



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

CONTRIBUCION DE LA FERRITINA DE ORIGEN ANIMAL A LA NUTRICION HUMANA

MARIA CONSTANZA MIRANDA VEGA

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

PROFESOR GUIA: FERNANDO PIZARRO AGUIRRE

SANTIAGO, CHILE
2007



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

CONTRIBUCION DE LA FERRITINA DE ORIGEN ANIMAL A LA NUTRICION HUMANA

MARIA CONSTANZA MIRANDA VEGA

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

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUIA : FERNANDO PIZARRO AGUIRRE
PROFESOR CONSEJERO : JUAN IGNACIO EGAÑA MORENO
PROFESOR CONSEJERO : ANA MARIA RAMIREZ KAMANN

SANTIAGO, CHILE
2007

Dedicatoria

A Pablo...

Agradecimientos

A mi Papá y a César, porque sé que estuvieron conmigo a lo largo de este camino.

A ti mamá, por apoyarme siempre en cualquier proyecto que emprenda, por darme la posibilidad de convertirme en una profesional y de demostrarte que soy capaz de cumplir hasta las metas más inalcanzables. Te doy las gracias por hacerme sentir que siempre estas a mi lado, que aunque estemos pasando por un mal momento siempre se puede salir adelante. Pero por sobre todas las cosas, te doy gracias por haberme forjado como persona, porque todas las cualidades y virtudes que ves en mí, las tengo gracias a ti, no hay nada en mi ser que no haya sido adquirido de ti, entonces cuando veas algo en mí que te enorgullezca, siéntete mil veces más orgullosa de ti, porque yo soy un simple reflejo tuyo. Me siento orgullosa de que seas mi madre.

Al Tey, por ser el mejor hermano que uno podría desear. Cuantas veces me explicabas una y otra vez materias en las que tenía dudas. Por enseñarme con tus acciones cosas que no te enseñan en clases. Por el solo hecho de acompañarme en momentos en que lo necesitaba. Como olvidar esos momentos de risas asfixiantes o de ocio infinito cuando trabajamos juntos. Pero más importante que eso, te agradezco por ser mi amigo incondicional, porque pase lo que pase yo sé que siempre contaré contigo.

A mi amiga Paola, porque ni siquiera los miles de kilómetros de distancia que nos separan pudieron dejarte ausente de este proceso, ayudándome cada vez que lo necesite.

A todo el Laboratorio de Micronutrientes del INTA: Angélica, Negro, Carola Valenzuela, Carolina Carriel, Miguel, Pauli, Diego, Sole y Lili, porque además de enseñarme muchísimas cosas profesionalmente, hacen que el trabajo de laboratorio, muchas veces tedioso, sea un agrado. Gracias por tantos momentos lindos y por alivianarme la tarea.

En especial quiero agradecer a mi Profe, Fernando Pizarro, no solo por ayudarme cada vez que lo necesité en la parte académica, sino que por confiar en mí al recibirme con los brazos abiertos, al darme la oportunidad de desarrollarme en distintos aspectos académicos, por entregarnos su tiempo y paciencia cada vez que lo requería, en fin tantas cosas. Me siento afortunadísima de tenerlo como profesor guía y además como amigo, eres una excelente persona.

Y por último, pero no menos importante, eres tú, el amor de mi vida, el que inunda mis pensamientos cada día al despertar y cada noche al dormirme. Quiero que sepas que fuiste una pieza fundamental en todo esto, escuchándome atentamente cada vez que te contaba mis inquietudes, dándome consejos y el apoyo necesario en cada decisión que tenía que tomar. Siempre me hiciste sentir respaldada por ti, que aunque me equivocara todo iba a estar bien, porque estábamos juntos y así mismo lo resolveríamos, porque nuestro amor es sin igual, es indestructible y para siempre. Mi amor, te llevo siempre en mi corazón y siento que somos afortunadísimos por habernos encontrado el uno al otro, porque un amor así no se encuentra fácilmente, porque me haces completamente feliz. Gracias mi amor, te amo con el alma.

Indice

Agradecimientos	1
Indice	2
Resumen	3
Summary	4
Introducción	5
Revisión Bibliográfica	6
Marco Teórico.....	6
El Hierro.....	8
La Ferritina.....	14
Hipótesis, Objetivo general y específico	16
Materiales y Métodos	17
Resultados	24
Discusión	31
Conclusión	37
Anexo 1: Consentimiento de participación en el Proyecto “Ferritina, una potencial tercera vía de absorción del hierro: estudios celulares y de biodisponibilidad en humanos”.....	38
Anexo 2: Protocolo recubrimiento entérico.....	42
Anexo 3: Protocolo carga de ferritina con isótopos de hierro.....	43
Anexo 4: Técnica de doble marcaje isotópico de Eakins y Brown.....	44
Bibliografía	47

Resumen

La ferritina es una proteína que se encuentra en alimentos de origen animal y vegetal. Esta proteína tiene como función almacenar hasta 4.500 átomos de hierro en su interior como reserva. Se ha postulado que la ferritina tiene una vía de absorción intestinal propia. Sin embargo, en un estudio previo se demostró que el hierro ferritínico competía por la vía de absorción de Fe no-hemínico (Fe no-Hem) cuando era administrada en cápsulas de liberación gástrica. Objetivo: Determinar si el hierro ferritínico de origen animal compite por la vía de absorción del Fe no-Hem cuando es liberado a nivel duodenal. Sujetos y métodos: 30 mujeres, sanas de entre 35 a 45 años de edad, participaron en 2 protocolos de absorción. En el protocolo A se hizo competir 0,5 mg de Fe como ferritina marcada intrínsecamente con ^{55}Fe ó ^{59}Fe , con 0; 4,5; 9,5 y 49,5 mg de Fe como FeSO_4 . Los compuestos fueron administrados en cápsulas de liberación entérica. Por otra parte, es sabido que al ácido ascórbico (AA) es un fuerte favorecedor de la absorción de Fe no-Hem, por tanto en el protocolo B se probó si el AA mejoraba la absorción del Fe ferritínico (relación molar AA:Fe, 4:1). Estos compuestos fueron ingeridos tanto en cápsulas de liberación gástrica como entérica. En ambos protocolos, los días 1, 2, 14 y 15 fueron administrados los compuestos marcados con isótopos de Fe y en los días 14 y 28 se midió la radiactividad circulante para determinar la biodisponibilidad de hierro. Se estableció el estado de nutrición de hierro de los sujetos por mediciones de hemoglobina, VCM, Zn-protoporfirina, saturación de transferrina y ferritina sérica. Resultados: El promedio geométrico de biodisponibilidad del hierro ferritínico del protocolo A fue de 26,3; 22,1; 14,3 y 9,6% para dosis de competencia con Fe no-Hem de 0; 4,5; 9,5 y 49,5 mg respectivamente (ANDEVA para muestras repetidas, $p < 0,05$). En el protocolo B, el promedio geométrico de biodisponibilidad de hierro ferritínico solo liberado gástricamente fue de 38,8% y al ser administrado junto con ácido ascórbico, el valor fue de 31,2% (tpr de Student, N.S.). La ferritina liberada entéricamente, presentó promedios geométricos de 32,5% cuando se ingirió sola y 43,3% cuando se administró junto a ácido ascórbico (tpr de Student, $p < 0,03$).

Conclusión: Los resultados de estos estudios sugieren que el hierro ferritínico es liberado a nivel duodenal, pasa a formar parte del pool común de hierro no hemínico, y por tanto estaría compitiendo por los transportadores del Fe no-Hem ubicados en el enterocito. Esto indicaría que el hierro ferritínico se absorbería por la vía del Fe no-Hem.

Summary

Ferritin is a protein found in foods of animal and vegetal origin. This storage protein can store up to 4,500 atoms of iron (Fe). It has been postulated that ferritin has its own intestinal absorption pathway. Nevertheless, a previous study has shown that the Fe in ferritin competes for the absorption pathway of non-hem Fe when provided in a gastric liberation capsule. Purpose: To determine whether the Fe in ferritin competes for the absorption pathway of non-hem Fe when it is liberated at the duodenal level. Subjects and methods: 30 healthy women between 35 and 45 years of age participated in two absorption protocols. In protocol A, 0.5 mg of Fe as ferritin intrinsically labeled with either ^{55}Fe or ^{59}Fe , are administered along with either 0, 4.5, 9.5 or 49.5 mg of Fe as FeSO_4 . Both compounds were provided as enteric liberation capsules. Given that it is known that ascorbic acid (AA) strongly promotes the absorption of non-hem iron, protocol B tested whether AA improved the absorption of the iron in ferritin (molar ratio AA:Fe, 4:1). Compounds were ingested as capsules of both gastric and enteric liberation. Compounds labeled with the isotopes of Fe were administered in days 1, 2, 14 and 15 of the study and in days 14 and 28 the circulating radioactivity was measured in order to determine Fe bioavailability. The Fe nutrition status of the subjects was assessed by measuring hemoglobin, VCM, Zn-protoporphyrin, transferrin saturation and serum ferritin. Results: The geometric mean of Fe in ferritin bioavailability when administered along with 0, 4.5, 9.5 and 49.5 mg of FeSO_4 was 26.3%, 22.1%, 14.3%, and 9.6%, respectively (protocol A) (repeated measures ANOVA, $p < 0.05$). In protocol B, the geometric mean of Fe bioavailability of ferritin liberated alone gastrically was 38.8% compared to 31.2% when it was administered with AA (paired t-Student, N.S.). On the other hand, the geometric mean of Fe bioavailability from ferritin enterically liberated was 32.5% when it was ingested alone and 43.3% when it was administered together with the ascorbic acid (paired t-Student, $p < 0.03$).

Conclusion: The results of this study suggest that the Fe in ferritin is liberated at the duodenal level, thus forming part of the common pool of non-hem Fe and competing for the non-hem Fe transporters located in the enterocyte. This indicates that the Fe in ferritin could be absorbed by non-hem iron absorption pathway.

Introducción

El hierro es un mineral indispensable para la vida y participa en procesos biológicos esenciales para un organismo vivo. La ferritina es una proteína que almacena hasta aproximadamente 4.500 átomos de hierro en su interior. Tiene como función estabilizar y el almacenar el hierro en los organismos vivos. En los mamíferos, los principales órganos de reserva de hierro son el hígado, bazo y médula ósea. El hierro ferritínico representa una forma altamente biodisponible para el ser humano y una nueva fuente alternativa de hierro dietario con enorme potencial para la contribución a la nutrición humana.

En la literatura existe poca información acerca de la absorción del hierro ferritínico. No existen investigaciones que permitan establecer si la ferritina tiene una vía propia de absorción, o bien si comparte la vía de absorción del hierro no hemínico. Tampoco se conoce si existen interacciones entre ferritina y otros componentes de la dieta, como son el ácido ascórbico, fitatos, proteínas, como tampoco con otros minerales como por ejemplo el calcio. Los resultados de estos estudios resultan ser controversiales, principalmente debido a la diversidad de los diseños.

Este trabajo tiene por objeto generar nuevos antecedentes que ayuden a resolver la incógnita de si la ferritina tiene una vía de absorción propia a nivel intestinal.

Basados en estudios celulares, en donde se observó que la ferritina ingresaba completa al enterocito, hipotetizamos que el hierro ferritínico tiene una vía de absorción alternativa a la vía del hierro hemínico y hierro no hemínico.

Como metodología, se planificaron protocolos de absorción en humanos que incluyen la marcación intrínseca de ferritina con ^{55}Fe y ^{59}Fe .

Revisión Bibliográfica

Marco Teórico

La malnutrición continúa siendo hasta el día de hoy un importante problema de salud pública a nivel mundial y particularmente más relevante en el Sur de Asia y Africa (Schofield y Ashworth, 1996).

Las dietas en las poblaciones son frecuentemente deficientes en macronutrientes (proteínas, carbohidratos y grasas), llevándonos a una malnutrición proteico-energética y en micronutrientes (electrolitos, vitaminas y minerales), llevándonos a deficiencias específicas de micronutrientes o, peor aún, en ambas (Millward y Jackson, 2004). Por otra parte, la malnutrición aumenta la severidad y susceptibilidad a infecciones, de esta manera es un componente importante dentro de las enfermedades y también del riesgo de morir por éstas (Black, 2003). En consecuencia, la malnutrición es el factor de riesgo más importante para la aparición de brotes de enfermedades en países en desarrollo (Müller y Krawinkel, 2005).

Dentro del concepto de malnutrición, se encuentran las deficiencias de micronutrientes. Estas deficiencias se han convertido durante los últimos años, en un importante problema de salud pública, comparativamente con la deficiencia de macronutrientes (Ferraz *et al.*, 2005; Darnton-Hill *et al.*, 2005). Dentro de ellas, destacan la deficiencia de hierro, yodo, vitamina A y zinc (Díaz *et al.*, 2003).

Las deficiencias de micronutrientes afectan por lo menos a 2 billones de personas a nivel mundial (Müller y Krawinkel, 2005). Esto, ha llamado la atención de las autoridades de salud y de los profesionales a nivel mundial. Estudios internacionales acerca de la deficiencia de elementos traza, han evidenciado la gran ocurrencia de la deficiencia de hierro (Ferraz *et al.*, 2005).

