



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

**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN ORAL DE HIERRO
HEMÍNICO/NO HEMÍNICO ENCAPSULADO SOBRE EL ESTADO
NUTRICIONAL DE HIERRO EN CERDOS NEONATOS**

Rubén Ignacio Antileo Valdés

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

PROFESOR GUÍA: CAROLINA PAZ VALENZUELA VENEGAS
Universidad de Chile
Inserción de Capital Humano Avanzado en la Academia 7912010043

SANTIAGO, CHILE
2015



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

**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN ORAL DE HIERRO
HEMÍNICO/NO HEMÍNICO ENCAPSULADO SOBRE EL ESTADO
NUTRICIONAL DE HIERRO EN CERDOS NEONATOS**

Rubén Ignacio Antileo Valdés

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

Nota Final:

FIRMA

Profesor Guía: Dra. Carolina Valenzuela V.

.....

Profesor Corrector: Dr. Íñigo Díaz C.

.....

Profesor Corrector: Dr. Jaime Figueroa H.

.....

SANTIAGO, CHILE
2015

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Magaly y Rubén por incentivarne a cumplir mis metas, por enseñarme que con esfuerzo todo es posible, por su cariño, consejos, valores y apoyo incondicional que me han brindado durante toda la vida.

A mi hermana Magaly, una gran amiga quién me escuchó, cuidó y cubrió las espaldas en momentos difíciles, por apoyarme siempre cuando lo necesito y por las risas que abundan día a día.

A la Dra. Carolina Valenzuela por su confianza al permitir mi participación en este proyecto, además de su disposición y dedicación para orientarme durante la realización de éste.

A mi gran amiga Betzabé, una hermana que encontré en la universidad, por su apoyo constante y los momentos vividos desde el primer día de clases.

A mi amiga Milena, por su hospitalidad e incontables anécdotas vividas durante la carrera.

A mi abuelo Juan por tenerme presente en sus oraciones, a mi abuelita Gabriela por su ternura y comprensión, sus comidas llenas de cariño y por cuidarme desde el cielo junto a mis abuelos Anita y Ricardo.

A mis amigos de la universidad, con quienes compartimos largas noches de estudio, tensión, numerosas aventuras y momentos de diversión.

A todos los docentes y funcionarios que entregaron sus experiencias y conocimientos contribuyendo a mi formación profesional.

RESUMEN

El presente estudio determinó el efecto de la suplementación oral de hierro hemínico/no-hemínico (Fe hemo/no-hemo) encapsulados sobre el estado nutricional de Fe en cerdos neonatos. Como suplemento oral se utilizó una mezcla entre Fe hemo/no-hemo encapsulados individualmente. Cerdos neonatos (N=66) fueron asignados aleatoriamente a 3 grupos de suplementación: 1) grupo parenteral: 200 mg Fe-dextrano i.m; 2) grupo oral-2: 2 dosis de 126 mg de Fe a los 2 y 8 días de edad; y 3) grupo oral-3: 3 dosis de 84 mg de Fe a los 2, 8 y 14 días. Se determinó el peso vivo, ganancia diaria de peso, mortalidad, parámetros hematológicos/séricos del estado de nutrición de Fe, y contenido de Fe en vísceras, intestino y músculo. No se observaron diferencias en el peso vivo, ganancia diaria de peso y mortalidad entre grupos. El suplemento oral en 2 dosis no evitó el desarrollo de anemia, a diferencia de la suplementación parenteral y oral en 3 dosis. Los valores de ferritina sérica de todos los grupos resultaron inferiores al rango fisiológico, indicando un estado de depleción de Fe, de éstos el valor del grupo oral 2 dosis fue significativamente inferior a los otros grupos. El mismo grupo presentó menor concentración de Fe en hígado, bazo e intestino, en comparación a los grupos parenteral y oral 3 dosis. La suplementación oral de Fe hemo/no-hemo encapsulado mediante 3 dosis cada 6 días en cerdos lactantes presenta un efecto hematínico y sobre las reservas de Fe comparable al Fe-dextrano i.m.

Palabras claves: Anemia, cerdo lactante, encapsulación, hierro hemo, hierro no hemo.

ABSTRACT

The study was conducted to determine the effect of oral supplementation of heme/non-heme encapsulated Fe on the nutritional Fe status in neonatal piglets. The oral Fe supplement used was a blend of heme and non-heme encapsulated individually. Sixty-six piglets were used. Animals were randomly allotted to three Fe supplementation treatments: 1) Parenteral group: 200 mg dextran Fe i.m.; 2) Oral group-2: Two doses of 126 mg of Fe administered at day 2 and 8; 3) Oral group-3: Three doses of 84 mg of Fe administered at day 2, 8 and 14. Body weight, daily gain, mortality, serum and hematological parameters as indicators of the nutritional status of Fe in piglets, and Fe content in viscera, intestine, and muscle were determined. No differences were observed in piglet's body weight, daily gain or mortality between groups. The oral two dose treatment did not avoid anemia. On the other hand, the parenteral and oral three dose treatment prevented anemia. Serum ferritin levels of all treatment groups were lower than reference values indicating a depletion of Fe status. Even more, serum ferritin in the oral group-two was lower than in the other groups. The same group showed lower Fe concentration in liver, spleen and intestine than parenteral, and oral group-three. Oral Fe supplementation with a blend of heme and non-heme encapsulated Fe, dispensed in three doses every six days could be considered as a Fe supplementation method presenting similar hematinic effect than parenteral administration of dextran Fe.

Keywords: Anemia, encapsulation, heme iron, non heme iron, suckling piglet.

INTRODUCCIÓN

El Fe es un elemento vital para todo organismo, participa en reacciones de óxido-reducción permitiendo el transporte de oxígeno, síntesis de ADN, respiración celular y un correcto funcionamiento del sistema inmune. En los alimentos el Fe se encuentra en forma de Fe no hemínico (Fe no hemo) en vegetales y lácteos; y Fe hemínico (Fe hemo) en productos cárnicos (carne, sangre, y vísceras). Para el caso de los mamíferos ambas fuentes de Fe se absorben principalmente en el duodeno en donde el mecanismo de absorción difiere según la fuente, pudiendo ocurrir simultáneamente ambos tipos de absorción. En el cerdo se ha descrito que el Fe no hemo es absorbido en el borde en cepillo del enterocito duodenal, en donde es reducido a Fe^{+2} por acción del citocromo B apical duodenal (Dcytb) y posteriormente internalizado al enterocito mediante el transportador de metales divalentes (DMT-1) (Lipiński *et al.*, 2013). El mecanismo de absorción del Fe hemo no se encuentra totalmente dilucidado en el cerdo, sin embargo Lipiński *et al.* (2013) postularon que el grupo hemo es absorbido como molécula intacta a través de una proteína transportadora (HCP1) y posteriormente metabolizado en el citosol del enterocito por la hemooxigenasa 1, liberándose el Fe^{+2} el cual ingresa como tal a la vía metabólica común del Fe no hemo, es decir al interior del enterocito el Fe^{+2} proveniente del Fe hemo o del Fe no hemo es transportado a la membrana basolateral del enterocito donde la enzima hefestina lo re oxida a Fe^{+3} , posteriormente en dicho estado es exportado del enterocito hacia circulación portal a través de los poros de ferroportina y finalmente transportado unido a transferrina hacia hígado para ser almacenado o hacia médula ósea donde es incorporado a la hemoglobina (Weiss y Wardrop, 2010).

