

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA
INSTITUTO DE NUTRICIÓN Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



**“EFECTO DE LA LECHE DE CABRA O VACA, ENRIQUECIDA O NO EN
CALCIO, SOBRE LA BIODISPONIBILIDAD DE HIERRO, CALCIO,
FÓSFORO Y MAGNESIO EN SITUACIÓN DE ANEMIA FERROPÉNICA
NUTRICIONAL”**

TESIS DOCTORAL

JAVIER DÍAZ CASTRO
2007

Esta memoria de Tesis Doctoral forma parte del Proyecto de Investigación AGL2000-1501, subvencionado por la Dirección General de Investigación Científica y Técnica (DGICYT) del Ministerio de Educación y Ciencia.



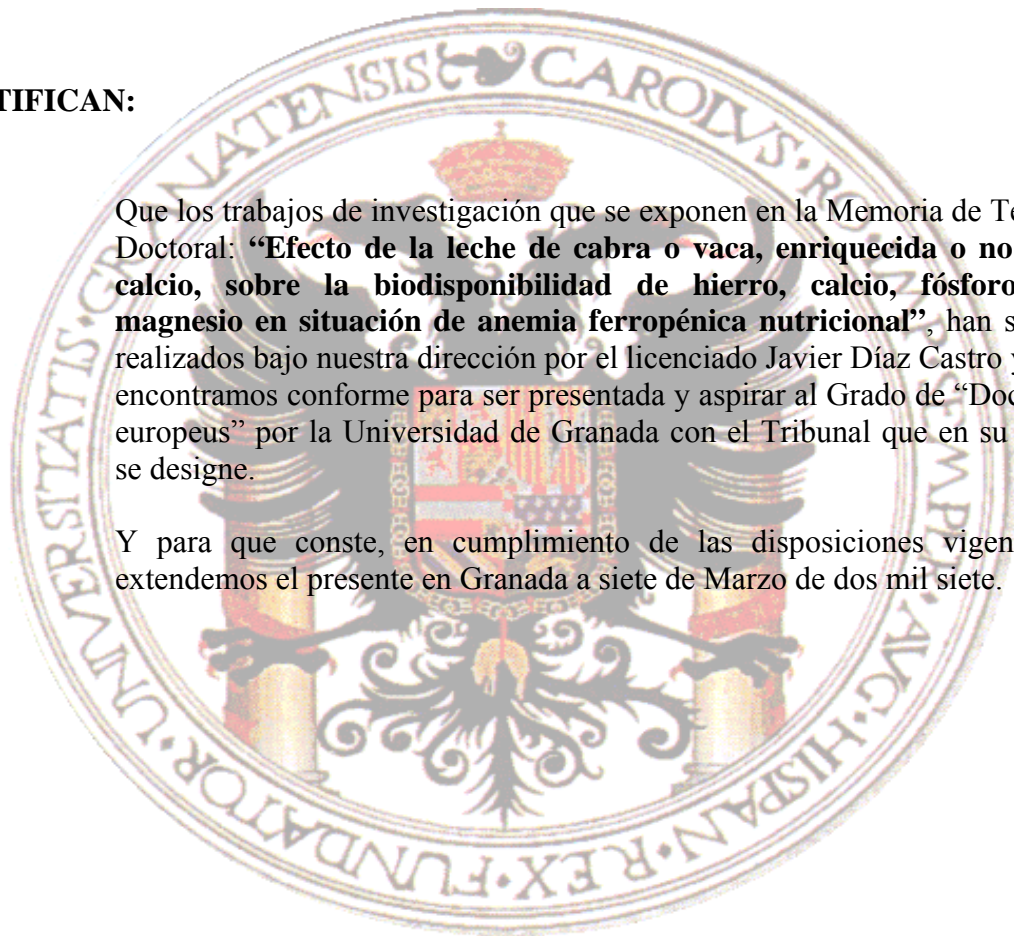
D^a Margarita Sánchez Campos. Catedrática de Fisiología de la Universidad de Granada.
D^a M^a Inmaculada López Aliaga. Profesora Titular de Fisiología de la Universidad de Granada.

D^a M^a José Muñoz Alférez. Profesora Titular de Fisiología de la Universidad de Granada.

CERTIFICAN:

Que los trabajos de investigación que se exponen en la Memoria de Tesis Doctoral: **“Efecto de la leche de cabra o vaca, enriquecida o no en calcio, sobre la biodisponibilidad de hierro, calcio, fósforo y magnesio en situación de anemia ferropénica nutricional”**, han sido realizados bajo nuestra dirección por el licenciado Javier Díaz Castro y la encontramos conforme para ser presentada y aspirar al Grado de “Doctor europeus” por la Universidad de Granada con el Tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, extendemos el presente en Granada a siete de Marzo de dos mil siete.





**MEMORIA QUE PRESENTA EL LDO. JAVIER DÍAZ CASTRO PARA ASPIRAR AL GRADO
DE DOCTOR POR LA UNIVERSIDAD DE GRANADA**

ESTA TESIS DOCTORAL HA SIDO REALIZADA BAJO LA DIRECCIÓN DE:

Prof. Dra.
D^a Margarita Sánchez Campos

Prof. Dra.
D^a M^a Inmaculada López Aliaga

Prof. Dra.
D^a M^a José Muñoz Alférez

Ldo.
D Javier Díaz Castro

Granada, 2007



Al finalizar este importante capítulo de mi vida, me gustaría expresar mi más sincero y profundo agradecimiento a todas las personas que han convertido este proyecto en una realidad:

-A mi directora, la Profesora D^a Margarita Sánchez Campos, por la confianza depositada en mí, sus acertados consejos, sus continuas y valiosas ayudas, por haberme introducido en el mundo de la investigación y por su cariño. A ella no solo le debo mucho en el terreno científico, sino también en el personal. Gracias por todo, desde el primer día hasta hoy.

-A la Profesora D^a M^a Inmaculada López Aliaga, por ser la chispa que encendió en mí la pasión por investigar, por su infinita paciencia, amabilidad y cariño a la hora de guiar mis pasos en el laboratorio. Gracias por tus consejos, tu ayuda continua, darme la oportunidad de investigar junto a vosotras y por tener siempre una sonrisa, en cualquier situación.

-A la Profesora D^a Maria José Muñoz Alférez. En ella siempre he encontrado comprensión, estímulo, cariño y apoyo, haciendo más fácil mi trabajo en el laboratorio. Gracias por tu paciencia, consejos, ayuda continua y por tener siempre palabras amables y alentadoras.

-A la Profesora D^a M^a Mercedes Barrionuevo Díaz, por poner a mi disposición su dilatada experiencia científica, su cariño, su amabilidad y su continuo apoyo durante todo el desarrollo de este trabajo. Gracias por hacerme sentir especial cada vez que habla conmigo.

-A la Dra. D^a Teresa Nestares Pleguezuelo que siempre ha estado apoyando y vigilando con gran interés y amabilidad mi trabajo en el laboratorio para que todo saliese perfecto. Gracias por tus acertados consejos.

-En general, a las cinco, “mis jefas”, gracias porque me habéis enseñado aún más si cabe en el terreno humano que en el científico. Es un orgullo y una satisfacción pertenecer a

vuestro grupo de investigación. Gracias por vuestra paciencia, consejos, entusiasmo y excelente calidad humana. Trabajar con vosotras es un placer. Gracias por confiar en mí siempre y en todo, desde tareas investigadoras hasta temas docentes.

-Al Profesor D. Miguel Moreno Prieto, director del Departamento de Fisiología. Muchas gracias por integrarme y tratarme como uno más desde el principio, gracias por poner a mi disposición todos los medios humanos y técnicos necesarios para el desarrollo de este trabajo.

-Al Profesor D. Emilio Martínez de Victoria, director del Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos, por aceptarme en el Instituto y poner a mi disposición las instalaciones, donde se ha efectuado la parte experimental de la Tesis.

-A la Profesora D^a M^a José Lupiani Torres. Gracias por hacerme sentir como en casa cada vez que estoy en el Departamento. Gracias por tu cariño, apoyo continuo y ayuda.

-A Rosi, por su continua, amable, eficiente y desinteresada ayuda durante la ejecución experimental de la Tesis. Gracias por tu cariño y continua alegría.

-A Elisa Alcover por su inestimable, continua y eficiente ayuda en todos los temas administrativos, haciéndolo todo más fácil.

-A todos los integrantes del Departamento de Fisiología e Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos, sin excepción, porque desde el primer día me hicisteis sentir como en casa. Gracias a todos por vuestro continuo interés, amabilidad y ayuda.

-A Sergio y Paqui: vosotros mejor que nadie sabéis cuanta ilusión y trabajo hay detrás de este proyecto. Gracias por estar siempre ahí, en lo bueno y en lo malo. Gracias por vuestra

amistad, ayuda, cariño y apoyo. Sin duda, gracias a vosotros todo ha resultado mucho más fácil. Es un orgullo teneros entre mis amigos. Gracias por enseñarme a ser mejor persona.

-Al resto de mis amigos: Tere, Sandra, Reme, Isa, Juan, Yolanda y Lydia. Gracias por vuestra amistad, comprensión, apoyo, interés y por no quejaros cuando a veces pasaba más tiempo con mis ratas que con vosotros. Se que siempre habéis estado y siempre estaréis ahí, lo cual me reconforta y me enorgullece.

-A mi familia, mi gran apoyo. Gracias por TODO. Espero que algún día podáis sentiros al menos la mitad de orgulloso que me siento de vosotros. Gracias a mi madre por su ejemplo, a mi abuela por su cariño, a mi hermana, por su apoyo, a mis primos y tíos porque siempre me habéis apoyado, respaldado y protegido incondicionalmente. Todo lo que soy os lo debo a vosotros.

“Detrás de cada línea de llegada, hay una de partida. Detrás de cada logro, hay otro desafío. Mientras estés vivo, siéntete vivo. Si extrañas lo que hacías vuelve a hacerlo. No vivas de fotos amarillas... Sigue aunque todos esperen que abandones. No dejes que se oxide el hierro que hay en ti. Haz que en vez de lástima, te tengan respeto. Cuando por los años no puedas correr, trota. Cuando no puedas trotar, camina. Cuando no puedas caminar, usa el bastón. ¡Pero nunca te detengas!” (Madre Teresa de Calcuta).

A mi madre... *Gracias por enseñarme a creer en mis sueños, pero sobre todo, gracias por ayudarme a conseguirlos. Tu ejemplo y tu cariño siempre hacen todo más fácil.*

ABREVIATURAS USADAS

- AAS**: Espectrofotometría de absorción atómica.
- ADP**: Adenosín difosfato.
- AMP**: Adenosín monofosfato.
- ATP**: Adenosín trifosfato.
- CDA**: Coeficiente de digestibilidad aparente.
- CP**: Creatín-fosfato.
- Dieta E**: Dieta estándar, con contenido normal de Ca.
- Dieta E⁺**: Dieta estándar, con contenido doble de Ca.
- Dieta C**: Dieta basada en leche de cabra, con contenido normal de Ca.
- Dieta C⁺**: Dieta basada en leche de cabra, con contenido doble de Ca.
- Dieta V**: Dieta basada en leche de vaca, con contenido normal de Ca.
- Dieta V⁺**: Dieta basada en leche de vaca, con contenido doble de Ca.
- DMT1**: Transportador de metales divalentes 1.
- DNA**: Ácido desoxirribonucleico.
- Dyctb**: Citocromo duodenal b.
- ERH**: Eficacia de regeneración de la hemoglobina.
- FAO**: Organización para la agricultura y alimentación.
- GLC**: Cromatografía gas-líquido.
- GOT**: Transaminasa glutámico-oxalacético.
- GPT**: Transaminasa glutámico-pirúvico.
- GTP**: Guanosín trifosfato.
- Hb**: Hemoglobina.
- HDL**: Lipoproteína de alta densidad.
- HPLC**: Cromatografía líquida de alta resolución.
- HFE**: Gen responsable de la hemocromatosis.
- IAN**: Instituto Americano de Nutrición.
- IRE**: Elemento regulador de hierro.
- IRP**: Proteína reguladora de hierro citosólica.
- LC**: Cromatografía líquida.
- LDL**: Lipoproteína de baja densidad.
- LPL**: Lipoproteín-lipasa.
- MCT**: Triglicérido de cadena media.
- MHC**: Complejo mayor de histocompatibilidad.
- MS**: Espectrometría de masas.
- MTP1**: Proteína transportadora de metales 1 (ferroportina 1).
- NADH**: Nicotín adenín dinucleótido reducido.
- PTH**: Parathormona.
- PTHrP**: Proteína relacionada con la PTH.
- Pi**: Fósforo inorgánico.
- PITC**: Fenilisotiocianato.
- PUFA**: Ácido graso poliinsaturado.
- RDA**: Ingesta diaria recomendada.
- R/I**: Relación retenido con respecto al ingerido.
- RNA**: Ácido ribonucleico.
- RP-HPLC**: Cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa.
- STF**: Estimulador del transporte de hierro.
- TfR1,2**: Receptor de transferrina 1,2.
- TIBC**: Capacidad total de fijación al Fe.
- VCM**: Volumen corpuscular medio.
- WHO/OMS**: Organización mundial de la salud.
- XO**: Xantina-oxidasa.



Índice

1. OBJETO	1
2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	
2.1. El hierro en la nutrición	5
2.1.1. Introducción.....	5
2.1.2. Deficiencia de hierro	5
2.1.2.1. Causas de la anemia ferropénica.....	6
2.1.2.2. Consecuencias de la ferodeficiencia	7
2.1.2.3. Tratamiento de la anemia ferropénica	10
2.1.3. Fuentes alimentarias de hierro y biodisponibilidad	11
2.1.4. Funciones del hierro	14
2.2. Utilización nutritiva de hierro.....	16
2.2.1. Requerimientos.....	16
2.2.2. Absorción.....	19
2.2.3. Distribución y captación celular	24
2.2.4. Metabolización	27
2.2.5. Depósitos de hierro en el organismo	27
2.2.6. Eliminación.....	31
2.2.7. Regulación homeostática del balance de hierro	31
2.2.8. Sobrecarga de hierro.....	33
2.3. El calcio en la nutrición	34
2.3.1. Introducción.....	34
2.3.2. Fuentes alimentarias de calcio	34
2.3.3. Funciones del calcio	35
2.3.4. Beneficios adicionales del calcio.....	37
2.3.5. Peculiaridades y ventajas del calcio en la leche y derivados lácteos	39
2.3.6. Enriquecimiento de alimentos con calcio.....	40

2.4. Utilización nutritiva de calcio	42
2.4.1. Requerimientos.....	42
2.4.2. Absorción.....	43
2.4.3. Factores que influyen en la biodisponibilidad del calcio.....	46
2.4.4. Distribución y captación celular	52
2.4.5. Depósitos de calcio en el organismo	53
2.4.6. Eliminación.....	53
2.4.7. Regulación homeostática del calcio	56
2.4.8. Calcemia	57
2.5. El fósforo en la nutrición	58
2.5.1. Introducción.....	58
2.5.2. Fuentes alimentarias de fósforo	60
2.5.3. Interacción con otros nutrientes.....	61
2.5.4. Funciones del fósforo.....	62
2.6. Utilización nutritiva de fósforo.....	65
2.6.1. Requerimientos.....	65
2.6.2. Absorción.....	66
2.6.3. Distribución y captación celular	67
2.6.4. Depósitos de fósforo en el organismo	68
2.6.5. Eliminación	69
2.6.6. Regulación homeostática del balance de fósforo	70
2.7. El magnesio en la nutrición	75
2.7.1. Introducción.....	75
2.7.2. Fuentes alimentarias de magnesio	75
2.7.3. Interacción con otros nutrientes.....	76
2.7.4. Funciones del magnesio	77

2.8. Utilización nutritiva de magnesio.....	78
2.8.1. Requerimientos.....	78
2.8.2. Absorción.....	79
2.8.3. Distribución y captación celular	82
2.8.4. Depósitos de magnesio en el organismo	83
2.8.5. Eliminación.....	83
2.8.6. Regulación homeostática del balance de magnesio.....	84
2.9. Características nutricionales de la leche de cabra.....	85
2.9.1 Introducción.....	85
2.9.2. Características organolépticas.....	86
2.9.3. Composición de la leche de cabra	87
2.9.3.1. Proteína de la leche de cabra.....	89
2.9.3.2. Carbohidratos de la leche de cabra	91
2.9.3.3. Composición lipídica de la leche de cabra	92
2.9.3.4. Composición mineral de la leche de cabra	94
2.9.3.5. Composición vitamínica de la leche de cabra	96
2.9.3.6. Otros componentes minoritarios de la leche de cabra	98
3. MATERIAL Y MÉTODOS	
3.1. Diseño experimental	99
3.2. Dietas utilizadas	105
3.3. Técnicas analíticas	113
3.3.1. Materia seca	113
3.3.2. Liofilización	113
3.3.3. Materia grasa.....	114
3.3.4. Ácidos grasos	114

3.3.5. Contenido en nitrógeno y composición de aminoácidos	114
3.3.6. Vitaminas A, D ₃ y C	115
3.3.7. Minerales totales	115
3.3.7.1. Hierro, calcio y magnesio	116
3.3.7.2. Fósforo	117
3.3.8. Calcio y fósforo en suero	117
3.3.9. Parathormona (PTH)	117
3.3.10. Corticosterona	118
3.3.11. Recuento de hematíes, Hb, hematocrito, VCM y plaquetas	118
3.3.12. Ferritina sérica	118
3.3.13. Hierro sérico, TIBC y saturación de la transferrina	118
3.4. Índices biológicos	119
3.5. Control de calidad	120
3.6. Tratamiento estadístico	121
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1. Tablas y figuras	123
4.2. Ingesta de alimento	174
4.3. Utilización digestiva y metabólica de hierro	174
4.4. Concentración hierro en órganos	177
4.5. Parámetros hematológicos	178
4.6. Utilización digestiva y metabólica de calcio y fósforo	182
4.7. Depósito de calcio y fósforo en órganos	184
4.8. Niveles séricos de calcio, fósforo, PTH y corticosterona	186
4.9. Utilización digestiva y metabólica de magnesio	187
4.10. Depósito de magnesio en órganos	190
5. RESUMEN Y CONCLUSIONES	193

6. SUMMARY	
6.1. Abbreviations used.....	197
6.2. Tables and figures.....	199
6.3. Introduction	250
6.4. Experimental design	252
6.5. Material and methods.....	257
6.6. Results and discussion.....	261
6.6. Conclusions.....	276
7. BIBLIOGRAFÍA.....	279



Objeto

1. OBJETO

Los avances en la tecnología alimentaria, con una población cada vez más preocupada por la salud y la calidad de vida, han llevado a la ciencia de la nutrición a la búsqueda de nuevos alimentos con valor añadido, que tengan beneficios saludables y ayuden a retrasar e incluso prevenir la aparición de algunas enfermedades. En este contexto se enmarca la leche de cabra, producto con unas propiedades nutricionales excelentes que le confieren un alto interés como alimento y objeto de investigación. A pesar de su bajo consumo, la leche de cabra está adquiriendo un gran interés en la tendencia actual de buscar alimentos más saludables en los países desarrollados.

La leche de cabra es un alimento natural de muy fácil digestión y tolerancia y con un alto valor nutricional. Es una fuente excelente de proteínas de alta calidad y fácil absorción, proporciona ácidos grasos de cadena corta y media (caproico, caprílico y cáprico) lo que contribuye a una digestión más rápida, así como ácidos grasos esenciales tales como linoleico, linolénico y araquidónico. Entre los minerales cabe destacar el calcio y el fósforo de alta digestibilidad, en parte debido a que se encuentran en asociación con la caseína de la leche. También es una buena fuente de vitaminas entre las que destacan la A, D, y E, tiamina, riboflavina y niacina.

Estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación en animales de experimentación han puesto de manifiesto el efecto beneficioso de la leche de cabra respecto a la de vaca sobre la utilización nutritiva de proteína, grasa y minerales en síndrome de malabsorción, acompañado de un descenso en los niveles de LDL- colesterol, manteniendo dentro del rango fisiológico los niveles de triglicéridos, HDL-colesterol y transaminasas.

Ya en la década de los cincuenta se llevaron a cabo por diversas entidades internacionales, entre ellas la propia Organización Mundial de la Salud, programas de enriquecimiento de alimentos para luchar contra la desnutrición en zonas deprimidas del

planeta. Ha sido en los últimos años cuando se ha producido el auténtico “boom” de los alimentos enriquecidos (vitaminas, minerales, fibra, ácidos grasos, etc), los cuales han empezado a formar parte habitual de nuestra dieta diaria. Al mismo tiempo, y de forma paralela, se va imponiendo también poco a poco la alimentación con productos naturales. Estas dos tendencias son complementarias y, en definitiva, son la expresión de la inquietud que se va generando en torno a la alimentación como fuente de salud.

El síndrome anémico secundario a una deficiencia férrica, representa la anemia carencial más frecuente en nuestro medio y la primera causa de consulta hematológica. Según la Organización Mundial de la Salud, el déficit de hierro es además, la causa más frecuente de deficiencia nutricional en todo el mundo y se caracteriza por una disminución o ausencia de los depósitos de hierro, con baja concentración de hierro sérico y una baja saturación de transferrina, lo que repercute en los niveles de concentración de hemoglobina y de hematocrito.

Por otra parte, nuestro grupo de investigación ha llevado a cabo estudios que demuestran que la anemia ferropénica nutricional provoca alteraciones importantes en el metabolismo del calcio y fósforo, con una mayor excreción urinaria que da lugar a un considerable grado de desmineralización ósea.

Ante el enriquecimiento creciente en calcio de algunos productos y la tendencia en el aumento de su consumo, es necesario plantearse los posibles efectos negativos debido a su interacción a nivel metabólico con otros minerales, en especial con el hierro, hecho que adquiere una gran importancia en situación de anemia ferropénica nutricional.

Sin embargo, los efectos de la suplementación crónica de calcio sobre el estatus mineral no están todavía claros y la información es escasa acerca de los efectos de una ingesta elevada de este mineral sobre la biodisponibilidad y depósitos corporales de hierro, calcio, fósforo y magnesio.

En base a estos antecedentes el objeto del presente trabajo se centra en el estudio comparativo de la leche de cabra respecto a la de vaca, con un contenido normal o enriquecidas en calcio, sobre la utilización digestiva y metabólica de hierro, calcio, fósforo y magnesio mediante la técnica de balance metabólico, en ratas controles y con anemia ferropénica nutricional inducida experimentalmente. Además, con el fin de conocer como la utilización nutritiva de estos minerales puede incidir en la distribución y destino metabólico de los mismos, se ha determinado su concentración a nivel de los distintos órganos implicados en su regulación homeostática. Por otra parte, se estudian distintos parámetros hematológicos relacionados con el metabolismo de hierro con el fin de conocer si está afectado su estatus, así como los niveles séricos de Ca (total e iónico), P, parathormona, y la concentración de Mg en sangre total, relacionados con el metabolismo de los otros minerales.

A decorative graphic featuring several red blood cells of varying sizes and orientations. To the left of the cells is a vertical bar chart with four bars of increasing height. The text 'Hb' is positioned below the first bar. The entire graphic is set against a light red background with some faint grid lines.

**Antecedentes
Bibliográficos**

2.1. EL HIERRO EN LA NUTRICIÓN

2.1.1. INTRODUCCIÓN

En términos de Salud Pública, la carencia de hierro es, con diferencia, la principal causa de anemia nutricional.

La anemia por deficiencia de hierro ha sido reconocida como uno de los mayores problemas sanitarios que afecta a una elevada proporción de la población mundial a todas las edades. Los grupos de población más afectados son las mujeres en edad fértil, especialmente las embarazadas y los niños (Stephenson y col., 2000).

La anemia ferropénica se produce cuando las pérdidas de hierro o los requerimientos del mismo superan el aporte que proporciona la dieta, con lo cual se agotan las reservas del organismo, disminuye la síntesis de enzimas ferropendientes, desciende la eritropoyesis y por último, disminuye la concentración de hemoglobina.

2.1.2. DEFICIENCIA DE HIERRO

La deficiencia de hierro es la más común de todas las enfermedades por deficiencia de nutrientes en el mundo. La anemia ferropénica es una enfermedad con una alta prevalencia, especialmente en niños y mujeres en edad de gestación. Los grupos que se considera que tienen un mayor riesgo de sufrir anemia ferropénica son: niños menores de 2 años, chicas adolescentes, embarazadas y la tercera edad. Las embarazadas adolescentes tienen un elevadísimo riesgo de sufrir ferropendencia, debido a sus pobres hábitos alimentarios y su continuo crecimiento. Mujeres en edad fértil que sufren ferropendencia pueden beneficiarse de dietas ricas en hierro o suplementos (Patterson, 2001). Se ha observado que en países poco desarrollados, la prevalencia de la anemia ferropénica en mujeres supera normalmente el 20%, mientras que en hombres (5-6%), es similar a la observada en mujeres de países desarrollados (MacPhail y Bothwell, 1992).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (WHO), la anemia se define como un nivel de hemoglobina inferior a 130 g/L en hombres y menos de 120 g/L en mujeres (Ania y col., 1997). La secreción de eritropoyetina aumenta cuando los niveles de hemoglobina descienden por debajo de 120 g/L, indicando que esos niveles de hemoglobina son necesarios para una oxigenación óptima de los tejidos (Gabrilove, 2000).

La anemia por deficiencia de hierro se caracteriza por la reducción o ausencia de depósitos de hierro, baja concentración de hierro sérico, baja saturación de transferrina, una concentración de hemoglobina baja y una reducción del hematocrito. Inicialmente, los depósitos corporales de hierro, la ferritina y la hemosiderina decrecen, mientras que el hematocrito y la hemoglobina permanecen normales. Después de esto, disminuye el nivel de hierro sérico y de forma concomitante aumenta la capacidad de fijación de hierro, reduciéndose el porcentaje de saturación de la transferrina. Consecuentemente, hay una rápida reducción de las células rojas en la circulación. Este estado se conoce como “deficiencia de hierro sin anemia”. La anemia por deficiencia de hierro es un estado más avanzado de hiposiderosis, caracterizado por baja concentración de hemoglobina y descenso de hematocrito, con cambios en la citología y morfología del eritrocito, los cuales dan lugar a hematíes microcíticos e hipocrómicos, además de una disfunción del transporte de oxígeno (Herberg y Galan, 1992).

2.1.2.1. CAUSAS DE LA ANEMIA FERROPÉNICA

La cantidad de hierro en el organismo se deriva del balance entre las demandas fisiológicas y la cantidad ingerida. Hay determinados períodos de la vida en los que este balance es negativo y el organismo debe recurrir al hierro de depósito para poder mantener una eritropoyesis adecuada. Por lo tanto, durante dichas etapas una dieta con insuficiente cantidad o baja biodisponibilidad de hierro agrava el riesgo de desarrollar una anemia ferropénica.

La anemia ferropénica puede deberse a:

-Disminución del hierro disponible, no pudiendo satisfacer los requerimientos normales.

En la mayoría de casos, la menor ingesta de hierro se produce en países pobres, donde la dieta en

general es insuficiente y el menor aporte de hierro es una deficiencia nutricional más. En los países socioeconómicamente desarrollados, el aporte insuficiente se produce por dietas inadecuadas, desequilibradas o insuficientes.

-Elevados requerimientos de hierro, como ocurre durante los primeros años de vida, adolescencia, embarazo y lactancia.

-Pérdidas sanguíneas, bien por pérdidas menstruales excesivas o por hemorragias diversas, como ocurre en el caso de tumores intestinales o uterinos.

-Por último, también puede deberse a infestaciones parasitarias como sucede en la anquilostomiasis, a síndromes de malabsorción, pacientes con aclorhidia o gastrectomía extensiva (Scanlon y Yip, 1996).

2.1.2.2. CONSECUENCIAS DE LA FERODEFICIENCIA

El hierro se encuentra formando parte de distintas moléculas de gran responsabilidad biológica, lo que conlleva alteraciones amplias y en ocasiones de gran severidad al establecimiento de anemia ferropénica. Las principales alteraciones que se producen en esta patología son:

-Falta de energía:

La incapacidad de un adecuado aporte de oxígeno a la célula, así como la deficiencia de la cadena de transporte electrónico impiden una adecuada obtención de energía que explica entre otros efectos, la sensación de fatiga, apatía, mareos, debilidad, irritabilidad, anorexia, mialgias e incluso parestesias de pies y manos.

-Disminución de la proliferación celular:

Los epitelios mucosos disminuyen su grado de proliferación ante la falta de hierro, afectando en mayor grado a aquellos de mayor capacidad proliferativa. Así ocurre a nivel de la

mucosa digestiva, donde puede llegar a producir atrofia gástrica con hipoclorhidia. Otras consecuencias de esta disminución de la proliferación celular son: lengua lisa y brillante, estomatitis angular, uñas quebradizas y deformes, pelo quebradizo, etc.

-Palidez de piel y mucosas:

Se debe a la disminución del pigmento hemático y la palidez cutánea a una vasoconstricción local, ya que como mecanismo homeostático circulatorio, se produce una desviación de la sangre desde la piel y riñón a los órganos vitales.