La deficiencia de hierro es la carencia alimentaria más prevalente en el mundo (Vásquez, 2003; WHO, 2007). Afecta a más personas que cualquier otra condición, constituyéndose así como una

epidemia, en términos de salud pública (WHO, 2007). Aproximadamente 1,2 billones de personas en el mundo se ven afectados por esta deficiencia. Su prevalencia es particularmente elevada en países en desarrollo (Africa, Asia, Sudamérica) (Grosbois *et al.*, 2005), pero además es la única deficiencia nutricional que también es significativamente prevalente en países industrializados (WHO, 2007; Grosbois *et al.*, 2005). En Japón, por ejemplo, alrededor del 15% de los donantes de sangre son rechazados a causa de la deficiencia de hierro y se estima que el déficit de hierro en mujeres jóvenes llega a valores tan altos como el 25% (Theil, 2004). En Estados Unidos, aproximadamente el 75% de las mujeres entre 18 y 22 años, reportan una ingesta baja de hierro (Ramakrishnan *et al.*, 2002) y una ingesta dietaria de hierro por debajo del nivel óptimo ocurre en el 90% de las embarazadas Americanas (Swensen *et al.*, 2001). Se estima que afecta a más de 100 millones de personas en Latinoamérica (Muñoz y Molina, 2005).

Las causas de la deficiencia de hierro son relativamente variadas, en algunos casos es el resultado de pérdidas de sangre por parasitosis intestinales, también se produce por enfermedades como la malaria o por deficiencia de vitamina A (Suharno y Muhilal, 1996). Sin embargo, la causa más común de la deficiencia de hierro es el bajo aporte de hierro biodisponible en la dieta habitual debido a la presencia de inhibidores que le impiden al organismo absorber las cantidades necesarias de este mineral, y esto ocurre a pesar de que los alimentos aportan niveles varias veces superiores a sus requerimientos. Si todo el hierro ingerido se absorbiera, no se presentaría la deficiencia. Sin embargo, aún cuando existen las mejores condiciones para su absorción, como es el caso de sujetos deficientes que ingieren una dieta con hierro altamente biodisponible, solamente el 30% de este se absorbe; en la mayoría de los casos los porcentajes de absorción son mucho menores (Cook, 1990).

Los lactantes, mujeres en edad fértil y gestantes, son los grupos más vulnerables de desarrollar deficiencia de hierro (Dallman *et al.*, 1980).

La manifestación más común de la deficiencia de hierro es la anemia, y esta ocurre cuando los niveles del micronutriente son tan bajos que la concentración de hemoglobina cae por debajo de los valores de corte específicos para la edad y sexo (Dallman *et al.*, 1980; Cook *et al.*, 1994). Es impresionante revisar los siguientes datos poblacionales: alrededor de 2 billones de personas y más del 30% de la población mundial, son anémicos y la mayoría de ellos es debido a la

deficiencia de hierro (WHO, 2007; y WHO, 2004). Cerca del 46% de los niños entre 5 y 14 años padecen anemia y la mayoría de ellos viven en países en vías de desarrollo. En Estados Unidos, el 3% de los preescolares y el 2 a 5% de las adolescentes, presentan anemia por deficiencia de hierro. A nivel mundial, el 48% de las embarazadas están afectadas, y esta cifra aumenta si nos enfocamos al Tercer Mundo, con un 56% de mujeres gestantes que padecen esta enfermedad (Muñoz y Molina, 2005); es importante tomar en cuenta estas cifras, ya que la anemia, por ejemplo en niños, se asocia con retardo en el crecimiento y en el desarrollo del sistema nervioso central, y en los adultos produce fatiga y disminución de la productividad laboral, entre muchos otros síntomas (Roncagliolo *et al.*, 1998).

La deficiencia de hierro, con o sin anemia, tiene importantes consecuencias en la salud humana y en el desarrollo de los niños: durante los primeros años de vida, afecta el desarrollo cognitivo de los individuos retrasándolo o dañándolo y en la edad adulta, disminuye la capacidad productiva y de trabajo físico, lo que produce un impacto económico negativo en los países que están más afectados por esta condición (Darnton-Hill *et al.*, 2005). En las mujeres embarazadas se ha asociado la deficiencia de este mineral con el aumento en los riesgos de muerte materna durante el parto y en el puerperio, además, los hijos de madres deficientes en hierro tienen mayor riesgo de nacer con un bajo peso, lo cual condiciona el desarrollo de enfermedades crónicas asociadas a la nutrición (Singh *et al.*, 2004). Estos datos son relevantes, si se tiene en cuenta el inmenso número de personas afectadas por esta condición (Darnton-Hill y Coyne, 1998).

El Hierro

El hierro es un mineral esencial para la vida. Es el tercer metal más abundante en la corteza terrestre y se encuentra en dos estados redox: Fe^{+2} (ferroso) y Fe^{+3} (férico). Este mineral participa en múltiples procesos: sirve como cofactor de muchas enzimas, hemoproteínas y proteínas no hem que cumplen diferentes funciones biológicas cruciales, tales como: síntesis de DNA, síntesis de RNA, transporte de oxígeno (hemoglobina), metabolismo del oxígeno (hemoxidasas, peroxidasas, catalasas e hidroxilasas), transporte de electrones (citocromos) y en el ciclo de Krebs (Olivares, 1995).

Puede considerarse que el hierro, dentro del organismo se encuentra formando tres compartimentos (Cuadro 1), uno funcional formado por numerosas proteínas, entre las que se incluyen la hemoglobina, mioglobina y las enzimas que requieren hierro como cofactor o como grupo prostético, ya sea en forma iónica o como grupo hem, otro compartimento de transporte constituido por la transferrina y un compartimento de depósito (reservas corporales de este metal), constituido por la ferritina y la hemosiderina (Forrelat *et al.*, 2000).

Cuadro 1: Distribución del hierro en el hombre

Tipo de hierro		Concentración (mg Fe/kg)	
		hombres	mujeres
<i>Hierro funcional</i>	Hemoglobina	31	28
	Mioglobina	5	4
	«hierro en trabajo»	1	1
	Enzimas no-hem	1	1
<i>Trasporte de hierro</i>	Transferrina	<1 (0.2)	<1 (0.2)
<i>Depósito de Hierro</i>	Ferritina	8	4
	Hemosiderina	4	2
<i>Total</i>		50	40

En los sujetos humanos normales, la cantidad aproximada de hierro total es de 4 a 5 g para los hombres y de 3,5 a 4 g en la mujer distribuidos en: la hemoglobina (Hb) (~2,5 g), las reservas, principalmente hepáticas (~1 g) y en la mioglobina y otras enzimas que son dependientes del metal (~0,3 g) (Conrad y Umbreit, 2002). En términos porcentuales, cerca del 70% del contenido total de hierro se encuentra como hemoglobina, proteína que transporta oxígeno en los eritrocitos y otro 10% está como mioglobina. Un 10 a 20% del hierro corporal se encuentra almacenado como ferritina y hemosiderina, y el remanente, menos del 1% como componente de diversas enzimas que participan en la producción oxidativa de energía celular, síntesis de

neurotransmisores y ADN (Bertram, 1994; Forrelat *et al.*, 2000). Los principales órganos de almacenamiento de hierro en el organismo son el hígado, bazo y médula ósea (Case *et al.*, 1997).

Diariamente, un adulto sano pierde alrededor del 0,025% de su hierro total (equivalente a 1 mg), el cual debe ser reemplazado desde la dieta. Estas pérdidas son producidas principalmente por la descamación de las células epiteliales del tracto gastrointestinal y por el micro sangrado fisiológico intestinal, menos importantes son las pérdidas que ocurren por descamación de piel y fanerios, sudoración o eliminación urinaria; en el caso de las mujeres las pérdidas aumentan debido al sangrado menstrual. Los requerimientos en el ser humano son muy bajos, diariamente se requieren absorber 1-2 mg desde la dieta (Conrad y Umbreit, 2002).

El hierro dietario se divide en dos tipos de acuerdo a su forma química: el hierro hemínico (Fe-Hem), el cual es absorbido como complejo porfirina estable sin ser afectado por otros componentes de los alimentos (Theil, 2004). El Fe-Hem tiene una alta absorción, la que alcanza hasta un 20-25%, y aunque representa como máximo el 10% del hierro dietario, puede proveer hasta un tercio del total de hierro absorbido (Bjorn-Rasmussen *et al.*, 1974), y además es más biodisponible que el hierro no hemínico (Fe no-Hem), este último constituye el 90% del hierro de la dieta y es considerado como hierro “libre” o bien, formando parte de un complejo débil, con una menor biodisponibilidad y estabilidad que el anterior. Algunos componentes de la dieta, como los fitatos y taninos pueden atrapar hierro desde los complejos débiles presentes en otros alimentos durante la digestión, alterando así la biodisponibilidad del hierro de esos alimentos (Hallberg *et al.*, 1987).

Por su característica química de encontrarse “libre”, el Fe no-Hem en el medio intestinal es ligado por factores dietarios que afectan su absorción. Entre los favorecedores de la absorción del Fe no-Hem están las proteínas de la carne, alimentos fermentados (Layrisse *et al.*, 1984) y al ácido ascórbico (Stekel *et al.*, 1985), el cual posee el efecto más notable. Este último ejerce su acción formando complejos solubles con el hierro y evitando la precipitación y polimerización del hierro. El ácido ascórbico es capaz de reducir el hierro desde su forma férrica a ferrosa la cual es más absorbible a valores de pH por encima de 3, el que es propio de intestino delgado. El efecto del ácido ascórbico persiste incluso en presencia de inhibidores (Hallberg *et al.*, 1987). Esta vitamina en relaciones molares con hierro superiores a 1:1, es capaz de duplicar la

absorción del Fe no-Hem de la dieta (Sayers *et al.*, 1973). Por el contrario, como factores inhibidores de la absorción de hierro se encuentran los fitatos y fibra, presentes en los vegetales, fundamentalmente en trigo entero, arroz, maíz, proteína de soya, nueces, legumbres (Hallberg *et al.*, 1987), también encontramos a los polifenoles (Pizarro *et al.*, 2005) y a la caseína (Hurrell *et al.*, 1989). Además de estos factores inhibidores se encuentran: calcio, carbonatos, oxalatos, fosfatos, el salvado y la yema de huevo. Los polifenoles, corresponden a los inhibidores con efecto más potente, en especial los taninos, presentes en el té, café y algunos alimentos vegetales (legumbres, espinacas, cereales) (Pizarro *et al.*, 1994; Disler *et al.*, 1975).

En contraposición, la absorción del Fe-Hem es poco afectada por factores intraluminales y de la dieta, entre los cuales se ha descrito que el calcio disminuye su absorción y las proteínas la favorecen (Layrisse y Martinez-Torres, 1972).

El Fe-Hem se halla en las carnes y la sangre, pero también existe un contenido muy bajo de Fe-Hem en las semillas de algunas plantas, asociado a los anillos tetrapirrólicos de la clorofila, el sirohemo, la fitocromobilina e incluso al grupo Hem (Santana *et al.*, 1998). El Fe no-Hem se encuentra presente en sales de hierro y en los alimentos vegetales (Pizarro *et al.*, 2005).

El metabolismo del hierro está regulado principalmente a través de su absorción. Esta, se lleva a cabo en el duodeno proximal (Flanagan, 1989), ya que en las porciones del duodeno más avanzadas, en donde existe pH básico debido a que las células pancreáticas secretan bicarbonato, el hierro tiende a formar precipitados con otros componentes de la dieta, disminuyendo su solubilidad, con lo cual se hace más difícil su absorción (Finch y Huebers, 1988). No existe absorción de hierro en la boca, esófago o estómago. El enterocito regula la absorción de hierro según las necesidades del organismo: altos niveles corporales de hierro bloquean su absorción y bajos niveles la incrementan (Flanagan, 1989). Además de esto, la absorción de hierro es controlada por factores intraluminales, de la mucosa intestinal y sistémicos. Los factores intraluminales reguladores más importantes son la forma química del hierro y la presencia de factores favorecedores o inhibidores. Los factores que intervienen en la absorción de hierro a nivel de la mucosa intestinal son: la extensión de la superficie y motilidad intestinal, y entre los factores sistémicos se incluyen el estado de los depósitos de hierro, la velocidad de la eritropoyesis y la hipoxia (Cook, 1990).

Existe un reciclaje de hierro al interior del organismo. La mayor parte de las necesidades de hierro del organismo son suplidas por la reutilización del hierro proveniente de la destrucción de los glóbulos rojos senescentes. Este proceso se lleva a cabo gracias a que los eritrocitos senescentes son fagocitados por los macrófagos, y el hierro, producto del catabolismo de la hemoglobina, en el sistema reticuloendotelial, se une en el plasma a la proteína transportadora de hierro transferrina, que corresponde a la misma proteína exportadora de hierro expresada en el enterocito del duodeno. Luego, ya en el plasma, el hierro es transportado a la médula ósea donde se incorpora a las nuevas células rojas (Fleming y Bacon, 2005).

