



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EFEECTO DEL COBRE SOBRE LA ABSORCIÓN DE  
HIERRO EN HUMANOS**

**ALEJANDRA YANETH MARTÍN MUÑOZ**

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

**PROFESOR GUIA: DR. MANUEL OLIVARES G.**

SANTIAGO, CHILE  
2010



# UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

## EFFECTO DEL COBRE SOBRE LA ABSORCIÓN DE HIERRO EN HUMANOS

ALEJANDRA YANETH MARTÍN MUÑOZ

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

NOTA FINAL: .....

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUIA : MANUEL OLIVARES GROHNERT	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO : JUAN IGNACIO EGAÑA MORENO	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO : HÉCTOR ADARMES AHUMADA	.....	.....

SANTIAGO, CHILE  
2010

## **Dedicatoria**

Para ti viejito hermoso...

# Índice

<b>Índice</b> .....	1
<b>Resumen</b> .....	2
<b>Introducción</b> .....	3
<b>Abstract</b> .....	4
<b>Revisión Bibliográfica</b> .....	5
Marco Teórico.....	5
El Hierro.....	8
El Cobre.....	12
<b>Hipótesis, Objetivo general y específico</b> .....	14
<b>Materiales y Métodos</b> .....	15
<b>Resultados</b> .....	25
<b>Discusión</b> .....	37
<b>Conclusión</b> .....	39
<b>Anexo 1: Consentimiento informado</b> .....	40
<b>Anexo 2: Técnica de doble marcaje isotópico de Eakins y Brown</b> .....	44
<b>Bibliografía</b> .....	47

## **Introducción**

Las deficiencias de microminerales, tales como hierro (Fe) y en menor grado cobre (Cu), constituyen uno de los problemas de nutrición y salud pública más significativos que afectan a los países en vías de desarrollo. En Chile, la magnitud del problema es menor que en otros países de América Latina, pero aún representa una preocupación desde el punto de vista de la salud pública.

La fortificación de alimentos y la suplementación son las principales estrategias utilizadas para prevenir las deficiencias de microminerales. Sin embargo, aún falta por determinar los niveles de estos metales y sus relaciones molares óptimas en alimentos fortificados y en suplementos medicinales que minimicen el riesgo de interacciones negativas entre sí y con otros minerales.

Esta información será útil para mejorar los actuales programas de fortificación/suplementación y/o para desarrollar nuevas intervenciones dirigidas para combatir las deficiencias nutricionales. Este estudio se centrará en los efectos del Cu sobre la absorción de Fe considerando la alta prevalencia que tiene la deficiencia de Fe a nivel mundial y el que todavía constituye en nuestro país un problema relevante de salud en la mujer en edad fértil. En la literatura no existen estudios que determinen si el Cu tiene un efecto inhibitorio sobre la biodisponibilidad de Fe en humanos; y cuál es la curva de dosis respuesta.

## Resumen

Para medir el efecto de la administración de Cu en solución acuosa sobre la absorción de Fe, participaron 29 mujeres adultas y saludables en 2 estudios de absorción de Fe.

Los sujetos recibieron 0.5 mg de Fe, como sulfato ferroso, sólo o combinado con Cu, como sulfato cúprico. Esto en proporciones molares Fe:Cu de 0,5:1; 1:1 ó 2:1 (estudio A) ó en proporciones molares Fe:Cu de 4:1, 6:1 ó 8:1 (estudio B). La administración se hizo como solución acuosa en los días 1, 2, 14 y 15 del estudio. La absorción de Fe fue valorada mediante la incorporación de los radioisótopos de Fe,  $^{55}\text{Fe}$  y  $^{59}\text{Fe}$ .

El promedio geométrico y rango  $\pm 1$  DE de la absorción de Fe solo y en proporciones molares Fe:Cu 0,5:1, 1:1 ó 2:1 fue de 34,4% (17,3%- 68,5%), 40,9% (24,9%-67,2%), 48,3% (24,8%-94,1%) y 50,2% (25,3%-99,5%), respectivamente (ANDEVA,  $p=0,12$ ). El promedio geométrico de la absorción de Fe solo o en proporciones molares Fe:Cu de 4:1, 6:1, 8:1 Cu:Fe fue de 28,7% (12,1%-67,9%), 21,5% (6,5%-71,5%), 29,6% (10,3%-85,4%) y 36,5% (18,3%-73,1%), respectivamente (ANDEVA,  $p=0,16$ ).

En conclusión la administración combinada de Fe y Cu en solución acuosa no inhibe la biodisponibilidad de Fe. Esta información podría ayudar en el diseño de guías racionales para los programas de suplementación con Fe y Cu.

Nuestros resultados sostienen la hipótesis que el DMT1 no es fisiológicamente relevante para la absorción de Cu en humanos.

## Abstract

To measure the effect of acute copper (Cu) administration, given as an aqueous solution, on the absorption of iron (Fe), twenty-nine healthy adult women participated in 2 iron absorption studies. Subjects received 0.5 mg of Fe, as ferrous sulfate, alone or with Cu, as copper sulfate, at 0.5:1, 1:1 or 2:1 Cu:Fe molar ratios (Study A) or at 4:1, 6:1 or 8:1 Cu:Fe molar ratios (Study B) as an aqueous solution on days 1, 2, 14 and 15 of the study. Fe absorption was assessed by erythrocyte incorporation of iron radioisotopes <sup>55</sup>Fe and <sup>59</sup>Fe. Geometric mean (range ± 1 SD) absorption of Fe alone or at 0.5:1, 1:1, 2:1 Cu:Fe molar ratios was 34.4% (17.3%-68.5%), 40.9% (24.9%-67.2%), 48.3% (24.8%-94.1%) and 50.2% (25.3%-99.5%), respectively (ANOVA, p=0.12). Geometric mean (range ± SD) absorption of Fe alone or at 4:1, 6:1, 8:1 Cu:Fe molar ratios was 28.7% (12.1%-67.9%), 21.5% (6.5%-71.5%), 29.6% (10.3%-85.4%) and 36.5% (18.3%-73.1%), respectively (ANOVA, p=0.16). In conclusion, combined Cu and Fe administration in an aqueous solution does not inhibit Fe bioavailability.

This information could help in the design of rational guidelines for copper and iron supplementation programs. Our results support the hypothesis that DMT1 is not physiologically relevant for copper absorption in humans.

