones de las biodisponibilidades de los tratamientos (A, B y C) respecto al control (c), los promedios geométricos fueron 0,83; 0,83 y 0,62.

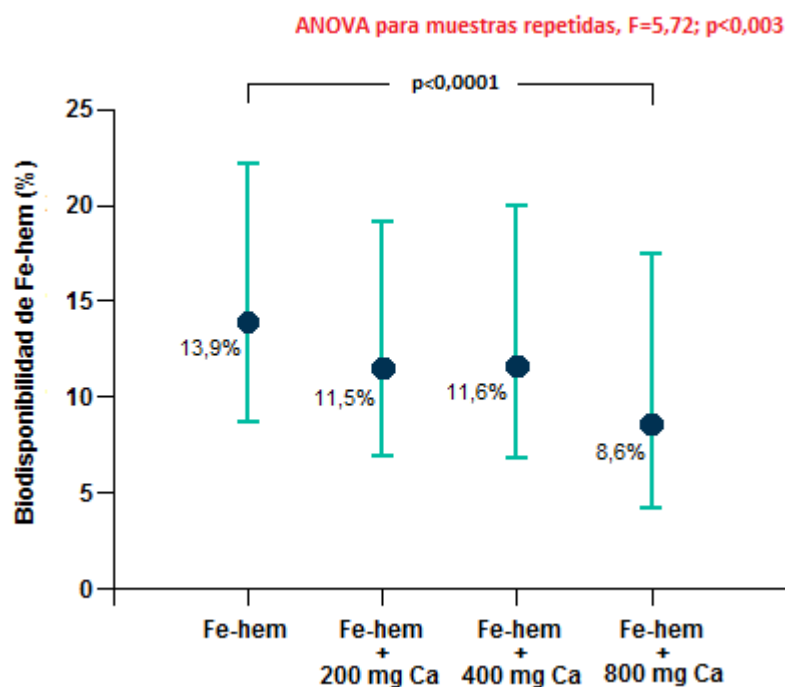


Figura 1: Biodisponibilidad de hierro hemínico estudio 1.

Con el resultado de este estudio, se rechaza la hipótesis y aborda el segundo objetivo específico de esta memoria, por lo que se diseña un segundo estudio con dosis crecientes de calcio entre 400 y 800 mg de Ca.

Tabla 5: Porcentajes de biodisponibilidad de hierro de cada sujeto en el estudio 2.

	Biodisponibilidad de Fe (%)				Razones de biodisponibilidad		
	Fe-hem	Fe-hem	Fe-hem	Fe-hem	A/c	B/c	C/c
	⁵⁹ Fe	+ 500 mg Ca ⁵⁵ Fe	+ 600 mg Ca ⁵⁹ Fe	+ 700 mg Ca ⁵⁵ Fe			
(c)	(A)	(B)	(C)				
SMA	6,8	5,1	6,1	5,6	0,75	0,89	0,82
MPP	10,4	13,7	13,5	13,2	1,32	1,30	1,27
NMC	7,2	4,6	5,1	3,4	0,64	0,71	0,48
MRG	15,4	9,3	5,0	8,7	0,60	0,33	0,56
MVR	10,8	7,5	10,2	11,8	0,69	0,94	1,10
CVR	6,8	4,6	8,9	10,4	0,68	1,31	1,53
YVM	5,5	4,8	3,7	5,9	0,87	0,66	1,07
BJP	32,9	25,4	14,8	20,9	0,77	0,45	0,63
CCC	10,3	7,1	18,8	10,1	0,69	1,82	0,98
JCS	28,6	24,4	19,8	20,4	0,85	0,69	0,71
MCC	10,2	13,7	17,2	15,3	1,34	1,68	1,50
PG *	11,1	9,0	9,6	10,1	0,81	0,87	0,91
- 1 DE	6,2	4,7	5,3	5,8	0,62	0,51	0,61
+1 DE	19,8	17,0	17,5	17,6	1,06	1,48	1,34

* Promedio Geométrico y rango \pm 1 DE.

En este estudio los promedios geométricos de biodisponibilidad fueron 11,1%; 9,0%; 9,6% y 10,1% para Fe-hem solo, Fe-hem más 500 mg de Ca, Fe-hem más 600 mg de Ca y Fe-hem más 700 mg de Ca respectivamente (Figura 2). No hubo diferencia estadística entre estos porcentajes al aplicar ANOVA para muestras repetidas ($F=1,09$, $p=0,36$; N.S.). Al calcular las razones de las biodisponibilidades de los tratamientos (A, B y C) respecto a la control (c), los promedios geométricos resultaron ser de 0,81; 0,87 y 0,91.

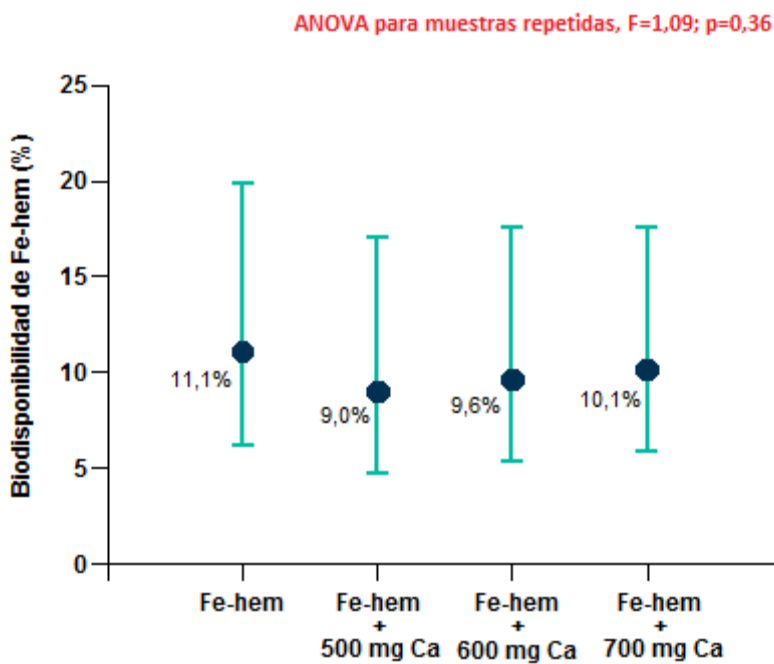


Figura 2: Biodisponibilidad de hierro hemínico estudio 2.