La anemia ferropénica de los lechones es la deficiencia nutricional más prevalente en cerdos neonatos criados en sistemas intensivos (Lipiński *et al.*, 2010). El desarrollo del cuadro se explica debido a que los requerimientos de Fe durante el periodo de lactancia (7-10 mg Fe/día) (NRC, 2012) no son cubiertos, debido a que el cerdo nace con escasas reservas de Fe (40-50 mg de Fe hepático), presenta una tasa de crecimiento muy alta y la leche de la cerda sólo aporta entre 0,2 a 4 mg Fe/día (Svoboda y Drábek, 2005a), lo que cubre sólo un 10% de los

requerimientos de Fe diarios. Adicionalmente, en sistemas productivos confinados los lechones no obtienen Fe mediante ingesta de tierra, generándose la necesidad de realizar un aporte exógeno de este mineral (Jolliff y Mahan, 2011). Actualmente a modo de prevención se suplementa Fe a través de una única dosis intra-muscular (i.m) de 200 mg de Fe dextrano, manejo al cual se le han descrito una serie de desventajas cuando la aplicación es realizada por personal no entrenado como generar daño muscular, cojeras, abscesos, hematomas, mayor susceptibilidad a infecciones, poliartritis, y toxicidad aguda que puede incluso generar mortalidad en cerdos deficientes en vitamina E y/o selenio (Segalés *et al.*, 1995; Velásquez y Aranzazu, 2004; Svoboda y Drábek, 2005b;). Adicionalmente la aplicación parenteral del Fe dextrano puede ser considerado un procedimiento estresante y doloroso que puede comprometer el bienestar de los lechones (Kegley *et al.*, 2002).

Numerosas intervenciones de suplementación oral con Fe no hemo (sulfato ferroso, fumarato ferroso, Fe aminoquelado, etc.) han sido realizadas, sin embargo, los resultados obtenidos de éstas experiencias no han tenido el éxito esperado debido a que el Fe no hemo presenta baja biodisponibilidad y se requieren dosis repetidas (diarias o cada 2 días durante todo el período de lactancia) para mantener un estado de nutrición de Fe adecuado (Loh *et al.*, 2001). Publicaciones recientes atribuyen la baja biodisponibilidad del Fe no hemo a la inmadurez de los receptores y transportadores intestinales de Fe no hemo (DMT-1 y ferroportina) reportada por Lipiński *et al.* (2010) en cerdos neonatos durante la primera semana de vida. La información acerca de la suplementación con Fe hemo oral en lechones es escasa, sin embargo, en humanos West y Oates (2008) y Sharp y Srai (2007) afirman que la biodisponibilidad del Fe hemo es superior a la del Fe no hemo; debido a que la absorción de este último es inhibida por numerosos factores dietarios (Henry y Miller, 1995; South *et al.*, 2000). Para el Fe hemo no se han descrito factores inhibidores de su absorción, sin embargo South *et al.* (2000) describieron que ésta es potenciada por derivados de la digestión de la carne, efecto que además se atribuye a la ingesta del eritrocito en su forma completa. Quintero *et al.* (2008) determinaron el efecto de la ingesta de galletas elaboradas con Fe hemo (en forma de hemina) sobre el estado nutricional de Fe en cerdos destetados, concluyendo que la absorción del Fe hemo supera en un 23% a la del sulfato ferroso y además mejora la concentración de hemoglobina, contenido de Fe en hígado y parámetros productivos como

peso vivo y mortalidad de lechones. Debido a lo anterior, sería posible aumentar la biodisponibilidad del Fe administrado vía oral, utilizando una mezcla de Fe no hemo y Fe hemo, aprovechando el efecto potenciador del Fe hemo sobre la absorción del Fe no hemo.

La encapsulación es una técnica de micro empaquetamiento donde materiales “núcleo” son protegidos con materiales “muralla” de características poliméricas. Esta tecnología se ha utilizado en nutrición animal mostrando buenos resultados sobre la biodisponibilidad de minerales (Underwood y Van Eps, 2012). La encapsulación del Fe permitiría: (1) proteger el Fe ante condiciones adversas propias del tracto gastrointestinal, disminuyendo su precipitación, la que también genera alteraciones gastrointestinales (2) evitar su interacción con otros componentes dietarios que afecten su absorción, (3) direccionar su liberación en duodeno, y (4) mejorar la palatabilidad de la fuente de Fe (Zimmermann, 2004). En consecuencia la encapsulación del Fe podría aumentar su absorción y biodisponibilidad cuando es administrado vía oral. Si bien existe bastante información sobre la encapsulación de Fe no hemo como medida de prevención y/o suplementación para combatir la anemia por deficiencia de Fe en roedores y humanos (Hurrell *et al.*, 2004; Zimmermann, 2004; Xu *et al.*, 2014), según nuestro conocimiento no hay estudios en cerdos. En relación a la encapsulación de Fe hemo, Yuan *et al.* (2013) determinaron en ratas con anemia por inflamación, que el Fe hemo (en forma de hemina) encapsulado en liposomas aumentó significativamente el hematocrito, hemoglobina y Fe sérico en comparación a la suplementación realizada con Fe hemo disuelto en buffer fosfato sin encapsular, resultados similares fueron obtenidos por Xu *et al.* (2014) quienes evaluaron el efecto de la suplementación de citrato amónico férrico y Fe hemo encapsulados en liposomas en ratas con anemia generada por ejercicio extenuante. Recientemente, Valenzuela *et al.* (2014) encapsularon en perlas de alginato, eritrocitos atomizados como fuente de Fe hemo. Sin embargo, según nuestro conocimiento hasta la fecha no hay estudios que determinen el efecto de la suplementación oral de formas de Fe encapsuladas en cerdos. Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la suplementación oral de Fe no hemo en combinación con Fe hemo encapsulados sobre los parámetros productivos y el estado nutricional de Fe en cerdos neonatos.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio fue realizado en un criadero de cerdos perteneciente a Comercial e Industrial El Monte S.A, ubicado en la localidad de El Monte de la Región Metropolitana, Santiago de Chile.

Suplementación parenteral de Fe

Se administró a los animales una dosis única de 200 mg de Fe dextrano 10% vía i.m (Veterquímica®), producto que es comúnmente utilizado en el criadero como suplementación de Fe.

Suplementación oral de Fe

El suplemento de Fe oral fue generado con anterioridad en el Laboratorio de Nutrición Animal de FAVET. Este suplemento combinó dos tipos de Fe encapsulados individualmente; como fuente de Fe hemo se utilizaron eritrocitos de cerdo atomizados (EA) (Lican Alimentos S.A) y como fuente de Fe no hemo se usó sulfato ferroso (Merk S.A). Para la encapsulación se preparó una solución de maltodextrina (Prinal S.A) al 40% p/v en agua destilada, en la cual se dispersaron 30 g de cada uno de los materiales núcleo/100 mL de solución de maltodextrina, posteriormente estas dispersiones fueron atomizadas (Spray drying mobile minor Gea Niro, MAP Chile SPA). Las micropartículas obtenidas fueron denominadas como tipo A (EA/maltodextrina) y tipo B (sulfato ferroso/maltodextrina). A cada forma de Fe encapsulada por separado se le determinó el contenido de Fe total por espectrofotometría de absorción atómica (GBC modelo 905AA, Australia).

Las micropartículas tipo A y tipo B se mezclaron en proporciones adecuadas para cumplir con la dosis requerida para cubrir los requerimientos de Fe de cerdos lechones de 210 mg de Fe descritos por el NRC (2012) para un período de lactancia de 21 días. Estos requerimientos se sobreestimaron en un 20% para contrarrestar pérdidas provocadas por devolución del producto

por parte del lechón, resultando el contenido total de Fe suplementado a cada cerdo en una cantidad de 252 mg de Fe, la cual fue dividida en 2 dosis de 126 mg de Fe, o 3 dosis de 84 mg de Fe según grupo de tratamiento. La mezcla de micro partículas tipo A y B fue diluida en agua destilada y entregada a los cerdos en un volumen de 2 mL por dosis, las cuales fueron administradas según el tratamiento al cual fueran asignados los animales, como se detalla a continuación.