Los estudios radioisotópicos han demostrado que el hierro de los alimentos vegetales es pobremente absorbido, no ocurriendo así con los alimentos de origen animal. Esto se debe a que el Fe-Hem y el Fe no-Hem presentes en la dieta, tienen un comportamiento diferente al momento de ser absorbidas por el intestino. Se describe que el enterocito diferencia químicamente a los dos tipos de hierro, para su absorción (Fe-Hem y Fe no-Hem) (Pizarro *et al.*, 2005; Layrisse y Martinez-Torres, 1972).

El Fe no-Hem, en el estómago, es liberado de la dieta por acción del HCl que no sólo ayuda a hidrolizar las proteínas sino que solubiliza el hierro reduciéndolo del estado férrico (Fe^{+3}) al ferroso (Fe^{+2}). La acción combinada del jugo gástrico y la pepsina, libera aproximadamente el 50% del hierro de la dieta y además efectúa la reducción de un tercio de la cantidad de los iones férricos (Derman *et al.*, 1982). Ya en el lumen intestinal, se encuentra principalmente en su estado férrico el cual es pobremente biodisponible (Miret *et al.*, 2003). Este es reducido desde el estado férrico al ferroso en el borde en cepillo del enterocito mediante una reductasa férrica duodenal (Dcytb) (McKie *et al.*, 2001). Luego, el estado ferroso del hierro es transportado a través de la membrana plasmática del enterocito mediante un transportador de metales divalentes (DMT1) al interior de la célula. Este hierro absorbido puede ser almacenado intracelularmente como ferritina (Gunshin *et al.*, 1997) o transportado desde el citosol hasta la circulación a través de la membrana basolateral mediante la ferroportina; este proceso es facilitado por la hefeatina, que corresponde a una enzima que oxida el Fe^{+2} y lo deja como Fe^{+3} . Luego, este Fe^{+3} se une a la transferrina, proteína sérica transportadora de Fe^{+3} , y de esta manera, como el complejo

transferrina-Fe⁺³, se moviliza por la circulación hacia sitios en donde será usado o almacenado (Donovan *et al.*, 2000), por ejemplo, en forma de ferritina (Vulpe *et al.*, 1999).

Como podemos ver, la vía metabólica de absorción de hierro elemental o Fe no-Hem está descrita en detalle, sin embargo, los componentes involucrados en la captura e internalización del Fe-Hem son aún materia de estudio (Philpott, 2002).

En cuanto a la absorción de Fe-Hem, en la década de los 50' era ampliamente aceptado que el hierro que se ubica en el centro del anillo protoporfirínico no estaba disponible para la absorción. Utilizando hemoglobina marcada intrínsecamente con ⁵⁹Fe obtenida de conejos, se demostró que el hierro proveniente de esta fuente era incorporado en los eritrocitos 14 días después de su ingesta y, por lo tanto, era absorbible (Callender *et al.*, 1957). Posteriormente se determinó que el Fe-Hem se absorbe por una vía alternativa a la del Fe no-Hem, que la captura e internalización del Fe-Hem ocurre como molécula completa, que su absorción está modulada por el nivel de hierro corporal, al igual que la absorción de Fe no-Hem (Hallberg y Sölell, 1967), y que la transferencia del hierro a la circulación es competitiva entre el hierro de la dieta proveniente del Hem y el proveniente de Fe no-Hem (Uzel y Conrad, 1998). Recientemente se ha descrito que el Hem es incorporado al enterocito por un mecanismo de endocitosis mediada por receptores (Arredondo *et al.*, 2007) y que la absorción del Hem es saturable (Pizarro *et al.*, 2003). Se sabe que el anillo metálico porfirínico es separado de la globina en el lumen intestinal, y ahí es transportado a través de la membrana de borde en cepillo como Hem al enterocito (Miret *et al.*, 2003), y una vez en su interior es separado por la Hem-oxigenasa en bilirrubina y Fe⁺² (Raffin *et al.*, 1974), el cual pasará a formar parte del pool común de hierro de bajo peso molecular del enterocito y, desde este punto, sigue el mismo camino que el Fe no-Hem y es encontrado en la sangre en la forma de hierro ligado a transferrina (Weintraub *et al.*, 1968).

Se ha postulado también una vía de absorción para el Fe no-Hem (Fe⁺³) a través de la membrana apical del enterocito, la cual involucraría a dos proteínas: una de la familia de las β_3 integrinas y otra conocida como mobilferrina, sin embargo, actualmente no existe consenso sobre la participación de esta vía en la homeostasis del hierro (Conrad *et al.*, 2000).

Se especula que existe otra vía de absorción distinta a la del Fe-Hem y Fe no-Hem: la vía de absorción de la ferritina. Se han realizado diferentes estudios obteniendo resultados bastante controversiales, que crean grandes expectativas para continuar con la investigación de esta proteína ¹(Theil, 2006).

La Ferritina

La ferritina es una proteína cuya función es almacenar grandes cantidades de hierro en su interior, en una forma biodisponible. Ella está presente en la mayoría de los diferentes tipos de células, es decir, desde las bacterias hasta los humanos (Theil, 2004).

La ferritina es una proteína de gran tamaño (12 nm de diámetro y 480.000 Da), constituida por 24 subunidades que forman una cubierta esférica, alrededor de un conglomerado de hasta 4.500 átomos de hierro insertos en una gran cavidad de 256 nm³. La mayoría del hierro dentro de la ferritina corresponde a Fe⁺³, pero este no está unido a la molécula de ferritina como tal, sino que lo hace a través de uniones minerales sólidas entre átomos de oxígeno y átomos de Fe⁺³ (Theil, 2003; Rohrer *et al.*, 1987; Theil, 2004). En mamíferos, la vida media de ferritina es de 48 a 96 horas, siendo degradada por un proceso de autofagocitosis y destinación del autofagosoma a lisosomas. Una vez en el lisosoma, la proteína es degradada y el hierro que contenía, es transportado al citosol para ser utilizado por la célula o almacenado como ferritina de neosíntesis (Aisen, 1988).

Existen dos tipos de ferritina, la ferritina de origen animal, que corresponde a una proteína principalmente citoplasmática dentro de la célula (Levi *et al.*, 2001), y la ferritina de origen vegetal, presente en las plantas, que se encuentra usualmente en los plastidios dentro de la célula (cloroplastos en las hojas, amiloplastos en tubérculos y semillas) (Seckback, 1982). Las semillas de plantas son particularmente ricas en ferritina, pues almacenan el hierro necesario para las primeras etapas de la germinación (Aisen, 1988; Theil, 2003).

Hay muy poca evidencia de la utilización de ferritina como fuente nutricional de hierro (Layrisse *et al.*, 1975), sin embargo, la posibilidad de utilizar alimentos ricos en ferritina como fuente

¹ **THEIL, E.** 2006. [comunicación personal]. U. Chile, Facultad de Ciencias.

dietaria de hierro es atractiva por su cualidad de alimento natural, es por esto que se hacen necesarios estudios básicos para entender los mecanismos celulares y moleculares que subyacen a la absorción de este tipo de hierro (Lucca *et al.*, 2002).

Hipótesis

1. El porcentaje de absorción de la dosis basal de hierro ferritínico no se modificará con las dosis crecientes de sulfato ferroso si el hierro ferritínico se absorbe por una vía propia.
2. El ácido ascórbico tendrá un efecto favorecedor de la absorción de hierro ferritínico a nivel gástrico debido a que una fracción de la ferritina será digerida liberando el hierro a nivel gástrico.
3. El ácido ascórbico no tendrá un efecto favorecedor de la absorción de hierro ferritínico a nivel intestinal debido a que la ferritina tiene una vía alternativa de absorción diferente a la del Fe no-hem.

Objetivo General

Medir la biodisponibilidad de la ferritina de origen animal en humanos.

Objetivos Específicos

1. Evaluar la competencia entre el hierro ferritínico y dosis crecientes de sulfato ferroso administrados simultáneamente en cápsulas de liberación entérica.
2. Evaluar el efecto del ácido ascórbico sobre la biodisponibilidad del hierro ferritínico administrado tanto para ser liberado gástricamente (cápsulas de gelatina), como entéricamente (cápsulas recubiertas).

Materiales y Métodos

Análisis estadístico

Muestra: las causas de las variabilidades fisiológicas y variación día a día que presenta la absorción de hierro, en un mismo individuo (intra-sujeto), no han sido plenamente identificadas, pero presumiblemente se asocian con cambios en la motilidad gastrointestinal y las secreciones gástrica, pancreática o biliar (Layrisse y Martínez-Torres, 1972); sin embargo, es adecuado realizar protocolos de absorción de hierro, incluyendo grupos de entre 12 y 13 sujetos con un mínimo de 8 por protocolo de absorción (Cook y Lipschild, 1977), por otra parte, en un modelo de mediciones repetidas (ANDEVA), 13 sujetos son suficientes para determinar diferencias de ± 1 desviación estándar (DS) de la misma variable, con un error $\alpha = 0,05$ y un poder = 90%. Basado en lo anterior, se decidió trabajar con 15 sujetos teniendo en cuenta las posibles pérdidas durante el protocolo experimental, ya sea por rechazo a la ingesta, o efectos laterales no deseados después de la ingesta.

Análisis: 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 los valores de ferritina sérica y biodisponibilidad de hierro presentan una distribución asimétrica en la población normal, estas fueron transformadas a sus logaritmos naturales antes de realizar las comparaciones para demostrar la hipótesis y 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. Se realizaron las pruebas de t pareado de Student y ANDEVA de medidas repetidas para determinar las diferencias en la biodisponibilidad de hierro entre los distintos tratamientos y se utilizó como prueba post hoc la prueba de Scheffé.

Sujetos experimentales

Se seleccionaron 15 mujeres en edad fértil (entre 35 a 45 años) para cada protocolo de absorción, las cuales estaban aparentemente sanas, no presentaron patologías del tracto gastrointestinal y no consumieron fármacos ni suplementos de minerales o multivitamínicos

durante los 6 meses anteriores, ni durante el estudio. Dado que se utilizaron isótopos radioactivos, sólo se permitió la participación a mujeres que usaban un método anticonceptivo (dispositivo intrauterino, anticonceptivos orales, ligadura de trompas) y previo a los protocolos de biodisponibilidad de hierro 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), en donde la muestra correspondió a tres gotas de orina de primera micción. Todas las participantes asistieron a una reunión informativa en la cual se les explicó, en lenguaje simple y en detalle, exactamente en qué consistía el estudio al cual se iban a someter y las precauciones que debían tomar para obtener un resultado satisfactorio. Luego de aclaradas sus dudas, procedieron a firmar un consentimiento aprobado por el Comité de Ética del INTA (Anexo 1).

Protocolo experimental

Las mujeres seleccionadas asistieron a las 8:00 de la mañana al Laboratorio de Micronutrientes del INTA los días 1, 2, 14, 15 y 28 del protocolo, luego de un ayuno de 8 horas. En el día 1, se obtuvieron los pesos (báscula de plataforma marca SECA con una precisión de 50 g) y las tallas (tallímetro metálico de pared con una precisión de 0,1 cm) de cada uno de los sujetos, con el fin de calcular su volemia utilizando la tabla de Tulane (Nadler *et al.*, 1962). Posteriormente, con los sujetos en ayunas, se realizaron dos protocolos de biodisponibilidad de hierro.

Protocolo 1: Competencia entre hierro ferritínico y Fe no hemínico como FeSO₄ a nivel entérico

Día 1: cada una de las participantes ingirió 0,5 mg de Fe elemental como ferritina marcada con 1 uCi de ⁵⁹Fe.

Día 2: cada una de las participantes ingirió 0,5 mg de Fe elemental como ferritina marcada con 3 uCi de ⁵⁵Fe más 4,5 mg de Fe como FeSO₄ no marcado.

Día 14: se tomó una muestra de 30 ml de sangre después del ayuno nocturno de 8 horas para la determinación del estado nutricional de hierro de los sujetos y para la determinación de la biodisponibilidad. Luego, cada una de las participantes ingirió 0,5 mg de Fe elemental como ferritina marcada con 1 uCi de ⁵⁹Fe más 9,5 mg de Fe como FeSO₄ no marcado.

Día 15: cada una de las participantes ingirió 0,5 mg de Fe elemental como ferritina marcada con 3 uCi de ⁵⁵Fe más 49,5 mg de Fe como FeSO₄ no marcado.

Día 28: Se realizó una toma de muestra de 20 ml de sangre, post ayuno nocturno de 8 horas, para la determinación de la biodisponibilidad de hierro. Se instruyó a las participantes para que se abstuvieran de consumir cualquier tipo de alimento dentro de las 4 horas posteriores a la ingesta de las soluciones (la figura 1 esquematiza el protocolo experimental realizado).