-Manifestaciones circulatorias:

Salvo en la piel y el riñón, hay vasodilatación con aumento del gasto cardíaco, lo cual, unido a una sangre más fluida, justifica la taquicardia, palpitaciones, aumento de la presión diferencial y por tanto la amplitud del pulso y los soplos cardíacos.

-Disnea:

Posiblemente se produce como consecuencia de una acidosis láctica hipóxica, que obliga a aumentar la ventilación, así como por una fatiga precoz de los músculos respiratorios.

-Afectación cerebral:

Se pueden afectar determinadas estructuras cerebrales que requieren un contenido relativamente elevado de hierro, como demuestra el dato indirecto de las reservas hepáticas de dicho elemento. Las funciones más afectadas son las relacionadas con el sistema dopaminérgico de neurotransmisión, posiblemente porque la deficiencia de hierro conduce a una disminución del receptor D2 de la dopamina. Esto, a su vez, se asocia con una alteración del catabolismo de las aminas biógenas como la serotonina, así como el de opiopéptidos endógenos. La sintomatología de la afectación nerviosa puede ser muy variada, pudiendo llegar a afectarse la atención, la memoria y el aprendizaje.

Con respecto a las manifestaciones de la patología en el sistema nervioso, hay que tener en cuenta que al nacimiento solo existe en el encéfalo un 10% del hierro presente en la edad

adulto, aumentando el contenido neuronal hasta el 50% a los 10 años, alcanzando el nivel máximo entre los 20 y los 30 años. Lo más relevante observado en animales de experimentación es, que si no se alcanzan los niveles de hierro, sobre todo durante la época de crecimiento, no se pueden conseguir posteriormente, a pesar de un importante suministro de hierro, lo que conlleva un riesgo de afectación neuronal (Hallterman y col., 2001).

-Alteraciones inmunitarias:

Se produce una disminución de la respuesta inmune mediada por células (linfocitos T), ya que disminuye la actividad de la enzima ribonucleótido reductasa, dependiente de hierro. Además hay una reducción de la capacidad fagocítica de los neutrófilos, por una menor producción de radicales libres, al disminuir la NADH dependiente de hierro. Igualmente, también se ve afectada la mieloperoxidasa, implicada en el mecanismo de defensa.

-Alteraciones metabólicas hepáticas:

El hígado es uno de los órganos fundamentales en el metabolismo del hierro, ya que además de almacenar y reciclar las reservas de este elemento, sintetiza diversas enzimas dependientes de hierro. Así en situación de anemia, disminuyen diversas ferroproteínas hepáticas como la citocromo C oxidasa, succinato deshidrogenasa, aconitasa, xantina oxidasa y mioglobina.

-Alteraciones hemáticas:

- a) Hematíes: microcíticos (volumen corpuscular medio, VCM < 80 fL). Además también son hipocrómicos, porque la síntesis de hemoglobina es insuficiente.
- b) Hemoglobina: inferior a 130 g/L en el hombre y 120 g/L en la mujer.
- c) Hierro sérico: inferior a 11 mmoles/L.
- d) Capacidad de fijación de hierro: superior a 70 mmoles/L.
- e) Índice de saturación de transferrina: inferior al 16%.
- f) Ferritina: inferior a 40 mmoles/L.
- g) Sideroblastos (tinción de Perls): No existe hierro teñible en aspirado de médula.

h) Otros datos hemáticos: los núcleos de los neutrófilos son hiperpigmentados y las plaquetas están aumentadas.

2.1.2.3. TRATAMIENTO DE LA ANEMIA FERROPÉNICA

El tratamiento preferido, antes de la identificación de la fuente de pérdida de hierro, es la administración oral de suplementos de hierro. Las sales de hierro ferroso son las más utilizadas, debido a su mayor solubilidad y disponibilidad al pH del duodeno y el yeyuno. La terapia estándar para la anemia por deficiencia de hierro en adultos consiste en la administración oral de una tableta de 300 mg de sulfato ferroso (60 mg de hierro elemental), tres o cuatro veces al día. Mientras la absorción está potenciada por la administración del hierro con el estómago vacío, es común que aparezca dolor epigástrico cuando se ingiere el suplemento de hierro en ayunas, por eso debe ser ingerido con las comidas. Otros efectos adversos que pueden aparecer con este tipo de preparados son pirosis, náuseas, vómitos y diarreas. Estos síntomas se reducen administrando las tabletas con las comidas, disminuyendo la dosis de hierro o administrando oralmente hierro-carbonilo. Las preparaciones pediátricas líquidas de hierro pueden ser usadas, modificando la dosis, para evitar efectos adversos. Para asegurar que hay una respuesta al tratamiento, la anemia debe ser monitorizada. La causa más frecuente del fallo del tratamiento, es el incumplimiento terapéutico.

Puede aparecer reticulocitosis a los 4 días de tratamiento y alcanza un máximo entre los 7 y 10 días. Posteriormente aparece un aumento del hematocrito y la concentración de hemoglobina. La terapia debe continuar durante 2 a 3 meses después de la corrección de la anemia para reponer los depósitos del hierro del organismo.

El hierro para administración intramuscular o intravenosa, estaba disponible en forma de hierro-dextrano, pero ha tenido una alta tasa de toxicidad y ahora rara vez es prescrito. Por el contrario, el polímero hierro-sacarosa resulta ser bastante más seguro. Otras preparaciones parenterales, tales como gluconato férrico y citrato férrico ceden el hierro a muchas proteínas aparte de las proteínas transportadoras de hierro, con lo cual pueden ser depositadas en el

parénquima hepático y causar necrosis (Geisser y col., 1992). Los productos orales de hierro se han abandonado en pacientes con enfermedad renal, que ahora son tratados con eritropoyetina. Los efectos adversos más frecuentes durante el tratamiento en pacientes con hemodiálisis son: hipotensión, calambres y náuseas (Nissenson y col., 2003).

2.1.3. FUENTES ALIMENTARIAS DE HIERRO Y BIODISPONIBILIDAD

Por ahora, la mejor fuente alimentaria de hierro es el hígado, seguido de pescados y ostras, riñones, corazón y carnes magras. Las judías secas son la mejor fuente vegetal de este elemento. Algunas otras fuentes que aportan una buena cantidad de hierro son: la yema de huevo, frutos secos, melazas de fruta, pasta integral, vino y cereales. La leche y productos lácteos están prácticamente desprovistos de hierro. El maíz es un alimento altamente pobre en hierro, por eso ciertas culturas cuyas dietas están basadas principalmente en este alimento, tienen tasas elevadas de anemia. La biodisponibilidad del hierro presente en la dieta es importante a la hora de considerar las fuentes alimentarias de dicho elemento. Por ejemplo, solo el 50% o menos del hierro presente en los cereales y algunos vegetales está disponible en una forma útil para el organismo. La fortificación con hierro de los cereales, harinas y pastas ha aumentado de forma significativa la ingesta total de hierro en ciertos países. Los cereales enriquecidos con hierro se han convertido en una fuente de hierro sustancial para niños, así como para adolescentes y adultos (Whittaker y col., 2001).

Varios factores afectan la biodisponibilidad del hierro de la dieta. La tasa de absorción de hierro depende del status de hierro del individuo, es decir, del nivel de hierro de los depósitos del organismo. Una baja cantidad de hierro en los depósitos implica una mayor tasa de absorción. Individuos con anemia ferropénica son capaces de absorber entre un 20 y un 30% del hierro presente en la dieta, mientras que un individuo sin anemia solo absorbe un 5-10% del total de hierro ingerido (Zlotkin, 2001).

El hierro está en dos formas en la dieta: hierro hemo o hierro no hemo. La primera forma está presente en la carne como hemoglobina, mioglobina y ferritina, y el hierro no

hemo está presente como hidróxidos de hierro y otras sales, que pueden ser endógenamente almacenadas en alimentos o adicionadas exógenamente durante la fortificación (por ejemplo de la harina) o como consecuencia de la contaminación. De las dos formas, el hierro hemo es el más disponible, la absorción media a partir de una comida que contiene hierro hemo es de un 25%. En una dieta occidental típica, el hemo debería probablemente constituir entre un 5 y un 10% de la ingesta de hierro diaria (Hallberg y col., 1979). La absorción de hierro hemo no está afectada por otros componentes de la dieta, con la posible excepción del calcio (Hallberg y col., 1991, 1992), pero el cocinado prolongado puede conducir a la degradación de la estructura porfirínica y la “conversión” a hierro no hemo (Lombardi-Boccia y col., 2002). Es de resaltar, que la presencia de carne en una comida no solo proporciona una fuente de hierro hemo sino también estimula la absorción intestinal de hierro no hemo (Glahn y col., 1996, 1998; Swain y col., 2002) a través de un “factor carne” cuya naturaleza sigue sin estar completamente dilucidada.

La absorción de hierro puede ser inhibida en diferente magnitud por un número de factores que quelan el hierro, incluyendo carbonatos, oxalatos, fosfatos y fitatos. También ciertos factores presentes en la fibra vegetal pueden inhibir la absorción de hierro no hemo. El hecho de tomar en las comidas te o café puede reducir la absorción de hierro en un 50% debido a la formación de complejos de hierro insolubles con los taninos. El hierro de la yema de huevo se absorbe muy poco debido a la presencia de fosvitina (Stopler y col., 1999).

-Potenciadores de la absorción del hierro no hemo:

- *Vitamina C (Ácido ascórbico)*: la vitamina C potencia fuertemente la absorción de hierro no hemo, reduciendo el hierro férrico de la dieta (Fe^{3+}) a hierro ferroso (Fe^{2+}) y formando un complejo absorbible hierro-ácido ascórbico.
- *Otros ácidos orgánicos*: cítrico, málico, tartárico y láctico tienen efecto potenciador sobre la absorción de hierro no hemo.

- *Carne, pescado y aves*: aparte de proporcionar hierro hemo altamente absorbible, también potencian la absorción de hierro no hemo. El mecanismo para favorecer la absorción de hierro no está aún claro (Lynch, 1997; Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, 2004).

-Inhibidores de la absorción del hierro no hemo:

- *Ácido Fítico*: El ácido fítico está presente en las legumbres y el arroz y actúa como inhibidor de la absorción de hierro no hemo. Pequeñas cantidades de ácido fítico (de 5 a 10 mg) pueden reducir la absorción de hierro no hemo en un 50%. (Fairbanks, 1999; Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, 2004).
- *Polifenoles*: estos compuestos presentes en ciertas frutas, verduras, café, te y especias, pueden inhibir de forma notable la absorción de hierro no hemo. Este efecto se reduce en presencia de la vitamina C (Fairbanks, 1999; Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, 2004).
- *Proteínas de la soja*: las proteínas de la soja, como las que se encuentran en el tofu, tienen un efecto inhibidor en la absorción de hierro, que depende del contenido en ácido fítico (Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, 2004).
- *Algunos minerales*: la absorción del hierro no hemo se ve afectada por distintos minerales con propiedades fisicoquímicas similares en cierta medida al hierro, entre los que se encuentran el cinc, manganeso, cobre y calcio (Reddy y Cook, 1997). Sin embargo, López-Aliaga y col. (2000), estudiaron la influencia de la leche de cabra y vaca sobre la utilización digestiva y metabólica de hierro y calcio en ratas adultas. Este estudio demostró el efecto beneficioso de la leche de cabra, que favorece la utilización de hierro y calcio y minimiza la interacción entre estos dos minerales.

TABLA I. Contenido en hierro de algunos alimentos (modificado de Yip, 2000):

<i>ALIMENTO</i>	<i>PORCIÓN</i>	<i>HIERRO (mg)</i>
<i>Tofu</i>	¼ de bloque	6.22
<i>Ostras</i>	6 (medianas)	5.04
<i>Patata con piel</i>	½ patata, cocida	2.75
<i>Riñones</i>	½ taza, cocinados	2.60
<i>Melaza</i>	1 cucharada sopera	3.50
<i>Ternera</i>	100g, cocinado	2.31
<i>Zumo de ciruelas</i>	Un vaso de 250 mL	2.27
<i>Carne de pollo</i>	100g, cocinado	1.13

2.1.4. FUNCIONES DEL HIERRO

El hierro es un elemento clave en el metabolismo de todos los organismos vivos. Las funciones se deben a su capacidad de participar en procesos de oxidación y reducción (Beard, 2001). Químicamente, el hierro es un elemento altamente reactivo que puede interaccionar con el oxígeno, dando lugar a especies intermedias con una capacidad potencial de dañar las membranas celulares o degradar el DNA. El hierro debe estar unido fuertemente a proteínas para evitar estos potenciales efectos perjudiciales sobre las células.

Las funciones principales del hierro son:

-Transporte y almacenamiento de oxígeno:

El grupo hemo es un compuesto que contiene hierro y se encuentra en varias moléculas biológicamente activas. La hemoglobina y la mioglobina son proteínas que contienen el grupo hemo y están implicadas en el transporte y almacenamiento de oxígeno. La hemoglobina es la principal proteína de las células rojas de la sangre y representa aproximadamente dos tercios de todo el hierro presente en el organismo. El papel vital que desempeña la hemoglobina en el transporte de oxígeno desde los pulmones al resto del organismo se deriva de su capacidad única para captar oxígeno rápidamente, durante el corto intervalo de tiempo que está en contacto con

los pulmones y liberar posteriormente este oxígeno según las necesidades a través de su circulación por los distintos tejidos. Las funciones de la mioglobina en el transporte y almacén de oxígeno a corto plazo en las células musculares, ayuda a cubrir su demanda por parte de los músculos que están trabajando (Beard, 2001).

-Sensibilización al oxígeno:

Un aporte inadecuado de oxígeno, por ejemplo como el que experimentan las personas que viven a grandes altitudes, o los que sufren una enfermedad crónica de pulmón induce una respuesta compensatoria fisiológica que incluye un aumento de la formación de células rojas, un aumento del crecimiento de vasos sanguíneos (angiogénesis) y una mayor producción de enzimas utilizadas en el metabolismo anaerobio. Bajo condiciones de hipoxia, factores de transcripción conocidos como factores inducibles por la hipoxia, se unen a elementos de respuesta en ciertos genes que codifican varias proteínas implicadas en la respuesta compensatoria a la falta de oxígeno e incrementan la síntesis de dichas proteínas. Recientes estudios revelan que la enzima prolil-hidroxilasa hierro-dependiente juega un papel crucial en la regulación de estos factores inducibles por la hipoxia y consecuentemente en la respuesta fisiológica a esta situación. Cuando la tensión celular es adecuada, las subunidades α de los recién sintetizados factores inducibles por la hipoxia, son modificados por la enzima prolil-hidroxilasa en un proceso dependiente de hierro que las hacen muy sensibles a la degradación. Cuando la tensión celular de oxígeno cae por debajo de un umbral crítico, la prolil-hidroxilasa no puede modificar la subunidad α para su degradación, lo que permite que esta subunidad α se una a la subunidad β y formen un factor de transcripción activo que es capaz de entrar en el núcleo y unirse a elementos de respuesta específicos en ciertos genes (Ivan y col., 2001; Jaakkola y col., 2001).

-Transporte de electrones, metabolismo energético y detoxificación del organismo:

En la producción de ATP mitocondrial participan multitud de enzimas que contienen hierro hemo y no hemo. Los citocromos presentes en prácticamente todas las células, ejercen su función en la cadena de transporte electrónico mitocondrial, transfiriendo electrones y almacenando energía gracias a las reacciones alternas de oxidación y reducción (redox) del

hierro. Numerosos xenobióticos insolubles en agua y moléculas orgánicas tóxicas son transformadas por el sistema del citocromo P450 hepático, en otras moléculas mucho más hidrosolubles, que pueden ser excretadas por vía biliar (Beard, 2001).

-Antioxidante y funciones pro-oxidantes beneficiosas:

La catalasa y la peroxidasa son enzimas que contienen el grupo hemo y protegen a la célula de la acumulación de peróxido de hidrógeno, una especie reactiva del oxígeno altamente perjudicial, convirtiéndola en agua y oxígeno. Formando parte de la respuesta inmune, algunas células blancas de la sangre engloban a bacterias patógenas y las exponen a especies reactivas del oxígeno, consiguiendo así eliminar al agente patógeno. La síntesis de ácido hipocloroso (una especie reactiva del oxígeno) de los neutrófilos es catalizada por la enzima mieloperoxidasa, que contiene el grupo hemo (Brody, 1999).

-Síntesis del DNA:

La ribonucleótido reductasa es una enzima dependiente de hierro requerida para la síntesis del DNA, de hecho, esta enzima tiene un papel limitante en la síntesis del ácido desoxirribonucleico (Beard, 2001).

2.2. UTILIZACIÓN NUTRITIVA DE HIERRO

2.2.1. REQUERIMIENTOS

Los requerimientos de hierro en cada etapa de la vida están determinados por los cambios fisiológicos a los que se enfrenta el organismo durante su desarrollo.

Al nacer, el niño sustituye el suministro seguro de hierro aportado por la placenta por otro más variable y con frecuencia insuficiente, proveniente de los alimentos. Durante el primer año de vida, el niño crece rápidamente, como resultado de lo cual, al cumplir el primer año habrá triplicado su peso y duplicado su hierro corporal (Dallman y col., 1993). En este periodo se estima que las necesidades de hierro oscilan en un rango de entre 0.6 y 1.0 mg/Kg/día (11 mg/día) (Bothwell, 1995; Food and Nutrition Board, 2004).

Durante esta etapa de vida, pueden distinguirse tres períodos característicos, en dependencia del estado nutricional del hierro. El primer período comprende las primeras 6 a 8 semanas, durante las cuales se produce un descenso progresivo de los niveles de hemoglobina, de 170 g/L al nacer a 110 g/L, como consecuencia de la disminución de la eritropoyesis. El hierro liberado producto de la destrucción de los hematíes es insuficiente para cubrir las necesidades durante este periodo y el que no se utiliza, se almacena para satisfacer las demandas de las siguientes etapas de desarrollo. Durante estas semanas, la cantidad de hierro absorbido a partir de los alimentos no es significativa (Lönnnerdal y Dewey, 1995).

El segundo periodo se caracteriza por el inicio de la eritropoyesis, a expensas fundamentalmente del hierro almacenado como producto de la destrucción de los hematíes en la etapa anterior, que se traduce en un incremento de los niveles de hemoglobina.

El tercer periodo comienza alrededor del cuarto mes y se caracteriza por un aumento progresivo de la dependencia de hierro alimentario para garantizar una eritropoyesis eficiente. Esto hace que sea necesario asegurar al lactante una dieta rica en hierro, que garantice un suministro adecuado de este metal para cubrir sus requerimientos (Dallman y col., 1993).

En el caso de los niños prematuros y con bajo peso al nacer, la susceptibilidad de desarrollar una ferropdeficiencia es mucho mayor, ya que sus reservas corporales son menores, unido a un crecimiento postnatal más acelerado. Esto hace que las reservas se agoten más fácilmente, por lo que se hace necesario el suministro de hierro exógeno antes del cuarto mes de vida.

Lönnnerdal y Dewey (1995) afirman que durante la infancia, las necesidades de hierro para el crecimiento son menores, alrededor de 10 mg/día, pero continúan siendo elevadas en términos de ingesta relativa, cuando se comparan con las del adulto, por lo que no desaparece el riesgo de desarrollar una ferropdeficiencia. En este periodo es fundamental evitar los malos hábitos dietéticos que limitan la ingesta de hierro o alteran su biodisponibilidad.

En la adolescencia se produce un nuevo incremento de las demandas de hierro, como consecuencia del crecimiento acelerado. Durante el desarrollo puberal, un adolescente aumenta unos 10 Kg de peso, que debe acompañarse de un incremento de 300 mg de su hierro corporal para lograr mantener constante su hemoglobina, que en este periodo aumenta a razón de 50-100 g/L/año. En consecuencia, un adolescente varón requiere alrededor de 350 mg de hierro por año durante el pico de crecimiento de la pubertad (Uzel y Conrad, 1998).

Las necesidades de hierro en mujeres son superiores, pues aunque la velocidad de crecimiento es menor, se adicionan las pérdidas menstruales (Lönnerdal y Dewey, 1995). El aumento de unos 9 Kg de peso de una adolescente durante la pubertad, implica un aporte de unos 280 mg de hierro para mantener la concentración de hemoglobina en niveles adecuados. Un sangrado menstrual promedio de unos 30 mL de sangre implica la pérdida de unos 75 mg de hierro. En consecuencia, una adolescente en pleno pico de crecimiento requiere unos 455 mg de hierro por año.

En las mujeres en edad fértil, los requerimientos son similares a los de una adolescente, fundamentalmente debido a las pérdidas menstruales. Estos requerimientos pueden aumentar por el uso de dispositivos intrauterinos, que provocan aumentos imperceptibles de las pérdidas, unido en ocasiones a una dieta inadecuada; los embarazos y la lactancia pueden agravar esta situación (Conrad y Umbreit, 2000).

Las necesidades de la rata, tanto en fase de crecimiento como en la edad adulta, se establecen en 45 mg/Kg de dieta de hierro (Reeves y col., 1993).

TABLA II. Ingestas diarias recomendadas (RDA) de hierro (modificado de Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, 2004):

Etapa de la Vida	Edad	Hombres (mg/día)	Mujeres (mg/día)
Lactantes	0-6 meses	0.27	0.27
Lactantes	7-12 meses	11	11
Niños	1-3 años	7	7
Niños	4-8 años	10	10
Niños	9-13 años	8	8
Adolescentes	14-18 años	11	15
Adultos	19-50 años	8	18
Adultos	51 años en adelante	8	8
Embarazo	Todas las edades	-	27
Lactancia materna	18 años o menos	-	10
Lactancia materna	19 años en adelante	-	9

2.2.2. ABSORCIÓN

La mayor parte del hierro no hemo de la dieta entra en el tracto gastrointestinal en la forma férrica o forma Fe^{3+} . Este es esencialmente no biodisponible y primero debe ser convertido a ferroso o Fe^{2+} (FIGURA I). Hay numerosos componentes dietarios capaces de reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} incluyendo el ácido ascórbico (Han y col., 1995; Wienk y col., 1999) β -caroteno (Layrisse y col., 1997; García-Casal y col., 2000) y aminoácidos tales como la cisteína (Glahn & van Campen, 1997) y la histidina (Swain y col., 2002). Además, los enterocitos poseen actividad reductora endógena gracias a la recientemente caracterizada reductasa férrica Dcytb (McKie y col., 2001) (Dcytb: citocromo duodenal b) que se expresa en la membrana del borde en cepillo de los enterocitos duodenales, el principal sitio para la absorción del hierro de la dieta. Se ha demostrado que una elevación de los anticuerpos frente al Dcytb, bloquea la actividad de la reductasa férrica endógena de la membrana del borde en

cepillo duodenal. Además, el RNAm del Dcytb y la expresión proteica están reguladas al alza por los estimuladores de la absorción de hierro, sugiriendo un papel principal en la captación de hierro (McKie y col., 2001).

Una vez formado, el Fe^{2+} llega a ser un sustrato para el transportador metal divalente (DMT1) conocido también como transportador catión divalente DCT1 (Gunshin y col., 1997) y proteína macrófago asociada a la resistencia natural, Nramp2 (Fleming y col., 1997). El pH relativamente bajo del duodeno proximal junto con el microclima ácido presente en la membrana del borde en cepillo (Lucas y col., 1978; McEwan y col., 1990) estabiliza al hierro ferroso. Además, este medio proporciona una fuente rica de protones que son esenciales para el cotransporte con el hierro vía DMT1 (Gunshin y col., 1997; Tandy y col., 2000). El papel de este transportador en la homeostasis de hierro intestinal es puesto de relieve por dos modelos de roedores, el ratón *mk/mk* (Fleming y col., 1997) y la rata Belgrade (b) (Fleming y col., 1998). Ambos modelos de animales poseen la misma mutación (G185R) en el gen DMT1 que conduce al defecto en la captación intestinal de hierro y a la anemia microcítica.

También se ha propuesto que el Fe^{3+} puede ser absorbido por los enterocitos intestinales a través de un mecanismo que es distinto al del DMT1 (Conrad y Umbreit, 2000). En este modelo, cuando el hierro es movilizado a partir del alimento en el medio ácido del estómago, es quelado por las mucinas, las cuales mantienen el hierro en estado férrico. El Fe^{3+} entra en el enterocito a través de la membrana apical por interacción con la integrina β -3 y mobilferrina (una homóloga de la calreticulina). En el citosol, este complejo se combina con la flavina monooxigenasa y la microglobulina β -2 para formar un conglomerado más grande conocido como paraferitina, resultando en la conversión del Fe^{3+} absorbido a Fe^{2+} .

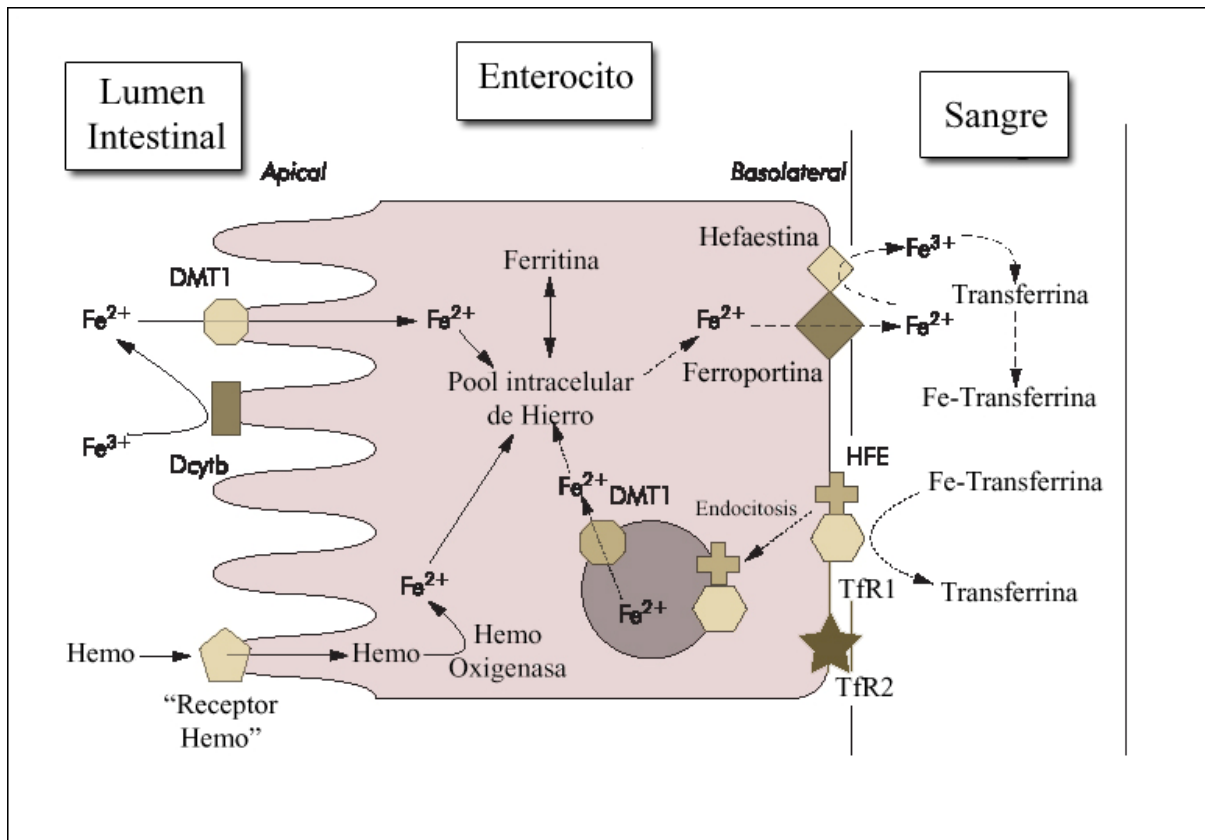
Los mecanismos involucrados en la captación del hemo no se conocen claramente. La captación tiene lugar a través de un mecanismo independiente del no hemo que puede involucrar un mecanismo mediado por receptor (Grasbeck y col., 1979, 1982). La evidencia funcional para un supuesto transportador/receptor hemo ha sido recientemente comprobada

en las células intestinales Caco-2 (Worthington y col., 2001), pero su localización y función en los tejidos intestinales nativos tienen que ser determinadas.

Dentro del enterocito, el hierro contenido en el anillo porfirínico hemo es escindido por acción de la hemo oxigenasa (Raffin y col., 1974) y entra en un pool común, junto con el hierro no hemo, dentro de los enterocitos duodenales. En esta fase, el hierro absorbido tiene dos destinos, dependiendo de los requerimientos del organismo. Si los depósitos corporales (principalmente en el hígado) están repletos, el hierro será almacenado en los enterocitos como ferritina y eliminado del lumen intestinal, ya que las células viejas son desprendidas en el ápice de la vellosidad. Sin embargo, si hay unos requerimientos para reponer los depósitos o una demanda metabólica incrementada, el hierro absorbido pasa a formar parte del pool de hierro lábil, desde donde es procesado para la salida de la célula.