## Revisión Bibliográfica

### Marco Teórico

Las deficiencias de microminerales, tales como Fe y Cu, constituyen uno de los problemas de nutrición y salud pública más significativos que afectan a los países en vías de desarrollo y algunos grupos poblacionales de los países desarrollados. El Fe y Cu poseen importantes funciones en el organismo. El primero, participa en procesos tales como transporte y almacenamiento de oxígeno, fosforilación oxidativa, metabolismo de neurotransmisores y síntesis del DNA (Bothwell *et al.*, 1979). El Cu es cofactor de varias enzimas que participan en procesos tales como transporte de electrones, dismutación de superóxidos, síntesis de melanina, entrecruzamiento del colágeno y elastina, síntesis de neurotransmisores y oxidación del hierro (Olivares, 1995)

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, pudiendo ser considerado 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 baja ingesta 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, que ocurre cuando los niveles de este 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 en el 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 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).

La deficiencia de Cu se ha descrito principalmente en niños desnutridos y niños alimentados con dietas predominantemente basadas en leches no fortificadas, especialmente si son prematuros o presentan diarreas a repetición (Olivares, 1995).

Las principales causas de las carencias de Fe y Cu, son: reducidos depósitos al nacer (prematuridad, bajo peso de nacimiento), aporte inadecuado (deficiencia y/o baja disponibilidad de estos microminerales de la dieta), aumento de los requerimientos (crecimiento, embarazo) y pérdidas aumentadas (Olivares, 1995).

## **El Hierro**

El Fe es absorbido preferentemente a nivel del duodeno, siendo el ingreso del Fe al enterocito mediado por una serie de receptores y proteínas ligantes de alta afinidad.

El Fe se absorbe por dos vías, la del Fe no-hem y del Fe hem. El Fe no-hem en el lumen intestinal, es transferido a transportadores que se ubican en la superficie luminal del enterocito. El Fe no-hem dietario es reducido en el borde de la vellosidad intestinal por la enzima citocromo duodenal b (Dcytb) de Fe+3 a Fe+2 (McKie et al, 2001), siendo luego captado por el transportador de metales bivalentes (DMT1) que lo internaliza a la célula. Existe una vía de absorción de Fe+3 mediada por las proteínas mobilferrina y  $\beta$ 3-integrina las que captan esta forma de Fe, lo internalizan y transportan al citosol del enterocito (Conrad y Umbreit, 2000). Desde allí el Fe puede ser transferido a la región basolateral donde es exportado a la circulación a través de la ferroportina 1 (FP1) y entregado a la apotransferrina plasmática previa oxidación de Fe+2 a Fe+3 por la hefestina (Vulpe et al, 1999), enzima homóloga a la ceruloplasmina oxidasa que transporta Cu en la sangre, o puede ser secuestrado por la ferritina (proteína citosólica, reservorio de Fe que puede contener hasta 4.500 átomos de Fe) que lo entrega según requerimientos del organismo o se pierde cuando la célula muere y se descama. El hem es incorporado intacto al enterocito por el transportador heme carrier protein 1 (HCP1) y en el compartimento microsomal es catabolizado por la hemo-oxigenasa que libera el hierro incorporándolo al pool de Fe del enterocito (Olivares, 1995), para posteriormente seguir los mismos pasos descritos para el Fe no-hem.

El proceso de absorción de Fe es controlado por factores intraluminales, de la mucosa y somáticos. Los factores intraluminales más importantes son el tipo de Fe y la presencia de favorecedores o inhibidores. Los factores de la mucosa son: la cantidad de su superficie y motilidad intestinal; y los factores somáticos incluyen: el estado de los depósitos de Fe, velocidad de la eritropoyesis y la hipoxia. Existe una relación inversa entre los depósitos de Fe y la absorción y una directa con la velocidad de la eritropoyesis y con la hipoxia. Varios factores afectan la absorción de Fe durante la fase luminal.

El Fe-hem es sólo afectado por proteínas animales que facilitan su absorción al proteger la molécula y por calcio que puede inhibir su absorción. En cambio, el Fe no-hem es influenciado por una gran cantidad de factores (Bothwell *et al*, 1979). Disminuyen la absorción de Fe la fibra, celulosa y pectina, ácido fítico, polifenoles y caseína (Hurrell *et al*, 1989). Favorecen la absorción del Fe no-hem el ácido ascórbico, compuestos derivados de la digestión de proteínas de carnes y alimentos fermentados (Olivares, 1995).

A nivel del enterocito, al igual que en las otras células, el Fe puede ingresar a través de la captura de transferrina circulante (Tf), facilitado por la proteína HFE, la que se asocia con el receptor de transferrina (TfR) y posiblemente con TfR2, facilitando la entrada de la Tf unida a Fe. Todas estas señales modulan intracelularmente, a través de una combinación de mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales, la actividad de la proteína celular reguladora de Fe (IRP) que determina el control de la traducción de Dcytb, DMT1, ferritina y FP1. Este proceso comanda que a nivel de las células de la cripta, sea detectado el Fe corporal, y el enterocito maduro quede programado para incrementar la absorción cuando existan bajos niveles corporales de Fe y disminuya la absorción en caso de existir niveles altos. El bloqueo transitorio de la mucosa para absorber Fe no-hem, después de una exposición a Fe, pareciera ser un mecanismo adicional, en el que existe una modulación de la función del DMT1 en el borde de la vellosidad intestinal y la redistribución de este transportador hacia compartimentos intracelulares (Oates *et al*, 2000). Hasta hace poco se estimaba que el mecanismo predominante de regulación de la absorción residía en este proceso que ocurría en la mucosa intestinal. Mas recientemente se ha visto que la FP1 sería el principal punto de regulación de la absorción de Fe dietario en respuesta a los requerimientos sistémicos, mientras que la regulación del transporte apical serviría de mecanismo de seguridad. La hepcidina, péptido producido en el hígado, produce una internalización y posterior degradación de la FP1, lo que lleva a una menor exportación de Fe y por ende a una menor transferencia a la Tf plasmática y a un aumento de la concentración del metal en el enterocito lo que, a su vez, conduciría a una inhibición de su captación apical consecuencia de la disminución de la expresión de DMT1.

La producción hepática de hepcidina estaría regulada por la saturación de Tf, estimándose que el RTF-2 hepático sensaría los niveles circulantes de Fe, de modo que cuando la relación Tf diférrica/RTf-2 aumenta, se induce la secreción de hepcidina.

Tienen un rol en la modulación de la producción de hepcidina la HFE y la hemojuvelina. También aumenta la producción de hepcidina la IL-6, mientras que la hipoxia y la anemia la reducen (Donovan *et al* ,2006).

**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 Cobre**

El Cu es absorbido predominantemente en el duodeno, donde en el enterocito es captado por el transportador hCTR1, que es específico para el Cu, y por DMT1, desde allí es llevado por chaperonas a los distintos compartimentos celulares, metaloproteínas y al transportador ATPasa 7A, que lo exporta al Cu por el lado basolateral. Desde allí el metal es llevado por vía portal unido a albúmina y transcupreína. Cualquier exceso de Cu que no sea exportado por el enterocito se une a la metalotioneína, la que actúa como una proteína intracelular ligante de metales (Arredondo y Nuñez, 2005). Se ha sugerido que esta proteína tendría un papel regulador de la absorción de Cu, sin embargo ello no ha sido demostrado.