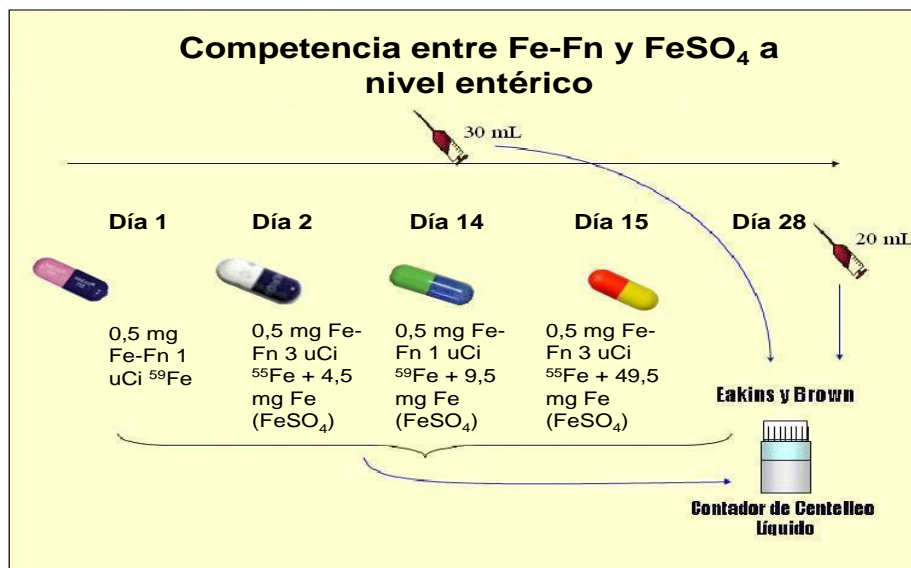


Figura 1: protocolo experimental 1. Se muestra la composición de cada una de las cápsulas administradas.

Los días 1 y 14 se utilizaron cápsulas con compuestos marcados con ^{59}Fe y los días 2 y 15 se utilizaron cápsulas con compuestos marcados con ^{55}Fe .

Tanto la ferritina como el FeSO_4 fueron entregados en cápsulas de liberación entérica, ya que fueron recubiertas el día anterior a la ingesta con un componente resistente a la digestión gástrica (Eudragit L30 D55; Röhm GmbH, Darmstadt, Germany). La cubierta entérica fue preparada siguiendo el protocolo que aparece en el Anexo 2 (Protocolo recubrimiento entérico). La ferritina utilizada cumplía con estándares altos de calidad (ferritina de bazo de equino, CALZYME Laboratories, INC. EEUU) cuyas especificaciones técnicas más relevantes son: proteína: 80 mg/ml, estable a 4°C , contenido de Fe: 30%, pureza: $\geq 90\%$. Esta, fue marcada intrínsecamente con ^{55}Fe ó ^{59}Fe siguiendo el protocolo presentado en el Anexo 3 (Protocolo carga de ferritina con isótopos de hierro). Se utilizaron los isótopos de hierro ^{55}Fe y ^{59}Fe como trazadores de la absorción de hierro (NEN, Life Science Products, Inc., Boston, MA). Las dosis de isótopos administradas fueron autorizadas por la Comisión Chilena de Energía Nuclear (CCHEN).

Protocolo 2: Efecto del ácido ascórbico sobre la biodisponibilidad del hierro ferritínico

Día 1: cada una de las participantes ingirió 0,5 mg de Fe elemental como ferritina marcada con 1 uCi de ^{59}Fe .

Día 2: cada una de las participantes ingirió 0,5 mg de Fe elemental como ferritina marcada con 3 uCi de ^{55}Fe más ácido ascórbico en relación molar AA: Fe de 4:1. Tanto el día 1 como el día 2 los compuestos fueron entregados en cápsulas de liberación gástrica.

Día 14: Se tomó una muestra de 30 ml de sangre después del ayuno nocturno de 8 horas para la determinación del estado nutricional de hierro de los sujetos y para la determinación de la biodisponibilidad. Luego, cada una de las participantes ingirió 0,5 mg de Fe elemental como ferritina marcada con 1 uCi de ^{59}Fe .

Día 15: cada una de las participantes ingirió 0,5 mg de Fe elemental como ferritina marcada con 3 uCi de ^{55}Fe más ácido ascórbico en relación molar AA: Fe de 4:1. Los días 14 y 15 los compuestos fueron entregados en cápsulas de liberación entérica.

Día 28: Se realizó una toma de muestra de 20 ml de sangre, post ayuno nocturno de 8 horas, para la determinación de la biodisponibilidad de hierro.

Se instruyó a las participantes para que se abstuvieran de consumir cualquier tipo de alimento dentro de las 4 horas posteriores a la ingesta de las soluciones (la figura 2 esquematiza el protocolo experimental realizado).

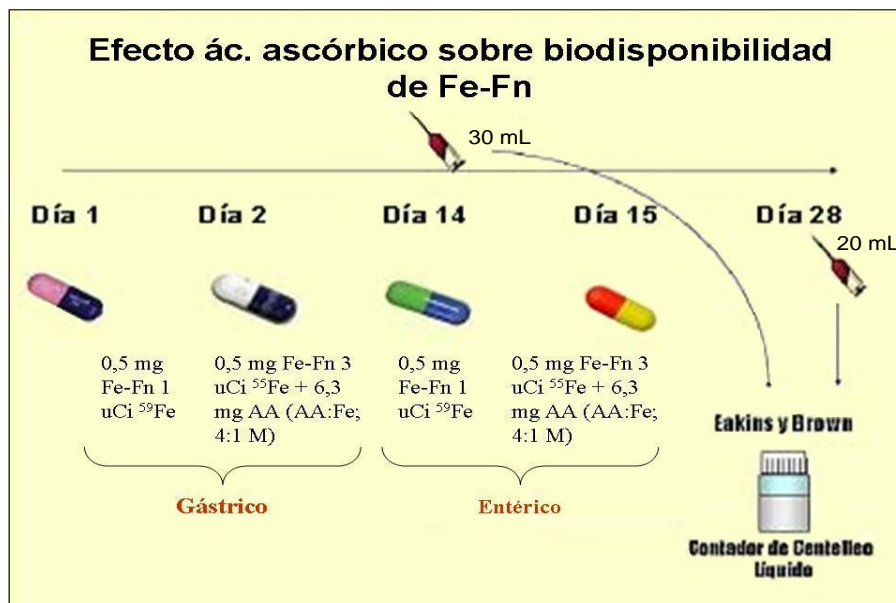


Figura 2: protocolo experimental 2. Se muestra la composición de cada una de las cápsulas administradas.

En los días 1 y 2 los compuestos fueron entregados en cápsulas de liberación gástrica (cápsulas de gelatina N° 0) y los días 14 y 15 en cápsulas de liberación entérica. Estas últimas, fueron recubiertas siguiendo el mismo protocolo citado anteriormente (Anexo 2). El resto de las especificaciones respecto de la ferritina y su marcaje con isótopos de hierro, además del origen de cada uno de estos compuestos, fueron las mismas que se señalaron en el protocolo anterior. Las dosis de isótopos administradas fueron autorizadas por la Comisión Chilena de Energía Nuclear (CCHEN).

Valoración del estado nutricional de hierro: la determinación de las variables bioquímicas del estado nutricional de hierro, se pudo llevar a cabo a través de las siguientes pruebas:

- Hemoglobina (Hb) y volumen corpuscular medio (VCM): determinadas en un

contador electrónico de células (CELL-DYN 1700, ABBOTT Diagnostics, Abbott Park, IL).

- Ferritina sérica: se realizó mediante una prueba de ELISA en sandwich, para lo cual, se utilizó como anticuerpo primario anti-Fn (Ref: A0362) y como secundario anti-Fn conjugado con peroxidasa (Ref: A0031), ambos de marca Dako Corporation.
- Fe sérico: se realizó mediante fotolorimetría, utilizando el cromógeno TPTZ.
- Capacidad total de unión a Fe (TIBC): según la metodología propuesta por Fischer y Price, 1964.
- Porcentaje de saturación de la transferrina (% Sat): se calculó mediante la fórmula de Fe en suero / TIBC (Fischer y Price, 1964).
- Protoporfirina libre eritrocitaria: (ZP Hematofluorímetro Modelo 206D, AVIV Biomedical Inc., Lakewood, NJ).

Biodisponibilidad: para el cálculo de la biodisponibilidad se utilizó la técnica de doble marcaje isotópico descrita por Eakins y Brown, 1966, utilizando como trazadores los isótopos radioactivos ^{55}Fe y ^{59}Fe (NEN, Life Science Products, Inc., Boston, MA). En términos generales, cada una de las muestras (sangre y compuestos) se digirió en medio ácido y se precipitó el contenido total de hierro. Luego, se determinó la radioactividad emitida en un contador de centelleo líquido LS 5000 TD, para lo cual se utilizaron 2 muestras blanco, triplicados 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). En el Anexo 4 (Técnica de doble marcaje isotópico de Eakins y Brown) se describe en forma detallada los pasos que se siguieron para desarrollar esta técnica.

Debido a que existe un traslape de las cuentas en cada uno de los carriles del contador de centelleo, se hizo necesario determinar la magnitud de este traslape 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 uno de los isótopos según el traslape; 3) cálculo de las cpm por mL de sangre para cada isótopo; 4) cálculo de las cpm de cada isótopo por mg de solución ingerida; 5) cálculo del total de cpm circulantes de cada uno de los isótopos; 6) cálculo del total de cuentas ingeridas de cada isótopo; 7) cálculo del porcentaje

de absorción de cada isótopo y 8) cálculo de la biodisponibilidad de los isótopos. La tabla 1 muestra las fórmulas utilizadas en cada uno de los pasos mencionados anteriormente.

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

¹Corrección de Bothwell (80% del hierro ingerido se destina a eritropoyesis)

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

Resultados

De los treinta sujetos incorporados al protocolo (15 en el protocolo 1: Competencia entre Fe ferritínico y Fe no hemínico como FeSO_4 a nivel entérico, y 15 en el protocolo 2: Efecto del ácido ascórbico sobre la biodisponibilidad del Fe ferritínico), uno del protocolo 1, presentó efectos gastrointestinales agudos cuando ingirió la dosis de 50 mg de Fe, por lo tanto no fue incorporado en el análisis de los resultados.

El estado de nutrición general de hierro de los sujetos estudiados era relativamente normal (Tablas 2 y 3). Sólo se encontró una mujer con anemia por deficiencia de hierro ($\text{Hb} < 120 \text{ g/L}$ más dos de los parámetros de nutrición de hierro alterados: $\text{VCM} < 80 \text{ fL}$ y/o $\text{FEP} > 80 \text{ ug/dL}$ GR y/o $\text{Sat} < 15\%$ y/o $\text{FS} < 12 \text{ ug/dL}$). Otros dos sujetos presentaron deficiencia de hierro sin anemia (Hb normal más dos de los parámetros de nutrición de hierro alterados) y otro tenía sus depósitos de hierro depletados (Ferritina sérica $< 12 \text{ ug/L}$).

	Suj	Edad	Peso	Talla	Hb	VCM	FEP	Fe	TIBC	%Sat	SF*
		(a)	(Kg)	(cm)	(g/L)	(fL)	(ug/dL GB)	(ug/dL)	(ug/dL)	(%)	(ug/L)
31	LGQ	32	60	170	126	81	77	68	444	15,3	4,3
32	CGQ	35	60	154	140	85	32	97	301	32,2	53,9
33	VGR	38	82	156	110	72	46	29	378	7,7	6,7
34	MAP	45	56	152	142	91	63	91	306	29,7	37,6
35	CRD	44	78	145	120	81	137	39	345	11,3	7,9
36	AAR	37	55	148	136	83	77	99	422	23,5	16,8
37	MMM	39	54	149	152	94	74	101	381	26,5	65,6
38	ECA	33	59	167	141	95	43	80	301	26,6	26,7
39	JGF	39	62	158	144	91	26	128	323	39,6	50,3
40	MGQ	36	75	167	141	82	37	81	428	18,9	44,4
41	NRR	35	80	168	142	87	86	84	362	23,2	20,7
42	JLS	35	75	151	139	91	60	37	306	12,1	21,4
43	MVA	41	70	160	138	89	26	116	323	35,9	27,7
45	PCA	35	77	163	151	92	60	66	315	21,0	46,5
Media		37	66	158	137	87	60	80	353	23,1	30
DE		4	10	8	11	6	30	29	51	9,5	10-53

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

*Promedio Geométrico y rango ± 1 DE.