El eflujo basolateral es llevado a cabo por medio de la acción coordinada de una proteína transportadora IREG1 (McKie y col., 2000)- también conocida como ferroportina 1 (Donovan y col., 2000) y MTP1 (Abboud y Haile, 2000)- y una oxidasa férrica, la hefaestina (Vulpe y col., 1999). El IREG1 actúa como una proteína de eflujo de hierro cuando se expresa en los oocitos de *Xenopus laevis*, pero esta función requiere la presencia de ceruloplasmina, una proteína de unión con átomos de cobre que actúa como una ferroxidasa, además de la transferrina para unirse al hierro liberado recientemente (McKie y col., 2000). Esto sugiere que el eflujo de hierro por medio de la IREG1 ocurre como Fe^{2+} pero debe ser oxidado a Fe^{3+} para facilitar su carga sobre la transferrina, favoreciendo así el posterior transporte en el plasma. En el intestino, la oxidación del hierro es llevada a cabo por un homólogo de la ceruloplasmina, la hefaestina, la cual como la ceruloplasmina es una ferroxidasa multicobre. El papel de la hefaestina en el eflujo de hierro fue demostrado en la anemia vinculada al sexo de este modelo animal, donde la captación de hierro a partir de la dieta es normal, pero la liberación a través de la membrana basolateral está enormemente alterada. En estos animales, el gen de la hefaestina es defectuoso conduciendo a una forma de proteína truncada no funcional (Vulpe y col., 1999).

FIGURA I. Modelo de las rutas de absorción de hierro en el enterocito. La figura muestra el hierro iónico y el hierro hemo del lumen intestinal y su transferencia a la sangre. DMT1: Transportador de metales divalentes 1. HFE: proteína de la hemocromatosis. TfR1: Receptor de la transferrina 1. TfR2: Receptor de la transferrina 2. (Trinder y col., 2002):



-Regulación del transporte intestinal de hierro:

La regulación de la absorción intestinal de hierro es un hecho complejo y reside en señales generadas en los principales sitios de almacén de hierro (hígado) y utilización (médula ósea) que indican el estado de hierro corporal. Estas señales son a menudo llamadas el “regulador de los almacenes” y el “regulador eritroide” respectivamente y juntos coordinan la captación intestinal con los requerimientos corporales.

El sitio de acción de estos reguladores es todavía controvertido. La hipótesis actual concierne al control de la absorción intestinal de hierro contempla las células producidas recientemente en las criptas duodenales de Lieberkühn y los “sensores” de hierro intestinal

que gobiernan la expresión de las proteínas involucradas en la homeostasis de hierro en el intestino.

Las células de las criptas solo expresan el HFE en el duodeno (Parkkila y col., 1997a; Waheed y col., 1999), una proteína que muta en más del 80% de los pacientes con hemocromatosis (Feder y col., 1996). El HFE es una molécula MHC de clase I y necesita estar asociada con la microglobulina β_2 para el procesamiento intracelular normal y la expresión en la superficie celular (Feder y col., 1997; Waheed y col., 1997, 2002). La microglobulina β_2 juega un papel esencial en el metabolismo del hierro, ya que la supresión de este gen conduce a una sobrecarga progresiva de hierro similar a la que aparece en los pacientes con hemocromatosis (Rothenberg y Volland, 1996; Santos y col., 1996).

Además del HFE y la microglobulina β_2 , las células duodenales de la cripta también expresan receptores a la transferrina (TfR) en su superficie basolateral. Se cree que el HFE unido a TfR regula la velocidad a la cual la transferrina unida al hierro puede entrar en la célula (Parkkila y col., 1997b; Feder y col., 1998). Normalmente, la captación de hierro por el duodeno a partir del plasma es directamente proporcional a la concentración plasmática de dicho elemento. Sin embargo, en los ratones knockout *nfe* la captación duodenal de hierro a partir de la transferrina plasmática es significativamente menor que en los ratones controles, confirmando la hipótesis de que el HFE juega un papel crucial en la regulación de la captación del hierro unido a transferrina (Trinder y col., 2002). Se pensó que la concentración celular de hierro establecida como el resultado de la interacción HFE / TfR determina, en último lugar, el nivel de expresión de las proteínas involucradas en la absorción de hierro en las células absorbivas maduras en el tercio superior de las vellosidades. Esto esencialmente significa que los niveles de proteína transportadora son pre-programados en las células que dejan la cripta y que la re-programación en respuesta a cambios en el estado corporal de hierro necesita 2-3 días más para ser establecida (por ejemplo, el tiempo necesario para que se produzca la división de las células de la base de la cripta duodenal y lleguen a convertirse en enterocitos maduros en la punta de la vellosidad).

Se piensa que el control de la expresión de los genes reguladores de hierro, ocurre por medio de un mecanismo post-transcripcional que implica interacciones entre las proteínas reguladoras de hierro citosólico (IRP) y los elementos sensibles al hierro (IRE), estructuras de tronco curvo en ambas regiones no translocadas 5' y 3' de varias especies de mRNA, incluyendo los transportadores de hierro (Lee y col., 1998). Tradicionalmente, la interacción IRP/IRE en el 3'UTR (por ejemplo en el receptor de la transferrina) se sospecha que induce la estabilidad del RNAm (Casey y col., 1988; Müllner y Kühn, 1988; Hentze y Kühn, 1996).

La regulación de la expresión del transportador IREG1 es una cuestión compleja y la evidencia sugiere que la respuesta a cambios en el estado de hierro es específica de los tejidos. El RNAm IREG1 contiene un solo IRE en el 5'UTR (Abboud y Haile, 2000; McKie y col., 2000). Se ha demostrado que la expresión de otros genes que poseen 5'IREs, tales como la ferritina, está incrementada por el hierro elevado en los enterocitos duodenales (Oates y Morgan, 1997). De acuerdo con estos efectos previsibles, la expresión del IREG1 en el hígado (Abboud y Haile, 2000) y pulmón (Yang y col., 2002) es regulada por el hierro elevado. Sin embargo, el papel del IRE en la regulación de la transcripción del IREG1 intestinal es controvertido.

2.2.3. DISTRIBUCIÓN Y CAPTACIÓN CELULAR

-Circulación sanguínea:

La mayoría del hierro en la sangre forma parte de la hemoglobina de las células rojas, lo cual representa una cantidad de entre 400 y 600 mg/L. La menor cantidad de este elemento presente en el plasma (2-20 mg/L) está casi completamente unida a transferrina. La ferroxidasa (ceruloplasmina) oxida el Fe^{2+} circulante a Fe^{3+} . El Fe^{3+} puede fijarse a dos sitios de la transferrina, pero menos de la mitad de los sitios disponibles son ocupados en individuos sanos. La concentración de hierro libre (no unido a transferrina) es normalmente inferior a 10^{-8} mol/L. El mantenimiento de una concentración muy baja de hierro libre limita la generación de radicales libres y evita la proliferación de bacterias dependientes de hierro en la sangre y tejidos.

Incluso un leve incremento, típico en individuos con variantes heterocigóticas del gen de la hemocromatosis HFE, aumenta el riesgo de sufrir una septicemia mortal (Gerhard y col., 2001).

Los receptores de transferrina en las fosas recubiertas de clatrina de la superficie de muchas células portan transferrina diférrica (que tiene dos átomos de hierro) con cientos de pliegues preferentes comparado con la apotransferrina (que no porta hierro) y ejerce como mediador de la captación a través de la ruta de la endocitosis. La invaginación de las fosas conduce a la formación de vesículas endosómicas que comienzan la acidificación por la acción de una ATPasa transportadora de protones (Levy y col., 1999). La bomba de protones DMT1 bombea hierro desde la vesícula ácida (rica en protones) hasta el citoplasma donde se une a mobilferrina (Conrad y col., 1996).

Existen dos receptores de transferrina con una distribución tisular característica. El receptor de transferrina 1 (TfR1) se expresa principalmente en los enterocitos y los precursores de muchas células rojas. El receptor de transferrina 2 (TfR2) se expresa en las células hepáticas y monocitos circulantes. Más de cuatro residuos de ácido neuramínico residen en la transferrina sanguínea de la mayoría de individuos sanos. Al receptor de transferrina se une transferrina sin ácido neuramínico (asialotransferrina) en menor cantidad que la sialotransferrina normal. La asialotransferrina es preferentemente aclarada en el hígado vía receptor de la asialoglicoproteína (Potter y col, 1992). Una ingesta muy elevada de alcohol incrementa el porcentaje de asialotransferrina en sangre (Walter y col., 2001).

-Barrera hematoencefálica:

Los mecanismos de transferencia de hierro desde la sangre al cerebro son de particular interés, porque un aporte inadecuado durante la infancia obstaculiza un óptimo desarrollo cognitivo e intelectual y porque la acumulación de hierro en el cerebro es una de las causas más comunes de enfermedades neurodegenerativas durante la tercera edad. El hierro puede alcanzar el cerebro por dos vías: atravesando la capa endotelial de los capilares cerebrales y por filtración al fluido cerebroespinal y consecuente captación mediada por receptor de las neuronas (Moos y Morgan, 2000). Tanto el hierro libre como el unido a proteínas también pueden cruzar

directamente de la circulación sanguínea al cerebro a través de sitios sin barrera hematoencefálica.

El principal mecanismo para entrar a las células endoteliales de la barrera hematoencefálica es la endocitosis mediada por receptor del hierro unido a transferrina. El DMT1 transporta hierro fuera de las vesículas endocíticas (Burdo y col., 2001). La salida de hierro se realiza usando apotransferrina de los astrositos, que es captada vía receptores de transferrina, cargada con hierro y retornada al espacio extracelular. Otra ruta transepitelial capta hierro unido a lactoferrina, gracias a una proteína relacionada con el receptor LDL (Gross y Weindl, 1987). El transporte axonal puede aportar hierro a las neuronas fuera del cerebro a distancia considerable. La proteína transportadora de metales 1 (MTP1) promueve la salida de hierro del cerebro (Burdo y col., 2001).

-Transferencia materno-fetal:

La transferrina diférrica de la sangre materna atraviesa la capa sincitiotrofoblástica por endocitosis mediada por receptores de transferrina (Georgieff y col., 2000). El hierro es transportado fuera de los endosomas por la DMT1 y movido a la membrana basal. La salida de hierro del sincitiotrofoblasto hasta la sangre fetal es un proceso complejo y no completamente conocido, que implica la oxidación por una cobre-oxidasa de la placenta, de forma similar a la acción de la ceruloplasmina (Danzeisen y col., 2000) y transferencia a través de la membrana basal por la ferroportina 1 (Gambling y col., 2001).

Al final de un embarazo a término, una madre ha proporcionado unos 245 mg de hierro al feto y 75 mg son usados para la placenta y el cordón umbilical (Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, 2004). Este hecho no tiene en cuenta la expansión de la masa de hemoglobina materna durante el embarazo (unos 500 mg). Una ferodeficiencia materna incrementa la eficiencia de la transferencia de hierro al feto, parcialmente debida a la expresión incrementada de la cobre-oxidasa y el receptor de transferrina (Gambling y col., 2001). Esto significa que la transferencia de hierro al feto tiene preferencia sobre las necesidades de la madre

y la deficiencia materna puede empeorar si la ingesta no es adecuada. La pérdida de sangre durante el alumbramiento implica una pérdida de otros 150 mg de los depósitos maternos.

2.2.4. METABOLIZACIÓN

-Recuperación de hierro hemo:

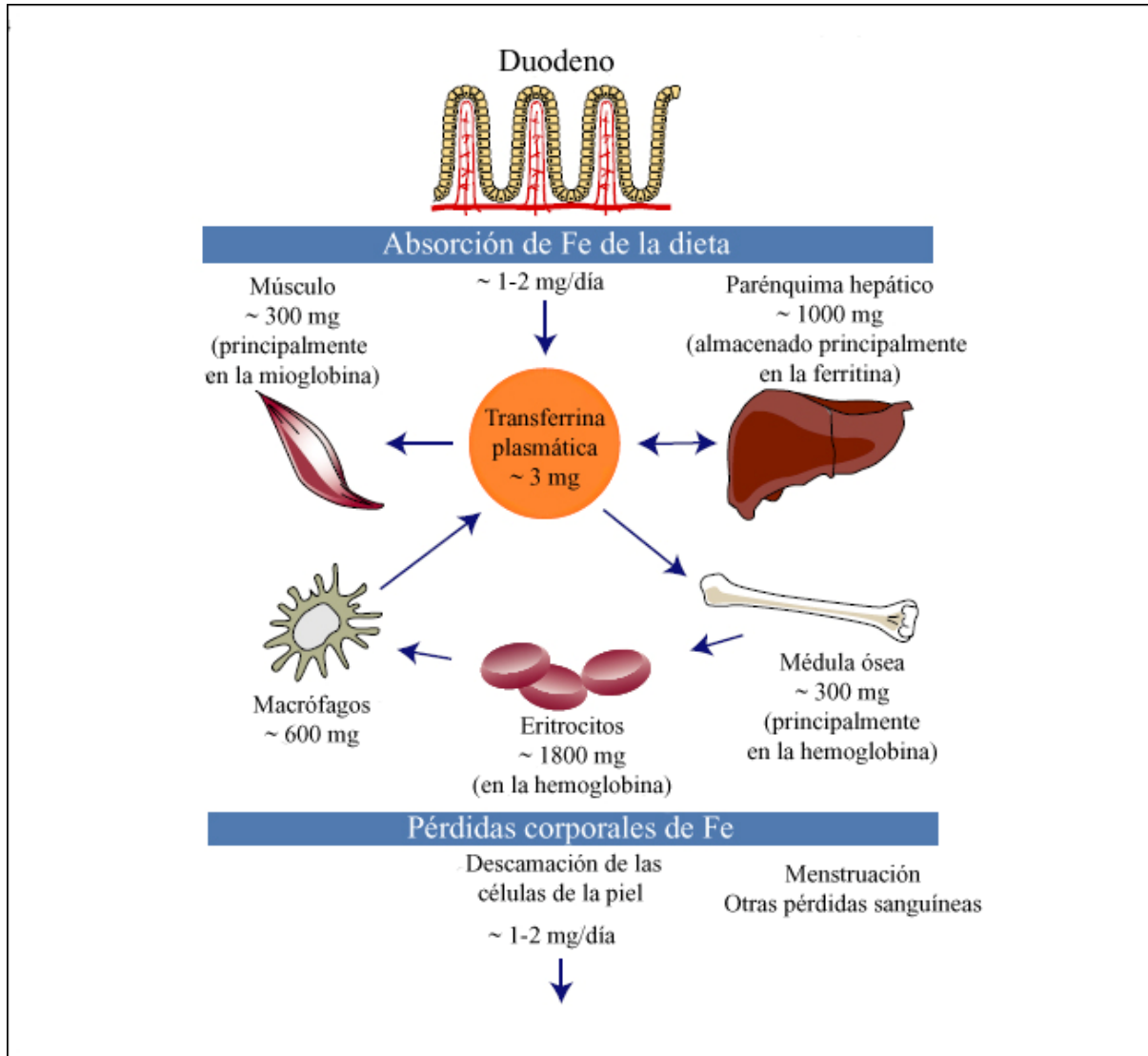
La hemo oxigenasa escinde el grupo α -metileno del hemo, genera biliverdina y libera Fe^{3+} . La NADH-ferrihemoprotein reductasa es necesaria para producir en una reacción NADH-dependiente tres moléculas de ferricitocromo por cada grupo hemo escindido.

La isoforma 1 de la hemo oxigenasa es inducida por el grupo hemo, la presencia de metales pesados, agentes oxidantes y endotoxinas, mientras que la hemo oxigenasa 2 no es inducible. Las células rojas senescentes de la sangre (las que han cumplido su ciclo de vida medio de unos 120 días) son eliminadas de la circulación principalmente por el bazo y el hígado. La hemo oxigenasa microsomal del bazo y muchos otros tejidos también provoca la escisión del grupo hemo de la mioglobina, citocromos y enzimas con el grupo hemo. La biliverdina entonces puede ser metabolizada por la biliverdin-reductasa y es convertida en bilirrubina. Alrededor de un 40% del hierro de las células rojas fagocitadas es usada para la síntesis de hemoglobina; el resto va a almacenarse en los depósitos de hierro (Cassanelli y Moulis, 2001).

2.2.5. DEPÓSITOS DE HIERRO EN EL ORGANISMO

El contenido total de Fe en los hombres es de unos 50 mg/Kg, mientras que las mujeres tienen una proporción ligeramente inferior y se distribuye como se ilustra en la FIGURA II. La mayoría del Fe del organismo (60-70%) forma parte de la hemoglobina de las células rojas (Papanikolau y Pantopoulos, 2004).

FIGURA II. Distribución del hierro en el organismo (Papanikolau y Pantopoulos, 2004):



El exceso de hierro se deposita intracelularmente como ferritina y hemosiderina, fundamentalmente en el sistema reticuloendotelial, el hígado y la médula ósea. Cada molécula de ferritina puede contener hasta 4500 átomos de Fe, aunque en condiciones normales tiene alrededor de 2500, almacenados como cristales de hidróxido fosfato férrico (Dallman y col., 1993; Wick y col., 1996; Cassanelli y Moulis, 2001).

La molécula de apoferritina es un heteropolímero formado por 24 subunidades de 2 tipos diferentes: L y H, con un peso molecular de 20 kDa cada una, constituidas por 4 cadenas helicoidales. Las variaciones en el contenido de subunidades que componen la molécula determinan la existencia de diferentes isoferritinas, las cuales se dividen en dos grandes grupos: isoferritinas ácidas (ricas en cadenas H) localizadas en el corazón, los glóbulos rojos, los linfocitos y los monocitos, y las isoferritinas básicas (ricas en cadenas L) predominantes en el hígado, bazo, placenta y granulocitos (Worwood, 1995; Cassanelli y Moulis, 2001).

Las subunidades se organizan entre sí de tal manera que forman una estructura esférica que rodea a los cristales de hierro. Esta cubierta proteica posee en su entramado 6 poros de carácter hidrofílico con un tamaño suficiente para permitir el paso de flavinmononucleótidos, ácido ascórbico o desferroxamina. Se plantea que estos poros tienen una función catalizadora para la síntesis de los cristales de hierro y su incorporación al interior de la molécula de ferritina (Dallman y col., 1993).

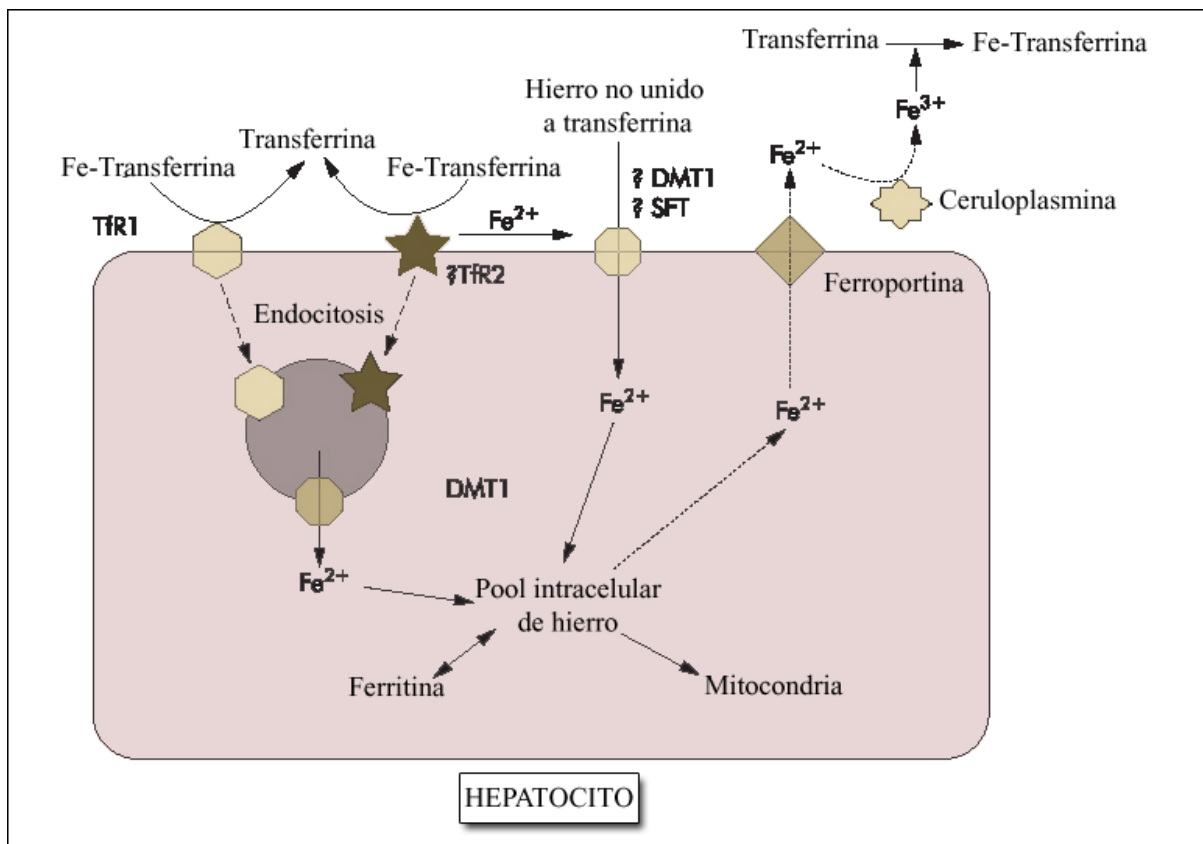
La función fundamental de la ferritina es garantizar el depósito intracelular de hierro para su posterior utilización en la síntesis de proteínas y enzimas (FIGURA III). Este proceso implica la unión del hierro a los canales de la cubierta proteica, seguido por la entrada y formación de un núcleo de hierro en el centro de la molécula. Una vez formado un pequeño núcleo sobre su superficie, puede ocurrir la oxidación de los restantes átomos del metal a medida que se van incorporando (Andrews y col. 1992).

Se han observado diferencias entre la velocidad de captación de hierro por las diferentes isoferritinas; así las isoferritinas ricas en cadenas H tienen mayor velocidad de captación y se ha demostrado que ésta es precisamente la función de este tipo de subunidad. No obstante, las cadenas H y L cooperan en la captación del hierro, las subunidades H promueven la oxidación del hierro y las L, la formación del núcleo (Levi y col., 1992). Tanto el depósito de hierro como su liberación a la circulación son muy rápidos, e intervienen en este último proceso el flavinmononucleótido. El hierro es liberado en forma ferrosa y convertido en férrico por la

ceruloplasmina plasmática para que sea captado por la transferrina que lo transporta y distribuye al resto del organismo.

La hemosiderina está químicamente emparentada con la ferritina, de la que se diferencia por su insolubilidad en agua. Aunque ambas proteínas son inmunológicamente idénticas, la hemosiderina contiene un porcentaje mayor de hierro (30%) y al microscopio se observa como agregados de moléculas de ferritina con una conformación diferente de los cristales de hierro (Cassanelli y Moulis, 2001).

FIGURA III. Representación esquemática de las rutas de absorción de hierro por los hepatocitos. DMT1: Transportador de metales divalentes 1. TfR1: Receptor de la transferrina1. TfR2: Receptor de la transferrina 2. STF: Estimulador del transporte de hierro. (Trinder y col., 2002):



2.2.6. ELIMINACIÓN

El hierro se pierde inevitablemente a través de la bilis (84 $\mu\text{g}/\text{Kg}$), la piel (42 $\mu\text{g}/\text{Kg}$), y la orina (14 $\mu\text{g}/\text{Kg}$). Una pérdida menstrual típica supone 30 mL por ciclo. La contracepción hormonal está asociada con menores pérdidas. El contenido de hierro de la hemoglobina es 3.46 mg/g. Con una concentración de hemoglobina en sangre de 130 g/L, la pérdida de 1 mL de sangre equivale a 0.45 mg de hierro. Pérdidas escasas de sangre, usualmente de unos mililitros por día del tracto digestivo, es una causa común de deficiencia severa de hierro, especialmente en la tercera edad.

La lactancia materna supone unas pérdidas de hierro para la mujer de 0.3-0.6 mg/día, debido a la transferencia a la leche (Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, 2004).

Las pérdidas de hierro por la orina son relativamente escasas, porque muchas proteínas que contienen hierro son demasiado grandes para filtrar a nivel glomerular. Además la hemoglobina libre y el hemo son eliminados rápidamente de la circulación bajo muchas circunstancias y la concentración de hierro libre en sangre es muy baja. Sin embargo, las pequeñas cantidades de transferrina que son filtradas se unen a cubilina en el borde en cepillo de la membrana del túbulo proximal y son captadas con la ayuda de la mesalina (Kozyraki y col., 2001). La falta de alguno de estos receptores incrementan las pérdidas de hierro notablemente.

2.2.7. REGULACIÓN HOMEOSTÁTICA DEL BALANCE DE HIERRO

Los niveles de hierro son regulados principalmente a nivel de la absorción intestinal, pero otros sitios incluyendo los riñones, también desempeñan un papel primordial en la regulación homeostática del hierro (Ferguson y col., 2001).

La función de la transferrina en el intestino delgado puede ser el enlace entre la concentración intracelular de hierro y los niveles de hierro sistémicos (la absorción de hierro es alta y no responde a los niveles de hierro sistémico en ausencia de transferrina). Con un estado

de hierro idóneo (depósitos llenos), mayor cantidad de hierro va de los enterocitos a la sangre y la concentración intracelular de hierro se mantiene más alta que en condiciones de ferropdeficiencia. Por tanto, individuos con los depósitos de hierro repletos absorben una mayor cantidad de hierro de la dieta, que aquellos que se encuentran en un estado de depleción.

La absorción intestinal de hierro está regulada en varios puntos. Uno de ellos es el ajuste de la captación mediada por la DMT1 (Divalent Metal Transporter). Una alta concentración de hierro en los enterocitos, tal como la que se puede producir con una comida rica en hierro, inmediatamente conduce a la redistribución de DMT1 desde el borde en cepillo de los enterocitos hasta el citosol e inmediatamente después a una disminución de los niveles de DMT1 y de la expresión del gen HFE (el gen responsable de la hemocromatosis) (Sharp y col., 2002). Un segundo mecanismo es el incremento de captación por la ferritina del enterocito en respuesta a una alta concentración de hierro intracelular. El complejo hierro-ferritina es bloqueado en su avance fuera de la célula y excretado en las heces cuando se produce la eliminación de la célula absorptiva al final de su periodo de dos o tres días de vida (Conrad y Umbreit, 2000). El gen HFE que se parece a las moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), juega un papel importante en la regulación de la absorción de hierro, puesto que personas con este gen defectuoso absorben más cantidad de hierro y muestran un fenotipo clínico de hemocromatosis (Pietrangelo, 2002).

La enzima dependiente de hierro aconitato-hidratasa y una proteína relacionada sin actividad aconitasa actúan como proteínas reguladoras de hierro (IRP) que detectan la concentración citosólica de hierro disponible y lo unen a elementos de respuesta específicos para el hierro (IRE) en varios genes. La unión de las IRPs repletas de hierro a las IRE de la ferritina incrementa su expresión y por tanto, disminuye la absorción intestinal y promueve el depósito en el hígado y los tejidos hematopoyéticos. La unión de las IRPs repletas de hierro al receptor de transferrina mRNA acelera su degradación y ralentiza la transferencia del hierro del intestino y los tejidos de reserva de hierro. Análogas interacciones también regulan la expresión de la ferroportina 1 y DMT1 (Pietrangelo, 2002).

2.2.8. SOBRECARGA DE HIERRO

Varios desórdenes genéticos pueden conducir a una acumulación patológica de hierro en el organismo. La hemocromatosis hereditaria aparece como resultado de una sobrecarga de hierro, en lugar de una ingesta normal de dicho elemento y la hemocromatosis subsahariana requiere una combinación de una alta ingesta de hierro y una predisposición genética.

-Hemocromatosis hereditaria:

Alrededor de uno de cada 200 individuos del Norte de Europa están afectados por un desorden genético conocido como hemocromatosis hereditaria (HH). Esta patología se caracteriza por una acumulación de hierro en el hígado y otros tejidos como resultado de un leve incremento en la absorción intestinal durante muchos años. Si no es tratado, la acumulación de hierro en los tejidos puede conducir a cirrosis hepática, diabetes, cardiomiopatía o artritis. La HH era conocida como un desorden genético que afectaba la absorción intestinal de hierro durante años, pero el gen (HFE) y la mutación resultante en la HH ha sido identificado hace escasos años (Feder y col., 1996). En el momento actual, el papel exacto de la proteína codificada por el gen HFE en la absorción intestinal de hierro no está aun bien dilucidado (Anderson y col., 2000). La sobrecarga de hierro en la HH es tratada por flebotomía, extrayendo 500 mL de sangre de una vez, a intervalos determinados por la severidad de la sobrecarga de hierro. Es común que se advierta a los individuos con HH que eviten cualquier suplemento de hierro, pero no suelen ser advertidos acerca de los perjuicios que pueden causarles los alimentos enriquecidos en hierro. El consumo de alcohol está totalmente desaconsejado debido al riesgo incrementado de sufrir cirrosis hepática (Fairbanks y col., 1999).

-Hemocromatosis Subsahariana:

La sobrecarga de hierro en personas de color de Sudáfrica esta asociada con una exposición crónica a dietas que contienen demasiado hierro derivado principalmente los utensilios de cocina y los barriles usados para fermentar la cerveza. Esta forma de sobrecarga de hierro es más severa en hombres adultos, cuyo consumo de cerveza tiende a ser mayor y en estos casos, la ingesta de hierro puede superar los 100 mg/día. Como ocurre en la hemocromatosis hereditaria, también puede producirse una cirrosis hepática o diabetes. De distinto modo a la

HH, la hemocromatosis subsahariana aparece como consecuencia de una alta ingesta de hierro, asociada a un factor genético que no ha sido aún identificado (Fairbanks, 1999; Walter y Segal, 1999).