La forma química en la que el Cu se encuentra en el lumen intestinal afecta marcadamente su absorción. A medida que la solubilidad es mayor la absorción es más eficiente. El pH gástrico tiene un papel importante al facilitar la solubilidad del Cu y al modular la interacción con ligandos y otros componentes del bolo dietario. Los factores que reducen la absorción de Cu reducen la solubilidad intraluminal de este mineral, y/o compiten con el transporte de cobre a través de la mucosa. Favorecen la absorción de Cu la proteína animal, leche humana y la histidina. Por el contrario tienen una acción inhibitoria la leche de vaca, fitatos, fructosa, ácido ascórbico, Zn, Fe, Ni y Mo (Lonnerdal, 1998).

El hígado es el órgano encargado de redistribuir el Cu. El cobre plasmático entra al hepatocito a través de los transportadores Ctr1 o DMT1. Una vez en el citosol y dependiendo de las necesidades de la célula, el Cu puede ser “almacenado” en la metalotioneína o ser distribuido por las distintas chaperonas (HAH1, Ccs, Cox17) hacia los distintos organelos o enzimas para su utilización, así como a la ATPasa 7B.

La ATPasa 7 B se localiza en aparato de Golgi donde participa en la vía secretora del Cu, en donde el metal es entregado a los lisosomas, para su posterior liberación al plasma unido a la ceruloplasmina o eliminación por los canalículos biliares.

Una fracción del Cu es almacenada en el hígado unido a la metalotioneína, superóxido dismutasa y otras proteínas ligantes. En el plasma alrededor de un 90-95% del Cu se encuentra unido firmemente a la ceruloplasmina, el 5-10% remanente se encuentra unido menos firmemente a la albúmina, transcupreína, y otros componentes de bajo peso molecular. Del cobre excretado por la bilis sólo un 10-15% de Cu es reabsorbido (Bertinato y L'abbe, 2004).

La homeostasis de Cu está fuertemente regulada por su absorción y excreción. A ingestas bajas, la absorción ocurre probablemente por un transporte activo saturable, mientras que a ingestas altas juega un papel la difusión pasiva. Los estudios isotópicos sugieren que la regulación de la absorción es el principal mecanismo de control cuando la ingesta de Cu es baja. En esta situación la fracción absorbida aumenta notablemente y las pérdidas endógenas se reducen. Por el contrario, cuando la ingesta es elevada la reducción de la fracción absorbida no previene totalmente la absorción de un exceso de Cu, siendo este exceso entonces eliminado aumentando las pérdidas endógenas. La absorción de Cu se adapta más rápido a una ingesta baja que ante una ingesta elevada de este mineral (Turnlund, 1998).

### **Efecto del Cu sobre la absorción de Fe**

Los metabolismos de Cu y Fe están íntimamente relacionados. Las cuproenzimas ceruloplasmina y hefestina juegan un rol importante en el metabolismo de Fe. La deficiencia de Cu produce en humanos una alteración de la utilización y movilización del Fe que determina una reducción de la síntesis de hemoglobina y a una anemia que no responde a la terapia con Fe.

Llama la atención que no se encuentren estudios sobre los efectos del Cu sobre la absorción de Fe en humanos. Recientemente se ha demostrado en células Caco-2 una reducción de la incorporación de Fe cuando se agregaron cantidades crecientes de Cu al medio (Arredondo et al, 2006).



## **Hipótesis**

1. El Cu inhibe la absorción de Fe cuando ambos minerales son administrados conjuntamente.

## **Objetivo General**

Determinar el efecto del Cu sobre la biodisponibilidad de Fe en humanos.

## **Objetivos Específicos**

1. Determinar si el Cu tiene un efecto inhibitorio sobre la biodisponibilidad de Fe en humanos.
2. Determinar la curva de dosis respuesta del Cu sobre la biodisponibilidad de Fe.
3. Determinar si la competencia entre el Fe y el Cu ocurre a nivel de un mecanismo que es saturable.

## **Materiales y Métodos**

### **Modelo de estudio**

Participaron 30 mujeres, clínicamente sanas. Estas no habían recibido ningún suplemento mineral en los últimos 6 meses y dado que se utilizaron isótopos radioactivos, estaban con un método anticonceptivo (dispositivo intrauterino, anticonceptivos orales, ligadura de trompas) y previo al estudio de absorción de Fe se les realizó un test de embarazo.

### Tamaño muestral:

Las causas de la variabilidad fisiológica o variación día a día que presenta la absorción de Fe en un mismo individuo (intra-sujeto) se asocian con cambios en la motilidad gastrointestinal y con las cantidades de secreción gástrica, pancreáticas o biliar. Sin embargo, es posible controlarla incluyendo grupos de entre 12 y 13 sujetos, con un mínimo de 8, por estudio de absorción. Por otro lado, considerando que postulamos encontrar diferencias de una desviación estándar en el mismo sujeto al comparado con su absorción basal, el n calculado para la prueba t de Student pareado es de 13 sujetos (error  $\alpha = 0.05$  y poder=90%). Se determinó estudiar grupos de 15 sujetos de modo de cubrir posibles pérdidas por rechazo a la ingesta; diarrea y/o vómito después de la ingesta.

### **Método**

Se cuantificó el Fe absorbido que es el utilizado efectivamente por los precursores eritroides, por lo que en rigor es una medida de la biodisponibilidad de Fe. Como trazadores de la absorción de Fe se utilizaron isótopos de Fe,  $^{55}\text{Fe}$  y  $^{59}\text{Fe}$  (NEN, Life Science Products, Inc., Boston, MA). Las dosis de isótopos administradas están autorizadas por la Comisión Chilena de Energía Nuclear.

La ingesta de los isótopos se realizó los días 1, 2, 14 y 15 y los días 14 y 28 se extrajo 30 y 20 ml de sangre respectivamente, ya que al día 14 se alcanzó un plateau en la absorción de Fe. Con 10 ml de sangre del día 14 se determinó el estado de nutrición de Fe de los sujetos: hemoglobina y volumen corpuscular medio (VCM) (Contador electrónico de células CELL-DYN 1700, ABBOTT Diagnostics, Abbott Park, IL), Fe sérico, capacidad total de fijación de Fe (TIBC) y % de saturación de la transferrina, protoporfirina libre eritrocitaria (ZP Hematofluorímetro Modelo 206D, AVIV Biomedical Inc., Lakewood, NJ) y ferritina sérica. El estado de nutrición de Cu se determinó a través de: Cu sérico (por absorción atómica, Perkin Elmer Model 2280, Norwalk, Conn.) y ceruloplasmina sérica por nefelometría (Array Protein System; Beckman Instruments Inc, Brea, CA). Con 20 ml de sangre de los días 14 y 28 se midió la radiactividad circulante (cpm/ml) según la técnica doble-isotópica de Eakins y Brown. Para el cálculo de la radiactividad ingerida se contaron sextuplicados de las soluciones marcadas con isótopos.