Suj	Edad	Peso	Talla	Hb	VCM	FEP	Fe	TIBC	Sat	SF*	
	(a)	(Kg)	(cm)	(g/L)	(fL)	(ug/dL GB)	(ug/dL)	(ug/dL)	(%)	(ug/L)	
46	XRP	32	60	170	79	63	194	6	412	1,5	4,2
47	MCJ	35	60	154	139	90	57	95	389	24,4	30,1
48	MSM	38	82	156	131	84	57	97	341	28,4	32,7
49	POR	45	56	152	144	88	43	104	307	33,9	48,6
50	RMJ	44	78	145	147	85	63	136	301	45,2	24,6
51	ONS	37	55	148	140	89	37	97	400	24,3	20,4
52	SGD	39	54	149	136	86	40	72	315	22,9	19,2
53	CRS	33	59	167	130	82	49	58	315	18,4	57,1
54	JRR	39	62	158	141	88	34	82	304	27,0	40,8
55	GGO	36	75	167	155	89	49	99	332	29,8	20,3
56	AGF	35	80	168	139	90	49	60	318	18,9	18,6
57	IRC	35	75	151	146	86	51	129	335	38,5	35,1
58	VSD	41	70	160	136	91	32	85	338	25,1	19,6
59	VOR	24	47	158	138	91	34	74	383	19,3	71,6
60	RMC	35	96	167	152	86	34	100	335	29,9	42,8
Media	37	67	158	137	86	55	86	342	25,8	27	
DE	5	13	8	17	7	40	31	37	10,0	14-54	

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

*Promedio Geométrico y rango ± 1 DE.

Con respecto al protocolo 1, el promedio de edad de las 14 participantes fue 37 ± 4 años. El índice de masa corporal (IMC) promedio fue de $27,2 \pm 4,7$ Kg/m² y el estado nutricional de la muestra, valorado por este índice, fue 5 normales (IMC 18,5 – 24,9), 6 con sobrepeso (IMC entre 25 a 29,9) y 3 obesas (IMC ≥ 30). En cuanto al protocolo 2, el promedio de edad de las 15 participantes fue 37 ± 5 años. El índice de masa corporal promedio fue de $27,0 \pm 5,4$ Kg/m² y el estado nutricional de la muestra, valorado por este índice, fue 6 normales, 5 con sobrepeso y 4 obesas.

Los promedios de los parámetros que miden estado de nutrición de hierro [hemoglobina (Hb), volumen corpuscular medio (VCM), Protoporfirina libre eritrocitaria (FEP), Saturación de la transferrina (%Sat) y ferritina sérica (FS)] no presentaron diferencias significativas (t Student). En resumen, ambos grupos presentaron su estado de nutrición general de hierro comparable.

Análisis de los datos de biodisponibilidad de hierro: los valores de biodisponibilidad de hierro se distribuyen asimétricamente, por lo tanto los datos individuales se transformaron a su logaritmo natural y se calculó el promedio geométrico. Las curvas de los promedios geométricos de absorción de hierro se expresaron en % de biodisponibilidad y mg de hierro absorbido. Para comparar la curva de absorción de hierro del protocolo 1 con datos anteriormente comunicados, las absorciones individuales se corrigieron a un 100% de la dosis de 0,5 mg de Fe como ferritina (absorciones relativas a la absorción basal). Esta modificación corrige las diferencias en la absorción de hierro entre los sujetos, debida a sus diferentes estados de nutrición de hierro permitiendo comparar grupos.

Biodisponibilidad de hierro del protocolo 1: la Tabla 4 muestra las absorciones individuales del protocolo 1.

Los promedios geométricos de biodisponibilidad de este estudio fueron de 26,3; 22,1; 14,3 y 9,6% para las dosis de competencia de 0; 4,5; 9,5 y 49,5 mg de Fe como sulfato ferroso (FeSO_4). Esta caída fue estadísticamente significativa al aplicar ANDEVA ($p < 0,001$); la prueba de Scheffé mostró que las diferencias se produjeron entre 26,3% con 14,3% ($p < 0,002$), y con 9,6% ($p < 0,001$); y entre 22,1 con 9,6% ($p < 0,001$). Al calcular las absorciones relativas a la absorción basal, los promedios geométricos de las dosis 5, 10 y 50 mg de Fe totales resultaron ser de 84,2; 62,5 y 37,9%.

	Biodisponibilidad de hierro (%)				Hierro absorbido (mg)			
	Dosis de hierro total ingerida (0,5 mg de Fe como ferritina y el resto como FeSO ₄)							
	0,5	5	10	50	0,5	5	10	50
31 LGQ	69,4	61,1	27,2	23,9	0,30	3,03	2,97	11,99
32 CGQ	24,6	16,0	14,0	3,4	0,10	0,94	1,47	1,71
33 VGR	79,5	64,0	58,5	23,3	0,34	3,25	6,07	11,74
34 MAP	4,5	5,3	8,9	2,7	0,02	0,29	0,93	1,34
35 CRD	44,3	37,9	8,2	18,3	0,19	1,91	0,87	9,18
36 AAR	54,0	41,8	32,0	9,0	0,23	2,31	3,33	4,45
37 MMM	6,0	4,4	7,9	4,6	0,03	0,24	0,84	2,28
38 ECA	40,9	16,1	26,5	13,6	0,18	0,94	2,83	6,86
39 JGF	10,6	22,9	4,4	7,2	0,04	1,36	0,48	3,63
40 MGQ	33,2	9,8	17,0	9,9	0,14	0,48	1,83	4,98
41 NRR	44,9	52,4	18,3	15,1	0,19	2,75	1,97	7,61
42 JLS	8,3	11,8	10,0	7,7	0,04	0,70	1,09	3,90
43 MVA	92,9	44,5	1,3	15,0	0,40	2,29	0,14	7,51
45 PCA	31,1	30,4	22,0	11,3	0,13	1,73	2,39	5,67
Media*	26,3	22,1	14,3	9,6	0,11	1,21	1,52	4,82
-1DE	10,3	9,2	6,7	4,9	0,04	0,51	0,72	2,47
+1DE	66,9	53,0	30,4	18,8	0,29	2,84	3,23	9,44

Tabla 4: Absorciones individuales del protocolo 1: Competencia entre Fe ferritínico y Fe no hemínico como FeSO₄ a nivel entérico.

* *Promedio Geométrico y rango ± 1 DE.

Biodisponibilidad de hierro del protocolo 2: la Tabla 5 muestra las absorciones individuales del protocolo 2.

El promedio geométrico de absorción del hierro ferritínico solo liberado gástricamente fue de 38,8% y al ser administrado junto con ácido ascórbico, fuerte favorecedor de la absorción de hierro, su absorción fue de 31,2% (t pareado de Student=1,58, N.S.). Sin embargo, la ferritina liberada a nivel duodenal, presentó promedios geométricos de absorción de 32,5% cuando se ingirió sola y de 43,3% cuando se administró junto a ácido ascórbico, diferencia significativa (t pareado de Student=2,43, $p < 0,03$) (Figura 2).

		Biodisponibilidad de hierro (%)				Hierro absorbido (mg)			
		Dosis de hierro total ingerida (0,5 mg de Fe como ferritina)							
		Liberación gástrica		Liberación entérica		Liberación gástrica		Liberación entérica	
		Fn sola	Fn+AA	Fn sola	Fn+AA	Fn sola	Fn+AA	Fn sola	Fn+AA
46	XRP	76,1	72,9	67,4	108,7	0,40	0,39	0,33	0,57
47	MCJ	77,2	49,0	44,5	56,4	0,42	0,25	0,21	0,30
48	MSM	25,8	26,3	9,3	30,1	0,14	0,13	0,05	0,16
49	POR	41,6	49,8	45,1	35,5	0,22	0,26	0,24	0,20
50	RMJ	9,8	1,3	13,5	8,0	0,05	0,01	0,07	0,04
51	ONS	71,1	64,1	48,5	53,8	0,37	0,33	0,24	0,29
52	SGD	48,8	45,3	50,0	71,8	0,26	0,24	0,24	0,39
53	CRS	28,6	20,4	26,7	29,2	0,16	0,11	0,13	0,16
54	JRR	17,3	15,2	13,9	40,7	0,29	0,08	0,07	0,22
55	GGO	38,3	29,4	48,5	36,3	0,65	0,16	0,24	0,20
56	AGF	56,0	37,7	34,8	53,5	0,30	0,20	0,18	0,29
57	IRC	53,8	54,0	36,6	58,5	0,29	0,29	0,19	0,32
58	VSD	66,7	61,6	53,5	83,6	0,36	0,32	0,28	0,46
59	VOR	15,0	16,5	16,5	19,6	0,08	0,09	0,08	0,11
60	RMC	54,9	73,3	57,6	77,4	0,29	0,38	0,31	0,44
Media*		38,8	31,2	32,5	43,3	0,24	0,16	0,16	0,24
-1DE		20,5	11,3	17,5	22,5	0,13	0,06	0,09	0,12
+1DE		73,5	85,7	60,5	83,1	0,47	0,45	0,30	0,45

Tabla 5: Absorciones individuales del protocolo 2: Efecto del ácido ascórbico sobre la biodisponibilidad del hierro ferritínico.

* *Promedio Geométrico y rango ± 1 DE.

Al aplicar t pareado de Student con el objeto de comparar las absorciones de hierro de ferritina sola liberadas a nivel gástrico y entérico, éstas no mostraron diferencias significativas. Sin embargo, cuando fueron administradas en conjunto con ácido ascórbico, la absorción de la ferritina liberada a nivel entérico fue significativamente mayor que la absorción de la ferritina liberada a nivel gástrico ($p < 0,03$).

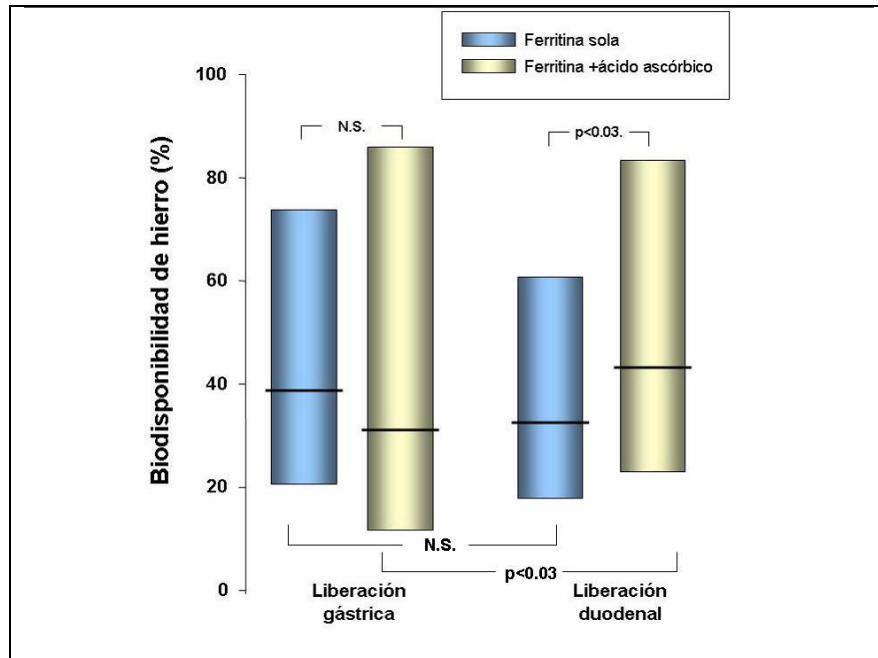


Figura 2: Efecto del ácido ascórbico sobre la biodisponibilidad del hierro ferritínico liberado a nivel gástrico y a nivel duodenal.

Discusión

El hierro es un mineral esencial para la vida (Olivares, 1995), participa formando parte de enzimas que actúan en diversos procesos biológicos indispensables para el buen funcionamiento de un organismo vivo. El hierro dietario se divide en dos de acuerdo a su forma química: hierro hemínico (Fe-Hem) y hierro no hemínico (Fe no-Hem) y cada uno de ellos se absorbe por distintas vías (Pizarro *et al.*, 2005). En términos generales, el proceso de la absorción de hierro puede ser dividido en tres etapas: 1) captación, 2) transporte al interior del enterocito (absorción) y 3) almacenaje, transporte y salida del enterocito hacia el organismo (Pizarro *et al.*, 2005). La mayoría del hierro es absorbido en el duodeno y el yeyuno superior y existen varios factores que afectan su absorción (Finch y Huebers, 1988).

La absorción de hierro se lleva a cabo en el enterocito y es controlada por receptores específicos que se ubican en el ribete estriado. El Fe no-Hem es reducido de Fe^{+3} a Fe^{+2} por la enzima Dcytb en el borde apical de los enterocitos (Mckie *et al.*, 2001); esta forma de hierro es capturada por el transportador DMT1 que lo internaliza a la célula (Gunshin *et al.*, 1997). Cuando el hierro de la dieta está unido a compuestos reductores como el ácido ascórbico, es capturado directamente por el DMT1. Al interior del enterocito, el hierro puede seguir dos vías: a) puede ser transferido a la región basolateral del enterocito desde donde el hierro es transportado a la circulación por la ferroportina (Donovan *et al.*, 2000) y entregado a la transferrina previa oxidación de Fe^{+2} a Fe^{+3} por la hefestina o, b) puede ser secuestrado por la ferritina que lo entrega según los requerimientos del organismo o se pierde cuando la célula muere y se descama (Vulpe *et al.*, 1999).