2.3. EL CALCIO EN LA NUTRICIÓN

2.3.1. INTRODUCCIÓN

El calcio es el mineral más común en el organismo humano y representa entre un 1.5 y un 2% del peso total del cuerpo. Alrededor del 99% se encuentra en los huesos y dientes, mientras que el 1% restante se encuentra en la sangre y tejidos blandos. Los niveles en la sangre y fluidos extracelulares deben ser mantenidos en unos rangos muy estrictos de concentración para asegurar un funcionamiento fisiológico normal del organismo. Las funciones fisiológicas del calcio son tan vitales, que el organismo recurre a la desmineralización ósea para mantener los niveles adecuados de éste en sangre cuando la ingesta no es adecuada. Puesto que el hueso contiene la mayor proporción de este mineral, su desarrollo y mantenimiento es el mayor determinante de las necesidades de dicho elemento. Los requerimientos varían en las distintas etapas de la vida, siendo mayores en los periodos de crecimiento rápido, en el embarazo y lactación y durante la tercera edad (Weaver y Heaney, 1999).

2.3.2. FUENTES ALIMENTARIAS DE CALCIO

Las fuentes de calcio más importantes son la coliflor, repollo, nabo y el brócoli (de estos alimentos puede absorberse hasta el 50%). También son una fuente importante de este mineral: la raspa de la sardina y el salmón ahumado (se puede absorber hasta un 30% del calcio que contienen), las almejas y las ostras. La soja también contiene una importante cantidad. El ácido oxálico limita bastante la biodisponibilidad en el ruibarbo, espinacas, y remolacha. Los zumos de naranja enriquecidos pueden llegar a contener tanto calcio como la leche. El tofu (un producto derivado de la soja) preparado por precipitación de calcio es también una excelente fuente de dicho mineral. El pan y otros productos de repostería preparados con calcio, tienen una cantidad aceptable de éste. Por otra parte, la leche y derivados lácteos también proporcionan un

buen aporte de calcio y con una elevada biodisponibilidad (de la leche puede absorberse más del 30%).

TABLA III. Contenido en calcio de algunos alimentos (modificado de Weaver y col., 1999):

<i>ALIMENTO</i>	<i>PORCIÓN</i>	<i>CALCIO (mg)</i>
<i>Yogur desnatado</i>	1 vaso	300
<i>Leche desnatada</i>	1 vaso	302
<i>Queso cheddar</i>	30 g	204
<i>Espinacas</i>	½ taza, cocinadas	138
<i>Tofu</i>	½ taza	115
<i>Naranja</i>	1, mediana	52
<i>Col</i>	½ taza, cocinada	47
<i>Carne de pollo</i>	100 g, cocinado	14

2.3.3. FUNCIONES DEL CALCIO

-Función estructural:

El calcio es el principal elemento estructural en los huesos y los dientes. El componente mineral del hueso consiste principalmente en cristales de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, que contienen una gran cantidad de calcio y fósforo (aproximadamente un 40% de calcio y un 60% de fósforo) (Heaney, 2000). El hueso es un tejido dinámico que está sometido a una constante remodelación a lo largo de la vida (es un “turnover” continuo). Las células encargadas de la formación del hueso se denominan osteoblastos, y las células encargadas de la resorción se denominan osteoclastos. Durante un crecimiento normal, la formación ósea supera a la resorción. En las etapas de la vida en las que no hay crecimiento existe un equilibrio entre los procesos de formación y resorción. La osteoporosis puede aparecer como resultado de un equilibrio negativo de ambos procesos, a favor de la resorción (Weaver y Heaney, 1999).

-Mensajero celular:

El calcio juega un papel importante como mediador en la contracción y relajación de los vasos sanguíneos (vasoconstricción y vasodilatación), transmisión del impulso nervioso, contracción muscular y en la secreción de hormonas tales como la insulina. Las células excitables, como las del músculo esquelético y neuronas, contienen canales de calcio voltaje-dependientes en sus membranas celulares, lo cual permite cambios rápidos en las concentraciones de calcio. Cuando una fibra muscular recibe un impulso nervioso que la estimula para contraerse, los canales de calcio de la membrana celular se abren para permitir la entrada de unos pocos iones de calcio a las células musculares. Estos iones de calcio se unen a proteínas activadoras dentro de la célula que liberan un flujo de iones de calcio desde las vesículas donde está almacenado en el interior celular. La unión del calcio a la proteína troponina-c inicia una serie de reacciones que conducen a la contracción muscular. La unión del calcio a la proteína calmodulina activa enzimas que escinden el glicógeno que produce la energía necesaria para la contracción (Weaver y Heaney, 1999).

-Cofactor para enzimas y proteínas:

El calcio es necesario para estabilizar o permitir la actividad óptima de un elevado número de proteínas y enzimas. La unión de iones de calcio es requerida para la activación de siete factores de coagulación dependientes de la vitamina K en la cascada de reacciones de la coagulación. El término de cascada de reacciones de la coagulación se refiere a una serie de eventos, dependientes todos entre sí, que frena el sangrado a través de la formación de agregados plaquetarios (Brody, 1999).

-Liberación de neurotransmisor:

El calcio juega un papel fundamental en la liberación de neurotransmisor desde las vesículas en las terminales sinápticas de las células nerviosas, pero muchos detalles acerca de estos mecanismos todavía no son bien conocidos (Agustine, 2001). Los canales de calcio voltaje-dependientes permiten un influjo rápido de calcio a las neuronas en respuesta a la despolarización y esto inicia la liberación de neurotransmisor. La liberación de neurotransmisor

y la excitabilidad de la neurona también está regulada a través de canales de potasio (Gribkoff y col., 2001).

-Crecimiento y proliferación celular:

El calcio está implicado en la iniciación de la síntesis de DNA, en la agrupación de los cromosomas, regulación de la división y proliferación celular. La estimulación de receptores sensibles al calcio, por ejemplo, promueve la diferenciación de células tales como los queratinocitos (Bikle y col., 2001).

-Sistema Vestibular:

El oído interno contiene un órgano sensorial que percibe el equilibrio y da la información acerca de la posición corporal. Las células sensoriales del sistema vestibular detectan el desplazamiento de una capa de carbonato cálcico incrustada en una matriz gelatinosa (la membrana otolítica).

2.3.4. BENEFICIOS ADICIONALES DEL CALCIO

-Calcio para prevenir la ganancia de peso:

La ingesta de calcio puede prevenir el incremento de peso que conduce a la obesidad. Davies y col. (2000) demostraron una asociación entre ingesta de calcio y peso corporal en la reevaluación de cinco estudios clínicos de ingesta de calcio. Las participantes eran mujeres de 20, 50 u 80 años. Se encontró una asociación negativa entre ingesta de calcio y ganancia de peso para los tres grupos de edad. Las participantes tratadas con calcio mostraron una pérdida de peso significativa en relación a las que recibían placebo. La estimación de la relación indica que una diferencia de 1000 mg en la ingesta de calcio está asociada con una diferencia de peso corporal de 8 Kg, lo cual explica aproximadamente el 3% de la varianza del peso corporal. Carruth y Skinner (2001) evaluaron la ingesta de alimentos en niños de edad preescolar de 24 a 60 meses y relacionaron estos hallazgos con la composición corporal a los 70 meses. Los resultados de las investigaciones mostraron que una ingesta más alta de calcio y más productos lácteos al día estaba relacionado con una menor cantidad de grasa corporal.

-Hipertensión:

El enriquecimiento con calcio puede prevenir la hipertensión esencial arterial y otros desórdenes hipertensivos relacionados con la gestación. Se ha demostrado que el suplemento de un gramo de calcio al día durante la gestación, puede disminuir la presión arterial máxima, particularmente en mujeres con alto riesgo de hipertensión gestacional (Atallah y col., 2000). Un estudio de la DASH (Dietary Approaches to Stop Hipertension) demostró una espectacular capacidad para disminuir la presión arterial de una dieta rica en frutas y verduras e incluso una reducción aún mayor cuando se servían tres productos lácteos bajos en grasa al día.

-Cáncer y otros desórdenes:

El incremento de la ingesta de calcio y derivados lácteos reduce el riesgo de sufrir cáncer de colon, posiblemente debido a la disminución de las concentraciones de ácidos biliares y ácidos grasos libres fecales, lo cual implica una menor citotoxicidad. Además, el calcio de la dieta y la vitamina D pueden proteger contra el cáncer de mama y otros tipos de cáncer. Tradicionalmente ha existido una gran preocupación porque se creía que el enriquecimiento de alimentos con calcio aumentaba el riesgo de sufrir cálculos renales. Estudios recientes indican que ocurre todo lo contrario: la posibilidad de sufrir cálculos renales es mayor en mujeres que ingieren una baja cantidad de calcio y magnesio (Hall y col., 2001). El mecanismo por el que se produce, consiste en que el calcio se une al oxalato, un compuesto que se absorbe muy poco, previniendo así que el oxalato forme cálculos (Weaver, 2001). Un suplemento de 1200 mg de calcio diario durante 3 meses también ha mostrado que reduce significativamente los síntomas de síndrome premenstrual en un 48%, comparado con un 30% del grupo placebo (Thys-Jacobs, 1998).

2.3.5. PECULIARIDADES Y VENTAJAS DEL CALCIO EN LA LECHE Y DERIVADOS LÁCTEOS

La leche y los derivados lácteos son la principal fuente de calcio en la dieta. La leche de vaca contiene una media de 1.20 g de calcio por litro (la misma cantidad aproximadamente que la de cabra), de los cuales el 20% está unido a caseína como un coloide orgánico insoluble y el 80% restante en forma mineral (45% en el fosfato tricálcico de los fosfocaseinatos, que es también insoluble y coloidal, y un 35% soluble). El calcio orgánico y mineral unido a la caseína es fácilmente liberado durante la digestión, y su biodisponibilidad es alta. Muchos estudios de solubilidad del calcio usan el de la leche como patrón de referencia. El calcio en las espinacas, presente como un oxalato insoluble, es tomado como el ejemplo extremo de la peor biodisponibilidad. Sin embargo, excepto para los recién nacidos alimentados con leche materna que pueden absorber casi todo el calcio ingerido, el porcentaje absorbido de la leche, rara vez excede el 40% en condiciones normales.

El calcio presente en los quesos es fácilmente disponible, a pesar de que usualmente contienen grandes cantidades de ácidos grasos saturados de cadena larga y no contienen lactosa (Guéguen, 1992). Estudios en ratas alimentadas con queso cheddar marcado con ^{47}Ca mostraron que el calcio fue absorbido de la misma forma que en la leche y que el grado de maduración del queso no afectó a la absorción (Buchowski y Miller, 1990).

Sin embargo, hay que tener en cuenta que el calcio de la leche difiere en varios aspectos interesantes del calcio presente en otros alimentos o suplementos dietéticos. Estos factores pueden ser importantes cuando es necesario asegurar una alta absorción de calcio, bajo ciertas condiciones fisiológicas que no son favorables. Puesto que el calcio de la leche está unido a péptidos y proteínas, es más probable que permanezca en solución cuando el pH es desfavorable, como cuando existe aclorhidia. El calcio de la leche puede absorberse en ausencia de vitamina D, bajo la influencia de la lactosa en el intestino delgado distal, a través de la vía

paracelular. Por tanto, la leche proporciona calcio con “absorción asegurada”, que es generalmente insensible a factores externos, excepto a los inhibidores como el ácido oxálico.

La leche y los derivados lácteos no son sólo una excelente fuente de calcio, sino que también proporcionan una gran cantidad de nutrientes beneficiosos en la dieta como proteínas, vitaminas y otros minerales. Este hecho fomenta la absorción de calcio y proporciona un aporte simultáneo de fósforo, esencial para la formación ósea. Estas ventajas no pueden ser proporcionadas por ninguna otra fuente de calcio (Heaney, 1996).

2.3.6. ENRIQUECIMIENTO DE ALIMENTOS CON CALCIO

Las sales más usadas para la fortificación de los alimentos con calcio son: glicerofosfato cálcico, gluconato cálcico y lactato cálcico. El tipo de sal usada parece que no afecta mucho a la biodisponibilidad de este mineral, según un estudio de dos leches infantiles fortificadas con calcio: una con gluconato cálcico y glicerofosfato cálcico y otra con fosfato cálcico tribásico (Schanler y Abrams, 1995). Estudios en fórmulas infantiles fortificadas han obtenido resultados similares y han demostrado que los efectos positivos de los suplementos de sales cálcicas podrían ser atribuidos de forma exclusiva al alto contenido de calcio presente en el alimento (Kaup, 1998).

Otros estudios realizados con ratas a las que se les suministró un suplemento de calcio en forma de carbonato, lactato y fosfato cálcico han demostrado que la suplementación con calcio durante largos periodos de tiempo producen efectos adversos como hipercalcemia, hipomagnesemia e hipofosfatemia. Los suplementos de fosfato cálcico obtuvieron los mejores resultados para el calcio y el fósforo, sin alterar los depósitos de magnesio. Esto demuestra la importancia de la combinación de calcio y fósforo para obtener una óptima mineralización ósea (Patwardhan y col., 2001).

El uso de lactato cálcico para la fortificación mejora el balance de calcio en niños con bajo peso al nacer. Sin embargo, esta mejora es más una consecuencia de la alta ingesta de calcio derivada de la adición de la sal, que del propio efecto del lactato cálcico. El posible efecto

beneficioso del lactato cálcico debería ser determinado teniendo en cuenta factores tales como la concentración de calcio en el propio suplemento o en el tipo de leche, comparándolo con otros tipos de sales similares como fosfato cálcico, cloruro cálcico o carbonato cálcico y la relación calcio/fósforo.

Las sales de calcio usadas para la fortificación presentan problemas relacionados con la solubilidad y las características organolépticas. El carbonato cálcico y el fosfato cálcico no poseen sabor, porque son insolubles en agua y medios acuosos. El lactato cálcico y el gluconato cálcico son solubles en agua, pero proporcionan al alimento un sabor muy fuerte, que generalmente no gusta al consumidor. Han aparecido otros compuestos alternativos como el gluconato cálcico estabilizado con glicina. Sarabia y col. (1999), usando ^{45}Ca como marcador, encontraron que la cantidad total de calcio excretado en orina es 10 veces mayor con el gluconato cálcico estabilizado con glicina, que con el gluconato cálcico solo. La alta solubilidad de esta sal en medio alcalino hace que sea fácil de absorber en el intestino y, consecuentemente, altamente biodisponible.

Las tasas de absorción aproximada de varias sales cálcicas después de la ingestión de 250 mg de calcio son las siguientes: carbonato cálcico, entre un 36% y un 42% es absorbido; acetato y lactato cálcico, del 28% al 36%; gluconato cálcico, entre un 24% y un 30%; citrato cálcico, del 27% al 33% (Groff y Cropper, 2000). Otros estudios han demostrado que la absorción de calcio procedente de citrato y carbonato cálcico es igual, con una biodisponibilidad similar (Heaney y col., 2001).

El calcio en los alimentos, particularmente en la leche, es mejor absorbido que en los suplementos (Cadogan y col., 1997). Es interesante resaltar que la biodisponibilidad del calcio en ciertos vegetales como el brócoli es más alta que en los derivados lácteos, aunque las cantidades de calcio son menores en estos vegetales. La razón de este hecho no está clara (Weaver y Heaney, 2001). Cuando se evalúa la ingesta, es apropiado asumir que la absorción del calcio es similar para la mayoría de derivados lácteos, sales de calcio usadas para fortificar alimentos y suplementos, por tanto no hay que centrarse inútilmente en la biodisponibilidad.

Pero cuando se incluyen en la dieta alternativas a los derivados lácteos como primera fuente de calcio, es importante asegurarse que otros nutrientes, aparte del calcio, son proporcionados por la dieta en cantidades adecuadas. Estos nutrientes necesarios son: magnesio, vitamina D, riboflavina y vitamina B₁₂ (Weaver, 2001).

2.4. UTILIZACIÓN NUTRITIVA DE CALCIO

2.4.1. REQUERIMIENTOS

Las ingestas adecuadas estimadas por el Food and Nutrition Board (2004) están basadas en determinar los requerimientos de ambos géneros durante las distintas etapas de la vida. Durante varios periodos del ciclo de vida femenino, la ingesta de calcio es crítica: pubertad, adolescencia, postmenopausia, embarazo y lactancia. En un estudio en adolescentes, 1300 mg de calcio o incluso más fueron necesarios para obtener una máxima retención ósea (Yates, 1998). Los hombres también necesitan cantidades adecuadas de calcio durante su ciclo vital, pero se conoce menos acerca de sus requerimientos.

Las ratas, tanto en fase de crecimiento como en la edad adulta, requieren 5000 mg/Kg de dieta de calcio (Reeves y col., 1993).

TABLA IV. Ingestas diarias recomendadas (RDA) de calcio (modificado de Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, 2004):

Etapas de la Vida	Edad	Hombres (mg/día)	Mujeres (mg/día)
Lactantes	0-6 meses	210	210
Lactantes	7-12 meses	270	270
Niños	1-3 años	500	500
Niños	4-8 años	800	800
Niños	9-13 años	1300	1300
Adolescentes	14-18 años	1300	1300
Adultos	19-30 años	1000	1000
Adultos	31-50 años	1000	1000
Adultos	51-70 años	1200	1200
Adultos	Más de 70 años	1200	1200
Embarazo	Menos de 18 años	-	1300
Embarazo	19-30 años	-	1000
Embarazo	31-50 años	-	1000
Lactancia	Menos de 18 años	-	1300
Lactancia	19-30 años	-	1000
Lactancia	Más de 30 años	-	1000

2.4.2. ABSORCIÓN

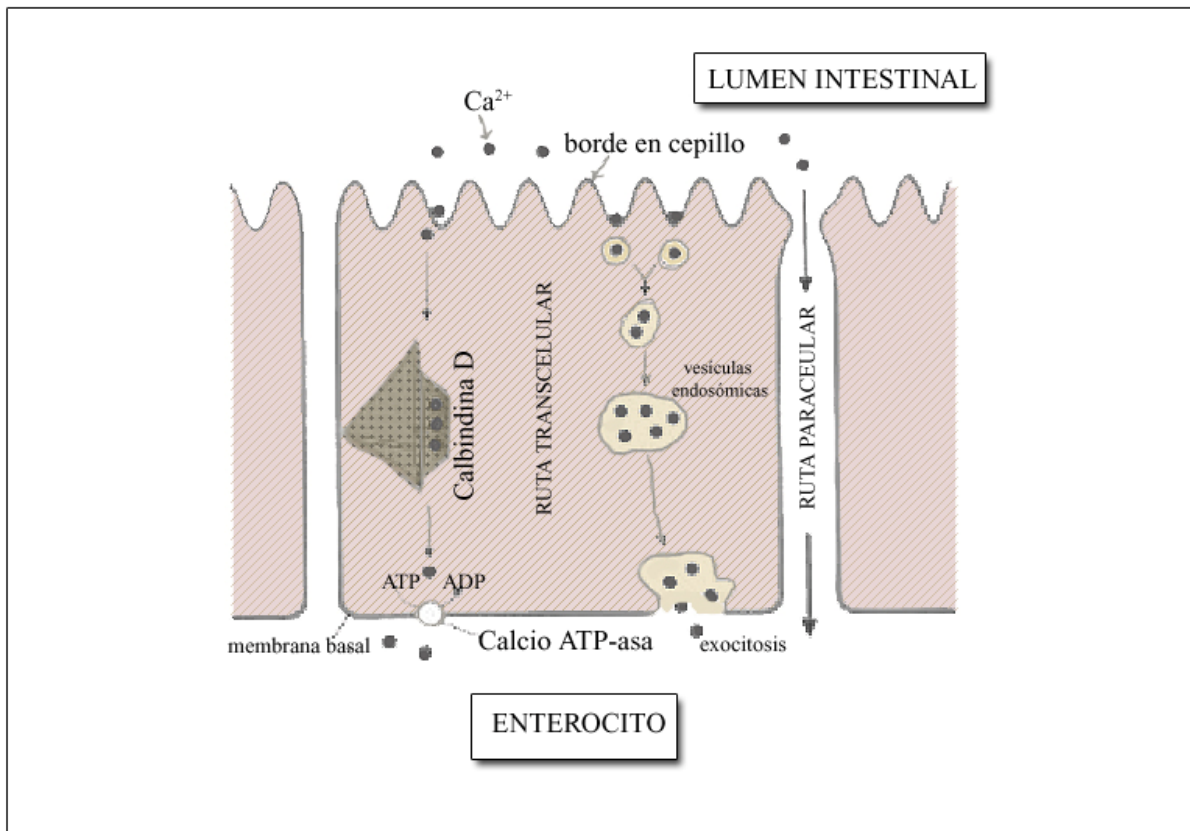
El calcio está presente en los alimentos y suplementos de la dieta como sales relativamente insolubles. Puesto que el calcio solo puede ser absorbido en su forma ionizada (Ca^{2+}), debe ser liberado de estas sales antes de absorberse. Este proceso ocurre a pH ligeramente ácido, de manera que las sales cálcicas se solubilizan en una hora aproximadamente. Sin embargo, el calcio puede formar complejos con otros minerales o constituyentes de la dieta bajo condiciones de alcalinidad, como en el intestino delgado, limitando la biodisponibilidad del calcio ingerido (Groff y Gropper, 2000).

La mayoría del calcio es absorbido en el intestino delgado, específicamente en el íleon, debido al prolongado espacio de tiempo que los alimentos permanecen en esta región intestinal (Groff y Gropper, 2000). La eficiencia de la absorción de calcio está basada en el estado actual del calcio en el organismo. Durante las etapas de crecimiento, embarazo, lactancia y adolescencia donde se produce el pico máximo de acumulación de masa ósea, se puede llegar a absorber hasta un 75% del calcio presente en la dieta. Se ha sugerido que el calcio es un nutriente umbral (Heaney, 1999). La ingesta de calcio por encima del umbral no produce necesariamente un aumento de masa ósea a largo plazo. El aumento de masa ósea puede ser determinado por otros factores, incluyendo factores genéticos y el nivel de ejercicio (estrés mecánico). Puesto que el valor del umbral depende de la edad, existen variaciones en los requerimientos según la edad. Sin embargo, existe mucha controversia acerca de los niveles adecuados de ingesta en hombres y mujeres en función de su edad.

Existen dos procesos principales de transporte responsables de la absorción del calcio. El primer proceso es la denominada ruta transcelular, que tiene lugar en el duodeno y en el yeyuno proximal. Es una transferencia activa que requiere energía y una proteína de unión llamada calbindina (Groff y Gropper, 2000). Este proceso está regulado por el calcitriol o vitamina D, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Weaver y Heaney, 1999). La ingestión de pequeñas cantidades de calcio estimula el sistema de transporte calcitriol-dependiente, particularmente con ingestas inferiores a 400 mg y también bajo condiciones de mayor necesidad como son el embarazo, la lactancia y adolescencia. Conforme disminuyen los niveles de calcio sérico, aumentan los niveles de PTH, causando la liberación de calcitriol. La absorción inducida por calcitriol implica cambios en la membrana lipídica del enterocito e inicia la síntesis de calbindina, una proteína transportadora que actúa como lanzadera de calcio desde el citoplasma del enterocito a la membrana basal. Cuando llega a la membrana basal, el calcio debe ser transportado fuera de la célula al líquido extracelular. Este proceso de extrusión requiere energía en forma de adenosín trifosfato (ATP) y una enzima regulada por la vitamina D (Ca-Mg ATP-asa) que hidroliza el ATP y libera energía para bombear el calcio fuera de la célula, mientras el magnesio y el sodio son bombeados al interior de la célula (Groff y Gropper, 2000; Weaver, 2001). La absorción regulada por calcitriol

decrece con la edad, particularmente en la menopausia. La producción renal de calcitriol se vuelve menos eficiente en respuesta a la PTH, hecho que también se exagera con la edad.

FIGURA IV. Modelo de transporte de calcio intestinal (Stipanuk, 2000):



El calcio atraviesa el intestino por dos posibles rutas. Una de ellas está caracterizada por un transporte paracelular no saturable, dependiente de la concentración y requiere energía, teniendo lugar probablemente entre los enterocitos y no está regulado hormonalmente. El segundo proceso consiste en un transporte transcelular saturable dependiente de energía, que tiene una capacidad de transporte limitada y está regulado principalmente por la $1,25(OH)_2D_3$ a través de un mecanismo que estimula la producción de calbindina D. La calbindina D es una proteína citosólica que actúa como un transportador intracelular para el calcio a través del compartimento citosólico acuoso. Parte del calcio también puede ser transportado en la célula por vesículas endosómicas y lisosómicas y salir de la célula a través de un proceso de exocitosis.

El segundo proceso por el que se produce la absorción de calcio, llamado difusión paracelular, implica la difusión pasiva del calcio entre las células en el yeyuno e íleon. La absorción de calcio por este proceso se incrementa cuando la ingesta de calcio es elevada y tiene lugar en un sistema de intercambio Na-Ca, en donde tres moléculas de Na⁺ se intercambian por una de Ca²⁺ (McCance y Hueter, 1998; Groff y Gropper, 2000). Una vez en la sangre, el calcio es transportado en una de estas tres formas: unido a proteínas (aproximadamente el 40%), formando complejos con fosfato, sulfato o citrato (aproximadamente el 10%) y libre o ionizado (el 50% restante) (Groff y Gropper, 2000).

El duodeno y yeyuno proximal son las regiones anatómicas más eficientes para la absorción activa del calcio, debido al pH ligeramente ácido (6.0) y la presencia de calbindina. Sin embargo, la mayoría de calcio se absorbe en el íleon debido al largo periodo de tiempo que el quimo permanece allí (Weaver y Heaney, 1999). Hay que tener en cuenta que el intestino delgado no es el único sitio donde se absorbe el calcio. Frecuentemente, el calcio se une a otros minerales y especialmente a la fibra. En muchos casos, esto impide la absorción del calcio, pero el intestino grueso contiene bacterias que pueden actuar en algunas fibras (como la pectina), fermentándolas y liberando así el calcio unido a ellas. Entre 5 y 8 mg pueden ser absorbidos diariamente en el colon (Groff y Gropper, 2000).

2.4.3. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA BIODISPONIBILIDAD DEL CALCIO

Existen multitud de factores que afectan la biodisponibilidad del calcio. Algunos de estos factores ayudan a lograr un correcto status de calcio para una correcta mineralización ósea. En este sentido, algunos compuestos presentes en la leche, tales como lactosa o caseinofosfopéptidos formados durante la digestión de las caseínas parece que mejoran la absorción del calcio. La proteína tiene un efecto negativo claro en la biodisponibilidad del calcio. Por otra parte, también se ha estudiado el posible efecto inhibitorio de la fibra, sin resultados concluyentes entre los estudios *in vivo* e *in vitro*. El papel del ácido fítico como inhibidor de la absorción de calcio podría ser prevenido usando fructooligosacáridos, que no

pueden ser digeridos en el intestino delgado y llegan prácticamente intactos al colon, donde son fermentados.

- Proteína:

Conforme aumenta la ingesta proteica, también se incrementa la excreción urinaria de calcio. Weaver y col. (1999) calcularon que cada gramo de proteína adicional ingerido con respecto a las recomendaciones, tiene la consecuencia de una pérdida adicional de calcio de 1.75 mg por día. Puesto que solo el 30% del calcio de la dieta es absorbido, cada gramo de incremento en la ingesta proteica diaria, requiere 5.8 mg de calcio adicionales para compensar la pérdida del mineral.

La biodisponibilidad del calcio en la leche es alta debido a su alto contenido en dicho mineral y que éste se encuentra asociado a caseínas. La caseína forma micelas y contiene fosfato cálcico en estado coloidal, lo cual favorece la absorción de calcio, siendo más importante que el efecto de la proteína sobre la absorción del mineral. Además los caseinofosfopéptidos formados durante la digestión de la caseína mejoran la absorción del calcio, a través de su unión con el mineral, manteniendo así el catión en una forma soluble, que lo hace biodisponible e inhibe su precipitación en el intestino en forma de fosfato cálcico. El efecto positivo de los caseinofosfopéptidos podría ser resultado no sólo del aumento de la solubilidad de calcio en el lumen intestinal, sino también el posible efecto protector de estos compuestos contra las interacciones antagonistas entre el calcio y otros minerales (Erba y Col., 2001).

-Fósforo:

El fósforo, que es típico de dietas ricas en proteína, tiende a disminuir la excreción de calcio en orina. Sin embargo, los alimentos ricos en fósforo también tienden a incrementar el contenido de calcio en las secreciones digestivas, dando como resultado un aumento de la pérdida de calcio en heces. Así pues, el fósforo no compensa la pérdida neta de calcio asociada a la elevada ingesta proteica (Weaver y col., 1999). El incremento en la ingesta de fosfatos, debido a los aditivos alimentarios o ciertas bebidas, han causado preocupación en ciertos investigadores con respecto a la correcta mineralización ósea.