La figura 3 muestra el gráfico que integra ambos estudios. La ordenada indica la razón entre la biodisponibilidad de hierro hemínico más calcio y la biodisponibilidad de hierro hemínico solo. Se observa que en dosis de calcio hasta 700 mg la razón es mayor a 0,80 y sólo la dosis de 800 mg se aleja significativamente de la razón 1,00.

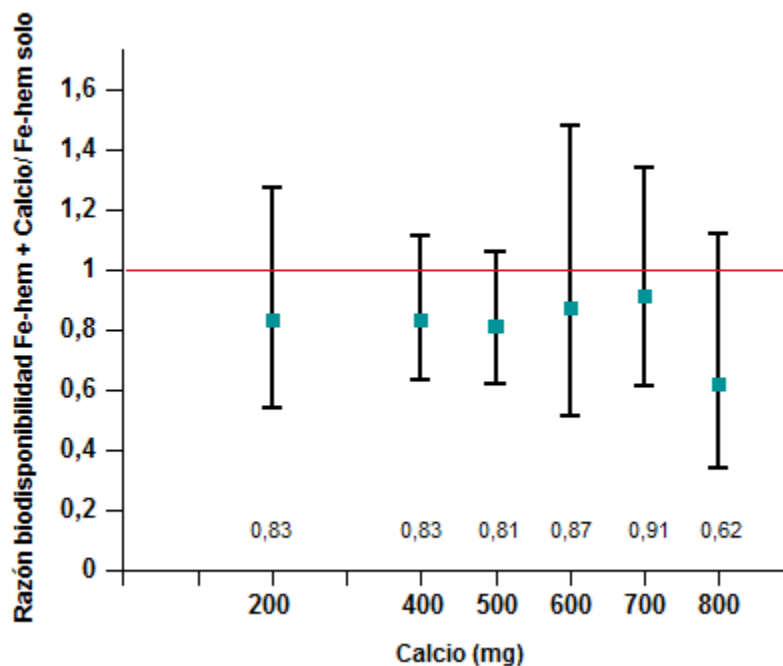


Figura 3: Razones entre biodisponibilidad del hierro hemínico más las distintas concentraciones de calcio y la biodisponibilidad del hierro hemínico solo de los dos estudios.

8.-DISCUSIÓN

El propósito de esta memoria de título, era establecer el efecto que tiene el calcio como cloruro de calcio sobre la absorción de hierro hemínico. Los resultados obtenidos evidenciaron que dosis iguales o menores a 700 mg de calcio, no tienen un efecto significativo sobre la absorción de hierro hemínico. A la vez, no se observaron diferencias entre las variables del estado nutricional de hierro y las absorciones del día control entre ambos estudios realizados, por lo que ambos grupos fueron comparables. Ello también permitió establecer una curva dosis respuesta para calcio y absorción de hierro hemínico.

Estos resultados no concuerdan con los obtenidos por Hallberg *et al.* (1991), donde mostró que al agregar 165 mg de calcio (como cloruro de calcio) a una comida experimental que contenía hierro hemínico disminuía su absorción en forma significativa. Ese estudio hasta la fecha, es el único que ha encontrado una diferencia significativa en la absorción tanto para hierro hemínico como no hemínico al adicionar calcio, y su impacto fue tal, que hasta hoy se toma como evidencia para afirmar que el calcio es un factor inhibidor del hierro.

Una diferencia fundamental entre este estudio y el realizado por Hallberg *et al.* (1991), está en que este último agrega el hierro hemínico y el calcio a una matriz alimentaria (pan con hamburguesa), por lo que no es posible observar el efecto aislado que tiene el calcio sobre el hierro. Esto es importante considerando que en esa comida habían otros factores intraluminales que pudieron estar inhibiendo directa o indirectamente la absorción del hierro hemínico. De hecho, el grupo debió repetir la primera fase de su estudio (donde busca el efecto que tiene el calcio sobre hierro no hemínico), puesto que atribuyó parte del efecto inhibitorio que tuvo el calcio, a la interacción entre el fitato presente en el pan junto al calcio. Estos formaron el compuesto fitato de calcio que impidió que las fitasas degradaran el fitato fuerte inhibidor de la absorción de hierro (Lynch, 2000). Los resultados obtenidos en el estudio de Hallberg *et al.* (1991) concluyeron que concentraciones de calcio entre 40 y 300 mg producen una inhibición significativa y dosis dependiente sobre la absorción de hierro no hemínico y que 165 mg de calcio disminuyen significativamente la absorción de hierro hemínico.

Al año siguiente, el mismo grupo de investigadores realizó un segundo estudio (Hallberg *et al.*, 1992a) realizado para esclarecer si los 165 mg de calcio añadidos a los panes, eran los responsables de la disminución en la absorción de hierro hemínico que formaba parte de las hamburguesas. El foco de este cuestionamiento, fue responder si el calcio tuvo un efecto directo

sobre el hierro o si el calcio bloqueaba el efecto favorecedor de la carne sobre su absorción. Con este estudio, se determinó que el efecto era independiente de la presencia de carne. No obstante, convergemos en el mismo punto señalado anteriormente, aún quedan muchos otros factores de esa matriz alimentaria que pudieron haber interactuado para inhibir al hierro.

Tomando en cuenta que la mayoría de los factores inhibidores del hierro ejercen su acción en el lumen del intestino, este grupo planteó un mecanismo distinto para el calcio. El hierro hemínico y no hemínico se absorben por receptores diferentes en la mucosa, por lo que ellos plantearon que la inhibición debe encontrarse en algún paso de transferencia común para ambos tipos de hierro dentro del enterocito (Hallberg, 1998).