Animales y diseño experimental

Este estudio fue aprobado por el Comité de Bioseguridad de FAVET N°2-2012 y por el Comité de Bioética de FAVET. Se utilizaron 66 cerdos neonatos lactantes, provenientes de cerdas de segundo y tercer parto, seleccionados según peso corporal entre 1,4 a 1,7 kg. El estudio tuvo una duración de 21 días, lo que coincidió con el período de destete del criadero. Durante la duración del estudio los animales fueron alimentados exclusivamente por sus madres sin tener acceso a alimento sólido de inicio.

El día 1 del experimento (nacimiento de los lechones) se realizó el pesaje y selección de los animales para la conformación de 6 camadas de 11 lechones cada una, las cuales fueron asignadas aleatoriamente a uno de los tres grupos experimentales (Figura 1), quedando finalmente cada grupo compuesto por dos camadas, con un total de 22 cerdos por grupo y una proporción similar entre machos y hembras (1:1).

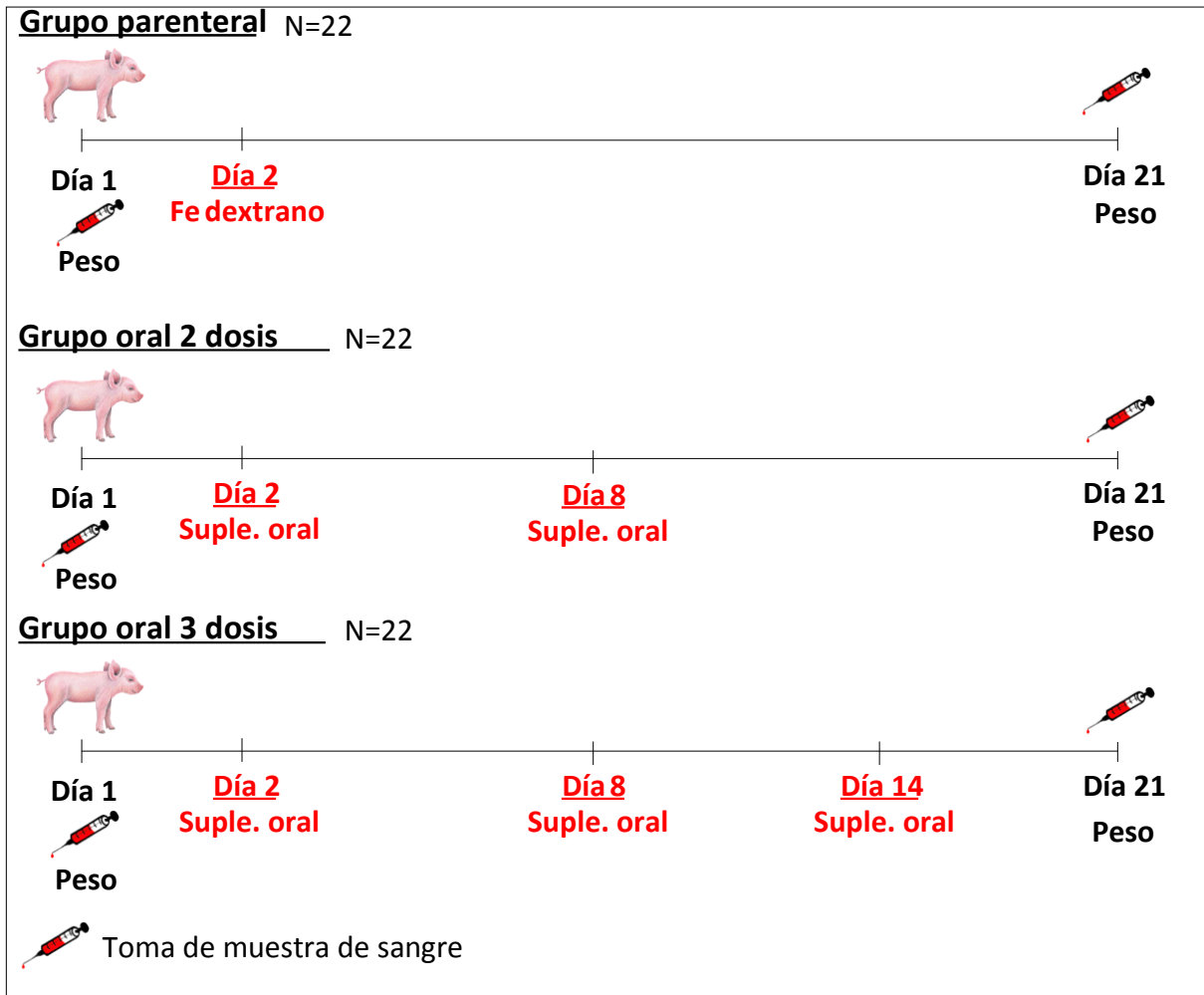


Figura 1. Distribución de grupos experimentales según días de suplementación (parenteral y oral), tiempos de registro de peso y toma de muestras de sangre. Suple.: suplementación.

Determinación de parámetros productivos

El pesaje de los lechones se realizó al nacimiento y al día 21 de vida. Con los datos de peso vivo se calculó la ganancia diaria de peso vivo durante el periodo de lactancia (1-21 días). Adicionalmente se determinó el porcentaje de mortalidad de cada grupo de tratamiento.

Determinación del estado de nutrición de Fe de los lechones

Se obtuvieron muestras de sangre de todos los lechones al nacimiento (línea base) y al día 21 de edad (Figura 1), mediante punción de la vena yugular. El calendario de toma de muestras de sangre fue diseñado en relación al tiempo que demora el Fe en formar parte de la hemoglobina en los eritrocitos desde que se ingiere, lo que se ha observado alcanza un *plateau* a los 14 días (Callender *et al.*, 1957). Dependiendo de la edad de los lechones al momento de la extracción de sangre, el volumen de sangre extraído fue de 2 mL para cerdos recién nacidos y 4 mL de sangre para cerdos de 21 días. Las muestras de sangre obtenidas fueron depositadas en 2 tubos; 0,5 mL en un tubo con EDTA para realizar hemograma completo, y el volumen restante en un tubo con activador de la coagulación para la obtención de suero y determinación de biomarcadores séricos del estado de nutrición de Fe. Ambos tubos fueron depositados en un “cooler” y transportados al Laboratorio de Micronutrientes del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA) de la Universidad de Chile donde fueron analizados.

Para estudiar el estado de nutrición de Fe se realizaron las siguientes determinaciones, usando técnicas estándares y de rutina del Laboratorio de Micronutrientes del INTA: eritrocitos, volumen corpuscular medio (VCM), hematocrito, hemoglobina, concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) (Electronic Counter, CELDYN), y zinc protoporfirina eritrocitaria (ZnPP), determinada en un hematofluorómetro (AVIV Biomedical Inc., Lakewood, NJ, modelo 206D). Adicionalmente, con las muestras de suero de los días 1 y 21 también se determinó ferritina sérica (Pig ferritin, FE ELISA Kit, Cusabio®).

Determinación del contenido de Fe total en órganos de reserva y músculo

Se determinó el contenido de Fe total desde tejidos y órganos involucrados en las vías metabólicas y en el almacenamiento del Fe. Para esto se seleccionaron aleatoriamente 4 lechones de cada grupo al día 21 de edad, los cuales fueron trasladados desde el criadero a la sala de necropsia de FAVET. Previo al sacrificio los cerdos fueron anestesiados mediante la aplicación de acepromacina (0,5 mg/kg i.m) y ketamina (60 mg/kg i.m), y posteriormente éstos fueron sacrificados con una dosis intracardiaca de 60 mg/kg de tiopental sódico.