-Sodio:

Una ingesta elevada de sodio produce un aumento de las pérdidas de calcio en la orina, debido posiblemente a la competencia entre sodio y calcio por la reabsorción renal o por un efecto del sodio en la secreción de PTH. Cada 2.3 g de incremento de sodio (5.8 g de sal, ClNa) excretado por el riñón, se ha observado que se excretan entre 25 y 40 mg de calcio en la orina. Debido a que las pérdidas urinarias representan, aproximadamente, la mitad de las diferencias en la retención de calcio entre individuos, el sodio de la dieta tiene una gran influencia en la pérdida de masa ósea. En mujeres adultas, cada gramo extra de sodio consumido al día produce una tasa adicional de pérdida de masa ósea de un 1% al año. Ciertos estudios en animales han revelado que la pérdida de masa ósea es mayor con elevada ingesta de sal y además, estudios clínicos no controlados, han llevado a confirmar la relación entre ingesta de sal y pérdida de masa ósea en humanos (Weaver y Heaney, 1999; Calvo, 2000). Además, un estudio de dos años en mujeres postmenopáusicas reveló que un aumento en la excreción urinaria de sodio (un indicador de una ingesta elevada de sodio) está asociada con una menor densidad ósea en la cadera (Devine y col., 1995).

-Carbohidratos:

El tipo de carbohidrato (lactosa, sacarosa, polímeros de glucosa, maltodextrinas, etc.) afectan a la biodisponibilidad del calcio de formas diferentes. Moya y col. (1992) compararon dos fórmulas infantiles con dos tipos de carbohidratos: lactosa y policosa (un polímero de la glucosa). Se observaron porcentajes más elevados de absorción de calcio en los niños alimentados con dietas que contenían lactosa. Con respecto a otros carbohidratos, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de calcio, fosfatasa alcalina, ni en el contenido mineral del hueso en los niños alimentados con dos tipos de fórmulas basadas en soja: una contenía exclusivamente polímeros de glucosa y la otra una mezcla de glucosa, fructosa, y polímeros de sacarosa a partes iguales.

Parece que la lactosa mejora la absorción del calcio. Este efecto positivo de la lactosa ha sido observado también en otros minerales como el zinc (Bertolo y col., 2001). Los efectos de la lactosa en la absorción de minerales pueden ser atribuidos a los disacáridos, porque la glucosa y

la galactosa no incrementan la absorción de minerales. Sin embargo, el mecanismo de acción aún no está claro.

-Fibra:

La biodisponibilidad del calcio también puede verse condicionada por la presencia de fibra en los alimentos, la cual parece tener un efecto negativo en la absorción de calcio. Este efecto, sin embargo, debe ser observado minuciosamente en los términos del papel que desempeñan las diferentes fracciones de la fibra que forma complejos con los cationes. Así pues, en ratas alimentadas con dos fuentes de lignina procedente de salvado de trigo y coliflor, no se observaron diferencias significativas en la absorción de ^{45}Ca , cuando se comparaban con el grupo control, que no recibía fibra (Shen y col., 1998). En un estudio *in vitro* con polisacáridos polianiónicos clasificados como fibra soluble, los polisacáridos con bajo contenido en sulfato y grupos carboxilo (goma guar y agar) presentaron una baja respuesta para formar complejos con cationes, mientras que la capacidad para unir cationes fue elevada en los polisacáridos con un alto contenido en sulfato y grupos carboxilo (pectina, carragenina y xantano). Este efecto puede explicarse por el hecho de que todos esos grupos son desprotonados al pH intestinal y pueden interactuar electrostáticamente con los cationes minerales (Debon y Tester, 2001). Se encontró un comportamiento similar *in vivo* para las condiciones que se experimentan en el intestino delgado cuando, después de neutralizar el jugo gástrico en el duodeno, el pH se incrementa a niveles de entre 6.5 y 7.0. Por tanto, la respuesta de algunos componentes de la fibra para formar complejos con cationes, es el resultado de la naturaleza polianiónica de la fibra, aunque muchos componentes de la dieta en condiciones fisiológicas pueden interferir con este proceso.

-Ácido fítico y fructooligosacáridos:

La reducción de la biodisponibilidad del mineral por el ácido fítico está ampliamente reconocida y se basa en el hecho de que es una molécula cargada con seis grupos fosfato, que muestran una gran afinidad para unir cationes como el calcio en el tracto gastrointestinal, evitando así su absorción y también la posterior reabsorción del calcio excretado endógenamente. Sin embargo, el efecto inhibitor del ácido fítico en la absorción mineral puede ser prevenido adicionando fructooligosacáridos a la dieta, los cuales no sólo incrementan la

absorción del calcio y otros minerales sino que también inhiben los efectos negativos del ácido fítico en la absorción mineral.

Este efecto puede explicarse por el hecho de que los fructooligosacáridos no pueden ser degradados por las enzimas presentes en el intestino delgado y, por tanto, llegan prácticamente intactos al colon donde son fermentados por la flora bacteriana autóctona, produciendo gases, lactosa y ácidos orgánicos tales como acetato, propionato y butirato, que disminuyen el pH y hacen al calcio más soluble, favoreciendo su absorción (López y col., 2001).

-Cafeína:

La cafeína en grandes cantidades incrementa la excreción urinaria de calcio durante un limitado periodo de tiempo. Sin embargo, ingestas de cafeína de 400 mg por día no cambian significativamente la excreción urinaria del mineral en mujeres premenopáusicas, comparado con el placebo (Barger-Lux y col., 1990). Aunque un estudio observacional encontró una pérdida de masa ósea acelerada en mujeres que consumieron menos de 744 mg de calcio por día y bebían de 2 a 3 tazas de café al día (Harris y Dawson-Hughes, 1994).

-Ciertos medicamentos:

Algunos medicamentos como los antibióticos, anticonvulsivantes y corticosteroides interfieren con la absorción del calcio. Dentro de los antibióticos se encuentra la tetraciclina, un compuesto que forma quelatos con minerales, provocando que tanto el principio activo como el mineral no sean disponibles. La minociclina tiene menor capacidad quelante y el efecto de la doxiciclina en la absorción del calcio aún está cargado de controversia (Utermohlen, 2000). Los anticonvulsivantes tales como la fenitoína y fenobarbital, pueden causar hipocalcemia por tres mecanismos diferentes: (a) disminuyen la absorción de calcio, posiblemente a través de la inhibición de proteína transportadora de calcio, (b) estimulan el catabolismo del colecalciferol (vitamina D₃) y (c) incrementan el catabolismo de la vitamina K, con la consiguiente reducción de la formación de proteínas dependientes de esta vitamina implicadas en el manejo del calcio por parte de los osteoblastos. Los corticosteroides administrados durante largos periodos incrementan la necesidad de vitamina B₆, calcio y vitamina D. El uso crónico de

anticonvulsivantes y corticosteroides son factores clave en el desarrollo de osteoporosis secundaria en mujeres jóvenes (Utermohlen, 2000).

-Edad:

La edad puede influenciar la absorción de calcio. Las mujeres ancianas pueden tener una absorción de calcio defectuosa, debido a la falta de respuesta intestinal a la 1,25-dihidroxitamina D₃ (Pattanaungkul y col., 2000). Con la edad también decrece la cantidad de ácido producido en el estómago (una ligera aclorhidia) que incrementa el pH del estómago, debido a lo cual el calcio no puede disociarse completamente de las sales, provocando una disminución de la absorción. Según Weaver y Heaney (2001) la aclorhidia no debería suponer un problema si el calcio se ingiere con las comidas. Adicionalmente, los complejos de bajo peso molecular como el carbonato cálcico pueden ser absorbidos intactos a través de la ruta paracelular, incluso en personas con aclorhidia (Weaver y Heaney, 1999).

-Estilo de vida:

El estilo de vida puede afectar a la absorción de calcio. Need y col. (2002) demostraron en mujeres postmenopáusicas que fumar estaba asociado a una reducción de la eficacia de absorción de calcio, debido a la supresión del eje PTH-calcitriol. Hasta hace relativamente poco tiempo, se pensaba que el consumo de elevadas cantidades de alcohol durante largos periodos tenía un efecto adverso que afectaba a las hormonas reguladoras del calcio. Un estudio reciente (Wolf y col., 2000) determinó que incluso moderadas cantidades de alcohol en mujeres perimenopáusicas podrían tener un efecto negativo en la absorción de calcio.

2.4.4. DISTRIBUCIÓN Y CAPTACIÓN CELULAR

-Circulación sanguínea:

La concentración normal de calcio en sangre oscila entre 2.20 y 2.65 mmol/L. Alrededor del 40% del calcio en sangre está unido a albúmina, 10% unido a citrato, bicarbonato o fosfato y el 50% restante está en forma ionizada. La afinidad del calcio por la albúmina y otras proteínas disminuye conforme desciende el pH (acidosis).

La concentración intracelular (citosólica) de calcio libre es una mínima fracción (alrededor de 0.0001 mmol/L) de la concentración en el fluido extracelular y la sangre. Varias ATPasas transportadoras de calcio bombean calcio al exterior de la célula para mantener este elevado gradiente. Además, los endosomas, lisosomas y otros compartimentos intracelulares retiran calcio con alta especificidad, bajo una estrecha regulación.

-Barrera hematoencefálica:

La concentración de calcio es menor en el cerebro que en la sangre. La ATPasa transportadora de calcio en la luz del endotelio capilar cerebral mantiene este gradiente bombeando calcio a la sangre (Manoonkitiwongsa y col., 2000).

-Transferencia materno-fetal:

El enorme tamaño del feto en relación al estrecho canal del parto requiere cierta flexibilidad del cráneo. Este hecho podría explicar la razón por la cual la mineralización del esqueleto fetal es relativamente débil. Sin embargo, deben transferirse alrededor de 140 mg/día de calcio de la madre al feto durante el tercer trimestre y un total de 30 g de calcio durante toda la gestación. La información acerca de las rutas de transferencia de calcio a través de la placenta está aún incompleta. Parece claro que el calcio difunde desde la madre al sincitiotrofoblasto a través de canales de calcio por difusión pasiva, ya que la concentración de calcio en la sangre materna es mucho mayor que en el feto (Lafond y col., 2001).

2.4.5. DEPÓSITOS DE CALCIO EN EL ORGANISMO

El calcio es el mineral más abundante del cuerpo humano y es necesario en muchas reacciones fundamentales para el organismo. El calcio como ión es capaz de unirse a 12 moléculas de oxígeno, permitiéndole fácilmente unirse a proteínas. En el cuerpo humano, el 99% del calcio está en el esqueleto (Weaver, 2001). En el hueso está en forma de hidroxapatita [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$], permitiendo esta forma de calcio almacenado ser rápidamente liberado en caso de necesidad, cuando la ingesta es inadecuada.

El calcio no solo está localizado en el hueso, sino también distribuido en los líquidos intracelulares y extracelulares. Las concentraciones de calcio en sangre y fluido extracelular son mantenidas bajo estrecha regulación, a 2.5 mmol/L, con aproximadamente la mitad del calcio existente como una molécula cargada positivamente, o una forma ionizada (Ca^{2+}) en el plasma y en el resto unida o complejada con otras sustancias (Weaver, 2001). El calcio extracelular es la principal fuente de calcio para el desarrollo de los huesos. Intracelularmente, el calcio activa un amplio rango de respuestas fisiológicas, incluida la contracción muscular, liberación hormonal, liberación de neurotransmisor, metabolismo del glicógeno, visión y diferenciación celular (Weaver y Heaney, 1999).

2.4.6. ELIMINACIÓN

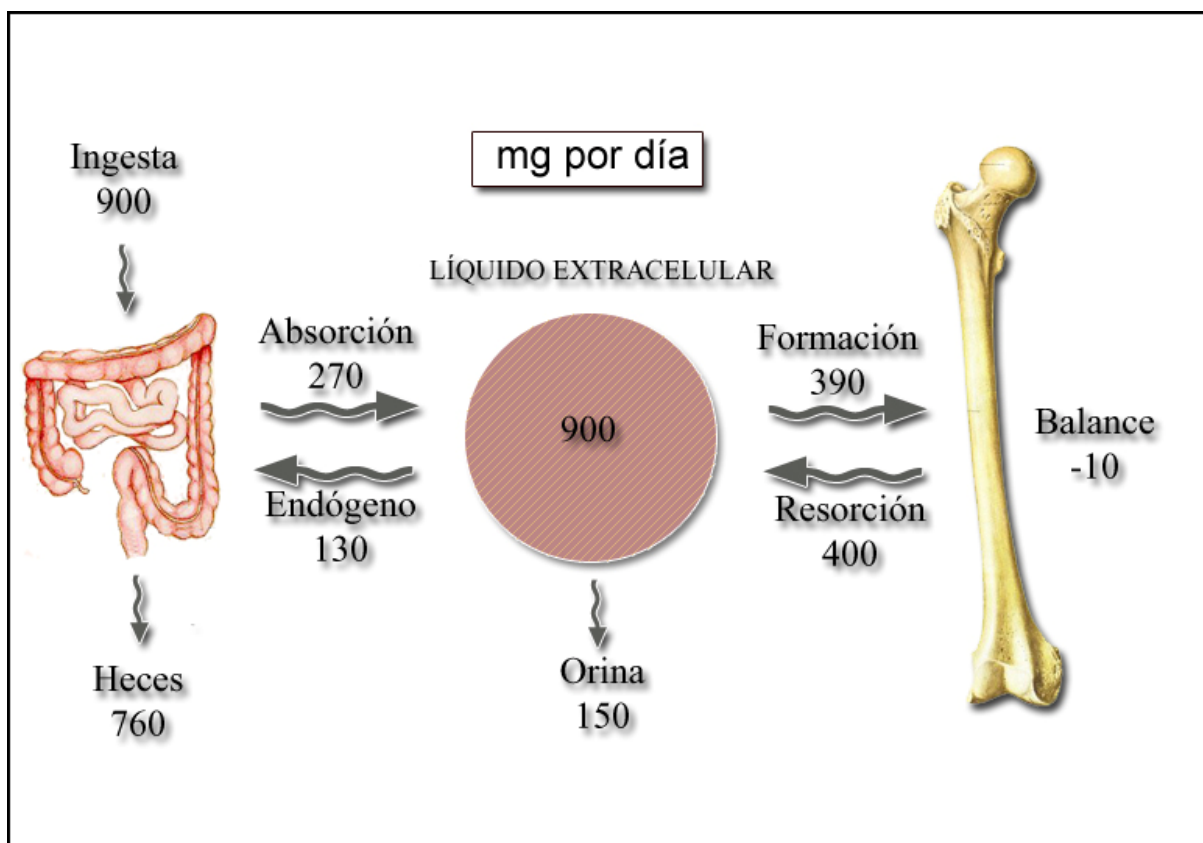
El exceso de calcio que no puede ser absorbido es excretado en las heces, orina y sudor. El balance de calcio en adultos es cero, de manera que el calcio absorbido es excretado por estas rutas, posiblemente después de haber sido incorporado y posteriormente liberado del hueso. Casi todo el calcio reabsorbido por el tracto intestinal proviene de secreciones como la bilis, y el calcio endógeno excretado en las heces es la fracción que no es reabsorbida.

Las pérdidas urinarias resultan de la filtración glomerular (unos 10g de calcio por día) y la reabsorción tubular, que recupera el 98% de la carga filtrada (Broadus, 1993). La reabsorción tubular es un proceso fuertemente regulado por la PTH. Las cantidades de calcio en la orina

humana son mucho mayores que en la orina de otros animales. Cambios en la cantidad de calcio excretado en orina pueden tener un gran impacto en el balance de calcio. Ciertos factores de la dieta pueden influenciar la reabsorción y deben ser evaluados cuidadosamente a la hora de evaluar la biodisponibilidad del mineral.

La FIGURA V muestra las principales rutas del calcio en humanos adultos. Los adultos pierden aproximadamente un 0.3% de su masa ósea al año. Esto significa que su balance de calcio es ligeramente negativo y pierden unos 10 mg de calcio cada año. Esta pérdida de masa ósea puede ser hasta 10 veces superior en mujeres postmenopáusicas.

FIGURA V. Rutas principales del calcio en adultos. (Guéguen y Pointillart, 2000):



El objetivo final de toda la regulación hormonal de la absorción, resorción ósea y reabsorción tubular del calcio es mantener la concentración plasmática de calcio constante, particularmente el 50% del mismo en forma iónica. La PTH y el calcitriol son las hormonas más

importantes implicadas en la homeostasis del calcio. Este complejo mecanismo de control también regula el calcio extracelular (unos 900 mg en el organismo humano). El fluido extracelular contiene unos 10^{-3} M de Ca^{2+} , mientras que la concentración en el citosol es más de 1000 veces menor.

-Factores de la dieta que afectan la excreción de calcio en orina:

Excepto la ingesta simultánea de fósforo, que puede ser confundido con el efecto de la comida (casi todos los alimentos son ricos en fósforo), y ciertos constituyentes que elevan el pH (bicarbonatos, sales de potasio), todos los demás factores de la dieta tienen un efecto a nivel renal que provocan un aumento de las pérdidas urinarias de calcio, generalmente por la reducción de la reabsorción tubular del mismo (Lemann, 1993).

El fósforo puede tener un efecto directo, incrementando la reabsorción de calcio en la parte distal de la nefrona, o un efecto indirecto, estimulando la secreción de PTH o favoreciendo el depósito de calcio en el hueso. La absorción simultánea de calcio y fósforo incrementa la captación de calcio por el hueso, por tanto, disminuye su excreción en orina.

Un exceso de proteína conduce generalmente a un incremento de la pérdida urinaria de calcio, que puede estar enmascarada por el efecto opuesto del exceso de fósforo (de componentes en la dieta ricos en proteína y fósforo). Este efecto es especialmente acusado en proteínas con alto contenido en aminoácidos con grupos sulfuro (cisteína, metionina), ya que la ruptura de estos grupos provoca la liberación de sulfato, causando una moderada acidosis e incrementando la eliminación de calcio en orina (Whiting y col., 1997). Los iones sulfato también se unen al calcio, impidiendo su reabsorción tubular e incluso su incorporación al hueso. Por tanto, no es de extrañar que un exceso de proteínas ricas en aminoácidos con grupo sulfuro u otras fuentes de sulfato (como ciertas aguas minerales), provoquen un aumento de las pérdidas urinarias de calcio que otros alimentos, tales como los típicos de dietas vegetarianas o con bicarbonatos, no suelen causar (Massey, 1998).

La acidosis crónica metabólica debido a excesiva ingesta de sulfato y aniones cloruro conduce a unas mayores pérdidas de calcio en orina. La alcalosis resultante de la ingestión de bicarbonato o citrato potásico tiene el efecto contrario (Massey, 1998).

2.4.7. REGULACIÓN HOMEOSTÁTICA DEL CALCIO

-Sensor de calcio:

Una red de hormonas y otros efectores regulan cuidadosamente la concentración de calcio en sangre. La proteína G asociada al receptor de calcio responde a las concentraciones extracelulares de calcio en varios puntos clave para la regulación (paratiroides, riñones, células epiteliales intestinales, células óseas, queratinocitos, otros tejidos) y promueve la liberación de varios mediadores y hormonas implicadas en la homeostasis del calcio (Brown y col., 2001). El efecto depende del tipo de célula donde esté localizado el receptor. La estimulación del receptor por una alta concentración iónica de calcio, provoca una disminución de la secreción de PTH por parte de las células de la glándula paratiroidea, aumenta la secreción de calcitonina por las células C del tiroides, promueve la reabsorción renal de calcio o regula los canales de cloruro intestinales (Shimizu y col., 2000).

-Hormona Paratiroidea (PTH):

Las glándulas paratiroideas están situadas a los lados de la glándula tiroides. Estas glándulas secretan PTH en una respuesta muy rápida (segundos) a la disminución de la concentración de calcio ionizado en sangre. La PTH promueve la movilización de calcio desde el hueso, la reabsorción renal de calcio, la síntesis de 1,25-dihidroxi-vitamina D y otras actividades que no están relacionadas directamente con la disposición de calcio. La proteína relacionada con la PTH (PTHrP) es un importante regulador de calcio producido por el feto, placenta y a bajo nivel por algunos tejidos no relacionados con el embarazo en adultos. Esta hormona peptídica también tiene influencia en el transporte de calcio a través de la placenta, desarrollo óseo y funciones como estimulador paracrino de la diferenciación y el crecimiento celular. Las células secretoras de PTH pueden adaptarse muy rápido a diferentes concentraciones extracelulares de calcio, cambiando la degradación intracelular de PTH cuando

está a punto de ser liberada. Si la síntesis de PTH es superior a la cantidad apropiada para la concentración de calcio circulante, un mayor porcentaje es secretado como fragmentos carboxi-terminales inactivos.

-Calcitonina:

Esta hormona peptídica reguladora del calcio es secretada en las células C de la glándula tiroides, células pituitarias y unas pocas células neuroendocrinas ampliamente dispersadas. La unión de la calcitonina a su receptor inhibe la acción de los osteoclastos, e indirectamente la liberación de calcio.

-Vitamina D:

El complejo de la 25-hidroxi-vitamina D y la vitamina D unida a proteínas, filtran en el riñón y son captadas del lumen tubular renal a través del receptor endocítico de la mesalina. La producción de 1,25 dihidroxi-vitamina D tiene lugar en las células epiteliales del túbulo renal, bajo la regulación de la PTH. Las acciones de la vitamina D como hormona incluyen la regulación de la expresión de calcio-ATPasa en el intestino delgado y en los túbulos renales distales.

2.4.8. CALCEMIA

El calcio total en el suero consiste en tres fracciones distintas:

- Calcio libre o ionizado: 50%.
- Complejos entre calcio y aniones como fosfato, citrato u otros aniones orgánicos: 10%.
- Calcio unido a proteínas, principalmente albúmina: 40%.

El Calcio ionizado (Ca^{2+}) se equilibra rápidamente con el calcio unido a proteínas en sangre. La concentración sérica de calcio ionizado es controlada principalmente por la PTH, aunque otras hormonas tienen papeles puntuales en su regulación. Entre esas otras hormonas se incluyen la calcitonina, vitamina D y estrógenos, entre otras. El nivel de calcio sérico total es

mantenido en un estricto límite de 8.8 a 10.8 mg/dL, siendo el rango del calcio sérico ionizado de 4.4 a 5.2 mg/dL.

El calcio en los huesos está en equilibrio con el calcio en sangre. La PTH desempeña el papel más importante en el mantenimiento de la concentración normal, mientras que el papel fisiológico de la calcitonina, aún no está bien definido. Cuando la concentración de calcio en sangre decae por debajo del nivel fisiológico, la PTH estimula la transferencia de calcio a la sangre. Al mismo tiempo, la PTH promueve la reabsorción tubular de calcio y estimula indirectamente la absorción intestinal de calcio, a través de la forma hormonal de la vitamina D (1,25[OH]₂D₃). La vitamina D no solo aumenta la absorción de calcio en el intestino delgado, sino también en el colon (Alfárez y col., 1996).

López-Aliaga y col. (1989) encontraron que el suplemento de vitamina D₃ en la dieta (0,4 mg/kg de dieta) mantiene la calcemia a niveles fisiológicos en las ratas sometidas a resección intestinal (11,7 mg Ca/100 mL de suero).

Otras hormonas como los glucocorticoides, hormonas tiroideas, y hormonas sexuales desempeñan un papel también importante en la homeostasis del calcio. Los glucocorticoides pueden impedir la absorción de calcio a través de mecanismos activos y pasivos. Un exceso de glucocorticoides conduce a una pérdida de masa ósea, una condición muy común entre pacientes que reciben terapia crónica con glucocorticoides. Las hormonas tiroideas pueden estimular la resorción ósea. En las mujeres, un balance óseo normal requiere concentraciones de estrógenos séricos normales. La resorción ósea también puede ser inhibida por la testosterona.

2.5. EL FÓSFORO EN LA NUTRICIÓN

2.5.1. INTRODUCCIÓN

El fosfato inorgánico (Pi) es fundamental para el correcto funcionamiento celular y la mineralización ósea. El Pi es suficientemente abundante en una dieta normal y es poco probable

desarrollar una deficiencia, excepto bajo condiciones de extrema inanición o como consecuencia de la administración de ciertos agentes terapéuticos que captan el Pi. La ingesta normal de fósforo del humano adulto es de 800 a 1600 mg/día. Aproximadamente del 65 al 75% del Pi ingerido es absorbido en el intestino delgado, independientemente del nivel de ingesta y la regulación hormonal de este proceso desempeña un papel secundario en la homeostasis del Pi. El Pi absorbido es eliminado o reabsorbido en el riñón, incorporado en formas orgánicas en células proliferativas y depositado como componente mineral del hueso (hidroxiapatita). La deposición mineral se relaciona con un mayor porcentaje de Pi retenido durante el periodo de crecimiento. Sin embargo, incluso en un organismo en crecimiento, sólo un pequeño porcentaje del fósforo procedente de la dieta es retenido. La mayoría del fósforo absorbido es excretado por vía urinaria. Esto significa que la homeostasis y la concentración plasmática del Pi dependen principalmente de los mecanismos renales que regulan su transporte tubular. El Pi representa alrededor del 1% del peso corporal. Aproximadamente el 85% el Pi está en los huesos y dientes, el 15% en tejidos blandos y el resto (<1%) en los fluidos extracelulares. El Pi existe en el plasma en dos formas: una forma orgánica que consiste principalmente en fosfolípidos y ésteres de fosfato y una forma inorgánica. Aproximadamente el 29% del total de la concentración plasmática de Pi está en forma inorgánica y sólo esta forma es determinada en los análisis clínicos de rutina. De esta fracción, entre un 10 y un 15% está unido a proteínas y el resto, que es filtrado fácilmente por el glomérulo renal, existe como iones libres de Pi o como iones complejados con Na^+ , Ca^{2+} o Mg^{2+} .

En la medida del Pi plasmático, hay que tener en cuenta que existe una variación diurna con un mínimo entre las 9:30-10:00 h y un máximo a las 4:00 h. Esta variación en la concentración plasmática puede ser de hasta 1 mg/dL, lo que representa del 25 al 35% de la concentración plasmática. La concentración de Pi también varía en función de la edad, encontrándose los mayores niveles durante los tres primeros meses de vida. Las ratas tienen un valor normal de Pi algo superior a los humanos, debido a las diferencias en el metabolismo basal, que es superior en los roedores (Tenenhouse, 2005).

2.5.2. FUENTES ALIMENTARIAS DE FÓSFORO

Es importante reconocer que los alimentos poseen tres tipos muy diferentes de compuestos de fosfato. Los primeros dos tipos, sales inorgánicas de fosfato y organofosfatos incluyendo los fosfolípidos, son fácilmente absorbidos y tienen un profundo impacto en el metabolismo humano. En contraposición a este hecho, los inositoles polifosfato son difícilmente absorbidos, no comparten ninguna de las características de las sales de fosfato o de otros organofosfatos y tienen propiedades características. Las tablas alimentarias actuales y otras fuentes de composición de alimentos proporcionan solo un valor único para el fosfato total y pierden por completo su utilidad en el caso de legumbres, frutas y verduras. Muchos de estos alimentos tienen una biodisponibilidad relativamente baja de fosfato, sin embargo esta información está disponible en las tablas de composición de alimentos más usadas (ADA, 1998).

La leche (1.0 mg/g) y los derivados lácteos son las fuentes principales de fosfato. Fuentes particularmente ricas en este nutriente son el queso cheddar (5.1 mg/g) y el queso suizo (6.1 mg/g). En otros tipos de quesos más suaves existen cantidades menores, pero también significativas. Una medida importante es la relación entre fosfato biodisponible y proteína, que alcanza valores elevados en la leche (29.6), queso curado (20), huevo (14.3) y valores más bajos en el cerdo (11.4), ternera (9.5), pollo (6.7) y pescado (6.1). Esta relación puede ser una valiosa herramienta para personas que necesitan minimizar la ingesta de fosfato, pero manteniendo un adecuado aporte proteico (Calvo y Park, 1996).

El contenido en fosfato de alimentos derivados de vegetales es mucho más difícil de establecer, puesto que una gran cantidad de este nutriente está unido a inositol como fitato (inositol hexafosfato, pentafosfato o tetrafosfato). Este hecho debe ser tenido en cuenta, especialmente en grupos con dietas presumiblemente saludables (ricas en cereales, legumbres, frutas y verduras), en los cuales no es relevante la medida de la ingesta total de fósforo (Calvo y Park, 1996).

Las sociedades industrializadas continúan incrementando el consumo de alimentos que contienen aditivos ricos en fosfato y la ingesta media proveniente exclusivamente de esta fuente puede llegar a proporcionar 500 mg/día. La ingesta total diaria de fosfato en varones jóvenes tiende a ser alrededor de 1500 mg, mientras que la de mujeres jóvenes ronda los 1000 mg. Las ingestas varían mucho entre individuos y tienden a descender cuando se llega a la edad media (Calvo y Park, 1996).