Por otra parte, existen estudios de otro grupo de investigadores que han obtenido resultados contradictorios. Un primer estudio concluye que 127 mg de calcio no afectan la absorción de hierro hemínico y no hemínico (Rougead *et al.*, 2002). Sin embargo, en un posterior estudio se encuentran con resultados disímiles, pues observan que la suplementación con 450 mg (como citrato de calcio) no afecta la absorción de hierro no hemínico presente en un alimento, pero sí afecta la absorción de hierro hemínico (Rougead *et al.*, 2005).

Las investigaciones mencionadas son las únicas que han estudiado el efecto que tiene el calcio sobre la absorción de hierro hemínico. Todas han trabajado con matrices alimentarias sin aislar el posible efecto que pudiesen tener otros factores dietarios sobre el calcio o el hierro, y además utilizan dosis puntuales de calcio. Esta investigación es la única hasta el momento que ha trabajado con dosis crecientes de calcio logrando establecer una curva dosis respuesta del efecto del calcio sobre la absorción de Fe-hem y que ha trabajado con hierro hemínico y calcio en su estado puro.

Para Fe no-hem el panorama es diferente y la cantidad de estudios realizados es variada. La mayoría postulan al calcio como un factor inhibidor del hierro habiendo trabajado con diversas sales de calcio - carbonato de calcio e hidroxapatita (Dawson-Hughes *et al.*, 1986), carbonato de calcio (Minihane y Fairweather-Tait, 1998), citrato-malato de calcio (Deehr *et al.*, 1990) y cloruro de calcio (Hallberg *et al.*, 1991) – o con alimentos ricos en calcio como leche o queso (Deehr *et al.*, 1990; Gleerup *et al.*, 1993; Gleerup *et al.*, 1995). También hay otros que descartan su rol inhibidor (Ames *et al.*, 1999; Abrams *et al.*, 2001; Grindler-Pedersen *et al.*, 2004; Mendoza *et al.*, 2004). Sin embargo, todos los estudios mencionados han utilizado comidas experimentales para administrar ambos minerales.

Un estudio realizado por Cook *et al.* en 1991 evalúa el efecto del calcio en dos escenarios; con y sin alimento. Los resultados que ellos obtienen son interesantes ya que el calcio como carbonato

de calcio disminuye significativamente la absorción de Fe no-hem cuando son administrados junto a un alimento, pero esto no sucede cuando son administrados sin alimento. Este estudio, si bien fue realizado para absorción de hierro no hemínico, es el único que ha utilizado una metodología similar a la de esta memoria de título. El mismo grupo quince años antes había descrito que la absorción de Fe no-hem se ve disminuida al agregar calcio y fosfato en forma combinada, pero no cuando son administrados en forma separada, por lo que sugirieron que un complejo calcio-fosfato-hierro sería el real responsable de la inhibición en la absorción (Monsen y Cook, 1976).

Por otra parte, un estudio paralelo realizado en el Laboratorio de Micronutrientes del INTA, demostró que el calcio como cloruro de calcio en dosis de hasta 800 mg no inhibe la absorción del hierro no hemínico. Al igual que esta memoria de título, se trabajó con hierro y calcio en su estado puro. (Miranda, 2010).




Las observaciones hechas, permiten cuestionar que el calcio sea un inhibidor del hierro y específicamente del hierro hemínico. Es muy probable que esto dependa de la sal de calcio utilizada y de las comidas experimentales elegidas. Sería interesante evaluar el efecto de otras sales de calcio junto a hierro en su estado puro, para descartar si hay interacciones entre esas sales y hierro. Sumado a ello, sería útil evaluar la interacción de ambos nutrientes en diversas matrices alimentarias, para abrirse a la posibilidad de diseñar alimentos fortificados con hierro y calcio, que permitan reducir el riesgo de deficiencias en la población vulnerable.

9.-CONCLUSIONES

- Se rechaza la hipótesis, por lo que el calcio si inhibe la absorción de hierro hemínico en dosis de 800 mg.
- El calcio como cloruro de calcio en dosis iguales o menores a los 700 mg, no inhibe la absorción del hierro hemínico.

10.-ANEXOS

ANEXO 1: Acta de aprobación del Comité ético del INTA

 <p>www.inta.cl CASILLA 138 - 11 SANTIAGO - CHILE FAX: (56)2 - 221 - 4030 TELEFONOS: 978 1400 - 978 1405 978 1467 - 978 1416 978 1401 - 978 1497</p>	<p>UNIVERSIDAD DE CHILE INSTITUTO DE NUTRICION Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS</p>	  <p>UNIVERSIDAD DE LAS NACIONES UNIDAS UNIDAD DE INVESTIGACION Y DOCENCIA</p>
---	--	---

Comité de Ética

Acta de aprobación N° 13
Del 18 de junio de 2008.

Asisten: Patricio Peirano (Médico, Prof. Titular), Marcela Castillo (Psicóloga, Prof. Asistente), Erna Raimann (Médico, Prof. Asociado), Eva Hertrampf (Médico, Prof. Asociado), Jorge Martínez (Bioquímico, Profesor Asociado), Ana María Pino Z. (Bioquímico, Profesor Asociado).

Preside: Dr. Ana María Pino Z.

Proyecto: "Rol del calcio sobre la biodisponibilidad del hierro hemínico y hierro no-hemínico de la dieta".

Investigador responsable: Prof. Fernando Pizarro A.

Institución: Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos.


Documentos revisados: Proyecto, consentimiento informado, currícula de los investigadores.


Se analiza el proyecto a la luz de los postulados de la Declaración de Helsinki, del Código de Núremberg y del Reglamento de Ética del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA) de la Universidad de Chile.