Finalmente se recolectaron muestras de 10 g en triplicado de hígado, bazo, riñones, corazón, intestino delgado y músculos de la pierna. Las muestras fueron almacenadas a -18°C hasta su análisis, donde se determinó el contenido de Fe total de las muestras mediante digestión ácida (método 999.11, AOAC, 1996) y lectura por espectrofotometría de absorción atómica (GBC 905AA, Australia). El resultado se expresó como mg Fe/g.

Análisis estadístico

Los datos de ganancia diaria de peso, recuento de glóbulos blancos, además del contenido de Fe determinado en muestras de riñón y bazo, no mostraron una distribución normal, por tanto se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis y comparación de múltiples rangos ($p < 0,05$). Todos los otros parámetros productivos y del estado de nutrición de Fe, al igual que las determinaciones del contenido de Fe en hígado, corazón, intestino y músculo presentaron distribución normal y fueron analizados mediante ANOVA con una prueba de Tukey ($p < 0,05$). Los resultados son presentados como promedio \pm desviación estándar.

RESULTADOS

Parámetros productivos

En la Tabla 1 se presentan los parámetros productivos basales de peso vivo al inicio (día 1) y al término del estudio (día 21). Se observa que no hubo diferencias significativas en el peso vivo entre los tratamientos al comienzo ni al término del estudio. Tampoco se observaron diferencias significativas en la ganancia diaria de peso entre los grupos. El grupo parenteral mostró un mayor porcentaje de mortalidad (Tabla 1) a diferencia de los grupos oral 2 y oral 3 donde no se registraron muertes. Pese a lo anterior, la mortalidad registrada en el grupo parenteral ocurrió durante la primera semana de vida y se debió a una muerte por aplastamiento de la cerda, lo cual es considerado esperable para la etapa de lactancia y no es atribuible al tipo de suplementación de Fe utilizado.

Tabla 1. Parámetros productivos de cerdos neonatos durante el periodo de lactancia (21d) sometidos a diferentes protocolos de suplementación de Fe.

Parámetros	Grupos de tratamiento			Valor-p
	Parenteral	Oral 2	Oral 3	
Peso vivo (kg) d1	1,61 ± 0,08 ^a	1,63 ± 0,09 ^a	1,63 ± 0,07 ^a	0,840
Peso vivo (kg) d21	6,27 ± 0,91 ^a	6,28 ± 1,00 ^a	6,27 ± 0,93 ^a	0,998
Ganancia de peso diaria 1-21d (kg)	0,22 ± 0,04 ^a	0,22 ± 0,05 ^a	0,22 ± 0,04 ^a	0,998
Mortalidad 1-21d (%)	4,6	0	0	

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). d1: línea base. d21: fin del estudio.

Estado de nutrición de Fe de cerdos neonatos

En la Tabla 2 se presentan los parámetros hematológicos de nutrición de Fe basal, determinados en los lechones a la edad de 1 día. Se observa que los parámetros: recuento de eritrocitos, VCM, hematocrito, hemoglobina y CHCM, se encuentran dentro del rango fisiológico (Weiss y Wardrop, 2010), y no muestran diferencias significativas entre los grupos experimentales.

A nivel basal se observaron diferencias entre los grupos en el recuento de glóbulos blancos. El grupo oral 3 presentó un recuento de glóbulos blancos inferior a los grupos parenteral y oral 2, cifra que resultó menor al valor mínimo definido para la especie (Weiss y Wardrop, 2010).

El grupo oral 2 presentó valores de ZnPP significativamente superiores al grupo parenteral. A pesar de esto, el promedio de los valores de ZnPP calculados para cada grupo no supera a los valores determinados por Espinoza *et al.* (2014), por lo que todos los grupos fueron considerados dentro del rango fisiológico para éste parámetro. Los valores de ZnPP determinados en éste estudio se compararon con los reportados por Espinoza *et al.* (2014) ya que no hay valores normales publicados para este indicador.

El promedio de ferritina sérica determinado en el grupo oral 2 resultó ser significativamente superior al del grupo oral 3 y éste superior al observado en el grupo parenteral. Sin embargo, los 3 grupos presentaron valores de ferritina sérica dentro del rango fisiológico definido para la especie.

Tabla 2. Parámetros hematológicos basales de cerdos neonatos (d1) sometidos a diferentes protocolos de suplementación de Fe.

Parámetros basales	Grupos de tratamiento			VR	Valor-p
	Parenteral	Oral 2	Oral 3		
Eritrocitos ($10^6 \times \text{mm}^3$)	$6,0 \pm 0,8^a$	$5,9 \pm 0,9^a$	$6,0 \pm 1,0^a$	$< 5,3^1$	0,983
VCM (fl)	$62,1 \pm 3,4^a$	$61,4 \pm 3,0^a$	$63,7 \pm 3,1^a$	$< 50^3$	0,052
Hematocrito (%)	$37,1 \pm 5,4^a$	$36,3 \pm 5,8^a$	$37,9 \pm 4,9^a$	$< 32^3$	0,641
Hemoglobina (g/dL)	$11,5 \pm 1,7^a$	$11,3 \pm 1,9^a$	$11,7 \pm 1,4^a$	$< 9,0^2$	0,735
CHCM (%)	$31,1 \pm 0,7^a$	$31,2 \pm 0,8^a$	$31,0 \pm 0,8^a$	$< 28,9^5$	0,767
Glóbulos blancos ($\times \text{mm}^3$)	8.623 ± 6.033^a	8.223 ± 2.845^a	4.907 ± 4.075^b	$< 7.600^5$	0,015
ZnPP (ug/dL GR)	$88,1 \pm 18,7^a$	$105,7 \pm 30,3^b$	$93,8 \pm 17,8^{ab}$	n.d	0,040
Ferritina sérica (ng/mL)	$13,5 \pm 4,4^a$	$25,5 \pm 4,8^b$	$17,8 \pm 4,8^c$	$< 12,1^4$	$< 0,001$

VR: Valores de referencia, VCM: Volumen corpuscular medio, CHCM: Concentración de hemoglobina corpuscular media, ZnPP: Zinc protoporfirina libre eritrocitaria, n.d: valor no determinado en la literatura como rango de referencia. ¹Friendship *et al.* (1984). ²Zimmerman (1980). ³Wittner (2012). ⁴Adams *et al.* (1988). ⁵Weiss y Wardrop (2010). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Los parámetros de nutrición de Fe obtenidos al término del estudio se presentan en la Tabla 3. Se observa que el grupo oral 2 presentó índices de recuento de eritrocitos, VCM y CHCM, significativamente inferiores en comparación a los grupos parenteral y oral 3, sin embargo, estos parámetros se encuentran dentro del rango fisiológico definido para la especie (Weiss y Wardrop, 2010).

Los parámetros de hematocrito y hemoglobina observados en el grupo oral 2 también resultaron significativamente inferiores en comparación a los grupos parenteral y oral 3, siendo estos menores al límite inferior del rango fisiológico, razón por la cual el grupo oral 2 es considerado anémico (Weiss y Wardrop, 2010).

El recuento de glóbulos blancos no presentó diferencias significativas entre los grupos experimentales, sin embargo, sólo los grupos oral 2 y oral 3 presentaron valores que se encuentran dentro del rango fisiológico definido para la especie, a diferencia del grupo parenteral el cual presentó un valor levemente inferior a dicho rango.