TABLA V. Contenido en fósforo de algunos alimentos (modificado de Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, 2004):

<i>ALIMENTO</i>	<i>PORCIÓN</i>	<i>FÓSFORO (mg)</i>
<i>Yogur desnatado</i>	240 g	383
<i>Lentejas</i>	½ taza, cocinadas	356
<i>Salmón</i>	90 g, cocinado	252
<i>Leche desnatada</i>	240 g	247
<i>Ternera</i>	90 g, cocinada	173
<i>Pavo</i>	90 g, cocinada	155
<i>Almendras</i>	30 g	139
<i>Queso mozzarella</i>	30 g	131
<i>Huevo</i>	1, cocinado	104
<i>Pan integral</i>	1 rebanada	64
<i>Bebida carbonatada de cola</i>	360 g	44

2.5.3. INTERACCIÓN CON OTROS NUTRIENTES

-Fructosa:

Un estudio reciente en 11 hombres adultos concluyó que una dieta rica en fructosa (20% del total de calorías) provocaba un incremento de las pérdidas urinarias de fósforo y un balance negativo (las pérdidas superaban la ingesta diaria). Este efecto era más pronunciado si la dieta también era deficiente en magnesio. Un mecanismo potencial para este efecto es la falta de

inhibición por retroalimentación negativa de la conversión de fructosa en fructosa-1-fosfato en el hígado. En otras palabras, la acumulación incrementada de fructosa-1-fosfato en la célula no inhibe la enzima que fosforila la fructosa, consumiendo grandes cantidades de fosfato. Este fenómeno es conocido como “captura de fosfato”. Este hallazgo es relevante porque el consumo de fructosa en los países industrializados se ha incrementado mucho en los últimos años, debido al elevado consumo de alimentos bajos en calorías que contienen este hidrato de carbono (Milne y Nielsen, 2000).

-Calcio y Vitamina D:

El fósforo de la dieta es rápidamente absorbido en el intestino delgado y el exceso de fósforo absorbido es excretado por vía renal. La regulación de los niveles plasmáticos de calcio y fósforo está vinculada a las acciones de la hormona paratiroidea (PTH) y la vitamina D. Un leve descenso en los niveles de calcio sanguíneo (por ejemplo cuando hay una ingesta inadecuada), estimula las glándulas paratiroideas aumentando por tanto la secreción de PTH. La PTH estimula la conversión de Vitamina D a su forma activa (calcitriol) en los riñones. Los niveles aumentados de calcitriol conducen a un aumento de la absorción intestinal de calcio y fósforo. La PTH y la vitamina D estimulan la resorción ósea, provocando la liberación de calcio y fósforo del hueso hacia la sangre. Aunque la estimulación de la producción de PTH produce una disminución de las pérdidas urinarias de calcio, también produce un aumento de la excreción urinaria de fósforo. Este incremento en las pérdidas renales de fósforo es una ventaja para elevar los niveles de calcio hacia el rango fisiológico, porque los altos niveles sanguíneos de fosfato inhiben la conversión de vitamina D en los riñones (Bringhurst y col., 1998).

2.5.4. FUNCIONES DEL FÓSFORO

El fósforo es uno de los principales constituyentes del hueso en forma de sales de fosfato cálcico denominado hidroxapatita. Los fosfolípidos son los principales constituyentes de las membranas celulares. Toda la producción y almacenamiento de la energía es dependiente de compuestos fosforilados como el adenosín trifosfato (ATP) y creatin-fosfato (CP). Los ácidos nucleicos, responsables del almacenaje y transmisión de la información genética son largas

cadena de moléculas que contiene grupos fosfato. Un número elevado de enzimas, hormonas y mensajeros celulares, dependen de la fosforilación para su activación. El fósforo también ayuda a mantener un balance ácido-base adecuado (pH), siendo uno de los tampones más importantes del organismo. El 2,3-difosfoglicerato se une a la hemoglobina en las células rojas sanguíneas y afecta a la liberación de oxígeno en los distintos tejidos (Knochel, 1999).

-Ésteres de fosfato ricos en energía:

Muchas de las reacciones de transferencia de energía química en el organismo implican la intervención de ésteres de fosfato. Esto es especialmente cierto para el ATP, que es la principal “moneda energética” de gran parte de reacciones metabólicas, pero también se puede aplicar a más formas especializadas como el GTP, creatinin-fosfato y arginin-fosfato. Estos y otros nucleótidos adicionales son también las bases para la síntesis del DNA y RNA. Varios nucleótidos como el cAMP también son fundamentales, debido a la función que desempeñan como mensajeros celulares (Kohlmeier, 2003).

-Organofosfatos:

Un largo espectro de compuestos sintetizados endógenamente, además de los ya mencionados anteriormente, contienen uno o más grupos fosfato formando parte de su estructura. Son necesarias grandes cantidades de varios tipos de fosfolípidos para la formación de membranas celulares, vainas de mielina neuronales, transporte de lípidos con lipoproteínas y facilitar la absorción de lípidos a nivel intestinal, entre otras funciones (Kohlmeier, 2003).

-Activación de ésteres de fosfato:

El metabolismo de muchos nutrientes transcurre a través de la vía ésteres de fosfato en algún punto, para proporcionar la reacción energética necesaria. En este grupo se incluyen los fosfatos de glucosa, fructosa, galactosa y glicerol entre otros. La lista de vitaminas que son activas sólo como ésteres de fosfato incluye: tiamina, riboflavina, piridoxina, niacina y pantotenato. La fosforilación también puede servir para prevenir la salida de dichos nutrientes de la célula y favorecer la absorción por difusión pasiva. Un ejemplo típico de este hecho es la absorción intestinal de vitamina B₆. La vitamina B₆ libre difunde a través del borde en cepillo

del enterocito, participando unos transportadores aún desconocidos y es inmediatamente fosforilada por la piridoxal-quinasa. Puesto que la forma fosforilada no puede retornar y la concentración intracelular de formas libres es muy baja, la difusión hacia el enterocito continúa mientras existan cantidades significativas en el lumen intestinal (Kohlmeier, 2003).

-Fosforilación de proteínas:

La actividad de muchas proteínas es regulada a través de la fosforilación y defosforilación. El efecto de un grupo fosfato añadido depende de la proteína en particular. Por ejemplo, la fosforilación inactiva la glicógeno-sintasa y la defosforilación reactiva el enzima (Kohlmeier, 2003).

-Capacidad tampón:

Las soluciones acuosas a pH fisiológico (alrededor de 7.4) contienen aproximadamente cuatro quintos del fosfato inorgánico como ión hidrogenofosfato (HPO_4^{2-}) y casi un quinto como ión dihidrogenofosfato (H_2PO_4^-). Esto significa que la cantidad significativa de fosfato inorgánico en las células, fluido extracelular y sangre actúa como un buffer efectivo, que estabiliza y amortigua los cambios de pH (Kohlmeier, 2003).

-Polifosfatos:

Algunos tipos de osteoblastos contienen cantidades significativas de polifosfatos (Leyhausen y col., 1998). Estos polifosfatos pueden contener miles de grupos fosfato unidos a la cadena. La función de estas estructuras no es bien conocida. Se sugiere que podrían actuar almacenando fosfato, inhibiendo la mineralización ósea, quelando iones dibásicos y aminoácidos básicos, en la apoptosis, regulando el pH o protegiendo contra el estrés osmótico, por ejemplo. Las exopolifosfatasas y en algunos casos las pirofosfatasas liberan iones fosfato de las cadenas de polifosfato (Kohlmeier, 2003).

2.6. UTILIZACIÓN NUTRITIVA DE FÓSFORO

2.6.1. REQUERIMIENTOS

El fósforo se encuentra ampliamente distribuido en los alimentos, especialmente en los que son fuente de proteínas de origen animal (carnes, pescados, huevos, lácteos), en legumbres y frutos secos. Por ello, su deficiencia dietética es prácticamente desconocida. Además, se añaden aditivos ricos en fosfatos a muchos alimentos procesados. Las dietas con una adecuada cantidad de energía y proteína, aportan también cantidades suficientes de fósforo (Calvo y Park, 1996).

Las ingestas diarias recomendadas para el fósforo están basadas en el mantenimiento de un nivel normal de fosfato en el adulto, el cual cubre las necesidades celulares y la formación ósea. La ingesta media de fósforo de un adulto en países industrializados es de 1300 mg/día para el hombre y 1000 mg/día para la mujer. La mayoría del fósforo (alrededor del 60%) proviene de la leche, carne, aves, pescado y huevos. Los cereales y las legumbres proporcionan otro 20% y menos del 10% proviene de frutas y zumos. Otras fuentes son té, café y aceites vegetales. La cantidad estimada que proporcionan los aditivos alimentarios es 10% (Calvo y Park, 1996).

TABLA VI. Ingestas diarias recomendadas (RDA) de fósforo (modificado de Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, 2004):

Etapas de la Vida	Edad	Hombres (mg/día)	Mujeres (mg/día)
Lactantes	0-6 meses	100	100
Lactantes	7-12 meses	275	275
Niños	1-3 años	460	460
Niños	4-8 años	500	500
Niños	9-13 años	1250	1250
Adolescentes	14-18 años	1250	1250
Adultos	19-30 años	700	700
Adultos	31-50 años	700	700
Adultos	51-70 años	700	700
Adultos	Más de 70 años	700	700
Embarazo	Menos de 18 años	-	1250
Embarazo	19-30 años	-	700
Embarazo	31-50 años	-	700
Lactancia	Menos de 18 años	-	1250
Lactancia	19-30 años	-	700
Lactancia	Más de 30 años	-	700

Los requerimientos de P para la rata son 3000 mg/Kg de dieta, tanto en fase adulta como de crecimiento (Reeves y col., 1993).

2.6.2. ABSORCIÓN

Existen varias formas de fosfatos en la dieta, incluyendo sales de fosfato, nucleótidos y fosfolípidos que son absorbidos con una alta eficiencia (60-70%) en el intestino delgado. Muchas moléculas de organofosfatos son escindidas como paso previo a la absorción del ión fosfato. La fosfatasa alcalina del borde en cepillo de la membrana del enterocito, por ejemplo,

escinde la creatina-fosfato. Tanto la fosfatasa inorgánica como la fosfatasa alcalina pueden hidrolizar el pirofosfato.

Los cotransportadores de Na/Pi tipo I y IIb movilizan el Pi y tres iones Na^+ a través del borde en cepillo (Murer y col., 2001). El transporte debido al transportador tipo I es constante, mientras que la expresión y el transporte del transportador tipo IIb depende de la ingesta de fosfato y la cantidad de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. También existe la posibilidad de que un transportador adicional Na^+ -independiente opere en la membrana del borde en cepillo.

Se cree que los cotransportadores de sodio tipo III proporcionan un flujo de Pi desde la membrana basolateral para cubrir las propias necesidades del enterocito (Tenenhouse y col., 1998). En relación a los fosfolípidos consumidos con los alimentos, es un hecho conocido que grandes cantidades son secretadas con la bilis y forman micelas con los ácidos biliares, ácidos grasos, colesterol y otro tipo de lípidos. Los fosfolípidos son hidrolizados por la fosfolipasa A2 del páncreas y la molécula resultante (lisolecitina) es captada desde la micela a través del borde en cepillo de la membrana enterocítica.

En el hígado, una proteína específica transportadora de ácidos grasos (L-FABP) colabora para movilizar los lisofosfolípidos a los compartimentos intracelulares. Un ácido graso se une a múltiples lisofosfolípidos y el fosfolípido es exportado con los quilomicrones. Alternativamente, la lisofosfolipasa puede hidrolizar la lisofosfatidilcolina a 3-fosforilcolina, que es exportada y llega al hígado a través de la circulación portal (Murer y col., 2001).

2.6.3. DISTRIBUCIÓN Y CAPTACIÓN CELULAR

-Circulación sanguínea:

La mayoría del fosfato circulante está contenido en los fosfolípidos de las lipoproteínas y las membranas de las células sanguíneas. Una menor cantidad circula como ión inorgánico (Pi). La concentración plasmática de fosfato inorgánico es de alrededor de 1 mmol/L si la ingesta es adecuada. El fosfato entra en las células a través del cotransportador de Na^+ , principalmente a través de los ubicuos cotransportadores de Na^+ tipo III. Una pequeña diferencia se observa a

nivel óseo, donde el cotransportador de Na^+/Pi tipo III bombea fosfato a la matriz extracelular durante la mineralización ósea en las primeras etapas de la vida. El cotransportador de Na^+/Pi tipo III también desempeña un papel importante en la calcificación vascular y de tejidos blandos, que se produce en respuesta a la hiperfosfatemia (Giachelli y col., 2001).

La mayoría del ATP es usado fuera de la mitocondria (por ejemplo proporciona la energía para bombear iones), pero necesita ser reconstituido de nuevo por la fosforilación oxidativa mitocondrial. El transportador de fosfato mitocondrial y los translocadores de adenina son los precursores para la síntesis de ATP en la mitocondria (Giachelli y col., 2001).

-Barrera hematoencefálica:

El transporte de fosfato a través de la barrera hematoencefálica no es un hecho bien conocido. Es probable que la mayor parte de la transferencia se realice a través de un transporte tipo antiporte que intercambia fosfato por bicarbonato (Lajeunesse y Brunnete, 1988).

-Transferencia materno-fetal:

El fosfato, que tiene que ser suministrado en grandes cantidades al feto para el crecimiento de sus tejidos y mineralización ósea cruza la placenta a través de un cotransportador de Na^+ (Lajeunesse y Brunnete, 1988).

2.6.4. DEPÓSITOS DE FÓSFORO EN EL ORGANISMO

El organismo humano adulto contiene entre 0.6 y 1.1% de fósforo (Arunabh y col., 2002), del cual, el 85% se encuentra en el hueso. Los osteoblastos depositan fosfato en la matriz ósea en forma de cristales de hidroxiapatita. Los cotransportadores Na/Pi tipo III están implicados en la movilización de fosfato a los sitios diana de mineralización extracelulares (Palmer y col., 1999). La liberación de iones fosfato de la fosfoetanolamina y otros ésteres de fosfato por una forma de fosfatasa alcalina tisular no específica (localizada en hígado, riñón y tejido óseo), es un evento muy importante en la mineralización ósea, aunque el mecanismo por el cual se produce no está aún bien dilucidado.

Los osteoclastos disuelven los minerales del hueso creando un microambiente ácido. La ATPasa vacuolar bombea protones generados por la anhidrasa carbónica II a un espacio restringido entre la superficie ósea y el borde sellado por las fibras de actina. Una serie de enzimas hidrolíticas, entre las cuales se encuentran fosfatasa ácida tartrato-resistente, proteasas y metaloproteasas, digieren el colágeno y otros elementos de la matriz ósea. Como resultado, los elementos minerales del hueso, incluyendo el fosfato, se liberan y pueden difundir por los capilares sanguíneos cercanos (Palmer y col., 1999).

2.6.5. ELIMINACIÓN

La mayoría del fosfato se excreta con la orina, pequeñas cantidades se pierden por las heces (descamación de la mucosa intestinal) y la piel. Una filtración glomerular disminuida debido a un fallo renal causa retención de fosfato, por la incapacidad de eliminar el exceso.

De los 16 g de fosfato que aproximadamente se filtran por el riñón cada día, la mayoría es reabsorbido. Las pérdidas renales dependen de la cantidad filtrada y de los niveles séricos de Pi. El umbral máximo para el fosfato es una medida de la cantidad máxima de fosfato que puede ser reabsorbida. Todo el fosfato filtrado que sobrepase este umbral es excretado en la orina (Murer y col., 2001).

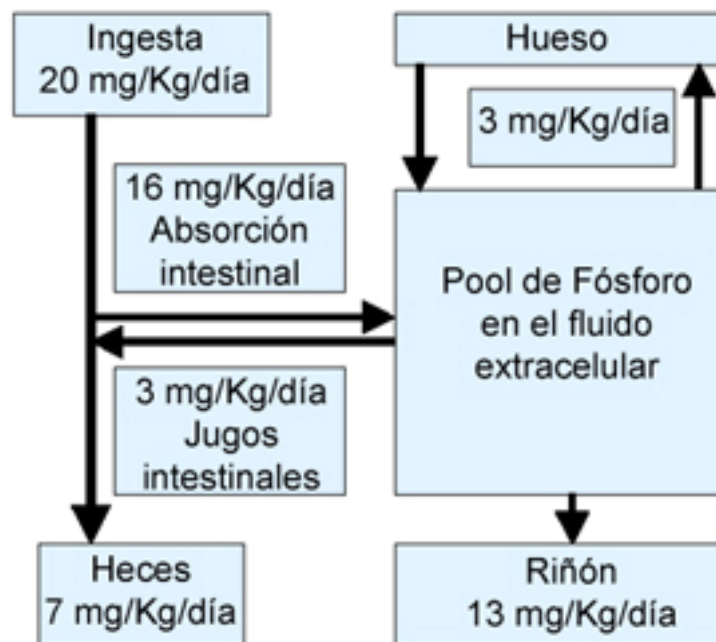
El cotransportador Na/Pi tipo IIa en las células del túbulo proximal renal es el principal responsable de la reabsorción del fosfato. Cantidades mucho menores de fosfato son recuperadas gracias al cotransportador Na/Pi tipo I en el túbulo distal (Murer y col., 2001).

2.6.6. REGULACIÓN HOMEOSTÁTICA DEL BALANCE DE FÓSFORO

El control de las concentraciones de fósforo a través de la absorción intestinal y la conservación renal es crítico para varios procesos biológicos, que incluyen el metabolismo mineral, desarrollo óseo, transferencia de energía, señales celulares y regulación de la función proteica.

La concentración circulante de fosfato depende de la ingesta de Pi procedente de la dieta, la absorción intestinal, la filtración y reabsorción renal y del intercambio intracelular y reservorio óseo (Murer y col., 2001).

FIGURA VI. Metabolismo del fósforo en humanos (Schiavi y Kumar, 2004):

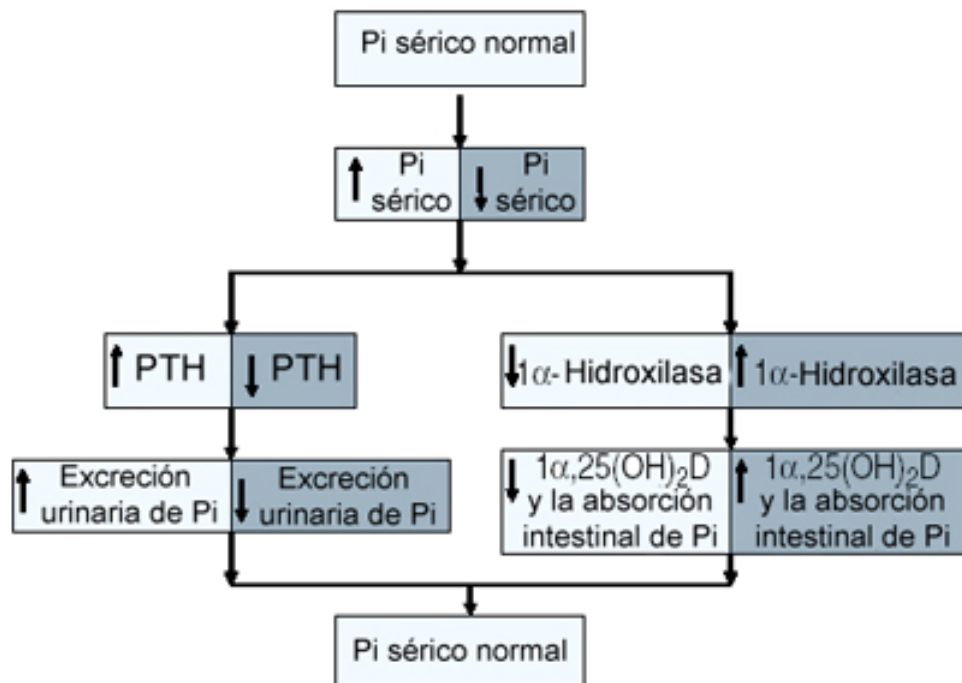


Un adulto normal ingiere aproximadamente entre 1.5 y 2.0 g de Pi por día (20 mg/Kg/día). De esta cantidad, entre 1.0 y 1.2 g (16 mg/Kg/día) es absorbido en el intestino proximal y unos 200 mg (3 mg/Kg/día) son secretados al lumen intestinal, resultando una absorción neta de aproximadamente 1.0 g (13 mg/Kg/día). El fósforo absorbido pasa al fluido

extracelular y varía según las necesidades del hueso (3 mg/Kg/día). Aproximadamente 1.0 g se excreta por los riñones, de manera que las cantidades absorbidas y eliminadas son equivalentes. Por tanto, bajo condiciones fisiológicas, la función intestinal y renal actúan manteniendo una homeostasis normal de fósforo y unas concentraciones plasmáticas normales de Pi (entre 2.5 y 4.5 mg/dL).

Las principales hormonas que regulan el metabolismo del fósforo son la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y la PTH (Murer y col., 2001). La PTH inhibe la reabsorción renal de fosfato y de manera indirecta incrementa la absorción intestinal de fósforo, estimulando la síntesis de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. El fósforo tiene un efecto estimulador directo en la secreción de PTH y parece ser que un nivel elevado de Pi en suero es un factor importante que contribuye al hiperparatiroidismo asociado con largos periodos de enfermedad renal crónica (FIGURA VII).

FIGURA VII. Influencia del fosfato en la síntesis y actividad de la PTH y la vitamina D (Schiavi y Kumar, 2004):



La 1,25(OH)₂D₃ incrementa la absorción intestinal y la reabsorción renal de Pi (Kumar, 2002). La generación de la forma activa de la vitamina D₃, 1,25(OH)₂D₃ es regulada por el Pi de la dieta, concentraciones séricas de Pi y la PTH. El Pi extracelular regula la actividad y síntesis de la 25(OH)D₃ 1 α -hidroxilasa, de manera que bajas concentraciones de Pi incrementan su síntesis y actividad y altas concentraciones de Pi producen el efecto contrario en la 25(OH)D₃ 1 α -hidroxilasa.

TABLA VII. La regulación de la homeostasis del fosfato en el riñón ocurre principalmente en el túbulo proximal y es controlada por varios factores que pueden incrementar o disminuir la reabsorción de Pi (Murer y col., 2001):

<i>Factores que disminuyen la reabsorción de Pi</i>	<i>Factores que aumentan la reabsorción de Pi</i>
Sobrecarga de Pi	Depleción de Pi
Hormona paratiroidea/cAMP	Extirpación del paratiroides
Expansión del volumen	Contracción del volumen
Hipercalcemia	Hipocacemia
Inhibidores de la anhidrasa carbónica	1,25(OH) ₂ D ₃
Glucosa y Alanina	Hormona del crecimiento (GH)
Desequilibrios ácido-base	
Incrementos de bicarbonato	
Hipercapnia	
Inhibidores metabólicos	

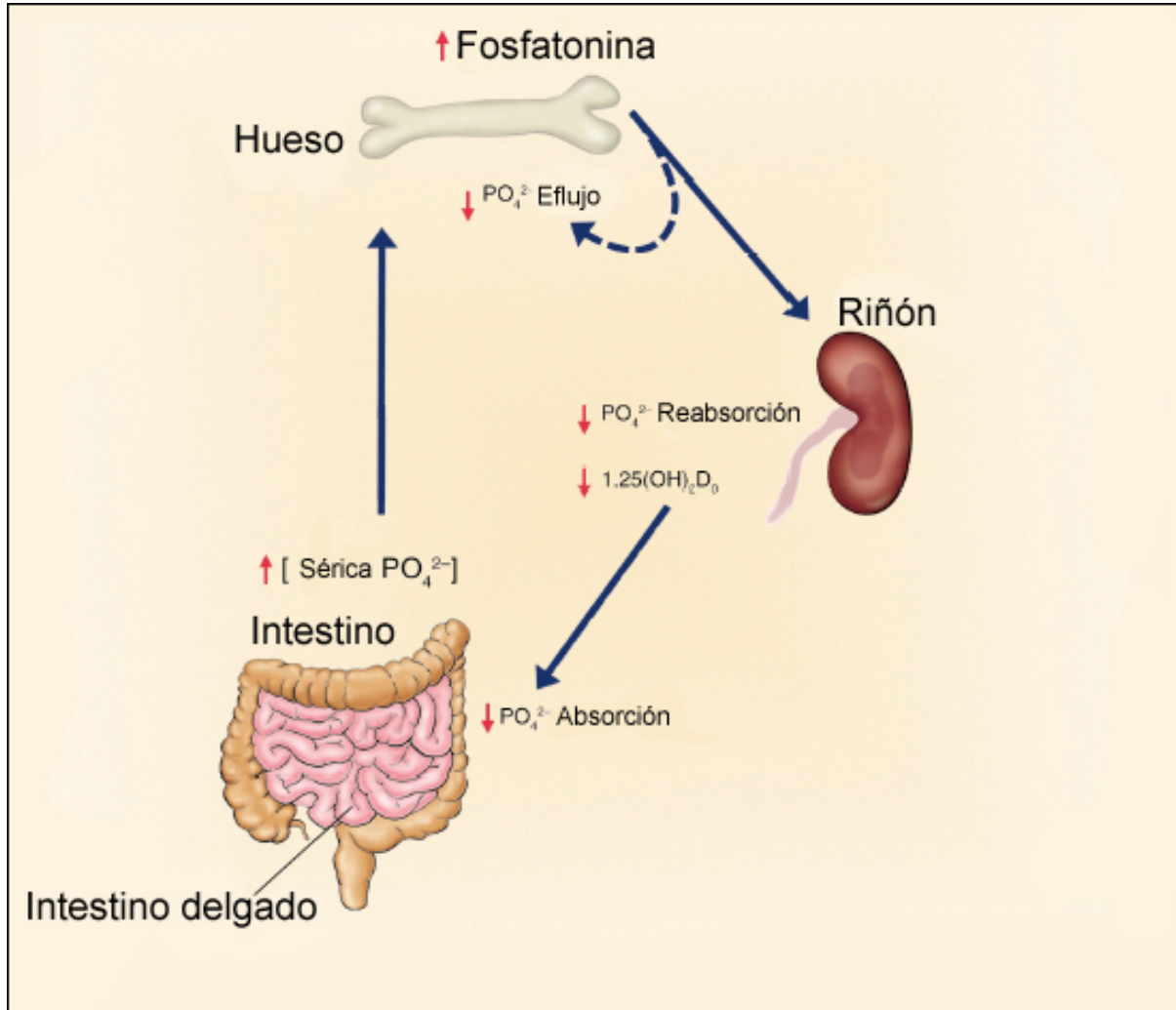
El fósforo inorgánico plasmático filtra libremente en el glomérulo. Aproximadamente el 80% del fosfato filtrado es reabsorbido junto con el sodio a través de cotransportadores específicos Na-Pi IIa, localizados en el túbulo proximal.

La regulación de la reabsorción de fosfato en el riñón es llevada a cabo controlando el número de cotransportadores Na-Pi IIa, presentes en la superficie del borde en cepillo de las membranas proximales de los enterocitos. Estudios actuales evidencian que un descenso agudo de Pi presente en la dieta, conduce a un reclutamiento de cotransportadores Na-Pi IIa de un pool intracelular (Levi y col., 1996), mientras que cambios crónicos en el Pi ingerido regulan los cotransportadores Na-Pi IIa a través de mecanismos de transcripción (Miyamoto e Itho, 2001). La administración crónica de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y PTH también modula la expresión génica de Na-Pi IIa (Friedlander y col., 2001). Una elevación de los niveles de PTH reduce rápidamente el número de transportadores Na-Pi IIa, retirándolos de la superficie celular y degradando los lisosomas resultantes (Hernando y col., 2001).

La absorción intestinal de fosfato ocurre a través de dos mecanismos: transporte pasivo no regulado y mecanismos de transporte activo regulados. El cotransportador Na-Pi IIb, localizado principalmente en el yeyuno, actúa como mediador en el transporte activo intestinal de fosfato y parece que está regulado a nivel transcripcional por la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Hernando y col., 2000). Sin embargo, este hecho no conlleva la retirada de cotransportadores en respuesta a la PTH. Los mecanismos que controlan la liberación de calcio y fosfato de los pools intracelular y óseo no están todavía bien dilucidados.

Además de estos mecanismos bien conocidos, en la actualidad existe una clase nueva de proteínas reguladoras de fosfato, que son las denominadas “fosfatoinas” (Jan de Beur y Levine, 2002). La fosfatoina desempeña un papel importante, modulando la reabsorción renal de fósforo y la producción de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

FIGURA VIII. Regulación de la reabsorción renal de fósforo y la mineralización ósea a través de la fosfatonina (Quarles, 2003).



La fosfatonina (una hormona fosfatúrica) estimula la excreción renal de fosfato. Se cree que los osteoblastos son las células encargadas de producir la fosfatonina. Un incremento en la liberación de fosfatonina conduce a un efecto autocrino para regular la mineralización ósea y una serie de efectos sistémicos que producen fosfaturia.

2.7. EL MAGNESIO EN LA NUTRICIÓN

2.7.1. INTRODUCCIÓN

El magnesio es un mineral esencial en los humanos, con múltiples funciones bioquímicas y fisiológicas como la activación de enzimas, implicación en múltiples rutas metabólicas, regulación de los canales de membrana y contracción muscular (Schweigel y Martens, 2000).

El magnesio está almacenado principalmente en el hueso y los compartimentos intracelulares de los tejidos blandos. Menos del 1% del magnesio total del organismo está circulando en sangre. En sujetos normales, los niveles séricos se mantienen en un rango estrecho de concentración (0.7-1.1 mmol/L). La homeostasis del magnesio depende del balance entre la absorción intestinal y la excreción renal (Kerstan y Quamme, 2002).