La ferritina es el paradigma de las proteínas que almacenan hierro debido a que se conoce muy poco acerca de ella. Sus 24 unidades conforman una cavidad central capaz de almacenar hasta 4.500 átomos de hierro en forma cristalina (Harrison, 1996). Esta proteína es una forma de Fe no-Hem muy abundante en diversos tipos de alimentos, y que ha sido muy poco considerada como fuente nutricional de hierro hasta ahora (Hallberg, 1981). En algunos estudios realizados en el pasado, usando isótopos de hierro para marcar ferritina, nos han guiado a una variedad de resultados (Layrisse *et al.*, 1975; Lynch *et al.*, 1984; Sayers *et al.*, 1973). Sin embargo, estudios más actuales hacen énfasis en que la naturaleza hace uso de la ferritina en períodos críticos del

desarrollo de los seres humanos, animales, plantas y microorganismos (Andrews *et al.*, 2003; Briat y Lobreaux, 1998). Solo el entendimiento de la biodisponibilidad de nuevas y diferentes formas químicas de hierro en la dieta, como la ferritina, nos permitirán hacer una real contribución a la nutrición. Para esto, es necesario aclarar el cómo, cuándo y dónde se lleva a cabo la absorción de la ferritina en el humano. El proyecto Fondecyt, dentro del cual se encuentra inserta esta memoria, considera responder algunas de estas interrogantes.

Previo a la realización de esta memoria (2005), se realizó un estudio de biodisponibilidad de hierro ferritínico en humanos, donde se hizo competir el hierro ferritínico (dosis fija de 0,5 mg de Fe elemental como ferritina) contra dosis crecientes de FeSO₄ (0; 4,5; 9,5; 49,5 mg de Fe como FeSO₄) igual que el protocolo 1 realizado en esta tesis, pero la diferencia es que los compuestos fueron administrados en cápsulas de liberación gástrica, con el fin de determinar si la ferritina compartía o no la vía de absorción del Fe no-Hem. Los resultados de este experimento mostraron que el promedio geométrico de biodisponibilidad de la ferritina administrada sola fue de 21,6% y al agregar FeSO₄ en dosis de 4,5; 9,5 y 49,5 mg la absorción del hierro ferritínico fue de 19,8; 14,2 y 4,7% respectivamente. Esta caída en la absorción fue estadísticamente significativa cuando se aplicó ANDEVA para medidas repetidas; F=4,0; p<0,001. Al calcular las absorciones relativas a la absorción basal, los promedios geométricos de absorción fueron 91,3; 65,7 y 21,5% para dosis de 5, 10 y 50 mg de Fe totales, si no hubiese habido competencia, el valor inicial de absorción correspondiente a la dosis de 0,5 mg de Fe, no se hubiese modificado. Por tanto, esto sugiere que el hierro ferritínico estaría compitiendo por los transportadores del Fe no-Hem y por tanto se estaría absorbiendo por la vía del hierro no hemínico.

Uno de los supuestos que se generaron a la luz de estos resultados fue que el hierro ferritínico era liberado por acción de la digestión gástrica y así pasaba a formar parte del pool común de hierro no hemínico. Sin embargo, esta teoría fue cuestionada ya que en la literatura existen antecedentes que indican que la ferritina, en experimentos *in vitro*, es estable a pH bajo, que resiste la denaturación por calor (a temperaturas >85° C) y es resistente a la acción de enzimas proteolíticas (Davila-Hicks *et al.*, 2004).

Existen varios autores que defienden la postura de que la ferritina, post digestión, llega intacta al intestino. Es así como Lavoie *et al.*, dicen que en algunos alimentos como las legumbres, la mayoría del hierro presente en ellas, está en forma de ferritina y que ella se encuentra en alta concentración en la cáscara, la que provee una protección adicional contra la digestión proteica. Esto, combinado con la estabilidad a la denaturación de la ferritina, además de la resistencia a la digestión proteolítica, da como resultado que la ferritina, por ejemplo, de poroto de soya, probablemente resista intacta el proceso de digestión humano y logre llegar al intestino como un conglomerado de hierro con una cubierta proteica (Lavoie *et al.*, 1978). Es más, incluso hay estudios realizados recientemente acerca de la biodisponibilidad de hierro ferritínico, tanto en animales como en humanos (Beard *et al.*, 1996; Murray-Kolb *et al.*, 2002; Murray-Kolb *et al.*, 2003; Ramakrishnan *et al.*, 2002), que promueven la idea de que la ferritina se absorbe intacta y por una vía propia. Ellos fundamentan que la absorción de ferritina pura en humanos y la resistencia de la ferritina a la digestión bajo condiciones similares a las que se presentan durante la digestión humana, indican la posible existencia de un producto genético necesario para el reconocimiento y absorción de la ferritina intacta. El respaldo de esta idea, que la ferritina puede entrar intacta al enterocito, viene del hecho de que los virus pueden atravesar membranas (Whittaker *et al.*, 2000).

Luego de los resultados del estudio de 2005, en donde se evidenció una competencia entre hierro ferritínico y FeSO_4 por la vía de absorción del Fe no-Hem, se propuso un nuevo estudio, el que corresponde a esta tesis, en donde al igual que en el estudio de 2005, se hizo competir el hierro ferritínico en dosis fija de 0,5 mg de Fe elemental, contra dosis crecientes de FeSO_4 de 0; 4,5; 9,5 y 49,5 mg de Fe elemental, pero esta vez los compuestos fueron administrados en cápsulas de liberación entérica. La razón de aquello, es que al estar administrando la ferritina en cápsulas de liberación entérica, estaríamos entregándosela al intestino en forma intacta, de manera que comparando estos resultados con los del estudio anterior permitiría proveer evidencia de una posible vía propia de absorción del hierro ferritínico.

Los resultados de este nuevo estudio realizado durante el año 2006, mostraron que los promedios geométricos de absorción fueron de 26,3; 22,1; 14,3 y 9,6% para dosis de 0; 4,5; 9,5 y 49,5 mg de Fe como FeSO_4 . Al calcular las absorciones relativas a la absorción basal, los promedios geométricos de absorción de las dosis 5, 10 y 50 mg de Fe totales, resultaron ser de 84,2; 62,5 y

37,9%. Al realizar la comparación de las curvas de ambos estudios (Figura 3) mediante ANDEVA para muestras repetidas de doble entrada, se observaron diferencias significativas en la disminución de la absorción de hierro ferritínico por efecto de la dosis de hierro como FeSO_4 ($F=19,8$; $p<0,001$), pero no por el tipo de tratamiento, cápsulas de liberación gástrica o entérica ($F=2,3$; N.S.), es decir, ambos estudios se comportaron de la misma forma, lo que indica que el hierro ferritínico liberado tanto a nivel gástrico como entérico, compite por la vía de absorción de hierro no hemínico.

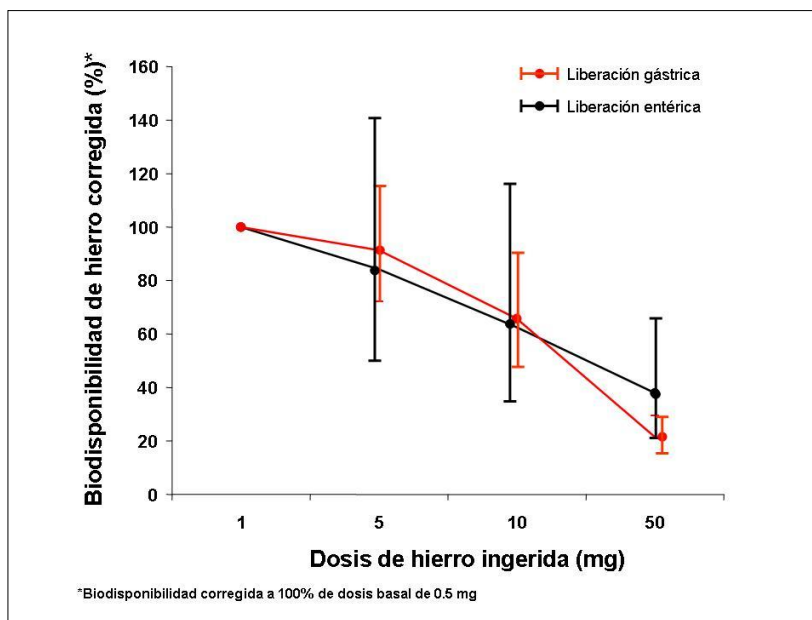


Figura 3: Competencia del hierro ferritínico con Fe no-hem (FeSO_4) por la vía de absorción del hierro no hemínico: Efecto de liberación a nivel gástrico y entérico.

Estos resultados se contraponen a la teoría de que la ferritina se absorbe por una vía propia y distinta a la del Fe no-Hem, sin embargo nuestra metodología no permite descartarlo ya que se ha demostrado, en experimentos celulares muy recientes, que la ferritina es capturada en forma intacta por el enterocito a través de un proceso de endocitosis (San Martín *et al.*, 2007), de todos modos, para aplicar esta información en humanos, es necesario realizar otros estudios.

Es por esto, que se propuso el segundo protocolo de biodisponibilidad de hierro ferritínico, el cual busca evaluar el efecto del ácido ascórbico, en dosis 4:1 molar respecto al hierro, en la

absorción de hierro ferritínico administrado tanto en cápsulas de liberación gástrica como entérica. Este estudio fue propuesto para poder descartar la absorción del hierro ferritínico por la vía del Fe no-Hem, ya que si el ácido ascórbico ejercía un efecto diferencial entre la absorción de lo gástrico y lo entérico, se demostraría que la ferritina era degradada a nivel gástrico liberando el hierro hacia el pool de Fe no-Hem y así el ácido ascórbico podría cumplir su función de reducir el hierro y favorecer su absorción. Los resultados de este estudio muestran que el promedio geométrico de absorción del hierro ferritínico solo liberado gástricamente fue de 38,8% y al ser administrado junto con ácido ascórbico, su absorción fue de 31,2% (t pareado de Student=1,58, N.S.). Sin embargo, la ferritina liberada a nivel entérico, presentó promedios geométricos de 32,5% cuando se ingirió sola y 43,3% cuando se administró junto a ácido ascórbico, diferencia significativa (t pareado de Student=2,43, $p<0,03$).

Al comparar las absorciones de hierro ferritínico solo liberado a nivel gástrico y entérico, no mostraron diferencias estadísticas (t pareado de Student=0,07, N.S.). Sin embargo, cuando fueron administrados en conjunto con ácido ascórbico, la absorción de la ferritina liberada a nivel entérico fue significativamente mayor que la absorción de la ferritina liberada a nivel gástrico (t pareado de Student=2,52 $p<0,03$). Una posible explicación a esta diferencia de comportamiento de la absorción a nivel gástrico y entérico, es que la interacción entre el ácido ascórbico y el hierro de la ferritina a nivel entérico, se produjo más próxima al enterocito, y así pudo cumplir con mayor eficiencia su función de “protector del estado reducido del hierro”, forma principal de absorción. Si bien existe esta suposición, también podemos especular si la cantidad de ácido ascórbico era la correcta para lograr resistir el proceso de digestión y ejercer su efecto favorecedor de la absorción de hierro. La cantidad de ácido ascórbico probablemente era muy pequeña (6,3 mg) y fue afectada por acción tanto de los ácidos como de las enzimas propias del ambiente gástrico, además de ser afectada por un efecto de dilución lo que provocaría que las moléculas de ácido ascórbico no logran ponerse en contacto con el hierro y las pocas que lo hicieran no podrían ejercer su función favorecedora de la absorción de hierro.

No existen estudios de biodisponibilidad que determinen si la absorción de ferritina se ve afectada por factores dietarios, como por ejemplo polifenoles, fitatos o taninos que sí afectan la absorción de Fe no-Hem, sin embargo existen otro tipo de estudios que dicen que la estructura proteica de la ferritina, protege al hierro mineralizado en su interior, de agentes inhibidores en

los alimentos como son los fitatos, oxalatos y taninos (Theil, 2004). De esta manera, se especula que la ferritina podría ser utilizada exitosamente en la fortificación de alimentos, ya que representa una forma de hierro altamente biodisponible para los seres humanos y que además no pareciera interferir en las características organolépticas de los alimentos a fortificar, como ocurre, por ejemplo, con sales como el sulfato ferroso que no pueden ser utilizadas en la mayoría de los alimentos porque causan rancidez (oxidación) y decoloración en ellos (Hurrell, 2002). Es más, algunos estudios sobre biodisponibilidad de hierro ferritínico, tanto en animales como en humanos (Beard *et al.*, 1996; Murray-Kolb *et al.*, 2002; Murray-Kolb *et al.*, 2003; Ramakrishnan *et al.*, 2002), han demostrado que diferentes formas de hierro dietario, ya sea como FeSO₄, ferritina de bazo de equino o ferritina de poroto de soya, son igualmente efectivas corrigiendo la anemia por deficiencia de hierro (Beard *et al.*, 1996). Otro estudio acerca de la biodisponibilidad de hierro ferritínico en humanos, usando ferritina purificada a la cual se le extrajo el hierro de su interior y fue reemplazado por ⁵⁹Fe *in vitro* bajo condiciones conocidas, nuevamente se evidenciaron biodisponibilidades de entre 21% a 27%, indistinguibles de las correspondientes al FeSO₄ (Theil, 2004). Las biodisponibilidades obtenidas en ambos estudios realizados en esta tesis, también estarían muy cercanos a estos valores.