Los valores de ZnPP determinados en los 3 grupos superan las mediciones realizadas por Espinoza *et al.* (2014). Si bien estos valores no difieren significativamente entre grupos, en el grupo oral 2 se observa una leve tendencia hacia el aumento de éste parámetro, lo que podría estar relacionado a un estado de deficiencia de Fe, que se condice con el estado anémico de los animales de este grupo.

Los 3 grupos presentaron valores de ferritina sérica inferiores al valor de referencia (Adams *et al.*, 1988), de éstos el valor correspondiente al grupo oral 2 fue significativamente inferior al de los grupos parenteral y oral 3, los cuales no presentaron diferencias entre sí, reflejando compromiso de las reservas corporales de Fe en todos los grupos, pero de mayor magnitud en el grupo oral 2.

Tabla 3. Parámetros hematológicos de cerdos neonatos sometidos a diferentes protocolos de suplementación de Fe determinados al final del estudio.

Parámetros	Grupos de tratamiento			VR	Valor-p
	Parenteral	Oral 2	Oral 3		
Eritrocitos ($10^6 \times \text{mm}^3$)	$6,0 \pm 0,5^a$	$5,6 \pm 0,6^b$	$6,3 \pm 0,8^a$	$< 5,3^1$	0,0064
VCM (fl)	$57,0 \pm 4,6^a$	$53,7 \pm 2,9^b$	$56,2 \pm 3,3^a$	$< 50^3$	0,0116
Hematocrito (%)	$34,1 \pm 3,5^a$	$30,2 \pm 3,0^b$	$35,1 \pm 4,8^a$	$< 32^3$	0,0002
Hemoglobina (g/dL)	$10,2 \pm 1,4^a$	$8,3 \pm 1,3^b$	$10,1 \pm 1,7^a$	$< 9,0^2$	0,0001
CHCM (%)	$29,7 \pm 1,6^a$	$27,3 \pm 2,3^b$	$28,7 \pm 1,5^a$	$< 26^5$	0,0002
Glóbulos blancos ($\times \text{mm}^3$)	5.955 ± 2.163^a	6.601 ± 2.241^a	6.814 ± 2.311^a	$< 6.200^5$	0,4313
ZnPP (ug/dL GR)	$132,7 \pm 37,0^a$	$152,6 \pm 29,3^a$	$139,7 \pm 31,2^a$	n.d	0,1338
Ferritina sérica (ng/mL)	$9,9 \pm 4,4^a$	$4,1 \pm 1,3^b$	$8,7 \pm 3,9^a$	$< 12^4$	$< 0,001$

VR: Valores de referencia, VCM: Volumen corpuscular medio, CHCM: Concentración de hemoglobina corpuscular media, ZnPP: Zinc protoporfirina libre eritrocitaria, n.d: valor no determinado en la literatura como rango de referencia. ¹Friendship *et al.* (1984). ²Zimmerman (1980). ³Wittner (2012). ⁴Adams *et al.* (1988). ⁵Weiss y Wardrop (2010). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Contenido de Fe en vísceras y músculo

La determinación de Fe en tejidos al término del estudio se representa en la Tabla 4. Se observa que el tipo de suplementación de Fe no generó diferencias significativas en el contenido de este mineral en corazón. Sin embargo, el contenido de Fe en muestras de riñón, bazo, hígado, y músculo fue superior para el grupo parenteral en comparación al grupo oral 2, no observándose diferencias significativas entre el grupo parenteral y oral 3. El contenido de Fe en intestino fue significativamente superior en el grupo parenteral, en comparación a los grupos orales, y entre éstos el grupo oral 3 presentó un contenido de Fe superior al grupo oral 2.

Tabla 4. Determinación del contenido de Fe (mg/kg) en muestras de tejidos obtenidos de cerdos sometidos a distintos tratamientos de suplementación de Fe durante el periodo de lactancia.

Contenido de Fe en tejidos	Grupos de Tratamiento			Valor-p
	Parenteral	Oral 2	Oral 3	
Riñón	51,1 ± 9,4 ^a	24,1 ± 1,6 ^b	34,2 ± 1,8 ^{ab}	<0,001
Bazo	196,7 ± 53,6 ^a	135,9 ± 47,2 ^b	200,9 ± 67,5 ^a	0,001
Hígado	77,6 ± 20,0 ^a	40,4 ± 8,2 ^b	72,2 ± 18,7 ^a	0,006
Corazón	40,3 ± 11,8 ^a	30,2 ± 7,2 ^a	37,3 ± 15,8 ^a	0,663
Intestino	25,8 ± 2,0 ^a	7,5 ± 4,2 ^b	17,1 ± 2,8 ^c	<0,001
Músculo	12,6 ± 4,6 ^a	6,9 ± 0,4 ^b	10,6 ± 1,7 ^{ab}	0,016

Letras distintas indican diferencias significativas (p<0,05).

DISCUSIÓN

El presente estudio permite inferir que el tipo de suplementación de Fe utilizado (parenteral, oral 2 dosis y oral 3 dosis) no tiene efecto sobre los parámetros productivos de lechones (peso vivo, ganancia de peso y mortalidad) en el periodo de lactancia. Resultados similares fueron obtenidos por Svoboda y Drábek (2002), Svoboda *et al.* (2004), Theilkuhl *et al.* (1986) y Zimmerman *et al.* (1959), quienes utilizaron Fe fumarato, lactato de Fe, citrato amónico férrico/sulfato ferroso y sulfato ferroso, respectivamente, como fuente de suplementación de Fe oral durante el periodo de lactancia en comparación a la suplementación con Fe dextrano i.m. En contraste a lo anterior, ensayos de suplementación oral con Fe amino quelado (Femetionina) (Kegley *et al.*, 2002) y Fe lactato disuelto en agua de bebida dispuesta para los animales (Loh *et al.*, 2001), obtuvieron índices de peso vivo inferiores en comparación a cerdos suplementados con Fe dextrano i.m. De éstos autores, Kegley *et al.* (2002) reportaron que no se observaron cuadros de diarrea en cerdos suplementados con Fe vía oral y atribuyen el mayor peso evidenciado en cerdos suplementados vía parenteral, al efecto de la administración parenteral de Fe como potenciador de la ganancia de peso, lo cual también fue descrito por Wahlstrom y Juhl (1960) y Zimmerman *et al.* (1959). Loh *et al.* (2001) por su parte, no se refieren a la ocurrencia de cuadros de diarrea durante su estudio, sin embargo reportan que en éste no se observó la relación positiva postulada por Murphy *et al.* (1997) entre los niveles de hemoglobina y peso corporal, lo cual atribuyeron a las diferencias que existen entre la absorción de las fuentes de Fe suplementadas oralmente y la absorción del Fe dextrano i.m.

La baja tasa de mortalidad observada en los grupos que componen el presente estudio coincide con lo reportado por Zimmerman *et al.* (1959) y Theilkuhl *et al.* (1986), donde los decesos son atribuidos a factores ajenos al tipo de suplementación de Fe utilizado, tales como aplastamiento y hemorragia posterior a la flebotomía, lo que es considerado esperable durante

el periodo de lactancia, para el tipo de sistema productivo y abordaje exploratorio de los animales. En contraste a lo anterior Kegley *et al.* (2002) observaron mayor porcentaje de mortalidad en cerdos lactantes suplementados con 200 mg de sulfato ferroso administrado al día 3, los cuales presentaron un pobre desarrollo en comparación a cerdos suplementados con Fe dextrano i.m y Fe-metionina oral, efecto que fue atribuido por el autor a la fuente de Fe utilizada.