La biodisponibilidad del Fe se calculó a partir de duplicados de sangre de los sujetos, asumiendo que el 80% del Fe absorbido es destinado a la síntesis de hemoglobina de los eritrocitos circulantes. Se estimó la volemia utilizando las tablas de Tulane por sexo.

Las muestras fueron contadas el tiempo suficiente para tener un error menor al 3% en un contador de centelleo líquido (LS 5000 TD, Beckman Instruments, Fullerton, CA).

Las muestras de sangre y las ingestas de las soluciones se efectuaron luego de ayuno nocturno. Sólo después de 3 horas de administrada las soluciones fue permitida la ingesta de alimentos.

En los estudios de absorción de Fe se utilizaron dosis de Fe elemental, como sulfato ferroso, marcado con  $^{59}\text{Fe}$  o  $^{55}\text{Fe}$ . Las dosis de Cu elemental administradas, como sulfato de Cu, no fueron marcadas con isótopos. En el caso del Cu, para garantizar que los sujetos no vomitaran la solución a administrar, la dosis máxima fue de 4,55 mg, ya que se ha descrito que el umbral de aparición de náusea está en 4 mg y de vómitos en 8 mg.

## Tratamientos

Como no es conveniente administrar más de 4 dosis de isótopos a cada sujeto, los objetivos de este trabajo se determinaron mediante dos estudios de 15 sujetos cada uno.

### Estudio A

El día 1, los sujetos ingirieron 150 ml de una solución acuosa de 0,5 mg de Fe marcado con 1 uCi de  $^{59}\text{Fe}$ .

El día 2, los sujetos ingirieron 150 ml de una solución acuosa de 0,5 mg de Fe marcado con 3 uCi de  $^{55}\text{Fe}$  más 0,28 mg de Cu (proporción molar Cu:Fe=0,5:1).

El día 14, se tomó una muestra de 30 ml de sangre para evaluar nutrición de Fe y de Cu, y radioactividad circulante que corresponde al  $^{59}\text{Fe}$  y  $^{55}\text{Fe}$  que permite evaluar la absorción del Fe obtenida los días 1 y 2 respectivamente. Además el día 14 se administró 150 ml de una solución acuosa de 0,5 mg de Fe elemental marcado con 1 uCi de  $^{59}\text{Fe}$  más 0,57 mg de Cu (proporción molar Cu:Fe=1:1).

El día 15, los sujetos ingirieron 150 ml de una solución acuosa de 0,5 mg de Fe con 3 uCi de  $^{55}\text{Fe}$  más 1,14 mg de Cu (proporción molar Cu:Fe=2:1).

El día 28, toma de muestra de 20 ml de sangre para medir la radioactividad superpuesta, correspondiente al  $^{59}\text{Fe}$  y  $^{55}\text{Fe}$  que nos permitió evaluar la absorción del Fe obtenida los días 14 y 15 respectivamente.

Día	0,5 mg Fe	Cu	Cu: Fe	Muestra
1	1 uCi <sup>59</sup> Fe			
2	3 uCi <sup>55</sup> Fe	0,28 mg	0,5:1	
14	1 uCi <sup>59</sup> Fe	0,57 mg	1:1	30 ml
15	3 uCi <sup>55</sup> Fe	1,14 mg	2:1	
28				20 ml

**Tabla 1. Descripción resumida Estudio A.**

### **Estudio B**

El día 1, los sujetos ingirieron 50 ml de una solución acuosa de 0,5 mg de Fe marcado con 1 uCi de <sup>59</sup>Fe.

El día 2, los sujetos ingirieron 150 ml de una solución acuosa de 0,5 mg de Fe marcado con 3 uCi de <sup>55</sup>Fe más 2,28 mg de Cu (proporción molar Cu:Fe=4:1).

El día 14, luego de toma de muestra de 30 ml de sangre para evaluar nutrición de Fe, nutrición de Cu y radioactividad circulante, los sujetos ingirieron 150 ml de una solución acuosa de 0,5 mg de Fe elemental marcado con 1 uCi de <sup>59</sup>Fe más 3,41 mg de Cu (proporción molar Cu:Fe=6:1). La radioactividad circulante corresponde al <sup>59</sup>Fe y <sup>55</sup>Fe que nos permitió evaluar la absorción del Fe obtenida los días 1 y 2 respectivamente.








El día 15, los sujetos ingirieron 150 ml de una solución acuosa de 0,5 mg de Fe con 3 uCi de <sup>55</sup>Fe más 4,55 mg de Cu (proporción molar Cu:Fe=8:1)

El día 28, toma de muestra de 20 ml de sangre para medir radioactividad superpuesta, correspondiente al <sup>59</sup>Fe y <sup>55</sup>Fe que nos permitió evaluar la absorción del Fe obtenida los días 14 y 15 respectivamente. Así, disponemos de información respecto a los efectos de las relaciones Cu:Fe 0,5:1, 1:1, 2:1, 4:1, 6:1 y 8:1.

Día	0,5 mg Fe	Cu	Cu: Fe	Muestra
1	1 uCi <sup>59</sup> Fe			
2	3 uCi <sup>55</sup> Fe	2,28 mg	4:1	
14	1 uCi <sup>59</sup> Fe	3,41 mg	6:1	30 ml
15	3 uCi <sup>55</sup> Fe	4,55 mg	8:1	
28				20 ml

**Tabla 2. Descripción resumida Estudio B.**

## Sujetos y Métodos

			 (a, b)		 (b)
	Día 1	Día 2	Día 14	Día 15	Día 28
	37kBq <sup>59</sup> Fe	111kBq <sup>55</sup> Fe	37kBq <sup>59</sup> Fe	111kBq <sup>55</sup> Fe	
					
	150 ml	150 ml	150 ml	150 ml	
<b>Estudio A</b> (n=15)					(a)
Cu (mg)	0,00	0,28	0,57	1,14	Hemoglobina VCM Sat. transferrina Protoporfirina libre GR Ferritina sérica
Fe (mg)	0,50	0,50	0,50	0,50	
Cu:Fe (molar)	0:1	0,5:1	1:1	2:1	
<b>Estudio B</b> (n=14)					(b) 
Cu (mg)	0,00	2,28	3,41	4,55	Radioactividad circulante Técnica Eakins & Brown
Fe (mg)	0,50	0,50	0,50	0,50	
Cu:Fe (molar)	0:1	4:1	6:1	8:1	

Cu como sulfato cúprico  
Fe como sulfato ferroso

### **Análisis estadístico**

Para las comparaciones intra-grupo del efecto de concentraciones crecientes de cobre sobre la absorción de hierro, se utilizará el análisis de varianza (ANDEVA) para medidas repetidas, en la que se considera la variabilidad debida a las diferencias entre los distintos sujetos y la debida a las diferencias entre las medidas para cada sujeto.