La ferritina es una fuente alternativa y natural de hierro dietario para los humanos, que ha sido subutilizada en los estudios y planes de suplementación. Quedan varias interrogantes para el futuro: ¿Cuánta ferritina está presente en los alimentos?, ¿Cuán biodisponible es esta ferritina?, ¿Pueden alimentos enriquecidos con ferritina ser consumidos en cantidades suficientes que logren minimizar la deficiencia de hierro dietaria?, ¿Existen suficientes variantes en los tipos de alimentos enriquecidos con ferritina con alta aceptabilidad que logran un impacto importante en la deficiencia de hierro mundial?

La expansión y uso del conocimiento sobre la química y bioquímica de diferentes formas de Fe no-Hem en los alimentos son cruciales. Alternativas de suplementos de hierro y de dietas, son necesarias para desarrollar y resolver el problema de la deficiencia de hierro. Una novedosa alternativa de hierro dietario, con un enorme potencial para contribuir con la erradicación mundial de la deficiencia de hierro en el siglo XXI, podría ser la ferritina.

Conclusión

- Se rechaza la hipótesis de que la absorción de la dosis basal de hierro ferritínico no se modifica por efecto de dosis crecientes de sulfato ferroso, lo que demuestra que la ferritina se absorbe por la vía del Fe no-hem.
- Se rechaza la hipótesis de que el ácido ascórbico tiene un efecto favorecedor de la absorción de hierro ferritínico a nivel gástrico. La cantidad de ácido ascórbico administrado no fue lo suficiente para promover la biodisponibilidad de la ferritina.
- Se rechaza la hipótesis de que el ácido ascórbico no tiene un efecto favorecedor de la absorción de hierro ferritínico a nivel intestinal. Por tanto, la ferritina utiliza la misma vía de absorción que el Fe no-hem.
- Estos resultados sugieren que el hierro ferritínico tiene una alta absorción cuando es administrado sin alimentos por tanto podría ser utilizado como suplemento en la prevención o tratamiento de la deficiencia de hierro.
- El hecho de que no tenga una vía propia de absorción no invalida que sea utilizado como fuente biológica de fortificación. Se requiere más investigación en esta área.

Anexo 1: Consentimiento de participación en el Proyecto “Ferritina, una potencial tercera vía de absorción del hierro: estudios celulares y de biodisponibilidad en humanos”

FONDECYT N° 1050068 Inv. Principal Tomas Walter

1. INFORMACION SOBRE EL ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

1.1. ¿Cuál es el propósito del estudio?

El hierro dietario es en su mayoría de origen inorgánico (sales de hierro). Un 10% aproximadamente viene de la hemoglobina de la carne. Cada uno tiene un mecanismo de absorción independiente y no competitivo. Otra fuente de hierro de la dieta es la ferritina, una proteína que contiene grandes cantidades de hierro en su interior, y se absorbe bien, pero su mecanismo de absorción no se conoce. Podría tratarse de otra forma de absorción, pues la ferritina es resistente a la digestión por el ácido del estómago. Este estudio pretende aclarar el mecanismo de absorción con estudios en células aisladas y en el humano.

1.2. ¿Quién puede participar en este estudio?

Pueden participar mujeres sanas de entre 35 a 45 años de edad.

1.3. ¿Por qué debiera yo considerar mi participación como sujeto de investigación en este estudio?

Este estudio permitirá conocer cuales son los mecanismos que controlan la absorción del hierro ferritínico, de tal modo de mejorar las recomendaciones de ingesta de ciertos tipos de alimentos.

1.4. ¿Tengo necesariamente que participar en este estudio? ¿Si acepto participar, puedo cambiar de opinión o retirarme?

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.

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

Usted concurrirá en ayunas al INTA 5 mañanas (días 1, 2, 14, 15 y 28). Los días 1, 2, 14 y 15 usted recibirá 50 mL de agua que contiene una pequeña cantidad de un isótopo radioactivo de hierro más hierro en cantidades que variarán entre 0,5 a 75 mg. Después de recibido el hierro usted deberá permanecer 3 horas solo con agua. En dos oportunidades se les extraerá una muestra de sangre de una vena del brazo: una de 30 mL (6 cucharaditas de té), 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 (4 cucharaditas de té) para medir la absorción de hierro.

1.6. ¿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. Las dosis de radioactividad que recibirá es menor a tomarse una radiografía de tórax. Además, se seleccionarán a las mujeres que estén con algún método anticonceptivo y se les realizará un test de embarazo a fin de no incluir personas embarazadas. En caso de fallar el método anticonceptivo y la participante quedara embarazada, las dosis utilizadas no constituyen ningún riesgo para el feto y la madre.

En el sitio de punción de la vena pudiera aparecer en algún caso un moretón. Para disminuir este riesgo la muestra será tomada por un profesional Tecnólogo Médico de mucha experiencia en tomar muestras de sangre.

1.7. ¿Qué harán los investigadores para asegurar que la información que recolectarán sobre mi, 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.

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

A través de la muestra de sangre le haremos varios exámenes de laboratorio que nos permitirá saber si Ud. tiene anemia por deficiencia de hierro. En el caso de presentar anemia se le derivará a su centro de salud o médico personal para su tratamiento.

1.9. ¿En qué podría este estudio beneficiar a otros?

Los resultados del estudio permitirán mejorar la recomendación de consumo de alimentos, lo que contribuirá a una mejor salud de nuestra población.

1.10. ¿Qué harán los investigadores si sufro algún daño durante el estudio?

No se espera que usted sufra ningún daño, salvo la posibilidad de un moretón en el sitio de punción de la vena, en cuyo caso se le dará las indicaciones médicas correspondientes.

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

Usted recibirá una compensación por los gastos de locomoción y tiempo ocupado en el proyecto.

1.12. ¿Se me 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.

1.13. ¿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 al Prof. Fernando Pizarro o Dr. Tomás Walter, INTA, Macul 5540, Fono 978-1480 ó 1481.

1.14. ¿Si decido no participar en este estudio, que me puede suceder, o que otras opciones tengo si necesito tratamiento?

No le sucederá nada. Las opciones de tratamiento serán las mismas que usa ahora.

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.

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 2: Protocolo recubrimiento entérico

Se hicieron múltiples ensayos para llegar a la forma óptima de realizar el recubrimiento, utilizando como criterio de éxito que el 100% de las cápsulas recubiertas tuvieran resistencia gástrica en solución de pepsina 0,04% en HCl 0,1 M, al ser sumergidas 2 horas a 37°C con agitación constante a 125 rpm, y se desintegraran en condiciones intestinales en solución de extracto de bilis al 1,2%/pancreatina al 0,2%/NaHCO₃ 0,1 M, en menos de 8 minutos. Finalmente, cumpliendo todos los requisitos, se llegó al siguiente protocolo:

A. Preparación de la solución de recubrimiento (40 g)

- 1) Se prepara una solución de polietilenglicol 6000 (PEG 6000) al 35% agregando 13,6 g de agua a 6,4 g de PEG 6000 con agitación constante. La solución es estable.
- 2) Mezclar 3 g de PEG al 32% y 16,68 g de agua destilada. Esta solución se agrega muy despacio y con agitación constante a 20,32 g de Eugragit L30 D55 al 30%. Se prepara solución nueva cada vez que se recubre un lote de cápsulas.

B. Recubrimiento de las cápsulas

- 1) Se utiliza una caja Petri (9-12 cm de diámetro) para el recubrimiento. Se agrega un volumen de solución de recubrimiento que alcance a formar 0,5 cm de altura.
- 2) Manteniendo la caja Petri en ángulo, con la ayuda de una pinza anatómica se sumerge la cápsula en la solución durante 2-3 segundos.
- 3) Cuidando de no hacer demasiada presión, se toma la cápsula con la pinza y se coloca en un vidrio de reloj, el cual se gira con movimientos cortos y precisos procurando que se forme un recubrimiento uniforme sobre la cápsula.
- 4) Cuando se ha eliminado el exceso de líquido, la cápsula es traspasada a una caja Petri limpia, para el secado del recubrimiento. Se utiliza una fuente de aire frío que llegue de forma indirecta a la cápsula.
- 5) Una vez seca, se procede de inmediato con la segunda capa de recubrimiento, repitiendo los pasos 2, 3 y 4. Esta operación se repita hasta lograr 4 recubrimientos por cápsula.

Anexo 3: Protocolo carga de ferritina con isótopos de hierro

Se hicieron múltiples ensayos para llegar a la forma más eficiente de realizar el marcaje intrínseco de la ferritina con isótopos de hierro, y se logró el siguiente protocolo.

En un vaso precipitado de 60 mL, agregar 47,4 mL de MOPS – NaCl 0,1 M más 600 uL de ferritina de bazo de equino (Solución A). A esta solución, agregar Solución B, la que esta compuesta por 0,86 mL de Solución C + 100 uL de ^{55}Fe o ^{59}Fe a una concentración de 3 mCi/mL (Solución C: 1,3333 g de FeSO_4 en 86 mL de HCl 0,001 N). Incubar 2 horas a temperatura ambiente tapado con parafilm. Luego, agregar 2,4 mL de DTPA 20 mM con lo que quedará una concentración final de 1 mM, esta reacción se debe dejar máximo 10 minutos. Terminado este proceso, la solución se debe someter a diálisis; a un vaso precipitado de 2 Lt agregar aproximadamente 1,5 Lt de buffer PBS 1X frío. Cortar las membranas de diálisis (punto de corte 6000-8000 Da) de una longitud de 40 a 50 cm aproximadamente, cerrarla herméticamente en un extremo y sumergirla en el buffer PBS 2 a 5 minutos y con un gotario se extrae la solución de ferritina del vaso precipitado y se traspasa a la bolsa de diálisis. Cerrar el extremo libre y sumergir la bolsa de diálisis procurando que el buffer PBS la cubra en su totalidad. Dejar dializando durante 1 hora en frío y con agitación constante. Hacer dos cambios de buffer de una hora cada uno.

Anexo 4: Técnica de doble marcaje isotópico de Eakins y Brown

I. Etapa: Digestión

a) Estándares: los estándares con que trabajamos en los estudios consistieron en triplicados de las cápsulas usadas en cada uno de ellos. Así, la primera semana del estudio se obtenían seis cápsulas estándares, tres que correspondían a ^{55}Fe y tres a ^{59}Fe , y de esta misma forma ocurría en la segunda semana de estudio.

b) 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 y se colocaron 6 a 8 perlas de vidrio de 5 mm de diámetro y se le agregó primero 3 mL de ácido sulfúrico al 95-97% p.a. (Merck, Germany) y luego 2 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:

- 95°C por 10 minutos
- 135°C por 5 minutos
- 150°C por 5 minutos
- 200°C por 10 minutos
- 250°C por 10 minutos
- 290°C por 15 minutos y se apagó (muestra color petróleo).

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 fumarante 37% p.a. (Merck, Germany).

II. Etapa: Precipitación 1

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

$$\text{mg de Fe que tiene la muestra} = \frac{\text{Hb} \times 3,39 \times \text{volumen de sangre}}{100}$$

$$\text{mL de carrier} = \frac{5 - \text{mg de Fe de la muestra}}{5 \text{ mg de Fe/mL } \left(\text{Concentración Carrier} \right)}$$

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 1 N.

III. Etapa: 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 enérgicamente con pizeta la 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.

IV. Etapa: 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 vortex. 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 vortex para luego ser trasvasiados al vial. Finalmente, cada vial fue agitado en vortex 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.

Bibliografía

- **AISEN, P.** 1988. Related iron metabolism in isolated liver cells. *Ann N Y Acad Sci.* 526:93-100.

- **ANDREWS, S.; ROBINSON, A.; RODRIGUEZ-QUINONES, F.** 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev.* 27:215-37.

- **ARREDONDO, M.; KLOOSTERMAN, J.; NÚÑEZ, S.; SEGOVIA, F.; CANDIA, V.; OLIVARES, M.; PIZARRO, F.** 2007. Heme-iron uptake by Caco-2 cells is a saturable and protein-mediated process. *Am J Physiol.* (enviado).

- **BEARD, J.; BURTON, J.; THEIL, E.** 1996. Purified ferritin and soybean meal can be sources of iron for treating iron deficiency in rats. *J Nutr.* 126:154-60.

- **BERTRAM, K.** 1994. *Farmacología básica y clínica.* 5a ed. El Manual Moderno, S.A. de C.V. México DF, México. 563-568.

- **BJORN-RASMUSSEN, E.; HALLBERG, L.; ISAKSSON, B.; ARVIDSSON, B.** 1974. Food iron absorption in man. Application of the two-pool extrinsic tag method to measure hemo and non-hem iron absorption. *J Clin Invest.* 53:247-56.

- **BLACK, R.** 2003. Micronutrient deficiency – an underlying cause for morbidity and mortality. *Bull World Health Organ.* 81:79.

- **BRIAT, J.; LOBREAUX, S.** 1998. Iron storage and ferritin in plants. *Met Ions Biol Syst.* 35:563-83.