2.7.2. FUENTES ALIMENTARIAS DE MAGNESIO

Puesto que el magnesio es parte de la clorofila (el pigmento verde de las plantas), los vegetales con hojas verdes son ricos en dicho elemento. Los granos sin refinar (integrales) y los frutos secos también tienen un elevado contenido de magnesio. La carne, la leche y los derivados lácteos tienen un contenido intermedio y los alimentos refinados tienen un contenido muy bajo. El agua potable es una fuente variable de este elemento. Las “aguas duras” (con elevado contenido de calcio) usualmente tienen una concentración más elevada de magnesio que las “blandas” (Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, 2004).

TABLA VIII. Contenido en magnesio de algunos alimentos (modificado de Sabatier y col., 2002; Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, 2004):

<i>ALIMENTO</i>	<i>PORCIÓN</i>	<i>MAGNESIO (mg)</i>
<i>Cereales ricos en fibra</i>	½ taza	129
<i>Arroz integral</i>	1 taza, cocinado	84
<i>Almendras</i>	30 g	82
<i>Espinacas</i>	½ taza, cocinadas	78
<i>Cacahuetes</i>	30 g	50
<i>Avellanas</i>	30 g	49
<i>Banana</i>	1, mediana	34
<i>Leche</i>	250 mL	34

2.7.3. INTERACCIÓN CON OTROS NUTRIENTES

-Cinc:

Dosis elevadas de cinc en forma de suplementos, parecen interferir con la absorción de magnesio. Un suplemento de cinc de 142 mg/día en hombres adultos sanos disminuye la absorción y balance de magnesio de forma significativa (Spencer y col., 1994).

-Fibra:

Incrementos elevados en la ingesta de fibra, disminuyen la utilización nutritiva de magnesio, como queda demostrado en numerosos estudios experimentales. Sin embargo, no es un hecho claro la magnitud en la cual la fibra de la dieta afecta al status nutricional del magnesio en individuos con una dieta variada (Shils, 1999).

-Proteína:

La cantidad de proteína en la dieta puede afectar a la absorción de magnesio. Un estudio reveló que la absorción fue menor cuando la ingesta proteica era inferior a 30 g/día. Ingestas

proteicas más elevadas (93 g/día) se asociaron con una mejor absorción de magnesio en adolescentes (Shils, 1999).

-Vitamina D y calcio:

La forma activa de la vitamina D (calcitriol) puede incrementar ligeramente la absorción de magnesio en duodeno, yeyuno y colon proximal (Lisbona y col., 1994). Sin embargo, la absorción de este elemento parece que no depende del calcitriol como en el caso del calcio y el fosfato. Elevadas ingestas de calcio no afectan a la utilización nutritiva de magnesio, como revelan varios estudios de balance. Unos niveles plasmáticos inadecuados de magnesio se traducen en bajos niveles de calcio plasmáticos, resistencia a la PTH y resistencia a algunos efectos de la vitamina D (Shils, 1999).

2.7.4. FUNCIONES DEL MAGNESIO

El magnesio está involucrado en más de 300 reacciones metabólicas esenciales para el correcto funcionamiento celular (Shils, 1999).

-Producción de energía:

El metabolismo de los carbohidratos y grasas para producir energía requiere numerosas reacciones químicas dependientes de magnesio. El magnesio se requiere para la síntesis proteica mitocondrial. El ATP, la molécula que proporciona energía para casi todos los procesos metabólicos, existe de forma primaria como un complejo con magnesio (MgATP) (Higdon, 2003).

-Síntesis de biomoléculas esenciales:

El magnesio se requiere en una serie de reacciones durante la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas. Un elevado número de enzimas implicadas en la síntesis de carbohidratos y lípidos requieren la presencia de este elemento como cofactor. El glutatión, un importante antioxidante, también requiere magnesio para su síntesis (Higdon, 2003).

-Función estructural:

El magnesio desempeña un importante papel estructural en el hueso, la membrana celular y los cromosomas. También es necesario para el transporte activo de iones como el K^+ y el Ca^{2+} a través de las membranas celulares. Debido a su papel en el transporte iónico, el magnesio afecta a la conducción nerviosa, la contracción muscular y la frecuencia cardíaca (Higdon, 2003).

-Mensajero celular:

El MgATP es requerido para la fosforilación de proteínas y la formación de mensajeros celulares como el cAMP. El cAMP está implicado en muchos procesos, incluyendo la secreción de la PTH por las glándulas paratiroideas (Higdon, 2003).

-Migración celular:

Los niveles de calcio y magnesio en el líquido extracelular afectan a la migración de ciertos tipos de células. Este efecto en la migración celular puede afectar al proceso de cicatrización de heridas (Higdon, 2003).

2.8. UTILIZACIÓN NUTRITIVA DE MAGNESIO

2.8.1. REQUERIMIENTOS

Los requerimientos de magnesio están basados en la cantidad de mineral necesaria para prevenir la deficiencia y mantener un estado de salud óptimo.

TABLA IX. Ingestas diarias recomendadas (RDA) de magnesio (modificado de Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, 2004):

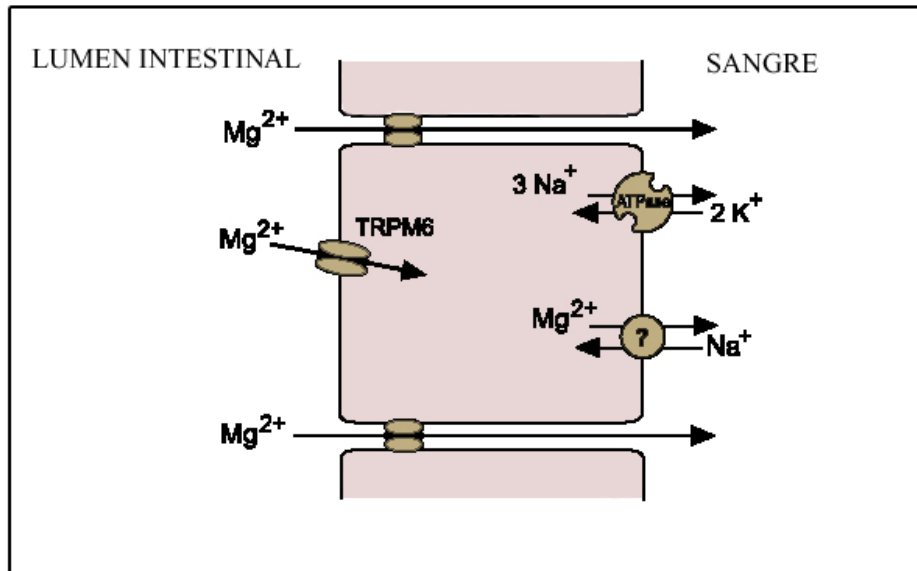
Etapas de la Vida	Edad	Hombres (mg/día)	Mujeres (mg/día)
Lactantes	0-6 meses	30	30
Lactantes	7-12 meses	75	75
Niños	1-3 años	80	80
Niños	4-8 años	130	130
Niños	9-13 años	240	240
Adolescentes	14-18 años	410	360
Adultos	19-30 años	400	310
Adultos	Más de 30 años	420	320
Embarazo	Menos de 18 años	-	400
Embarazo	19-30 años	-	350
Embarazo	Más de 30 años	-	360
Lactancia	Menos de 18 años	-	360
Lactancia	19-30 años	-	310
Lactancia	Más de 30 años	-	320

Los requerimientos de magnesio para la rata son 513 mg/Kg de dieta, en fase de crecimiento y 511 mg/Kg de dieta en fase adulta (Reeves y col., 1993).

2.8.2. ABSORCIÓN

El principal lugar de absorción de magnesio es el intestino delgado, en particular el íleon. Cantidades menores de magnesio también se absorben en el colon. La absorción intestinal de magnesio ocurre a través de dos rutas principales: un transporte activo transcelular saturable y un transporte pasivo paracelular no saturable (FIGURA IX) (Kerstan y Quanme, 2002; López-Aliaga y col., 2003).

FIGURA IX. Modelo de absorción intestinal de magnesio (Konrad y col., 2004):



-Transporte transcelular saturable:

El movimiento neto de un ión en ausencia de gradientes electroquímicos y su dependencia de la energía metabólica evidencia la presencia de un mecanismo de transporte activo, presumiblemente celular. De acuerdo con este criterio, el transporte de magnesio en dirección a las membranas mucosa y serosa es parcialmente celular en el íleon y colon, mientras que el flujo en dirección inversa es puramente difusivo (Jüttner y Ebel, 1998).

El transporte transcelular intestinal de magnesio se puede considerar como un proceso en tres pasos, consistente en: (a) entrada a la célula epitelial desde el lumen, (b) tránsito a través del citosol y (c) extrusión desde la célula a través de la membrana basolateral.

La entrada de magnesio a la célula intestinal a través del borde en cepillo o membrana apical no requiere energía metabólica, puesto que dicho elemento se mueve gracias al gradiente electroquímico.

La concentración de magnesio en el lumen intestinal es variable, pero se mantiene en un rango de entre 0.5 y 2 mM durante el ayuno y aumenta hasta 45 mM tras ingerir alimentos.

Aunque el magnesio celular total es relativamente alto (3-6 mM/mg de peso fresco), la concentración de magnesio intracelular libre se mantiene entre 0.4 y 1 mM. Debido a estas diferencias de concentración, se crea una diferencia de potencial negativa entre el exterior y el interior de la célula (Schweigel y col., 1999).

En la actualidad no hay datos concluyentes acerca de la extrusión de magnesio a través de la membrana basolateral. Probablemente no exista (o si lo hay es mínimo) un gradiente químico para el magnesio a través de esta membrana. El gradiente eléctrico ascendente para la salida de un catión tal como el magnesio sugeriría la participación de un transporte activo primario (bombeo de Mg^{2+}) o secundario (intercambio Mg^{2+}/Na^+) (Schweigel y Martens, 2000).

La cinética de saturación del sistema de transporte transcelular se explica por la capacidad limitada del transporte activo. A bajas concentraciones intraluminales, el magnesio es absorbido principalmente a través de la ruta transcelular y a concentraciones superiores, se absorbe básicamente a través de la ruta paracelular (Konrad y col., 2004).

-Transporte paracelular no saturable:

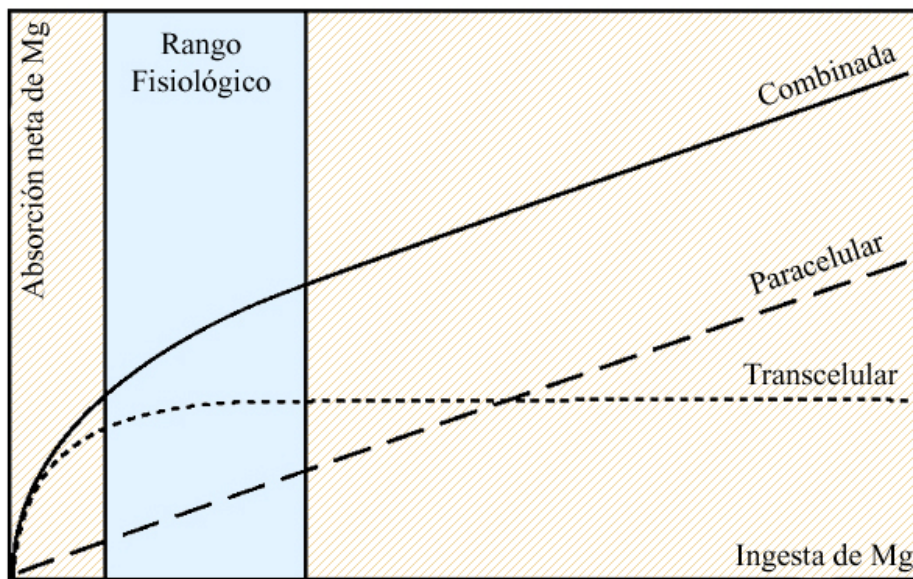
El movimiento pasivo de magnesio es más efectivo en el epitelio de los segmentos proximales del tracto gastrointestinal (intestino delgado), donde solo una pequeña fracción de la conductividad total del tejido puede ser atribuida al flujo transcelular del ión a través de las membranas mucosa y serosa. El resto (al menos el 85%), es una consecuencia del movimiento de iones, principalmente Na^+ , K^+ y Cl^- gracias a la alta conductividad y baja resistencia de las rutas extracelulares.

El aumento paralelo de la absorción neta de magnesio con el contenido de dicho elemento en la dieta, sugiere que la absorción de magnesio se realiza principalmente a través de un proceso de difusión pasiva (Hardwick y col., 1990).

El flujo y dirección del transporte pasivo de magnesio a través de la ruta paracelular está exclusivamente determinado por gradientes electroquímicos. Sin embargo, esto no implica que

el flujo pasivo de magnesio a través de la ruta paracelular no esté completamente regulado. Existen evidencias de que la absorción de magnesio está relacionada con la concentración luminal del mismo a través de una función curvilínea (FIGURA X) (Konrad y col., 2004)

FIGURA X. Absorción intestinal de magnesio frente a ingesta. La función curvilínea resulta de la combinación del transporte paracelular y transcelular (Konrad y col., 2004):



2.8.3. DISTRIBUCIÓN Y CAPTACIÓN CELULAR

-Circulación sanguínea:

El 55% del magnesio en plasma (entre 0.7-1.1 mmol/L) está en forma ionizada. Una fracción más pequeña (33%) se encuentra unida a proteínas y el resto (12%) formando complejos con distintos aniones. Las células captan el magnesio a través de un transportador que intercambia sodio. Los nucleótidos forman complejos con la mayoría del magnesio intracelular, manteniendo las concentraciones de magnesio libre ionizado por debajo de 1 mmol/L (Romani y col., 1993).

-Barrera hematoencefálica:

Las concentraciones de magnesio en el fluido cerebroespinal y cerebro parecen estar reguladas de forma independiente y no están relacionadas con la concentración sanguínea. Los mecanismos de transporte a través de la barrera hematoencefálica no están aún bien estudiados (Gee y col., 2001).

-Transferencia materno-fetal:

Proporcionalmente pasa mucho menos magnesio de la madre al feto que con otros cationes divalentes similares como el calcio, lo cual indica que los mecanismos de transporte no son compartidos. La manera exacta en la que el magnesio atraviesa la barrera placentaria no está aún bien dilucidada (Gee y col., 2001).

2.8.4. DEPÓSITOS DE MAGNESIO EN EL ORGANISMO

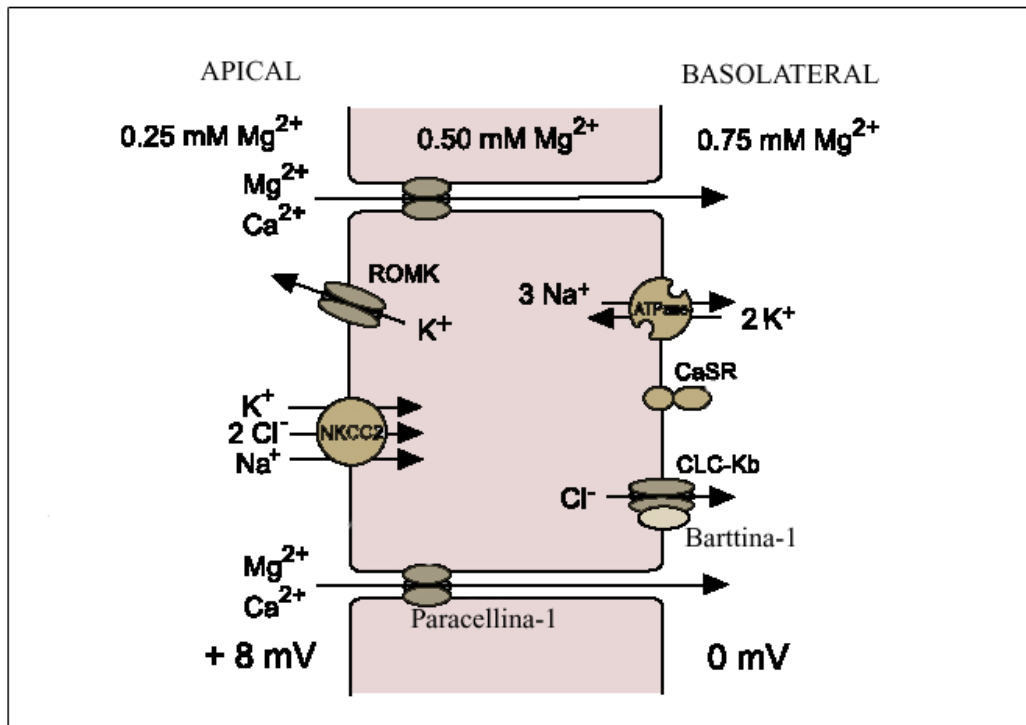
El organismo de un adulto contiene unos 25 g de magnesio, almacenado principalmente en el hueso y los compartimentos intracelulares de los tejidos blandos. Menos del 1% del total del organismo está circulando en sangre. En sujetos normales, los niveles séricos se mantienen en un rango estrecho de concentración (0.7-1.1 mmol/L) (Kerstan y Quamme, 2002).

2.8.5. ELIMINACIÓN

El magnesio libre ionizado (Mg^{2+}) y el magnesio complejoado con pequeños iones, que constituyen la mayoría (80%) del magnesio circulante son filtrados fácilmente en el glomérulo renal (en condiciones normales más de 2 g/día). Los individuos sanos pierden menos del 5% del magnesio filtrado en la orina. Una parte del magnesio luminal es recuperado de los túbulos proximales, una mayor proporción (70%) del asa de Henle ascendente y otra pequeña proporción del túbulo distal (Cole y Quanme, 2000). La reabsorción de magnesio ocurre en una considerable proporción debido al movimiento del elemento entre las células epiteliales. Existen ciertas proteínas complejas que sellan estos espacios intercelulares, como la claudina 16

(paracellina 1), una proteína que controla el paso del magnesio a través de la ruta paracelular (Weber y col., 2001).

FIGURA XI. Reabsorción de magnesio en el Asa de Henle (Konrad y col., 2004):



2.8.6. REGULACIÓN HOMEOSTÁTICA DEL BALANCE DE MAGNESIO

La reabsorción renal del filtrado primario es el principal mecanismo de control del contenido de magnesio en el organismo. Las pérdidas urinarias se relacionan estrechamente con las concentraciones sanguíneas de calcio y magnesio, así como con la cantidad de magnesio presente en la dieta. La 1,25-dihidroxitamina D estimula la reabsorción de magnesio en el túbulo distal, posiblemente porque la inducción de la calbindina 9K promueve el transporte transcelular (Ritchie y col., 2001). El receptor extracelular de calcio/magnesio (Casr) en la superficie externa de la membrana basolateral responde a la concentración de iones divalentes, modulando la permeabilidad de las uniones intercelulares y el voltaje transepitelial. Puesto que las concentraciones iónicas de calcio y magnesio disminuyen en el espacio pericapilar adyacente

a la membrana basolateral (y en el lumen capilar), se incrementa la absorción de ambos iones (Cole y Quamme, 2000).

La PTH, calcitonina, hormona antidiurética y el glucagon también pueden disminuir las pérdidas renales, pero su importancia en el mantenimiento de la homeostasis del magnesio parece ser menor y no está aún bien estudiada. La PTH también puede promover el transporte activo de la absorción intestinal (Rude, 2000).

2.9. CARACTERÍSTICAS NUTRICIONALES DE LA LECHE DE CABRA

2.9.1 INTRODUCCIÓN

En la actualidad se ha considerado a través de pruebas obtenidas por diversos estudios arqueológicos, que hace aproximadamente unos 10000 años, la especie humana dejó la caza y la colección de diversos recursos alimentarios vegetales y animales disponibles en el medio, para paulatinamente iniciar nuevas actividades que favorecían su subsistencia, como la agricultura y la ganadería.

La ganadería lechera, tiene sus orígenes como se ha demostrado, en la trashumancia, que consiste en una forma de vida humana siguiendo a los rebaños de animales de acuerdo con sus emigraciones anuales, obteniendo de las hembras leche y otros recursos. Existen evidencias arqueológicas de la existencia de las cabras en la cultura Natufia que abarcó desde el año 11000 hasta el 9300 A. C. y que se expandió por Palestina y Levante (Vega, 2003).

La adaptabilidad a climas variados y condiciones de manejo, aunado a su docilidad, facilidad para el manejo y la factibilidad de obtener leche diariamente, hacen de la cabra un animal de gran valor actual y futuro para mejorar el nivel de vida de los productores. La cabra fue una de las primeras especies animales introducidas por los españoles en México en el siglo XVI, y se continuaron importando hasta el siglo pasado, con el propósito de sostener e incrementar sus inventarios (Sánchez, 2004).

La cabra ha sido considerada como uno de los animales domésticos de mayor aprovechamiento, sobre todo por su leche y carne, pero no debe olvidarse la utilidad de su piel y otras partes de su cuerpo (Sánchez, 2004).

La leche de cabra es un alimento con unas características nutricionales altamente beneficiosas, que le confieren un alto interés como alimento y objeto de investigación. A pesar de su bajo consumo, la leche de cabra está adquiriendo un gran interés nutricional en la tendencia actual de buscar alimentos más saludables en los países desarrollados (Chandan y col., 1992).

Muchas de las reacciones adversas que a veces se presentan por el consumo de leche de vaca, concretamente frente a ciertas fracciones proteicas, así como la intolerancia a su lactosa, se pueden evitar en muchas ocasiones por el cambio a la leche de cabra (Park, 1991). Desde hace bastantes años hay indicios evidentes en la literatura científica del beneficio de la leche caprina en problemas de acidez, úlcera de estómago, colitis, problemas hepáticos y biliares, asma, migraña, eccemas y estados de convalecencia. Además puede ser un alimento aconsejable y bien tolerado por niños y ancianos, debido a la elevada digestibilidad de su proteína y grasa (Dostalova, 1994). En 1995, Zoppi y col., demostraron experimentalmente que el consumo de dietas que contienen leche de cabra reduce los niveles de LDL colesterol y colesterol total. Posteriormente (Alfárez y col., 2001; López-Aliaga y col, 2005) se demostró que el consumo de leche de cabra, además de reducir los niveles de LDL colesterol y colesterol total, mantiene en el rango fisiológico los niveles de HDL colesterol, triglicéridos y transaminasas (GOT y GPT).

2.9.2. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS

La leche de cabra es más blanca que la de vaca, debido a que no tiene carotenos, que amarillean en parte a la última. Posee un fuerte olor y sabor, como consecuencia de la absorción de compuestos aromáticos durante su manejo. Sin embargo, estas características organolépticas

poco atractivas desde el punto de vista del consumo humano, pueden eliminarse en gran parte por un sencillo tratamiento de desodorización al vacío (Borrás, 1968).

El sabor característico de la leche de cabra se debe, según Kim Ha y Lindsay (1991), a los ácidos grasos libres, especialmente a los de cadena ramificada 4-metiloctanoico y 4-etiloctanoico. También contribuyen al fuerte sabor de la leche caprina las mayores concentraciones de ácidos grasos caproico, caprílico y cáprico, de 6, 8 y 10 átomos de carbono respectivamente. Además, su mayor contenido con respecto a otras leches de cloro y minerales, le confieren un sabor ligeramente salobre.

La dieta caprina también constituye un elemento clave en las características organolépticas de la leche. Diversos tipos de alimentos vegetales como especies de los géneros *Brassica sp.*, *Lupinus sp.*, *Verbena sp.*, *Xanthium sp.*, *Digital sp.*, *Eupatorium sp.*, *Capsella sp.*, así como diversas plantas aromáticas o la pulpa de la remolacha, comunican sabores extraños y poco atractivos a la leche (Arbiza, 1986).

2.9.3. COMPOSICIÓN DE LA LECHE DE CABRA

Los componentes de la leche de cabra son sintetizados desde precursores presentes en el plasma sanguíneo (glucosa, acetato, ácidos grasos no esterificados, etc.), que son captados por las células de la glándula mamaria y usados para la síntesis de los componentes de la leche, o como substrato energético para dicha síntesis, según el estado nutricional del animal (Fehr y col., 1982).

Dependiendo de la raza de las cabras, condicionamientos genéticos, alimentación, factores medioambientales, momento de la lactación, etc., existen variaciones en la composición de la leche. En relación a los componentes mayoritarios de la leche de cabra, según los diversos autores consultados, su composición oscila en el siguiente rango de valores:

TABLA X. Componentes mayoritarios y características de la leche de cabra (Gnan y col., 1985; Espie y Mullan, 1990; Faria y col., 1999):

<i>PARÁMETRO</i>	<i>RANGO DE VALORES</i>
<i>Crioscopía (°C)</i>	(-0.585),(-0.595)
<i>pH</i>	6.41-6.70
<i>Sólidos Totales (%)</i>	11.70-15.21
<i>Lactosa (%)</i>	3.80-5.12
<i>Grasa (%)</i>	3.00-6.63
<i>Proteína (%)</i>	2.90-4.60
<i>Caseína (%)</i>	2.45-2.72
<i>Cenizas (%)</i>	0.69-0.89

Chandan y col. (1992), indican que en un clima templado, la leche a finales de verano contiene menor cantidad de grasa y sólidos totales. Además también tiene una marcada influencia el momento de la lactación, provocando unas fluctuaciones de composición que son más pronunciadas en la cabra que en la vaca (Parkash y Jenness, 1968).

Sin embargo, con total seguridad, es la dieta del animal la que incide en mayor medida sobre la composición de la leche, especialmente en su contenido proteico, graso y vitamínico, además de condicionar las características organolépticas de la misma (Boza, 1992).

Sobre el nivel proteico, los factores que ejercen mayor influencia son las características energéticas y nivel proteico de la dieta. Además también desempeña un papel importante la propia carga genética del animal, siendo la ausencia de degradabilidad proteica en el rumen el factor que modifica principalmente el contenido proteico.

En cuanto al porcentaje de materia grasa y su composición, como ya se ha comentado, depende en gran medida de la dieta y carga genética del animal, así como de la naturaleza y composición de la dieta que recibe, puesto que ésta determina cambios en la fermentación

ruminal, modificando la producción de los diferentes ácidos grasos y con ello el contenido graso de la leche. La modificación de la composición láctea en los rumiantes es más difícil que la de los animales monogástricos, debido al proceso de hidrogenación que sufre la grasa de piensos y forrajes en el rumen, incrementando el contenido de ácidos grasos saturados y reduciendo el de los esenciales en la leche. Las grasas “protegidas” suministradas en los piensos, salvan el obstáculo del rumen y parecen una buena estrategia para mejorar la calidad láctea, aumentando el contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), con marcados efectos beneficiosos en el metabolismo lipídico humano (Clarke y Jump, 1994; Sanz-Sampelayo y col., 2004).

2.9.3.1. PROTEÍNA DE LA LECHE DE CABRA

Una característica importante de la leche de cabra es que su composición proteica varía mucho de una raza a otra, debido a la gran variabilidad genética que caracteriza a este animal (Martín, 1996). Si consideramos un genotipo “estándar”, la composición proteica global, así como la cantidad de proteínas es muy similar en las leches caprina y bovina. Sin embargo, y aunque la proporción caseínas/proteínas del lactosuero es también similar (80/20), las caseínas de la leche de cabra son más solubles y por tanto su absorción es mucho más fácil (Boza y Sanz-Sampelayo, 1997). Por tanto, la calidad de la proteína de la leche de cabra es mayor que la de la leche de vaca. Esta elevada calidad proteica queda demostrada en un estudio realizado en ratas con resección parcial de intestino delgado, en el que se observó que las ratas que consumieron dieta elaborada a base de leche de cabra tenían un índice de crecimiento superior, con una mejor utilización digestiva y metabólica de la proteína, en comparación a las que consumían dieta estándar o basada en leche de vaca (López-Aliaga y col., 2003).

La leche de cabra contiene alrededor de 5.2 g N/Kg, lo cual representa 33.2 g de proteína. La fracción proteica mayoritaria de la leche caprina, al igual que en la leche de vaca, son las caseínas que precipitan a un pH= 4.6. Las proteínas que permanecen en solución a dicho pH son las del lactosuero: α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, albúmina, inmunoglobulinas, péptidos y otras proteínas menores, algunas con carácter enzimático.

Como componentes de la proteína láctea, existen seis fracciones genéricas de la glándula mamaria de carácter mayoritario: α_1 -caseína, α_2 -caseína, β -caseína, γ -caseína, β -lactoglobulinas y α -lactoalbúminas, exhibiendo todas un polimorfismo genérico producto de genes autosómicos alélicos codominantes (Swaisgood, 1992). La leche caprina tiene menos α_1 -caseína que la leche de vaca (5% del total de proteínas en la cabra, frente al 35% de la vaca) (Martín, 1996). Esta proteína, que no está presente en la leche humana, es considerada uno de los principales alérgenos responsables de la alergia a la proteína de la leche de vaca (Bianca-María y col., 2001).

Quiles y col. (1994), señalaron que a lo largo de la lactación de la cabra, los grupos proteicos y sus fracciones se incrementan, salvo las proteínas del suero que disminuyen. Posteriormente, Brown y col. (1995), observaron cambios en la fracción caseínica de la leche de cabra a lo largo de la lactación, señalando una disminución de α_2 -caseína a medida que progresa la lactación, consecuente con la susceptibilidad a la proteólisis, así como un aumento en la concentración de κ -caseína en dicho curso. Igualmente, indican una correlación entre β y γ -caseína y la producción láctea, marchando paralela con la involución de la glándula mamaria en el transcurso de la lactación.