De las mediciones de parámetros sanguíneos realizadas al inicio del experimento sólo el recuento de glóbulos blancos determinado en el grupo oral 3 se encuentra fuera del rango fisiológico. Esta situación no se observa al término del experimento y puede ser atribuida a la presencia en el criadero del virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino, el cual presenta tropismo por las células inmunitarias y genera disminución transitoria de linfocitos, monocitos y neutrófilos evidenciable hasta 4 días posterior a la infección (AACP, 2006).

En relación a los parámetros hematológicos observados en el presente estudio, la administración de 200 mg de Fe dextrano y 3 dosis del preparado oral de mezcla entre Fe hemo/no hemo encapsulados (84 mg Fe/dosis equivalentes a 252 mg totales) evitaron el desarrollo de anemia por deficiencia de Fe durante el periodo de lactancia de 21 días. Resultados similares obtenidos de ensayos de suplementación oral fueron reportados por Svoboda y Drábek (2002) mediante la administración de 2 dosis de 200 mg de fumarato ferroso al día 6 y 11 de vida de los lechones. Por tanto, estos autores utilizaron una dosis total de 400 mg de Fe, lo que duplica los requerimientos para cerdos durante el periodo de lactancia, equivalentes a 210 mg de Fe aproximadamente (cálculo realizado en base a los 7 a 10 mg de Fe diarios requeridos por el cerdo neonato definidos por el NRC (2012), para un período de lactancia de 21 días comúnmente usado en Chile); a diferencia del presente trabajo donde se logró evitar la anemia en los animales del grupo oral 3 administrando una dosis total de 252 mg de Fe en 21 días, cifra que representa un 63% de lo utilizado por Svoboda y Drábek (2002). El efecto anti-anémico utilizando una menor dosis de Fe podría explicarse debido a diferencias en la capacidad de absorción de los compuestos de Fe no hemo. En el presente estudio se utilizó sulfato ferroso, a diferencia de Svoboda y Drábek (2002) los cuales utilizaron fumarato ferroso, ambas fuentes de Fe no difieren en su biodisponibilidad media

relativa en humanos, sin embargo, en ratas se ha reportado que el fumarato ferroso es inferior en un 5% respecto a la biodisponibilidad del sulfato ferroso (Hurrell, 2002). También podría existir un efecto de la técnica de encapsulación, la cual ha reportado una mejora en la biodisponibilidad del Fe no hemo en humanos (Hurrell *et al.*, 2004; Zimmerman, 2004), y en ratas (Xu *et al.*, 2014), hecho que también se ha descrito para el Fe hemo (Yuan *et al.*, 2013). Adicionalmente, el hecho de que el efecto anti-anémico en el presente trabajo se obtuvo con 3 dosis de baja carga de Fe se podría explicar también por la asociación entre Fe no hemo y Fe hemo del suplemento oral, en donde el Fe hemo actúa como un potenciador de la absorción intestinal de Fe no hemo (Ma *et al.*, 2011; Henry y Miller, 1995).

En otro estudio, Zimmerman *et al.* (1959) suplementaron cerdos lactantes con 40 mg de sulfato ferroso administrado 2 veces por semana durante 4 semanas; logrando prevenir la anemia por deficiencia de Fe en cerdos. Aunque la dosis total de Fe usada por estos autores fue de 320 mg de Fe (240 mg Fe en 3 semanas), menor a los 400 mg de Fe-fumarato administrados en 2 dosis por Svoboda y Drábek (2002), y levemente inferior a los 252 mg de Fe utilizados en el presente estudio, ésta debió ser administrada en 8 dosis, por lo que el método utilizado por Zimmerman *et al.* (1959) requiere realizar la captura de los lechones 8 veces durante la lactancia para entregar el suplemento oral, lo que demanda un manejo excesivo por parte del personal y se traduce en mayores costos para el criadero, lo que justamente se evita con la aplicación de una dosis única de Fe dextrano i.m.

Por otra parte, Loh *et al.* (2001) mediante la administración de 32 mg/mL de lactato de Fe en agua de bebida desde el tercer día de vida hasta el destete de los cerdos (28 días), evitaron el desarrollo de anemia por deficiencia de Fe, sin embargo la dosis de Fe suplementada no fue definida ya que no se determinó la cantidad total de agua consumida por los cerdos y además durante este periodo a éstos también se les ofreció alimento sólido desde el séptimo día de vida, el cual contenía 1 g/kg de sulfato ferroso. Cabe destacar que resulta muy difícil la suplementación con Fe a través del agua de bebida en cerdos durante el período de lactancia ya que éstos casi no consumen agua, sino que se alimentan exclusivamente de leche de la cerda. Además la inclusión de una fuente de Fe inorgánico en el agua puede alterar el sabor de

ésta, generando el típico sabor metálico que causa el Fe cuando es adicionado sin encapsular a alimentos o bebidas (Hurrell, 2002), produciendo aversión en los animales.

Además de los parámetros hematológicos ya mencionados, se determinaron otros indicadores del estado de nutrición de Fe, tales como ferritina sérica y ZnPP. La literatura disponible no describe un rango de referencia definido para el parámetro ZnPP en cerdos, sin embargo, Espinoza *et al.* (2014) determinaron dicho parámetro en un grupo de cerdos alimentados con una dieta comercial basal formulada para cerdos de 45 a 75 días de edad, equivalente a 119 ± 23 y 106 ± 23 ug ZnPP/dL de glóbulos rojos para cerdos al nacimiento y a la edad de 30 días, respectivamente. Pese a que a nivel basal ningún grupo superó el rango reportado para ZnPP por Espinoza *et al.* (2014), el grupo oral 2 presentó un valor significativamente superior al grupo parenteral, lo que podría ser explicado por una menor disponibilidad de Fe para la síntesis de hemoglobina (Weiss y Wardrop, 2010). La determinación de ZnPP al término del estudio no presentó diferencias significativas entre grupos, sin embargo, los 3 grupos superaron los valores obtenidos por Espinoza *et al.* (2014). A pesar de lo anterior, el promedio de ZnPP del grupo oral 2 superó al del grupo oral 3 y éste al grupo parenteral, una tendencia que podría indicar que el grupo oral 2 presentaría un estado carencial de Fe superior, el cual dificultaría la formación del grupo hemo (Weiss y Wardrop, 2010), que coincide con el menor valor de hemoglobina en este grupo.

La ferritina sérica constituye la principal proteína de almacenaje de Fe en mamíferos, que disminuye en situaciones de deficiencia de Fe y está directamente relacionada con las reservas corporales de Fe (Kaneko *et al.*, 2008). La determinación de éste parámetro es considerada por Smith *et al.* (1983) el método más objetivo para determinar el estado nutricional de Fe en comparación al diagnóstico realizado considerando sólo los índices de hemoglobina y hematocrito usados universalmente, los cuales pueden presentar una alteración retardada por la vida media de los eritrocitos. La clasificación de los grupos según la determinación de ferritina sérica resultó compleja debido a que los valores de referencia en cerdos disponibles para este parámetro difieren según autor y presentan una dispersión de valores alta. El rango normal de ferritina sérica determinado por Smith *et al.* (1983) es de $20,8 \pm 14,7$ ng/mL, mientras que el reportado por Adams *et al.* (1988) es de $12,1 \pm 8,7$ ng/mL. Para efectos del presente estudio se

utilizó como referencia los valores de ferritina sérica determinados por Adams *et al.* (1988) ya que este autor utilizó cerdos neonatos lactantes y un mayor tamaño muestral para definir este rango de referencia, y además sus resultados se asemejan a los valores definidos por el CDC (1998) para bebés humanos. Posterior a la suplementación de Fe, en los 3 grupos se observó depleción de los depósitos de Fe. El valor observado en el grupo oral 2 representa casi un 50% del valor determinado en los grupos parenteral y oral 3, por lo cual se infiere que la depleción de las reservas de Fe es más severa en este grupo que en los otros.