Para las comparaciones entre grupos se utilizará la prueba de Student no pareada. Como los valores de ferritina sérica y absorción de Fe tienen una distribución asimétrica, los valores se normalizarán mediante su transformación logarítmica.



## 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 (FS): se realizó mediante una prueba de ELISA en sandwich, utilizando 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 (Zpp): (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  $^{55}\text{Fe}$  y  $^{59}\text{Fe}$  (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 ( $^{55}\text{Fe}$  y  $^{59}\text{Fe}$ ) 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  $^{55}\text{Fe}$  (carril A) y de  $^{59}\text{Fe}$  (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	cpm A = cpm en A – Promedio de los blancos en A cpm B = cpm en B – Promedio de los blancos en B
2	cmp $^{55}\text{Fe}$ = cpm en A – cpm de traslape de B a A cmp $^{59}\text{Fe}$ = cpm en B – cpm de traslape de A a B
3	cmp $^{55}\text{Fe}/\text{mL}$ sangre = cmp $^{55}\text{Fe}/\text{mL}$ sangre analizada cmp $^{59}\text{Fe}/\text{mL}$ sangre = cmp $^{59}\text{Fe}/\text{mL}$ sangre analizada
4	cmp $^{55}\text{Fe}/\text{mg}$ solución = cmp Standard $^{55}\text{Fe}/\text{mg}$ solución analizados cmp $^{59}\text{Fe}/\text{mg}$ solución = cmp Standard $^{59}\text{Fe}/\text{mg}$ solución analizados
5	cmp circulantes $^{55}\text{Fe}$ = cmp $^{55}\text{Fe}/\text{mL}$ sangre* volemia cmp circulantes $^{59}\text{Fe}$ = cmp $^{59}\text{Fe}/\text{mL}$ sangre* volemia
6	cmp ingeridas $^{55}\text{Fe}$ = mg de solución ingeridos * cpm $^{55}\text{Fe}/\text{mg}$ de solución cmp ingeridas $^{59}\text{Fe}$ = mg de solución ingeridos * cpm $^{59}\text{Fe}/\text{mg}$ de solución
7	% $^{55}\text{Fe}$ absorbidas = cmp ingeridas $^{55}\text{Fe}/\text{cmp}$ circulantes $^{55}\text{Fe} * 100$ % $^{59}\text{Fe}$ absorbidas = cmp ingeridas $^{59}\text{Fe}/\text{cmp}$ circulantes $^{59}\text{Fe} * 100$
8	Biodisponibilidad de $^{55}\text{Fe}$ = % $^{55}\text{Fe}$ absorbido * 0,8 <sup>1</sup> Biodisponibilidad de $^{59}\text{Fe}$ = % $^{59}\text{Fe}$ absorbido * 0,8 <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Corrección de Bothwell (80% del hierro ingerido se destina a eritropoyesis)

**Tabla 3. Fórmulas utilizadas para el cálculo de la biodisponibilidad de Fe mediante la utilización de los isótopos  $^{55}\text{Fe}$  y  $^{59}\text{Fe}$ .**

## Resultados

### Resultados Estudio A

Nro	Edad (años)	Peso (Kg)	Talla (m)	IMC (peso/talla <sup>2</sup> )
1	28	53,5	1,555	22,1
2	39	62,1	1,656	22,6
3	33	78	1,648	28,7
4	34	62,5	1,57	25,4
5	35	62,2	1,541	26,2
6	46	65,2	1,55	27,1
7	43	63	1,57	25,6
8	41	60	1,54	25,3
9	45	79	1,66	28,7
10	33	54	1,54	22,8
11	36	62	1,59	24,5
12	35	59,5	1,61	23
13	33	62,5	1,585	24,9
14	34	56,5	1,552	23,5
15	43	58	1,56	23,8
PROMEDIO	37,2	62,5	1,6	24,9
DE	5,3	7,3	0,04	2,1

**Tabla 4. Antropometría de sujetos del Estudio A**

El estado nutricional de los sujetos, estimado mediante el Índice de Masa Corporal (IMC), fue de 8 normales (IMC 18,5 – 24,9) y 7 con sobrepeso (IMC entre 25 a 29,9).

Nro	Hb (g/dL)	VCM (fL)	Zpp (ug/dl GR)	Fe (ug/dl)	TIBC (ug/dL)	%Sat (%)	FS (ug/L)	LNSF (Ln FS)
1	13,9	84	54,1	24,5	266,6	2,3	10,6	2,4
2	13,4	90	37,3	101,3	277,4	36,5	27,1	3,3
3	12,7	89	51,5	79,6	312,8	25,4	11,6	2,5
4	14	87	51,2	55,8	301,9	18,5	30,4	3,4
5	15,5	94	62,9	59,8	326,4	18,3	140,8	4,9
6	12,6	76	85,6	29,9	288,3	10,4	4	1,4
7	13,2	90	65,8	44,9	272	16,5	10,7	2,4
8	13,7	91	48,6	65,3	274,7	23,8	19,8	3
9	14,9	90	68,6	63,2	263,8	24	45	3,8
10	11,9	82	77,1	65,3	293,8	22,2	19,3	3
11	13,2	95	80	94,5	375,4	25,2	43,3	3,8
12	14,5	88	51,5	114,2	345,4	33,1	19,7	3
13	13,9	94	40,1	77,5	320,9	24,2	12,4	2,5
14	13,8	88	51,4	72,8	424,3	17,2	12,3	2,5
15	13,5	92	48,5	86,4	236,6	36,5	16,6	2,8
PROMEDIO	13,6	88,7	58,3	69	305,4	22,3		2,98
DE	0,91	5,0	14,5	24,9	48,3	9,2		0,81
PG							19,7	
RANGO								
-1 DE							8,7	
+1DE							44,3	

**Tabla 5. Concentración de hierro endógena de sujetos del Estudio A.**

En cuanto a los 15 sujetos incorporados en el Estudio A se puede decir que el estado de nutrición de hierro es relativamente normal, los parámetros que miden este estado son: hemoglobina (Hb), volumen corpuscular medio (VCM), Saturación de la transferrina (%Sat) y ferritina sérica (FS)

Sólo se encontró 1 mujer con anemia; 1 mujer con deficiencia de hierro sin presentar anemia (Hb normal más dos de los parámetros de nutrición de hierro alterados) y 4 mujeres con depósitos de hierro depletados (Ferritina sérica <12 ug/L).