- **CALLENDER, S.; MALLETT, B.; SMITH, MD.** 1957. Absorption of hemoglobin iron. *Brit J Haemat.* 3:186-192.

- **CASE, L.; CAREY, D.; HIRAKAWA, D.** 1997. *Nutrición canina y felina: manual para profesionales.* Harcourt Brace. Madrid, España. 48-49.

- **CONRAD, M.; UMBREIT, J.; MOORE, E.; HAINSHWORTH, L.; PORUBCIN, M.; SIMOVICH, M.; NAKADA, M.; DOLAN, K.; GARRICK, M.** 2000. Separate pathways for

cellular uptake of ferric and ferrous iron. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 279(4):767-74.

- **CONRAD, M.; UMBREIT J.** 2002. Pathways of iron absorption. *Blood Cells Mol Dis.* 29(3):336-55.

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

- **COOK, J.** 1990. Adaptation in iron metabolism. *Am J Clin Nutr.* 51:301-8.

- **COOK, J.; SKIKNE, B.; BAYNES, R.** 1994. Iron deficiency: the global perspective. (Abstract). *Adv Exp Med Biol.* 356:219-28.

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

- **DARNTON-HILL, I.; COYNE, E.** 1998. Feast and famine: socioeconomic disparities in global nutrition and health. *Public Health Nutr.* 1(1):23-31.

- **DARNTON-HILL, I.; WEB, P.; HARVEY, P.; HUNT, J.; DALMIYA, N.; CHOPRA, M.; BALL, M.; BLOEM, M.; DE BENOIST, B.** 2005. Micronutrient deficiencies and gender: social and economics costs. *Am J Clin Nutr.* 81:1198-1199.

- **DAVILA-HICKS, P.; THEIL, E.; LONNERDAL, B.** 2004. Iron in ferritin or in salts (ferrous sulfate) is equally bioavailable in nonanemic women. *Am J Clin Nutr.* 80: 936-940.

- **DERMAN, D.; BOTHWELL, T.; TORRANCE, J.; MACPHAIL, A.; BEZWODA, W.; CHARLTON, R.; MAYET, F.** 1982. Iron absorption from ferritin and ferric hydroxide. *Scand J Haematol.* 29:18-24.

- **DIAZ, JR.; DE LAS CAGIGAS, A.; RODRIGUEZ, R.** 2003. Micronutrient deficiencies in developing and affluent countries. *Eur J Clin Nutr.* (57):70-2.

- **DISLER, P.; LYNCH, S.; CHARLTON, R.; TORRANCE, J.; BOTHWELL, T.; WALKER, R.; MAYET, F.** 1975. The effect of tea on iron absorption. *Gut.* 16:193-200.

- **DONOVAN, A.; BROWNLIE, A.; ZHOU, Y.; SHEPARD, J.; PRATT, S.; MOYNIHAN J.; PAW, BH.; 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(7):391-7.

- **FERRAZ, I.; DANELUZZI, J.; VANNUCCHI, H.; JORDAO JR, A.; RICCO, R.; DEL CIAMPO, L.; MARTINELLI JR, C.; D'ANGIO ENGELBERG, A.; BONILHA, L.; CUSTODIO, V.** 2005. Prevalence of iron deficiency and its association with vitamin A deficiency in preschool children. *J Pediatr.* 81(2):169-74.

- **FINCH, C.; HUEBERS, H.** 1988. Iron absorption. *Am J Clin Nutr.* 47:102-107.

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

- **FLANAGAN, P.** 1989. Mechanisms and regulation of intestinal uptake and transfer of iron. *Acta Paediatr Scand.* 361:21-30.

- **FLEMING, R.; BACON, B.** 2005. Orchestration of iron homeostasis. *N Engl J Med.* 352:1741-1744.

- **FORRELAT, M.; GAUTIER DU DEFAIX, H.; FERNANDEZ, H.** 2000. Metabolismo de hierro. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemter.* 16:149-160.

- **GROSBOIS, B.; DECAUX, O.; CADOR, B.; CAZALETS, C.; JEGO, P.** 2005. Human iron deficiency. (Abstract). *Bull Acad Natl Med.* 189(8):1649-63.

- **GUNSHIN, H.; MACKENZIE, H.; BERGER, U.; GUNSHIN, Y.; ROMERO, M.; BORON, W.; NUSSBERGER, S.; GALLAN, J.; HEDIGER, MA.** 1997. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature.* 388:482-488.

- **HALLBERG, L.; SÖLELL, L.** 1967. Absorption of hemoglobin iron in man. *Acta Med Scand.* 181:335-354.

- **HALLBERG, L.** 1981. Bioavailability of dietary iron in man. *Annu Rev Nutr.* 1:123-47.

- **HALLBERG, I.; ROSSANDER, I.; SKANBERG, A.** 1987. Phytates end the inhibitory effect of bran on iron absorption in man. *Am J Clin Nutr.* 45:988-996.

- **HARRISON, PM.** 1996. The ferritins: molecular properties, iron storage functions and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta.* 1275:161-203.

- **HURREL, R.; LYNCH, S.; TRINIDAD, T.; DASSENKO, S.; COOK, J.** 1989. Iron absorption in humans as influenced by bovine milk proteins. *Am J Clin Nutr.* 49:546-552.

- **HURREL, R.** 2002. Fortification: overcoming technical and practical barriers. *J Nutr.* 132:806-12.

- **LAVOIE, D.; ISHIKAWA, K.; LISTOWSKY, I.** 1978. Correlations between subunit distribution, microheterogeneity and iron content of human liver ferritin. *Biochemistry.* 17:5448-54.

- **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.

- **LAYRISSE, M.; MARTINEZ-TORRES, C.; RENZY, M.; LEETS, I.** 1975. Ferritin iron absorption in man. *Blood.* 45(5):689-698.

- **LAYRISSE, M.; MARTINEZ-TORRES, C.; LEETS, I.; TAYLOR, P.; RAMIREZ, J.** 1984. Effect of histidine, cysteine, glutathione or beef on iron absorption in humans. *Brit J Nutr.* 52:37-46.

- **LEVI, S.; CORSI, B.; BOSISIO, M.; INVERNIZZI, R.; VOLZ, A.; SANFORD, D.; AROSIO, P.; DRYSDALE, J.** 2001. A human mitochondrial ferritin encoded by an intronless gene. *J Biol Chem.* 276:24437-40.

- **LUCCA, P.; HURRELL, R.; POTRYKUS, I.** 2002. Fighting iron deficiency anemia with iron-rich rice. *J Am Coll Nutr.* 21:184-190.

- **LYNCH, S.; DASSENKO, S.; BEARD, J.; COOK, J.** 1984. Iron absorption from legumes in humans. *Am J Clin Nutr.* 40:42-47.

- **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.

- **MILLWARD, DJ.; JACKSON, AA.** 2004. Protein/energy ratio of current diets in developed and developing countries compared with a safe protein/energy ratio: implications for recommended protein and amino acid intakes. *Public Health Nutr.* (7): 387-405.

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

- **MÜLLER, O.; KRAWINKEL, M.** 2005. Malnutrition and health in developing countries. *Canadian Medical Association Journal.* 173(3):279-286.

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

- **MURRAY-KOLB, L.; THEIL, E.; TAKAIWA, F.; GOTO, F.; YOSHIHARA, T.; BEARD, J.** 2002. Transgenic rice as a source of iron for iron-depleted rats. *J Nutr.* 132:957-60.

- **MURRAY-KOLB, L.; WELCH, R.; THEIL, E.; BEARD, J.** 2003. Woman with low iron stores absorb iron from soybeans. *Am J Clin Nutr.* 77:180-84.

- **NADLER, S.; HIDALGO, I.; BLOCK, T.** 1962. The Tulane table of blood volume in normal man. *Surgeon.* 51: 224-232.

- **OLIVARES, M.** 1995. Clinical nutrition of the young child: Nutricional Anemias. Raven Press\Nestlé. New York, USA. 29: 561-575.

- **PHILPOTT, C.** 2002. Molecular aspects of iron absorption: insights into the role of HFE in hemochromatosis. *Hepatology.* 35:993-1001.

- **PIZARRO, F.; OLIVARES, M.; HERTRAMPF, E.; WALTER, T.** 1994. Factores que modifican el estado de nutrición de hierro: contenido de taninos de infusiones de hierbas. *Arch Latinoam Nutr.* 44:277-280.

- **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 población de Santiago. *Rev Chil Nutr.* 32(1):19-27.

- **RAFFIN, S.; WOO, C.; ROOST, K.; PRICE, D.; SCHMID, R.** 1974. Intestinal absorption of hemoglobin heme iron cleavage by mucosal heme oxygenase. *J Clin Invest.* 54:1344-1352.

- **RAMAKRISHNAN, U.; FRITH-TERHUNE, A.; COGSWELL, M.; KETTLE KHAN, L.** 2002. Dietary intake does not account for differences in low iron stores among Mexican, American and non-Hispanic white women: Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *J Nutr.* 132:996-1001.

- **ROHRER, J.; MIN-SOO JOO.; DARTYGE, E.; SAYERS, D.; FONTAINE, A.; THEIL, E.** 1987. Stabilization of iron in a ferrous form by ferritin. *J Biol Chem.* 262(28):13385-13387.

- **RONCAGLIOLO, M.; GARRIDO, M.; WALTER, T.; PEIRANO, P.; LOZOFF, B.** 1998. Evidence of altered central nervous system development in infants with iron deficiency anemia at 6 mo: delayed maturation of auditory brainstem responses. *Am J Nutr.* 68:683-90.

- **SAN MARTIN, C.; GARRI, C.; PIZARRO, F.; WALTER, T.; THEIL, E.; NUÑEZ, T.** 2007. Intestinal epithelia (Caco-2) cells absorb soybean ferritin by clathrin-dependent endocytosis. *J Nutr.* (enviado).

- **SANTANA, M.; PIHAKASKI-MAUNSBACH, K.; SANDAL, N.; MARCKER, K.; SMITH, A.** 1998. Evidence that the plant host synthesizes the heme moiety of leghemoglobin in root nodules. *Plant Physiol.* 116(4):1259-69.

- **SAYERS, M.; LYNCH, S.; JACOBS, P.; CHARLTON, R.; BOTHWELL, T.; WALKER, R.; MAYET, F.** 1973. The effects of ascorbic acid supplementation on the absorption iron in maize, wheat and soya. *Br J Haematol.* 24:209-19.

- **SCHOFIELD, C.; ASHWORTH, A.** 1996. Why have mortality rates for severe malnutrition remained so high?. *Bull World Health Organ.* (74):223-9.

- **SECKBACK, J.** 1982. Ferreting out of the secrets of plant ferritin. *J Plant Nutr.* 5:369-94.

- **SINGH, R.; SHAW, J.; ZIMMET, P.** 2004. Epidemiology of childhood type 2 diabetes in the developing world. *Pediatr Diabetes.* 5(3):154-68.

- **STEKEL, A.; OLIVARES, M.; PIZARRO, F.; AMAR, M.; CHADUD, P.; CAYAZZO, M.; LLAGUNO, S.; VEGA, V.; HERTRAMPF, E.** 1985. The role of ascorbic acid in the bioavailability of iron from infant foods. *Int J Vitaminol Nutr Res.* (27):167-175.

- **SUHARNO, D.; MUHILAL.** 1996. Vitamin A and nutritional anaemia. *Food Nutr Bull.* 17(1):7-10.

- **SWENSEN, A.; HARNACK, L.; ROSS, J.** 2001. Nutritional assessment of pregnant women enrolled in the Special Supplemental Program for Women, Infants and Children (WIC). *J Am Diet Assoc.* 101:903-8.

- **THEIL, E.** 2003. Metal-binding proteins and trace element metabolism. Ferritin: at the crossroads of iron and oxygen metabolism. *J Nutr.* 133:1549-53.

- **THEIL, E.** 2004. Iron, Ferritin, and Nutrition. *Annu. Rev. Nutr.* 24: 327-343.

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

- **VASQUEZ, E.** 2003. La anemia en la infancia. *Pan Am J Public Health.* 13(6):349-351.

- **VULPE, C.; KUO, Y.; MURPHY, T.; CWLEY, L.; ASKWITH, C.; LIBINA, N.; GITSCHIER, J.; ANDERSON, G.** 1999. Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nat Genet.* 21:195-199.

- **WEINTRAUB, LB.; WEINSTEIN, MB.; HUSER, H.; RAFAL, S.** 1968. Absorption of hemoglobin iron: the role of a heme-splitting substance in the intestinal mucosa. *J Clin Invest.* 47:531-539.

- **WHITTAKER, G.; KANN, M.; HELENIUS, A.** 2000. Viral entry into the nucleus. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 16:627-51.

- **WORLD HEALTH ORGANIZATION.** 2004. Assesing the iron status of populations. [en línea]. <http://whqlibdoc.who.int/publications/2004/9241593156_eng.pdf>. [consulta: 09-03-2007].

- **WORLD HEALTH ORGANIZATION.** 2007. Micronutrient deficiencies. [en línea]. <<http://www.who.int/nutrition/topics/ida/en/print.html>>. [consulta: 09-03-2007].