Sobre la base de toda la información revisada (copia en archivo), y los antecedentes aportados personalmente por los investigadores, el Comité de Ética estima que las dosis de isótopos de hierro utilizadas en el estudio no significan para los sujetos involucrados un riesgo, tampoco hay riesgos psíquico, social, legal o de otra naturaleza, propios de este tipo de investigación. Los investigadores toman las precauciones apropiadas para no incluir sujetos vulnerables. Adicionalmente, para el sujeto involucrado, representa un beneficio conocer su nutrición de hierro.

Cualquiera modificación del protocolo debe ser autorizada por este Comité. En caso de observar reacciones adversas, se deberá informar al comité de ética dentro de las 48 h. siguientes. Una vez finalizado el estudio, el comité deberá ser informado de los resultados de éste.

En virtud de tales consideraciones el Comité otorga la autorización correspondiente para la realización del estudio dentro de las especificaciones señaladas en el protocolo, que incluye el Proyecto de Investigación y el Consentimiento Informado.


PROFESORA ANA MARÍA PINO Z.
Presidente



ANEXO 2: Consentimiento de participación en el Proyecto “Rol del calcio sobre la biodisponibilidad del hierro hemínico y hierro no-hemínico de la dieta”

1. INFORMACION SOBRE EL ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

1.1. ¿Cuál es el propósito del estudio?

El calcio es un mineral usado en la formación de huesos y dientes, especialmente en la niñez. El calcio principalmente se encuentra en leche y derivados. Por muchos años se ha creído que el calcio disminuye la absorción intestinal de hierro y se ha recomendado que no se debiera enriquecer los alimentos con hierro y calcio. En este estudio trataremos de aclarar este punto. Por lo tanto, lo invitamos a participar en este estudio.

1.2. ¿Quién puede participar en este estudio?

Pueden incorporarse al estudio mujeres sanas de entre 35 a 45 años. Que no estén participando en otros protocolos de investigación clínica. Que no hayan recibido ningún suplemento mineral en los últimos 6 meses; no estén embarazadas, ni programen embarazarse. Por tanto, estar con un método anticonceptivo (DIU, anticonceptivos orales o ligadura de trompas). También podrán participar hombres de entre 21 y 45 años, sanos.

1.3. ¿Tengo necesariamente que participar en este estudio? ¿Si acepto participar, puedo cambiar de opinión o retirarme? ¿Si decido no participar en este estudio, que me puede suceder, o que otras opciones tengo si necesito tratamiento?

Usted no tiene ninguna obligación de participar en el estudio. Si acepta participar puede retirarse en cualquier momento del estudio sin ningún perjuicio para usted. No participar en el estudio no tiene consecuencias para usted. Si decide retirarse y se le ha tomado una muestra de sangre, se le informará el nivel de hemoglobina que define anemia, el resto de la muestra será destruida.

1.4. ¿Si decido participar en el estudio, en qué consisten precisamente las evaluaciones, y que tipo de tratamientos o procedimientos me van a practicar?

Usted será citado al INTA para participar en una charla donde se le explicará en detalle de que se trata el estudio. Si usted decide participar, deberá concurrir en ayunas al INTA durante 5 mañanas (días 1, 2, 14, 15 y 28 del estudio). Los días 1, 2, 14 y 15 usted recibirá líquidos o cápsulas que contienen 5 mg de hierro con o sin calcio, el hierro será marcado con una pequeña cantidad de una marca radioactiva. Después de recibido el hierro usted deberá permanecer 3 horas sin recibir ningún alimento. En dos oportunidades se le extraerá una muestra de sangre de una vena del

brazo: una de 30 ml (2 cucharadas soperas), el día 14 para medir la absorción de hierro y para saber su nutrición de hierro y el día 28 una muestra de 20 ml (2 cucharadas de postre) para medir la absorción de hierro. Usted será recogido desde un lugar cercano a su hogar por un vehículo provisto por el proyecto y serán devueltos en máximo dos horas después al mismo lugar.

1.5. ¿Qué peligros podría experimentar en este estudio, y que harán los investigadores para reducir el riesgo de que éstos se presenten?

Usted no corre ningún peligro. La dosis de radioactividad que recibirá es menor a la recibida cuando se le toma una radiografía de tórax. Por razones de seguridad, sólo serán seleccionadas mujeres si están utilizando algún método anticonceptivo y se les realizará un test de embarazo, el día 1 y 14 del estudio, a fin de no incluir personas embarazadas. En el sitio de punción de la vena pudiera aparecer en algún caso un moretón lo que se tratará de evitar haciendo que quien le tome la muestra sea un Tecnólogo Médico de mucha experiencia en tomar muestras de sangre.

1.6. ¿Qué harán los investigadores para asegurar que la información que recolectarán sobre mí, no caerá en manos equivocadas?

Usted será identificado con un código, siendo su identidad sólo conocida por el investigador responsable del proyecto. En la comunicación de los resultados no figurará su identidad. No se conservarán células. Sólo se conservará su muestra de suero para el propósito del estudio, cuando éste termine el resto de la muestra será destruida.

1.7. ¿Qué beneficios personales puedo yo esperar al participar en este estudio?

Usted sabrá si tiene anemia u otra forma más leve de carencia de hierro. En el caso de presentar anemia o carencia de hierro, se le derivará a su centro de salud o médico personal para su tratamiento.

1.8. ¿Recibiré algún pago por participar en este estudio?

Usted recibirá un aporte de \$70.000 (setenta mil pesos) al final del estudio como compensación por el tiempo ocupado.

1.9. ¿Se cobrará a mí, a mi Isapre o compañía de seguros de salud el costo de algunos de estos estudios?

Este estudio no tiene ningún costo para usted o su sistema de salud.

1.10. ¿Una vez que yo haya ingresado como sujeto de estudio, a quien tendría que dirigirme para averiguar más acerca del estudio o para hacer llegar algún reclamo respecto al trato que hubiese recibido?