Nro	Cu (ug/dL)	Cp (mg/dL)
1	135	40,9
2	95	30,1
3	110	35,6
4	170	48,7
5	110	37,5
6	135	39,1
7	95	33,1
8	100	33,8
9	95	29,1
10	85	24,3
11	110	30,7
12	100	32,3
13	160	45,1
14	110	36,3
15	110	35,8
PROMEDIO	114,7	35,5
DE	24,7	6,3

**Tabla 6. Concentración de cobre endógena de sujetos del Estudio A.**

El estado nutricional de cobre de los individuos del Estudio A se presentó dentro de los rangos de normalidad.

Nro	AbsDia1 (%)	Absdia2 (%)	Absdía14 (%)	Absdía15 (%)
1	68,7	68,3	72,6	77,2
2	25,7	20,8	60,5	45,8
3	31,5	38,3	105	90,1
4	20,7	31	17	38,5
5	37	33,2	43,1	22,2
6	58	80	32,3	93,3
7	94,2	103,3	96,3	81,4
8	36,8	56	68,5	69,7
9	22,7	43,3	64,6	72,7
10	15,4	36,7	57,4	79
11	9,7	20,3	24,2	22,6
12	33,3	46,6	42,1	39,4
13	17	35,7	72,5	53,2
14	96,7	55,8	89,6	96
15	70,5	19,3	10,3	8,6
PG	34,2	40,9	48,3	50,1
RANGO				
-1 DE	17,3	24,9	24,8	25,3
+1DE	68,5	67,2	94,1	99,5

**Tabla 7. Absorción de hierro de sujetos del Estudio A.**

### **Resultados Estudio B**

Nro	Edad (años)	Peso (kg)	Talla (m)	IMC (peso/talla <sup>2</sup> )
16	35	65	1,55	27,1
17	35	66	1,67	23,8
18	38	62	1,61	23,9
19	44	61	1,5	27,1
20	34	57,6	1,6	22,5
21	36	74,6	1,61	28,8
22	39	69,5	1,6	27,1
23	38	64,3	1,45	30,6
24	38	62	1,53	26,5
25	37	64	1,56	26,5
27	44	77	1,68	27,3
28	40	78	1,57	31,6
29	41	58,9	1,52	25,5
30	38	62	1,62	23,6
PROMEDIO	38,4	65,9	1,58	26,6
DE	3,1	6,5	0,06	2,6

**Tabla 8. Antropometría de sujetos del Estudio B.**

El estado nutricional de los individuos del Estudio B, fue de 4 normales, 8 con sobrepeso y 2 obesos (IMC > 30).

Nro	Hb (g/dL)	VCM (fL)	Zpp (ug/dL GR)	Fe (ug/dL)	TIBC (ug/dL)	%Sat (%)	FS (ug/L)	LNSF (Ln FS)
16	13,2	89	57,1	70,7	293,8	24,1	54,9	4
17	13,7	88	63	39,4	345,4	11,4	5,8	1,8
18	13,5	90	85,7	76,8	301,9	25,4	11,1	2,4
19	15,6	91	51,5	47,6	247,5	19,2	40,9	3,7
20	11,6	89	51,4	40,8	375,4	10,9	10,4	2,3
21	14,3	92	54,2	93,8	307,4	30,5	13,6	2,6
22	14	87	91,5	101,3	361,8	28	16,5	2,8
23	13,9	87	68,6	93,2	418,9	22,2	5,9	1,8
24	14,4	84	71,4	48,3	326,4	14,8	14,8	2,7
25	13,2	86	74,4	78,9	304,6	25,9	12,9	2,6
27	13,8	86	51,4	92,5	321	28,8	51,7	3,9
28	14,1	83	74,2	76,8	326,4	23,5	42,6	3,8
29	14	92	45,6	143,5	353,6	40,5	14,1	2,6
30	13,7	88	59,9	121	361,8	33,4	10,1	2,3
PROMEDIO	13,8	88	64,3	80,3	331,9	24,2		2,8
DE	0,9	2,799	13,8	30,4	42,0	8,3		0,7
PG							16,5	
RANGO								
-1 DE							7,9	
+1DE							35,0	

**Tabla 9. Concentración de hierro endógena de sujetos del Estudio B.**

En cuanto a los 14 sujetos incorporados en el Estudio B se puede decir que el estado de nutrición de hierro fue relativamente normal.

No se encontró ninguna mujer con anemia ferropriva; sólo 3 mujeres con deficiencia de hierro sin presentar anemia y 2 mujeres sólo con depósitos de hierro depletados.



Nro	Cu (ug/dL)	Cp (mg/dL)
16	135	37,5
17	110	34,6
18	120	36,3
19	95	24,4
20	90	18,8
21	100	29,7
22	155	45
23	120	38,3
24	115	37,5
25	90	26,7
27	160	44,2
28	115	35,5
29	110	37,9
30	100	35,6
PROMEDIO	115,4	34,4
DE	21,9	7,3

**Tabla 10. Concentración de cobre endógena de sujetos del Estudio B.**

El estado nutricional de cobre de los individuos del Estudio B se presenta dentro de los rangos de normalidad y no difieren del estudio A.

Nro	AbsDia1 (%)	Absdia2 (%)	Absdía14 (%)	Absdía15 (%)
16	5,1	10,3	33,7	36,4
17	63,5	83,2	103,3	103,2
18	25,1	47,4	3,8	17,7
19	20,8	20,1	11,6	13
20	31	3	10	38,2
21	40	68,2	61,9	44,7
22	68,8	67,1	66,2	48,5
23	103,2	97,2	89,6	103,7
24	54,6	68,7	82,5	96,6
25	17,9	10,8	34,4	37,2
27	11,6	8,4	27,2	17,1
28	12,5	6	7	19
29	16,5	4,3	17,5	19,9
30	74,5	26	75,2	44,2
PG	28,7	21,5	29,6	36,5
RANGO				
-1 DE	12,1	6,5	10,3	18,3
+1DE	67,9	71,5	85,4	73,1

**Tabla 11. Absorción de hierro de sujetos del Estudio B**

## Resumen Resultados

La concentración endógena de Fe, de la mayoría de los sujetos participantes en ambos estudios, fue normal. Sólo una de 29 mujeres presentó anemia por deficiencia de Fe, 5 tuvieron deficiencia de Fe sin anemia y 5 tuvieron reservas depletadas. No hubo diferencias significativas en edad, peso o indicadores del estado de nutrición de Fe encontradas entre los dos grupos (Tabla 1).