Otro indicador del estado de nutrición de Fe ampliamente utilizado en mamíferos es la determinación del contenido Fe en tejidos, que permite estimar las reservas corporales de este mineral en un individuo. Usualmente se determina su concentración en hígado y bazo, ya que ambos tejidos contienen Fe en una alta concentración, debido a que son órganos de reserva de este metal. En los órganos el Fe está presente en forma de Fe hemo y no hemo, sin embargo, sólo la fracción no hemo representa el Fe almacenado en forma de ferritina y hemosiderina (Kaneko *et al.*, 2008). Existen pocos estudios disponibles en relación a la determinación de Fe en tejidos al término del periodo de lactancia en cerdos neonatos. Erikson *et al.* (1998) determinaron el contenido de Fe en hígado de cerdos de 21 días, previamente suplementados con Fe dextrano i.m y cerdos de la misma edad sin suplementación de Fe durante el mismo periodo, éstos últimos resultaron anémicos y mostraron valores de 25,69 mg de Fe/kg de hígado, valor bastante inferior al contenido de Fe en hígado observado en nuestro estudio para los grupos oral 3 y parenteral, pero levemente inferior al observado en el grupo oral 2. Kegley *et al.* (2002) determinaron una mayor concentración de Fe en hígado y bazo de cerdos lactantes suplementados con 200 mg de Fe como gleptoferron administrado vía parenteral, en comparación a cerdos suplementados vía oral con Fe-metionina en dosis de 100 o 200 mg al nacimiento, 200 mg al tercer día de vida o 200 mg de sulfato ferroso a la misma edad, en un periodo de lactancia de 21 días. Por el contrario, según los resultados del presente estudio, el suplemento oral de Fe hemo/no hemo encapsulado administrado en 3 dosis no mostró diferencias en relación al contenido de Fe en hígado, bazo, riñon y músculo, determinados en el grupo parenteral. Por lo que si bien el Fe aminoquelado presenta mayor biodisponibilidad que el sulfato ferroso administrado oralmente (Kegley *et al.*, 2002), el suplemento oral utilizado en nuestro estudio durante el periodo de lactancia, generó mayor repleción de las

reservas de Fe en comparación a la suplementación oral de Fe metionina o sulfato ferroso ensayada por estos autores, lo que podría deberse a la mayor biodisponibilidad del Fe proveniente del suplemento utilizado en éste estudio, producto de la encapsulación de sus componentes y/o del efecto potenciador del Fe hemo sobre la absorción del Fe no hemo.

Por otra parte, la concentración de Fe en corazón no presentó diferencias significativas entre los 3 grupos de tratamiento, lo que podría explicarse debido a que este órgano a pesar de ser el principal responsable de la distribución sanguínea en un organismo, no constituye un órgano de reserva de Fe, a diferencia del hígado y bazo.

En relación al contenido de Fe en intestino, el grupo parenteral fue significativamente superior a los grupos de suplementación oral, de los cuales el grupo oral 3 presentó un contenido de Fe 2,28 veces superior al grupo oral 2. Estos datos fueron sorprendentes, ya que el Fe entregado vía parenteral no se absorbe mediante la vía intestinal, sino que lo hace por circulación linfática (Thoren y Jonsson, 1977). Por tanto, se postula que el Fe suplementado vía parenteral viaja por el organismo unido a la molécula de transferrina, y de esta forma alcanza intestino en donde se deposita como ferritina. Otra posible explicación podría estar relacionada con la función de la molécula hepcidina, un péptido sintetizado en hígado que regula la absorción intestinal de Fe, el cual aumenta su expresión en condiciones de sobrecarga férrica y disminuye cuando existe deficiencia de este mineral (Del Castillo y De Portugal, 2003). Starzyński *et al.* (2013) determinaron niveles de hepcidina en plasma de cerdos lactantes sometidos a diferentes protocolos de suplementación con Fe i.m., observando que cerdos suplementados con la mayor dosis de Fe al inicio del estudio (150 mg de Fe dextrano) mostraron un aumento de hepcidina 12 veces superior a los otros tratamientos parenterales (con menor cantidad de Fe entregado). Así, considerando la dosis de 200 mg de Fe dextrano administrada en nuestro estudio al grupo parenteral, es posible que el mayor contenido de Fe determinado en intestino se genere debido a un fuerte aumento de hepcidina, la cual inhibe la exportación del Fe absorbido desde el enterocito (vía leche materna), generando su retención al interior de éste, producto de la degradación de los canales de ferroportina, razón por la cual el contenido de Fe podría ser mayormente detectado en muestras de intestino en comparación a los grupos oral 3 y oral 2.

De acuerdo a la literatura disponible resulta difícil realizar una comparación de los resultados obtenidos de la concentración de Fe en tejidos, ya que casi la totalidad de las experiencias reportadas por otros autores a excepción de Kegley *et al.* (2002) y Erikson *et al.* (1998) corresponden a mediciones realizadas en etapas posteriores al destete, donde previamente hubo suplementación parenteral de Fe y además existe un aporte de Fe a través de la dieta sólida. No fue posible comparar con otros autores, los valores de contenido de Fe determinados en músculo de cerdos pertenecientes a este estudio, ya que según nuestro conocimiento no hay información al respecto. Si bien el presente estudio demuestra que el suplemento oral entregado en 3 dosis generó indicadores del estado de nutrición de Fe en cerdos similares a los del grupo suplementado con Fe dextrano, éste no permite determinar con certeza si el efecto hemático que presenta se debe a las ventajas que entrega la tecnología de encapsulación o la asociación de Fe hemo y Fe no hemo.

CONCLUSIONES

Es posible concluir que el tipo de suplementación de Fe, oral o parenteral, utilizados en éste ensayo, no influye sobre los parámetros de peso vivo, ganancia de peso y mortalidad en cerdos durante el periodo de lactancia (21 días). Sin embargo, la administración del suplemento oral de mezcla entre Fe hemo/no hemo encapsulados en 2 dosis de 126 mg de Fe, no evitaría el desarrollo de anemia en cerdos lactantes, situación que se revierte al administrar 3 dosis de 84 mg de Fe del mismo suplemento, cada 6 días durante un período de lactancia de 21 días. Éste método de suplementación en 3 dosis generó biomarcadores del estado de nutrición de Fe los cuales no presentaron diferencias con aquellos determinados en el grupo de cerdos suplementados vía parenteral, presentando un efecto hemático y sobre las reservas corporales de Fe comparable a la suplementación tradicional de Fe dextrano i.m.

Es necesario realizar estudios adicionales para determinar si el efecto hematínico y sobre las reservas corporales de Fe del suplemento oral utilizado se debe a la asociación de Fe hemo/no hemo, y/o a la encapsulación de dichos compuestos.

BIBLIOGRAFÍA

- **AACP.** 2006. Síndrome reproductivo y respiratorio del cerdo (PRRS) y su importancia en la producción porcina. [en línea] < http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infeciosas/porcinas/01-sindrome_reproductivo_respiratorio_cerdo.pdf > [consulta: 22-04-2015].
- **ADAMS, P.; POWELL, L.; HALLIDAY, J.** 1988. Solid phase immunoradiometric assay for porcine serum ferritin. *Comp. Biochem. Phys. B.* 3(2):355-358.
- **AOAC.** 1996. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists. 16th ed. International. Gaithersburg, USA.
- **CALLENDER, S.; MALLETT, B.; SMITH, M.** 1957. Absorption of hemoglobin iron. *Brit. J. Haematol.* 3(2):186-192.
- **CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC).** 1998. Recommendations to prevent and control iron deficiency in the United States. *Morbidity and mortality weekly report.* Georgia, USA.
- **DEL CASTILLO, A.; DE PORTUGAL, J.** 2003. Hefcidina, una nueva proteína en la homeostasis del hierro. *An. Med. Intern.* 20:605-606.
- **ERIKSON, K.; BEARD, J.; CONNOR, J.** 1998. Distribution of brain iron, ferritin, and transferrin in the 28-day-old piglet. *J. Nutr. Biochem.* 9:276-284.