Usted se podrá dirigir a profesor Fernando Pizarro (fono 9781522) en INTA, El Líbano 5542, Macul

Cualquier reclamo sobre el trato recibido lo puede hacer a la Presidenta del Comité de Ética del INTA, Profesora Ana María Pino, fono 9781418.

2. DOCUMENTACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

2.1. ¿Después que firme el documento, quien lo guardará?

El investigador responsable del proyecto.

Declaro haber leído la información descrita y mis preguntas acerca del estudio han sido respondidas satisfactoriamente. Al firmar esta copia, indico que tengo un entendimiento claro del proyecto y deseo participar en él.

Nombre del participante : _____ Firma: _____

Fecha: _____

2.2. Consentimiento del investigador

Al sujeto de investigación he entregado información sobre el estudio, y en mi opinión esta información es precisa y suficiente para que el sujeto entienda completamente la naturaleza, los riesgos y beneficios del estudio, y los derechos que tiene en tanto sujeto de investigación. No ha existido coerción ni ha actuado bajo influencia alguna. He sido testigo que el sujeto firmó el documento.

Nombre del investigador : _____ Firma: _____

Fecha: _____

ANEXO 3: Técnica de doble marcaje isotópico de Eakins y Brown

A) Digestión

1. Estándares: los estándares con que trabajamos en los estudios consistieron en cuadruplicados de la cantidad de CGR usado en cada uno de ellos.
2. Blancos y muestras: ambos ítems se trabajaron en duplicados. Las muestras blanco correspondieron a 5 mL de sangre de banco de sangre del Instituto de Salud Pública (ISP). Las muestras como tal, correspondieron a 8 mL de sangre de cada sujeto participante del estudio.

Cada estándar, blanco y muestra, se puso en un tubo de digestión (matraces Kjendhal) y se colocaron 6 a 8 perlas de vidrio de 5 mm de diámetro y se le agregó primero 4 mL de ácido sulfúrico al 95-97% p.a. (Merck, Germany) y luego 5 mL de ácido nítrico al 65% p.a. (Merck, Germany) y se dejó reposar al menos una noche, idealmente todo el fin de semana.

Ya transcurrido este tiempo, se colocaron los tubos de digestión en un digestor marca Quimis distintos tiempos a distintas temperaturas:

65°C por 5 minutos

85°C por 5 minutos

95°C por 5 minutos

100°C por 5 minutos

150°C por 10 minutos

290°C por 15 minutos y se apagó (muestra color petróleo).

Se dejó enfriar y a continuación se agregó 5 mL de ácido nítrico y se repitió protocolo de la primera digestión.

Luego, se agregó 1 mL de ácido perclórico al 70-72% p.a. (Merck, Germany) a cada tubo y se siguió con la digestión a:

220°C por 10 minutos

250°C por 5 minutos

290°C hasta que la muestra quede color amarillo pálido (aproximadamente 60 minutos).

Luego, los matraces se sacaron del digestor y cuando ya estaban fríos, se les agregó 10 mL de ácido clorhídrico 1N.

B) Precipitación 1

En tubos de fondo redondo de 100 mL siliconados, se agregó cantidad necesaria de carrier según la siguiente fórmula:

$$\text{mg de Fe de la muestra} = \frac{\text{Hb} * 3.39 * \text{volumen de sangre}}{100}$$

$$\text{mL de carrier} = \frac{5 - \text{mg de Fe de la muestra}}{5 \text{ mg de Fe/mL}}$$

Se trasvasijó la muestra completa desde el tubo de digestión al tubo de 100 mL incluyendo las perlas de vidrio. Se lavó cinco veces el matraz con 4 mL de agua desionizada enjuagando las paredes del cuello del matraz y vortexeando en cada lavado.

Se adicionó hidróxido de amonio 10 M enérgicamente con pizeta la cantidad necesaria para formar un precipitado de color café e insoluble en agua. Se dejó decantar el precipitado y luego se centrifugó a 1.800 rpm durante 30 minutos a 22°C. Terminado el proceso, se descartó el sobrenadante sin perder el precipitado, y se agregó 1 mL de ácido clorhídrico fumarante 37% p.a. (Merck, Germany).

C) Precipitación 2

Se trasvasijó el contenido completo del tubo de 100 mL a tubos de 15 mL y se realizaron 4 lavados en vortex con 2,5 mL de agua desionizada.

Se adicionó hidróxido de amonio 10 M en cantidad necesaria para formar un precipitado de color café. Esta precipitación en particular, se hace en vortex cuidando que la formación de precipitado llegue hasta el fondo del tubo. Se dejó decantar el precipitado y luego se centrifugó a 2.500 rpm durante 20 minutos a 22°C. Después, se eliminó el sobrenadante y se agregaron 10 mL de agua desionizada, se agitó en vortex hasta que se levantó el precipitado y se lavaron las paredes con 5 mL más de agua desionizada. Se repitió la centrifugación a 2.500 rpm durante 20 minutos a 22°C. Luego, se eliminó el sobrenadante y se agregó 0,5 mL de ácido ortofosfórico al 85% p.a. (Merck, Germany) (la muestra queda transparente) y después se precipitó en vortex con 10 mL de cloruro de amonio en etanol 0,05 M, más 5 mL de la misma solución sin vortexear. Se repitió la centrifugación a 2500 rpm durante 20 minutos a 22°C. Después, se eliminó el sobrenadante y se agregaron 4 mL de etanol absoluto (Merck, Germany), se agitó en vortex hasta que se levantó el precipitado y se lavaron las paredes con 8 mL más de etanol absoluto (Merck, Germany). Se repitió la centrifugación a 2.500 rpm durante 20 minutos a 22°C y se eliminó el sobrenadante.