La absorción de 0.5 mg de Fe, solo o en combinación con Cu en diferentes proporciones molares se muestra en la tabla 2 (estudio A) y tabla 3 (estudio B). Se observó un efecto no significativo del Cu sobre la absorción de Fe. En el estudio A, el promedio geométrico (rango  $\pm$  1 DE) de la absorción de Fe solo fue 34,4% (17,3%-68,5%) y en proporciones molares Cu:Fe de 0.5:1, 1:1, 2:1 fue, 40,9% (24,9%-67,2%), 48,3% (24,8%-94,1%) y 50,2% (25,3%-99,5%), respectivamente ( $p=0,12$ ). En el estudio B, el promedio geométrico (rango  $\pm$  1 DE) de la absorción de Fe solo o en proporciones molares de 4:1, 6:1, 8:1 fue 28,7% (12,1%-67,9%), 21,5% (6,5%-71,5%), 29,6% (10,3%-85,4%) y 36,5% (18,3%-73,1%), respectivamente ( $p=0,16$ ).

	Estudio A (n=15)	Estudio B (n=14)	p <sup>2</sup>
Edad (años)	37,2 ± 5,3	38,4 ± 3,1	NS
Peso (kg)	65,5 ± 7.3	65,9 ± 6,5	NS
Estatura (m)	1,58 ± 0.04	1,58 ± 0.06	NS
Hb (g/dL)	13,6 ± 0,9	1,38 ± 0,9	NS
VCM (fL)	89 ± 5	88 ± 3	NS
Zpp (ug/dL GR)	58,3 ± 14,5	64,3 ± 13,8	NS
Sat (%)	22,3 ± 9.2	24,2 ± 8.3	NS
SF <sup>1</sup> (µg/L)	20 (9-44)	17 (8-35)	NS

**Tabla 12. Características generales y de nutrición de Fe de los sujetos.**

<sup>1</sup> Promedio geométrico y rango de ±1 DE.

<sup>2</sup> t de Student.

Dosis Cu (mg)	0	0,28	0,57	1,14
Dosis Fe (mg)	0,50	0,50	0,50	0,50
Cu:Fe (proporción molar)	0:1	0.5:1	1:1	2:1
Absorción Fe (%) <sup>1,2</sup>	34,4 (17,3-68,5)	40,9 (24,9-67,2)	48,3 (24,8-94,1)	50,2 (25,3-99,5)

**Tabla 13. Efecto de dosis graduales de Cu (0 a 1,14 mg) sobre la absorción de 0,5 mg de Fe (estudio A; n=15)**

<sup>1</sup> Promedio geométrico (rango  $\pm 1$  DE).

<sup>2</sup> ANDEVA de medidas repetidas, F = 2,054, p = 0,12.

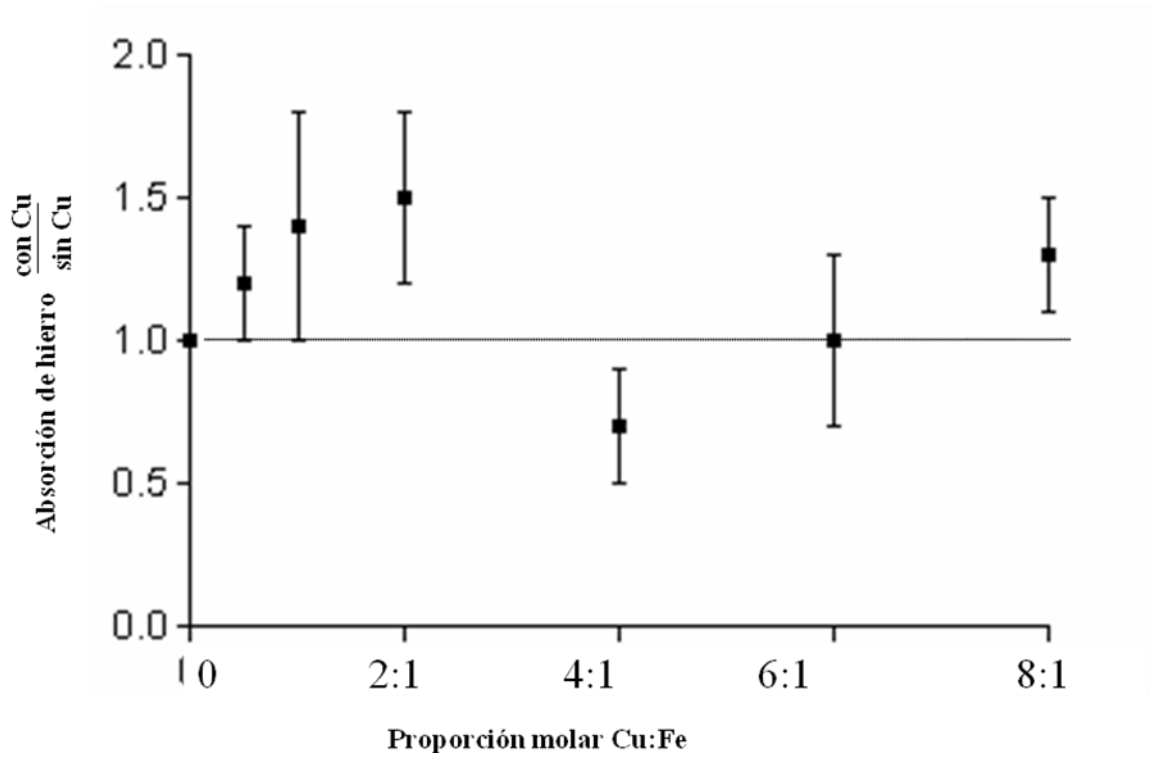
Dosis Cu (mg)	0	2.28	3.41	4.55
Dosis Fe (mg)	0,50	0,50	0,50	0,50
Cu:Fe (proporción molar)	0:1	4:1	6:1	8:1
Absorción Fe (%) <sup>1,2</sup>	28,7 (12,1-67,9)	21,5 (6,5-71,5)	29,6 (10,3-85,4)	36,5 (18,3-73,1)

**Tabla 14. Efecto de dosis graduales de Cu (0 a 4,55 mg) sobre la absorción de 0,5 mg de Fe (estudio B; n=14)**

<sup>1</sup> Promedio geométrico (rango  $\pm 1$  DE).

<sup>2</sup> ANDEVA de medidas repetidas, F = 1,823, p = 0,16.

Efecto del cobre sobre la absorción de hierro (0.5 mg)  
Curva de dosis respuesta (promedio geométrico  $\pm$  rango 1 ESM)



Se observó un efecto no significativo del Cu sobre la absorción de Fe.