- **ESPINOZA, A.; MORALES, S.; ARREDONDO, M.** 2014. Effects of acute dietary iron overload in pigs (*Sus scrofa*) with induced type 2 diabetes mellitus. Biol. Trace Elem. Res. 158:342-352.

- **FRIENDSHIP, R.; LUMSDEN, J.; MCMILLAN, I.; WILSON, M.** 1984. Hematology and biochemistry reference values for ontario swine. Can. J. Comparat. Med. 48(4):390-393.

- **HENRY, P.; MILLER, E.** 1995. Iron availability. **In:** Ammerman, C.B. Baker, D.H. Lewis, A.S. (Eds.), Bioavailability of nutrients for animals, Academic Press, San Diego, USA. pp.169-199.

- **HURRELL, R.** 2002. How to ensure adequate iron absorption from iron-fortified food. Nutr. Rev. 60(7):7-15.

- **HURRELL, R.; LYNCH, S.; BOTHWELL, T.; CORI, H.; GLAHN, R.; HERTRAMPF, E.; KRATKY, Z.; MILLER, D.; RODENSTEIN, M.; STREEKSTRA, H.; TEUCHER, B.; TURNER, E.; YEUNG, C.; ZIMMERMANN, M.** 2004. Enhancing the absorption of fortification iron. A sustain task force report. Int. J. Vitam. Nutr. Res. 74(6):387-401.

- **JOLLIFF, J.; MAHAN, D.** 2011. Effect of injected and dietary iron in young pigs on blood hematology and postnatal pig growth performance. J. Anim. Sci. 89(12):4068-4080.

- **KEGLEY, E.; SPEARS, J.; FLOWERS, W.; SCHOENHERR, W.** 2002. Iron methionine as a source of iron for the neonatal pig. Nutr. Res. 22:1209-1217.

- **KANEKO, J.; HARVEY, J.; BRUSS, M.** 2008. Clinical biochemistry of domestic animals. 6^a ed. Elsevier. San Diego, USA.

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

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

- **LOH, T.; LEONG, K.; TOO, H.; MAH, C.; CHOO, P.** 2001. The effects of iron supplementation in preweaning piglets. *Malays. J. Nutr.* 7:41-49.

- **MA, Q.; KIM, E.; HAN, O.** 2011. Heme boosts non-heme iron absorption in human intestinal Caco-2 cells. *Faseb. J.* 25:607-617.

- **MURPHY, K.; FRIENDSHIP, R.; DEWEY, C.** 1997. Effects of weaning age and dosage of supplemented iron on the hemoglobin concentrations and growth rate of piglets. *Swine Health Prod.* 5(4):135-138.

- **NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC).** 2012. Nutrient requirements of swine. 11th rev. ed. National Academy of Science. Washington DC, USA. pp. 61-69.

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

- **SEGALÉS, J.; DOMINGO, M.; MARCO, A.; SAN MARTIN, J.; PIJOAN, C.** 1995. Atrophic myopathy in young pigs. *Swine Health Prod.* 3(2):75-78.

- **SHARP, P.; SRAI, S.** 2007. Molecular mechanisms involved in intestinal iron absorption. *World J. Gastroenterol.* 13(35):4716-4724.

- **SMITH J.; MOORE K.; BOYINGTON D.; POLLMANN D.; SCHONEWEIS D.** 1983. Serum ferritin and total iron-binding capacity to estimate iron storage in pigs. *Vet. Pathol.* 21:597-600.

- **SOUTH P.; LEI X.; MILLER D.** 2000. Meat enhances nonheme iron absorption in pigs. *Nutr. Res.* 20(12):1749-1759.

- **STARZYŃSKI, R.; LAARAKKERS, C.; TJALSMA, H.; SWINKELS, D.; PIESZKA, M.; STYS, A.; MICKIEWICZ, M.; LIPINSKI, P.** 2013. Iron supplementation in suckling piglets: How to correct iron deficiency anemia without affecting plasma hepcidin levels. *Plos One.* 8(5):e64022.

- **SVOBODA, M.; BOUDA, J.; DRÁBEK, J.; DOUBEK, J.** 2004. Effect of per os iron lactate supplement on development of haematological profile of piglets in the early postnatal period. *Acta Vet. Brno.* 73:431-436.

- **SVOBODA, M.; DRÁBEK, J.** 2002. Effect of oral administration of Fe²⁺-fumarate on erythrocyte profile and growth rate of suckling piglets. *Acta Vet. Brno.* 71(2):217-222.

- **SVOBODA, M.; DRÁBEK, J.** 2005a. Iron deficiency in suckling piglets: ethiology, clinical aspects and diagnosis (a review). *Folia Vet.* 49(2):104-111.

- **SVOBODA, M.; DRÁBEK, J.** 2005b. Iron deficiency in suckling piglets: parenteral and oral iron administration to piglets (a review). *Folia Vet.* 49(3):165-174.

- **THEILKUH, J.; LOZANO, F.; MENESES DE GONGORA, B.** 1986. Estudio comparativo del sulfato ferroso y del citrato amónico férrico en el modelo de la anemia hipocrómica del cerdo lactante. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.* 15:3-15.

- **THOREN, K.; JONSSON, L.** 1977. Cellular distribution of orally and intramuscularly administered iron dextran in newborn piglets. *Can. J. Comp. Med.* 41:318-325.

- **UNDERWOOD, C.; VAN EPS, W.** 2012. Nanomedicine and veterinary science: The reality and the practicality. *Vet. J.* 193(1):12-23.

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

- **VELÁSQUEZ, D.; ARANZAZU, D.** 2004. An acute case of iron toxicity on newborn piglets from vitamin E/Se deficient sows. *Rev. Colomb. Cienc. Pec.* 17(1):60-62.

- **WAHLSTROM, R.; JUHL, E.** 1960. A comparison of different methods of iron administration on rate of gain and hemoglobin level of the baby pig. *J. Anim. Sci.* 19:183-188.

- **WEISS, D.; WARDROP, K.** 2010. *Schalm's Veterinary Hematology.* 6^a ed. Editorial Office. Ames, USA.

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

- **WITTNER, F.** 2012. *Manual de patología clínica veterinaria.* 2^a ed. Imprenta América. Valdivia, Chile.

- **XU, Z.; LIU, S.; WANG, H.; GAO, G.; YU, P.; CHANG, Y.** 2014. Encapsulation of iron in liposomes significantly improved the efficiency of iron supplementation in strenuously exercised rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 162(1-3):181-8.

- **YUAN, L.; GENG, L.; GE, L.; YU, P.; DUAN, J.; CHANG, Y.** 2013. Effect of iron liposomes on anemia of inflammation. *Int. J. Pharm.* 454(1):82-89.

- **ZIMMERMAN, D.** 1980. Iron in swine nutrition. In national feed ingredient association literature review on iron in animal and poultry nutrition. National Feed Ingredient Association. Des Moines, USA.

- **ZIMMERMAN, D.; SPEER, V.; HAYS, V.; CATRON, D.** 1959. Injectable iron-dextran and several oral iron treatments for the prevention of iron-deficiency anemia of baby pigs. *J. Anim. Sci.* 18(4):1409-1415.

- **ZIMMERMANN, M.** 2004. The potential of encapsulated iron compounds in food fortification: a review. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 74(6):453-461.