D) Conteo

A cada tubo, se agregó 4 mL de Ultrafluor (Complete liquid scintillation counting solution for aqueous radioactive samples; Nacional Diagnostics, USA) y se agitó en vórtex. Luego, el contenido de los tubos fue trasvasiado a viales de conteo que fueron previamente llenados a tres cuartos de su capacidad con CAB-O-SIL (Thixotropic gelling powder, scintillation grade; Nacional Diagnostics, USA). Los tubos, fueron lavados posteriormente dos veces con 4 mL de Ultrafluor y agitados en vórtex para luego ser trasvasiados al vial. Finalmente, cada vial fue agitado en vórtex aproximadamente 30 segundos hasta homogenizar el gel y se guardó en cajas en un lugar oscuro durante 48 a 36 horas. Cumplido este tiempo, las muestras estuvieron aptas para su lectura en el contador de centelleo líquido.

ANEXO 4: Obtención de hierro hemínico

A) Marcación del hierro hemínico

Para obtener hierro hemínico marcado intrínsecamente se utilizaron conejos adultos New Zeland White de aproximadamente 3 kilos.

Hem marcado con ^{55}Fe : A dos conejos se les inyectó en la vena central de la oreja 0.2 ml con 0.75 mCi ^{55}Fe citrato.

Hem marcado con ^{59}Fe : A dos conejos se les inyectó en la vena central de la oreja 0.35 ml con 1 mCi ^{59}Fe citrato.

Los conejos fueron exanguinados a las dos semanas luego de que el 80% del isótopo fue incorporado a los glóbulos rojos.

Estos procedimientos estaban aprobados por el Comité de Bioética para la experimentación en Animales del INTA. Un Médico Veterinario realizó las intervenciones. Los animales se mantuvieron en jaulas separadas, donde fueron alimentados y cuidados por un técnico en bioterios. Las dosis de radioisótopos indicadas no provocaron ninguna sintomatología a los animales y al momento de su exanguinación estaban previamente anestesiados. La muerte se produjo por anemia aguda y sin dolor para el animal. Los cuerpos de los conejos fueron cubiertos con cal y guardados en el depósito de desechos radiactivos que dispone el INTA de acuerdo a las normas relativas al manejo de material radiactivo, para su posterior eliminación por la Comisión Chilena de Energía Nuclear.

La sangre de los conejos fue recibida en recipientes con anticoagulante Wintrobe. A partir de esta sangre se obtuvo un concentrado de glóbulos rojos (CGR), centrifugando la sangre a 2500 rpm, descartando el suero y el anticoagulante al lavar con suero fisiológico y volver a centrifugar en las mismas condiciones. Luego, el CGR se congeló en balones de vidrio y se deshidrató en un liofilizador de bandeja (Eyela freezer dryer FD-1, Tokyo Rikakikai, Co Ltda, Tokio, Japón).

B) Hierro hemínico sin marcar

Para completar las dosis de 5 mg de hierro hemínico a utilizar en el estudio, se exanguinó un cordero sano con el fin de obtener CGR sin marca isotópica.

11.-BIBLIOGRAFÍA

ABRAMS, S.A.; GRIFFIN, I.J.; DAVILA, P.; LIANG, L. 2001. Calcium fortification of breakfast cereal enhances calcium absorption in children without affecting iron absorption. *J. Pediatr.* 139: 522- 526

AISEN, P.; LISTOWSKY, I. 1980. Iron transport and storage proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 49: 357-393.

AMES, S.K.; GORHAM, B.M.; ABRAMS, S.A. 1999. Effects of high compared with low calcium intake on calcium absorption and incorporation of iron by red blood cells in small children. *Am. J. Clin. Nutr.* 70: 44- 48.

BEARD, J.I.; PIÑERO, D.J. 1997. Metabolismo del hierro. In: O'Donnell, M.; Viteri, F.; Carmuega, E. (Eds.) Deficiencia de hierro: Desnutrición oculta en América Latina. CESNI. Buenos Aires. Argentina. pp.13-47.

BELKACEMI, L.; SIMONEAU, L.; LAFOND, J. 2002. Calcium-binding proteins: distribution and implication in mammalian placenta. *Endocrine.* 19:57- 64.

BINDELS, R.J.; HARTOG, A.; ABRAHAMSE, S.L.; VAN OS, C.H. 1994. Effects of pH on apical calcium entry and active calcium transport in rabbit cortical collecting system. *Am. J. Physiol. Renal Fluid Electrolyte Physiol.* 266: 620- 627.

BOCCIO, J.; SALGUEIRO, J.; LYSIONEK, A.; ZUBILLAGA, M.; GOLDMAN, C.; WEILL, R.; CARO, R. 2003. Metabolismo del hierro: Conceptos actuales sobre un micronutriente esencial. *ALAN.* 53:119- 132

BOTHWELL, T.H.; FINCH, C.A. 1962. Iron metabolism. Little, Brown and company. Londres. Reino Unido. 440 p.

BRONNER, F. 1998. Calcium absorption — A paradigm for mineral absorption *J. Nutr.* 128: 917.

BRONNER, F. 2003. Mechanisms of intestinal calcium absorption. *J. Cell. Biochem.* 88: 387- 393.

CONRAD, M.; CORTELL, S.; WILLIAMS, H.; FOY A. 1966. Polymerization and intraluminal factors in the absorption of hemoglobin-iron. *J. Lab. Clin. Med.* 68:659-668.

CONRAD, M.E.; UMBREIT, J.N.; MOORE, E.G. 1999. Iron absorption and transport. *Am. J. Med. Sci.* 318: 213-229.

CONRAD, M.; UMBREIT J. 2002. Pathways of iron absorption. *Blood. Cells. Mol. Dis.* 29: 336-355.

COOK, J.D.; LIPSCHILD, D.A. 1977. Clinical measurement of iron absorption. *Clin. Hematol.* 6: 567- 581.

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., SKIKNE, B.S., BAYNES, R.D. 1994. Iron deficiency: the global perspective. *Adv. Exp. Med. Biol.* 356: 219-228.

DALLMAN, P.; SIIMES, M.; STEKEL, A. 1980. Iron deficiency in infancy and childhood. *Am. J. Clin. Nutr.* 33:86-118.