## 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 mayor parte 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).

La mayor parte de la información existente sobre la interacción entre Fe no hemínico y el Cu se ha obtenido desde estudios que han proporcionado estos dos minerales simultáneamente como suplemento o como alimento fortificado; y se ha observado un efecto negativo del Fe sobre el estatus de Cu. Sin embargo, no hay información previa disponible acerca del efecto del Cu sobre la absorción o el estatus de Fe.

Por otro lado, se ha observado en células Caco-2 polarizadas, que la adición de 5  $\mu$ M de Cu, en presencia de ácido ascórbico en el lado apical de la célula conduce a la inhibición de la absorción del Fe y esta inhibición es dosis dependiente. Al contrario, Linder mostró que la adición de 1  $\mu$ M de Cu en proporción equimolar con Fe no afecta la absorción del Fe, en presencia o ausencia de ácido ascórbico.

La información obtenida en este trabajo demuestra que el Cu administrado en solución, en distintas proporciones molares Cu:Fe, no inhibe la absorción de Fe en mujeres no gestantes y que, por lo tanto, no habría competencia de ambos metales por el transportador proteico DMT1.

Estos resultados apoyan la hipótesis de que el DMT1 no es fisiológicamente relevante para la absorción de Cu en humanos, probablemente porque la afinidad de este transportador por el  $\text{Cu}^{+2}$  puede ser mucho más baja que para el  $\text{Fe}^{+2}$ . Nuestra observación está apoyada por estudios con ratas Belgrado que tienen una mutación donde el DMT1 está inactivado. Se ha observado que estas ratas desarrollaron anemia por deficiencia de Fe, pero tenían un estatus normal de Cu.



## **Conclusiones**

1. La administración de Cu y Fe como una solución acuosa no inhibe la absorción de Fe, incluso en una proporción molar Cu:Fe de 8:1.
2. Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que el DMT1 no es fisiológicamente relevante para absorción de Cu en humanos.
3. Esta información podría ayudar a diseñar guías racionales para los programas de suplementación que combinan Cu y Fe.

## **Anexo 1: Consentimiento de participación en el Proyecto**

### **“Efecto del Cobre sobre la absorción de Hierro en Humanos”**

**FONDECYT N° 1070665**

#### **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: 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  $^{55}\text{Fe}$  y tres a  $^{59}\text{Fe}$ , 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:

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

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

Se trasvasió 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 trasvasió 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. Etapas: 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

- **ARREDONDO M, MARTINEZ R, NUNEZ MT, RUZ M, OLIVARES M.** 2006. Inhibition of iron and copper uptake by iron, copper and zinc. *Biol Res*; 39:95-102.
- **ARREDONDO M, NUNEZ MT.** 2005. Iron and copper metabolism. *Mol Aspects Med*;26:313-27.
- **BERTINATO J, L'ABBE MR.** 2004. Maintaining copper homeostasis: regulation of copper-trafficking proteins in response to copper deficiency or overload. *J Nutr Biochem*;15: 316–322.
- **BERTRAM, K.** 1994. *Farmacología básica y clínica.* 5a ed. El Manual Moderno, S.A. de C.V. México DF, México. 563-568.
- **BOTHWELL TH, CHARLTON RW, COOK JD, FINCH CA.** 1979. *Iron metabolism in man.* Oxford: Blackweel Scientific.
- **CASE, L.; CAREY, D.; HIRAKAWA, D.** 1997. *Nutrición canina y felina: manual para profesionales.* Harcourt Brace. Madrid, España. 48-49.
- **CONRAD ME, UMBREIT JN.** 2000. Iron absorption and transport – an update. *Am J Hematol*;64:287-289.
- **CONRAD, M.; UMBREIT J.** 2002. Pathways of iron absorption. *Blood Cells Mol Dis.* 29(3):336-55.
- **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.

- **DONOVAN A, ROY CN, ANDREWS NC.** 2006. The ins and outs of iron homeostasis. *Physiology*;21:115-123.
- **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.
- **FINCH, C.; HUEBERS, H.** 1988. Iron absorption. *Am J Clin Nutr.* 47:102-107.
- **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, B.; BERGER, UV.; GUNSHIN, Y.; ROMERO, MF.; BORON, WF.; NUSSBERGER, S.; GOLLAN, JL.; HEDIGER, MA.** 1997. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter, *Nature* 388:482-488
- **HURREL R, LYNCH SR, TRINIDAD TP, DASSENKO SA, COOK JD.** 1989. Iron absorption in humans as influenced by bovine milk proteins. *Am J Clin Nutr*;49:546-552.
- **LINDER MC, WOOTEN P, CERVEZA S, COTTON R, SHULZE R, LOMELI N.** 1998. Copper transport *Am J Clin Nutr* ; 67: 965S-971S.
- **LONNERDAL B.** 1998. Copper nutrition during infancy and childhood. *Am J Clin Nutr*;67:797S–811S.
- **MCKIE AT, BARROW D, LATUNDE-DADA GO, ROLFS A, SAGER G, MUDALY E, MUDALY M.** 2001. An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science*;291:1755-1759.
- **MUÑOZ, A.; MOLINA, A.** 2005. Tratado de nutrición: Hierro. *Acción Médica.* Granada, España. 931-971.
- **OATES PS, TRINDER D, MORGAN EH.** 2000. Gastrointestinal function, divalent metal transporter-1 expression and intestinal iron absorption. *Pflügers Arch*;440:496-502.

- **OLIVARES M.** 1995. Nutritional Anemias. In: Clinical Nutrition of the Young Child. Ballabriga A, Brunser O, Dobbing J, Gracey M, Senterre J, editors. Raven Press\Nestlé, New York\Vevey, Chapter 29, 561-575.
- **PIZARRO, F.; OLIVARES, M.; KAIN, J.** 2005. Hierro y zinc en la población de Santiago. Rev Chil Nutr. 32(1):19-27.
- **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.
- **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.
- **SINGH, R.; SHAW, J.; ZIMMET, P.** 2004. Epidemiology of childhood type 2 diabetes in the developing world. Pediatr Diabetes. 5(3):154-68.
- **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.** 2004. Iron, Ferritin, and Nutrition. Annu. Rev. Nutr. 24: 327-343.
- **TURNLUND JR.** 1998. Human whole-body copper metabolism. Am J Clin Nutr;67:1046S–53S.
- **VASQUEZ, E.** 2003. La anemia en la infancia. Pan Am J Public Health. 13(6):349-351.
- **VULPE CD, KUO YM, MURPHY TL, CWLEY L, ASKWITH C, LIBINA N, GITSCHIER J.** 1999. Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. Nat Genet;21:195-199.

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