DAWSON-HUGHES, B.; SELIGSON, F.H.; HUGHES, V.A. 1986. Effects of calcium carbonate and hydroxyapatite on zinc and iron retention in postmenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.* 44: 83- 88.

DE BENOIST, B. 2001. Iron-deficiency anemia: Reexamining the nature and magnitude of the public health problem. *J. Nutr.* 131: 564S.

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.

DONOVAN, A.; BROWNLIE, A.; ZHOU, Y.; SHEPARD, J.; PRATT, S.; MOYNIHAN, J.; PAW, B.H.; DREJER, A.; BARUT, B.; ZAPATA, A.; LAW, T.; BRUGNARA, C.; LUX, S.; PINKUS, G.; PINKUS, J.; KINGSLEY, P.; PALIS, J.; FLEMING, M.; ANDREWS, N.; ZON, L. 2000. Positional cloning of zebrafish ferroportin 1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature.* 403: 776-781.

EAKINS, J.; BROWN, D. 1966. An improved method for the simultaneous determination of iron-55 and iron-59 in blood by liquid scintillation counting. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* 17: 391-397.

FILLET, G.; BEGUIN, Y.; BALDELLI, L. 1989. Model of reticuloendothelial iron metabolism in humans: Abnormal behavior in idiopathic hemochromatosis and in inflammation. *Blood.* 74: 844-851.

FISCHER, D.S.; PRICE, D.C. 1964. A simple serum iron method using the new sensitive chromogen tripyridil-s-triazine. *Clin. Chem.* 10: 21-31.

FRIEDMAN, P.A.; GESEK, F.A. 1995. Cellular calcium transport in renal epithelia: measurement, mechanisms, and regulation. *Physiol. Rev.* 75: 429- 471.

GAITÁN, D.; OLIVARES, M.; ARREDONDO, M.; PIZARRO, F. 2006. Biodisponibilidad de hierro en humanos. *Rev. Chil. Nutr.* 33:142-148.

GLEERUP, A.; ROSSANDER-HULTÉN, L.; HALLBERG, L. 1993. Duration of the inhibitory effect of calcium on non-haem iron absorption in man. *Eur. J. Clin. Nutr.* 47: 875- 879.

GLEERUP, A.; ROSSANDER-HULTÉN, L.; GRAMATKOVSKI, E.; HALLBERG, L. 1995. Iron absorption from the whole diet: comparison of the effect of two different distributions of daily calcium intake. *Am. J. Clin. Nutr.* 61: 97- 104.

GRINDER-PEDERSEN, L.; BUKHAVE, K.; JENSEN, M.; HØJGAARD, L.; HANSEN, M. 2004. Calcium from milk or calcium-fortified foods does not inhibit nonheme-iron absorption from a whole diet consumed over a 4-d period. *Am. J. Clin. Nutr.* 80: 404- 409.

HALLBERG, L.; BRUNE, M.; ERLANDSSON, M.; SANDBERG, A.S.; ROSSANDER-HULTÉN, L. 1991. Calcium: effect of different amounts on nonheme- and heme-iron absorption in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 52:112-119.

HALLBERG, L.; ROSSANDER-HULTEN, L.; BRUNE, M.; GLEERUP, A. 1992a. Inhibition of haem-iron absorption in man by calcium. *Br. J. Nutr.* 69: 533-540

HALLBERG, L.; ROSSANDER-HULTEN, L.; BRUNE, M.; GLEERUP, A. 1992b. Calcium and iron absorption: mechanism of action and nutritional importance. *Eur. J. Clin. Nutr.* 46: 317–27.

HALLBERG, L.; HULTEN, 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. 1998. Does calcium interfere with iron absorption?. *Am. J. Clin. Nutr.* 68: 3-4.

HEINRICH, C.; GABBE, E.; KUGLER, G. 1971. Comparative absorption of ferri-haemoglobin- 59 Fe-Ferro-haemoglobin- 59 Fe and 59 Fe 3+ - 59 Fe 2+ in humans with normal and depleted iron stores. *Eur. J. Clin. Invest.* 1:321-327.

HOENDEROP, J.G.; NILIUS, B.; BINDELS, R.J. 2002. Molecular mechanism of active Ca reabsorption in the distal nephron. *Annu. Rev. Physiol.* 64: 529- 549.

HOENDEROP, J.G.J.; NILIUS, B.; BINDELS, R.J.M. 2005. Calcium absorption across epithelia. *Physiol. Rev.* 85: 373- 422.

LARSSON, D.; NEMERE, I. 2002. Vectorial transcellular calcium transport in intestine: Integration of current models. *J. Biomed. Biotechnol.* 2: 117-119.

LATUNDE-DADA, G.O.; VAN DER WESTHUIZEN, J.; VULPE, C.D.; ANDERSON, G.J.; SIMPSON, R.J.; MCKIE, A.T. 2002. Molecular and functional roles of duodenal cytochrome B (Dcytb) in iron metabolism. *Blood. Cells. Mol. Dis.* 29: 356-60

LEVY, M.N.; KOEPPEN, B.M.; STANTON, B.A. 2006. Digestión y absorción. In: Fisiología. 4ª ed. Elsevier Mosby. España. pp. 473- 493.

LAYRISSE, M.; MARTINEZ-TORRES, C. 1972. Model for measuring dietary absorption of heme iron: test with a complete meal. *Am. J. Clin. Nutr.* 25: 401-441.

LYNCH, S.R. 1997. Absorción de hierro: interacción con otros nutrientes. In: O'Donnell, M.; Viteri, F.; Carmuega, E. (Eds.) Deficiencia de hierro: desnutrición oculta en América Latina. CESNI. Buenos Aires. Argentina. pp.49-65.

LYNCH, S.R. 2000. The effect of calcium on iron absorption. *Nutr. Res. Rev.* 13: 141- 158.

MCKIE, A.; BARROW, D.; LATUNDE-DADA, G.; ROLFS, A.; SAGER, G.; MUDALY, E.; MUDALY, M.; RICHARDSON, C.; BARLOW, D.; BOMFORD, A.; PETERS, T.; RAJA, K.; SHIRALI, S.; HEDIGER, M.; FARZANEH, F.; SIMPSON, R. 2001 An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science* 291: 1755-1759.

MENDOZA, C.; PEERSON, J.M.; BROWN, K.H.; LÖNNERDAL, B. 2004. Effect of a micronutrient fortificant mixture and 2 amounts of calcium on iron and zinc absorption from a processed food supplement. *Am. J. Clin. Nutr.* 79: 244- 250.

MINIHANE, A.M.; FAIRWEATHER-TAIT, S.J. 1998. Effect of calcium supplementation on daily nonheme-iron absorption and long-term iron status. *Am. J. Clin. Nutr.* 68: 96- 102.

MIRANDA, C. 2010. Efecto del calcio sobre la biodisponibilidad de hierro no hemínico en humanos. Tesis Magister en Nutrición y Alimentos. Santiago, Chile. U. Chile, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos. 72p.

MIRET, S.; SIMPSON, R.; MCKIE, A. 2003. Physiology and molecular biology of dietary iron absorption. *Annu. Rev. Nutr.* 23: 283-301.

MONSEN, E.R.; 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.

MUÑOZ, A.; MOLINA, A. 2005. Hierro. In: Gil, A. Tratado de nutrición. Acción Médica. Granada, España. pp. 931-971.

NADLER, S.B.; HIDALGO J.U.; BLOCK, T. 1962. Prediction of blood volume in normal human adults. *Surgery.* 51: 224-232.

NEMETH, E.; TUTTLE, M.S.; POWELSON, J.; VAUGHN, M.B.; DONOVAN, A.; WARD, D.M.; GANZ, T.; KAPLAN, J. 2004. Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science.* 306: 2090-2093.

NIH. NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. 1994. Optimal calcium intake. *JAMA.* 272: 1942-1948.

OLIVARES, M.; WALTER, T.; HERTRAMPF, E.; PIZARRO, F. 1999. Anaemia and iron deficiency disease in children. *Br. Med. Bull.* 55: 534-548.

OLIVARES, M.; WALTER, T. 2003. Consecuencias de la deficiencia de hierro. *Rev. Chil. Nutr.* 30:226-233.

OLIVARES, M. 2001. Anemia Ferropriva: Diagnóstico y Prevalencia. Laboratorio Andrómaco, Santiago, Chile. Chile. 28p.

PALOMO, I.; OLIVARES, M.; ARREDONDO, M.; PIZARRO, F. 2005. Alteraciones del metabolismo del hierro y de la síntesis del grupo hem. In: Hematología: Fisiopatología y diagnóstico. Universidad de Talca. Talca, Chile. 134 p.

PÉREZ, F.; GARAULET, M.; GIL, A.; ZAMORA, S. 2005. Calcio, fósforo, magnesio y flúor. Metabolismo óseo y su regulación. In: Gil, A. Tratado de Nutrición. Acción Médica. Granada, España. pp. 901-925.

PIZARRO, F.; OLIVARES, M.; HERTRAMPF, E.; MAZARIEGOS, D.; ARREDONDO, M. 2003. Heme-iron absorption pathway is saturable by heme-iron dose in humans. J. Nutr. 133: 2214-2217.

PIZARRO, F.; OLIVARES, M.; KAIN, J. 2005. Hierro y zinc en la dieta de la población de Santiago. Rev. Chil. Nutr. 32: 19-27.

ROUGHEAD, Z.K.; HUNT, J.R. 2000. Adaptation in iron absorption: iron supplementation reduces nonheme-iron but not heme-iron absorption from food. Am. J. Clin. Nutr. 72:982-989.

ROUGHEAD, Z.K.; ZITO, C.A.; HUNT, J.R. 2002. Initial uptake and absorption of nonheme iron and absorption of heme iron in humans are unaffected by the addition of calcium as cheese to a meal with high iron bioavailability. Am. J. Clin. Nutr. 76: 419-425.

ROUGHEAD, Z.K.; ZITO, C.A.; HUNT, J.R. 2005. Inhibitory effects of dietary calcium on the initial uptake and subsequent retention of heme and nonheme iron in humans: comparisons using an intestinal lavage method. Am. J. Clin. Nutr. 82: 589-597.

SCHOLL, T.O.; HEDIGER, M.L.; FISCHER R.L.; SHEARER, J.W. 1992. Anemia vs iron deficiency: increased risk of preterm delivery in a prospective study. Am. J. Clin. Nutr. 55: 985-988.

SHENNAN, D.B.; PEAKER, M. 2000. Transport of milk constituents by the mammary gland. Physiol. Rev. 80: 925- 951.

SIIMES, M.A.; REFINO, C.; DALLMAN, P.R. 1980. Manifestation of iron deficiency at various levels of dietary iron intake. Am. J. Clin. Nutr. 33: 570-574.

SKIKNE, B.S.; FLOWERS, C.H.; COOK, J.D. 1990. Serum transferrin receptor: a quantitative measure of tissue iron deficiency. *Blood*. 75: 1870-1876.

TURNBULL, A.; CLETON, F.; FINCH, C.A. 1962. Iron absorption. IV. The absorption of hemoglobin iron. *J. Clin. Invest.* 41: 1897-1907

UZEL, C.; CONRAD, M.E. 1998. Absorption of heme iron. *Semin. Hematol.* 35: 27-34.

WEST, A.R.; OATES, P.S. 2008. Mechanisms of heme iron absorption: Current questions and controversies. *World. J. Gastroenterol.* 14: 4101-4110.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2008. Worldwide prevalence of anaemia 1993–2005 : WHO global database on anaemia. WHO. Ginebra. Suiza. 40 p.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2009. Micronutrient deficiencies. [en línea]. <<http://www.who.int/nutrition/topics/ida/en/index.html>>. [consulta: 02-09-200