De acuerdo con Chandan y col. (1992), la concentración enzimática en las leches de cabra y vaca son bastante diferentes. La actividad proteolítica de la leche de cabra fresca es más alta que la de vaca, mientras que la actividad xantina-oxidasa (XO) es un 10% menor en la leche de cabra. La lipólisis de la leche de cabra es muy diferente a la de vaca, generándose en aquella ácidos grasos libres y productos aromáticos característicos, debidos a la distribución de la lipoprotein-lipasa (LPL) en varias de sus fracciones.

En la leche de vaca, tras someterse a calentamiento y enfriarse rápidamente, se consigue la separación de la nata, facilitando esta aglomeración las euglobulinas lácteas. Este hecho no se produce con la leche de cabra, lo cual puede ser debido al pequeño volumen de los glóbulos grasos y escaso contenido en euglobulinas y aglutininas que son responsables de la escasa capacidad de la leche de cabra para formar crema (Chandan y col., 1992).

2.9.3.2. CARBOHIDRATOS DE LA LECHE DE CABRA

Tanto en la leche de vaca como en la de cabra, el hidrato de carbono más importante es la lactosa (4,7-4,8%).

En condiciones fisiológicas, la lactosa de la leche es hidrolizada por la lactasa en la superficie de las células de la mucosa intestinal, pero deficiencias de este enzima pueden producir diarreas, distensión abdominal y flatulencia, debido al aumento en la luz intestinal de este disacárido osmóticamente activo. En casi todos los mamíferos, la actividad lactásica intestinal es alta al nacer, declina en la niñez y permanece baja en la edad adulta; valores bajos de lactasa se asocian a la intolerancia láctea (Ganong, 2004). La mayor tolerancia a la lactosa de la leche de cabra parece ser debida a su mayor digestibilidad, pudiendo existir una interacción entre calidad y cantidad proteica, de manera que la tasa de liberación de nutrientes desde el estómago al intestino es más ventajosa, optimizando así la utilización digestiva de la lactosa.

Sin embargo, a pesar de que ambos tipos de leche contienen una cantidad de lactosa similar, una diferencia muy importante en la composición glucídica de ambos tipos de leche reside en los oligosacáridos: la leche de vaca solo contiene trazas de estos compuestos, mientras que en la de cabra se encuentran concentraciones 10 veces superiores. Además, los oligosacáridos caprinos se caracterizan por su gran variabilidad estructural, que los hace los más parecidos que existen a la leche humana. Otra característica importante es su elevado contenido en galactosa, muy importante para el desarrollo cerebral en las primeras etapas de vida (Martínez-Férez, 2004).

La similitud de los oligosacáridos de la leche de cabra con los de la leche humana sugiere que estos compuestos podrían tener una bioactividad similar. En este sentido, se ha demostrado *in vitro* que los oligosacáridos de la leche de cabra inducen la maduración del epitelio intestinal, ya que favorecen la diferenciación de células Caco-2 (Martínez-Férez, 2004).

2.9.3.3. COMPOSICIÓN LIPÍDICA DE LA LECHE DE CABRA

La cantidad total de materia grasa es similar en las leches de vaca y cabra (3.2-3.8%), también muy parecida a la de la leche humana. El contenido en colesterol (0.3-0.6%) y en fosfolípidos (1%) es también similar en las leches de las tres especies.

La materia grasa de la leche es secretada por las glándulas mamaria en forma de glóbulos grasos, dando lugar a una emulsión lipídica. Estos glóbulos grasos están formados principalmente por un núcleo de triglicéridos, rodeado de una capa externa constituida por lípidos polares (principalmente fosfolípidos) y proteínas. El tamaño de los glóbulos grasos de la leche de cabra es por término medio de 3.5 μm , presentando un elevado porcentaje de glóbulos con un diámetro comprendido entre 1.5 y 3 μm , considerablemente más pequeños a los de la leche de vaca (4.5 μm por término medio). Este menor tamaño de los glóbulos grasos de la leche de cabra da como resultado una emulsión más fina y uniforme, que influye favorablemente en su digestibilidad, puesto que estos pequeños glóbulos son más accesibles para las lipasas que participan en la digestión lipídica (Chilliard, 1996).

Por otra parte, tanto la leche de vaca como la de cabra, contienen cantidades muy importantes del enzima lipoprotein-lipasa (LPL). Este enzima juega un papel crucial en la lipólisis espontánea de la leche (hidrólisis de triglicéridos, principalmente en posición 3, para producir ácidos grasos libres). En el caso de la leche de vaca, la LPL se encuentra ligada a las moléculas de caseína, mientras que en la leche de cabra está más ligada a los glóbulos de grasa, facilitando la hidrólisis. Esta es la razón por la cual la leche de cabra presenta mayor porcentaje de ácidos grasos libres (0.6% del total de grasa frente al 0.4% en la leche de vaca), lo que también contribuye a su mayor digestibilidad (Chilliard, 1996).

Posiblemente, una de las principales diferencias en la composición lipídica de las leches de cabra y vaca está en el tipo de ácidos grasos que componen los triglicéridos. En la leche de cabra el porcentaje de ácidos grasos de cadena media (C6:0 caproico, C8:0 caprílico, C10:0 cáprico) es superior al de la leche de vaca. Así, la leche de cabra es más rica en triglicéridos de

cadena media (MCT). Estos triglicéridos son una fuente de energía rápida, ya que se absorben directamente en el intestino delgado proximal y no necesitan la participación de las sales biliares para su absorción. Además, la oxidación mitocondrial de los ácidos grasos de cadena media es, en parte, independiente de los niveles de carnitina, lo cual supone una ventaja en casos de déficits de esta enzima (Ode, 1997).

Por esta razón, estos triglicéridos podrían tener efectos beneficiosos en situaciones metabólicas desfavorables, tales como enfermedades hepáticas, pacientes inmunodeprimidos o en el recién nacido, cuyo metabolismo es aún inmaduro. Así, los MCT han sido utilizados en nutrición parenteral de pacientes con enfermedades críticas y en niños prematuros, con mejores resultados que los triglicéridos de cadena larga (LCT) (Chan y col., 1998).

Debido a su rápida absorción, los MCT han sido utilizados en la prevención de la obesidad. Los ácidos grasos derivados de estos triglicéridos son rápidamente oxidados en el hígado, por lo que estimulan la saciedad de forma rápida, disminuyen los depósitos de grasa y facilitan el control de peso, sin modificar el aporte energético (St-Onge y Jones 2002).

Alfárez y col. (2001), estudiaron el efecto de la grasa de las leches de cabra y vaca sobre la utilización digestiva de dicho nutriente y sobre parámetros bioquímicos relacionados con el metabolismo lipídico. En el estudio se emplearon ratas controles (transectadas) y otro grupo con resección intestinal del 50% del intestino delgado distal. La utilización digestiva de la grasa fue mayor en los animales que consumieron dieta elaborada a base de leche de cabra (rica en MCT), con respecto a los que consumían dieta basada en leche de vaca. Además el consumo de leche de cabra produce una reducción de los niveles de LDL-colesterol, manteniendo dentro del rango fisiológico los niveles de triglicéridos, HDL-colesterol y transaminasas (GOT y GPT) (López-Aliaga y col., 2005).

2.9.3.4. COMPOSICIÓN MINERAL DE LA LECHE DE CABRA

Al analizar la composición mineral de un determinado tipo de leche, no sólo hay que tener en cuenta las cantidades de cada mineral, sino también su biodisponibilidad. En este sentido, existen interacciones entre diferentes minerales y de éstos con otros componentes lácteos, que puede afectar a su absorción.

Así, la composición mineral de las leches de cabra y vaca no presentan grandes diferencias. Es destacable la mayor cantidad de potasio de la leche de cabra y su menor contenido en sodio. Sin embargo, existen estudios científicos que demuestran que la biodisponibilidad de ciertos minerales si es diferente, siendo mucho más ventajosa en la leche de cabra.

TABLA XI. Composición mineral de las leches de cabra y vaca (Gueguen , 1996):

	Leche de vaca	Leche de cabra
Macroelementos	mg/L	mg/L
Calcio	1200	1260
Fósforo	920	970
Potasio	1500	1900
Sodio	450	380
Magnesio	110	130
Relación Ca:P	1/3	1/3
Microelementos	µg/L	µg/L
Zinc	3800	3400
Hierro	460	550
Cobre	220	300
Manganeso	60	80
Yodo	70	80
Selenio	30	20

El hierro es un claro ejemplo de cómo las interacciones entre componentes pueden aumentar la biodisponibilidad. La leche de cabra contiene una cantidad de hierro ligeramente superior a la de vaca, sin embargo, la biodisponibilidad de este elemento es mucho mayor en la leche de cabra. López-Aliaga y col., (2000) estudiaron el efecto de las leches de cabra y vaca sobre la utilización digestiva y metabólica de hierro y calcio, usando como control una dieta estándar (sin leche). La utilización digestiva del hierro y calcio, así como el depósito en órganos diana fue superior en los animales que ingirieron dietas basadas en leche de cabra. Por tanto, la leche de cabra minimiza las interacciones entre hierro y calcio, favoreciendo así su metabolismo. Además, Alférez y col., (2006) estudiaron el efecto de la leche de cabra comparativamente a la de vaca en ratas con anemia ferropénica nutricional inducida, concluyendo que el Fe presente en la leche de cabra favorece su depósito en órganos diana y la vuelta a la normalidad de los parámetros hematológicos alterados como consecuencia de la anemia ferropénica nutricional.

El efecto beneficioso de la leche de cabra sobre la utilización digestiva de hierro puede deberse a varios factores nutricionales que se encuentran en la leche de cabra en mayor proporción como son: la cisteína y la lisina por la solubilización de Fe ferroso o férrico formando quelatos tridentados, son el principal factor asociado con una mayor absorción del metal (Van Campen, 1973). Por otra parte, el mayor contenido de ácido ascórbico (vitamina C) en la leche de cabra, contribuye a aumentar la absorción de hierro en las ratas alimentadas con dieta elaborada con leche de cabra, ya que es conocido que la vitamina C forma un quelato con este mineral que permanece soluble a un pH más alto del intestino delgado (Czajka-Narins, 1998).

La mayor absorción de calcio en los animales que consumen la dieta con leche de cabra se puede atribuir en parte al alto contenido en Vitamina D de la leche de cabra respecto a la leche de vaca, que favorece la absorción de esta mineral (Alférez y col., 1996).

Otro factor que puede contribuir a esta mayor absorción de calcio con la dieta elaborada con leche de cabra es su mayor contenido en lisina respecto a la leche de vaca. El efecto de este aminoácido parece que está relacionado con el transporte de calcio pasivo, ya

que no hay diferencias significativas entre los dos estereoisómeros de la lisina.

Además, la leche de cabra tiene un alto contenido en MCT frente a la leche de vaca que, según Tappenden y col. (1997), favorece el transporte de nutrientes a través de la membrana basolateral del enterocito, por una más rápida utilización de la energía disponible a partir de esos triglicéridos de cadena media.

La cantidad de magnesio en la leche de cabra también es ligeramente superior a la de vaca. Un estudio en ratas con resección intestinal demostró que la leche de cabra aumentaba la absorción de magnesio (López-Aliaga y col, 2003). También los MCT parecen responsables de este efecto beneficioso en el metabolismo mineral. Además Campos y col., (2003) también demostraron que el consumo de leche de cabra en ratas ressecadas mejoraba la absorción de calcio y fósforo, así como su destino metabólico en los órganos diana implicados en la homeostasis de estos minerales.

2.9.3.5. COMPOSICIÓN VITAMÍNICA DE LA LECHE DE CABRA

El bajo contenido en ácido fólico (vitamina B₉) de la leche de cabra es prácticamente el único inconveniente de este tipo de leche en comparación con la de vaca y la humana. Algunos casos descritos de anemia megaloblástica (patología asociada al déficit de esta vitamina) en niños de 3 a 12 meses alimentados exclusivamente con leche de cabra, fue una de las razones del descrédito que sufrió la leche caprina en los años 60 y 70 (Sullivan y col., 1966). Esta carencia se debe a una glicoproteína que presenta la capacidad de unir ácido fólico y que no se encuentra en la leche de vaca (Chandan y col., 1992).

TABLA XII. Composición vitamínica de las leches de cabra y vaca (Chandan y col., 1992; O'Connor, 1994; Mataix y col., 1995):

VITAMINAS	Leche de cabra	Leche de vaca
A, UI/L	2030.0	1260.0
D, µg/L	0.6	0.3
E, mg/L	0.3	1.0
K, µg/L	12.0	-
B₁, mg/L	0.5	0.1
B₂, mg/L	1.4	1.4
Niacina, mg/L	2.7	0.8
Ácido Ascórbico, mg/L	21.0	15.6
Ácido pantoténico, mg/L	3.1	3.0
B₆, mg/L	0.5	0.7
B₁₂, µg/L	0.7	3.5
Ácido fólico, µg/L	6.0	50.0
Colina, mg/L	119.9	120.0
Inositol, mg/L	110.5	109.3

La leche de cabra contiene niveles más altos de vitaminas del grupo B que la leche de vaca, con la salvedad de que las vitaminas B₆ y B₁₂ están en menor cantidad (Jauber y Kalantzopoulos, 1996). El contenido en vitamina D y ácido nicotínico también es superior en la leche de cabra.

Otra característica destacable de la leche de cabra es su elevado contenido en vitamina A y, a diferencia de la leche de vaca, no contiene precursores de dicha vitamina, sino que se presenta como tal (Devendra y McLeroy, 1986).

2.9.3.6. OTROS COMPONENTES MINORITARIOS DE LA LECHE DE CABRA

Las poliaminas (espermidina, espermina y putrescina) son compuestos nitrogenados presentes en la leche de diferentes mamíferos y parecen jugar un papel importante en el desarrollo intestinal de los neonatos de distintas especies.

La concentración de estas sustancias en la leche varía en función del periodo de lactancia, probablemente debido a una adaptación de las necesidades del neonato (Ploszaj y col., 1997). En la leche de vaca, la concentración de espermina y espermidina es máxima en el calostro, debido a que la capacidad de síntesis es máxima. Durante el primer mes de lactancia, la concentración de estas sustancias disminuye y permanece baja hasta el final de la lactancia.

Por el contrario, la concentración de poliaminas en la leche de cabra permanece estable durante todo el periodo de lactación (a excepción de la putrescina que disminuye durante las primeras semanas) y siempre los niveles son superiores a los de la leche de vaca (Ploszaj y col., 1997). Este patrón de secreción es parecido al que ocurre en la leche humana.

La mayor concentración de poliaminas se ha relacionado con la reducción del riesgo de padecer alergias alimentarias, ya que al favorecer la maduración intestinal, dificultan el paso de alérgenos alimentarios. En este sentido, diferentes estudios sugieren que el menor riesgo de padecer este tipo de reacciones alérgicas en niños amamantados podría explicarse, al menos parcialmente, por la mayor concentración de espermina y espermidina en la leche humana, comparada con las fórmulas infantiles disponibles en el mercado (Dandriofosse y col., 2000).

La leche de cabra también es más rica en nucleótidos. Al contrario de lo que ocurre con las poliaminas, el patrón de secreción de nucleótidos es muy similar en las leches caprina y bovina. En el calostro, la concentración es máxima, y a partir de las primeras semanas, disminuye. Sin embargo, el contenido en nucleótidos totales es siempre mayor en la leche de cabra. La leche de vaca sólo es más rica en ácido orótico, nucleótido del que solo existen trazas en la leche humana (Jaubert, 1996).



Material y Métodos

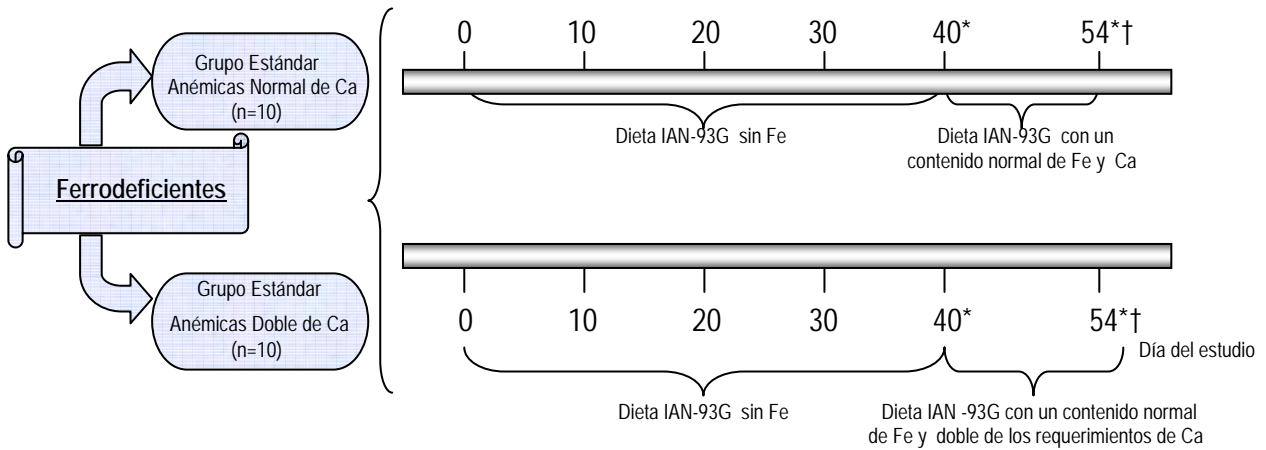
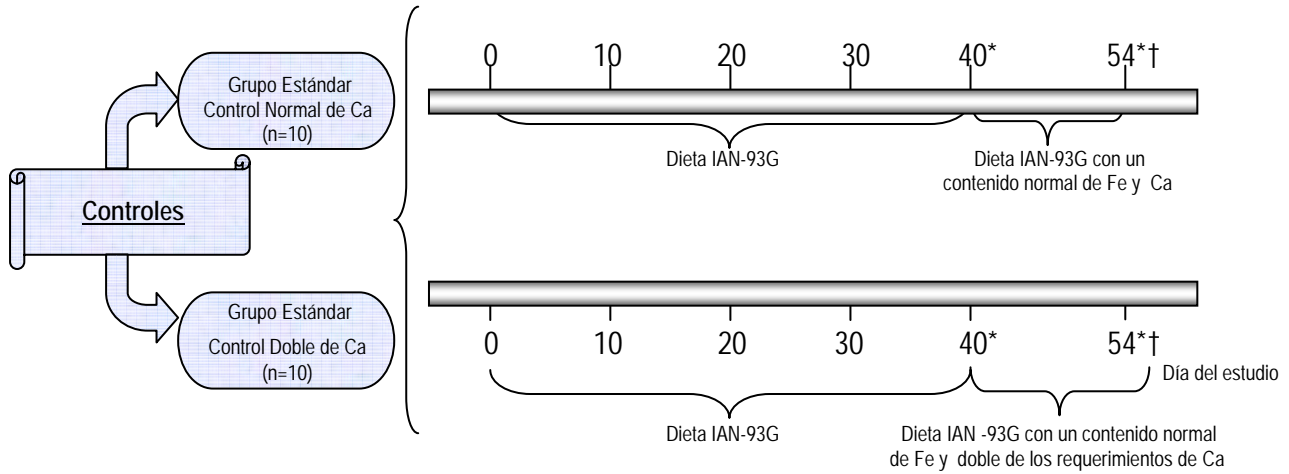
3. MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudia el efecto de la leche de cabra en relación a la de vaca enriquecidas o no en Ca sobre metabolismo del Fe, así como la interacción con el metabolismo de otros minerales (Ca, P y Mg) en ratas controles y con anemia ferropénica nutricional.

3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se han usado 120 ratas (*Ratus norvegicus*, raza Wistar albina) con un peso inicial aproximado de 175 ± 3 g, procedentes del Servicio de Animales de Laboratorio de la Universidad de Granada y distribuidas al azar en 12 experimentos de 10 ratas cada uno.

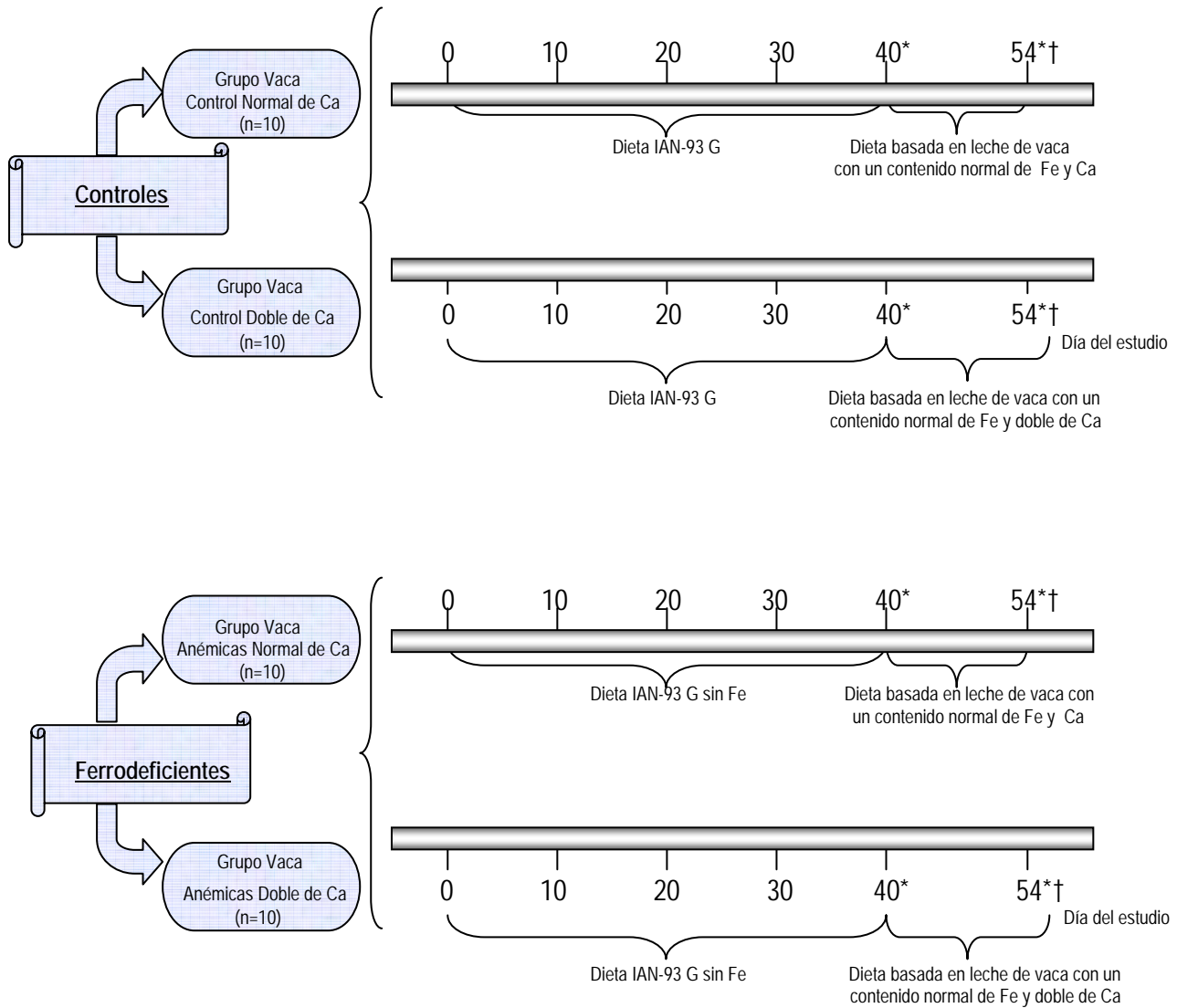
Las ratas se alojan en células individuales de metabolismo con recogida separada de heces y orina. Estas células se encuentran situadas en una habitación aireada y termorregulada ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) con fotoperíodo controlado de 12 horas (luz-oscuridad), donde durante 40 días toman agua bidestilada y dieta “*ad libitum*”. Durante esta primera fase experimental se le suministra dieta estándar (IAN-93G) a las ratas controles y dieta estándar carente de hierro para provocar un ferrodeficiencia en las ratas que posteriormente constituirán el grupo de las anémicas.



* = Toma de sangre de la vena caudal.

† = Sacrificio, extracción de sangre y órganos.

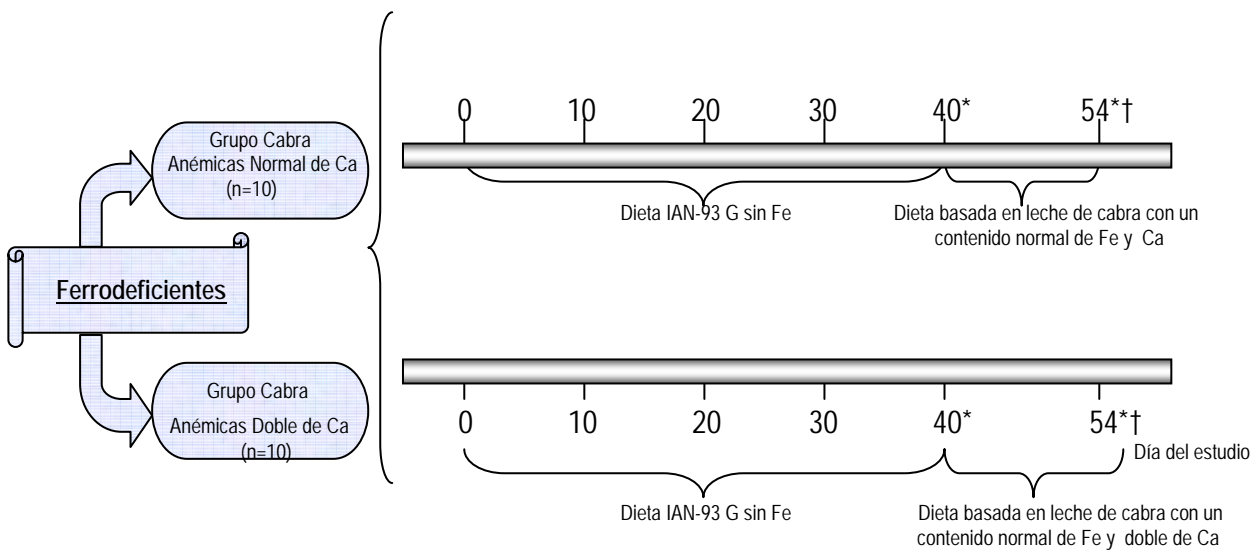
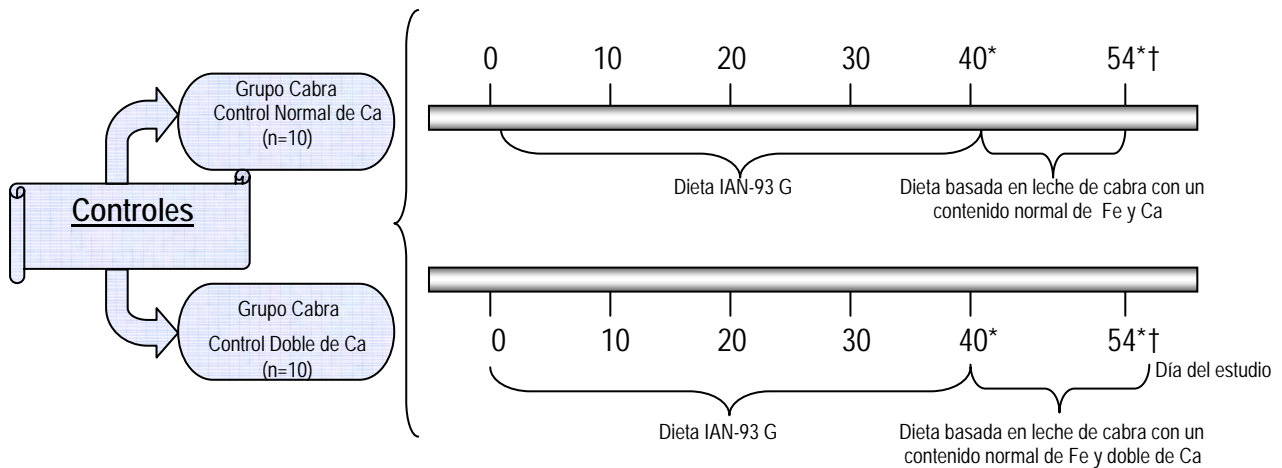
**DIETA BASADA EN
LECHE DE VACA**



* = Toma de sangre de la vena caudal.

† = Sacrificio, extracción de sangre y órganos.

DIETA BASADA EN LECHE DE CABRA



* = Toma de sangre de la vena caudal.

† = Sacrificio, extracción de sangre y órganos.

En el día 40 se toma una muestra de sangre de la vena caudal en tubos que contienen EDTA como anticoagulante para el control hematológico de la anemia. Tras los 40 días de suministro de la dieta IAN-93G con o sin Fe, los animales son alimentados durante 14 días con las seis dietas a ensayar (dieta estándar, dieta basada en leche de vaca, dieta basada en leche de cabra, enriquecidas o no en Ca), así los 12 grupos experimentales quedan definidos de la siguiente manera:

GRUPO EXPERIMENTAL	CARACTERÍSTICAS
1.-Grupo estándar control normal Ca	Las ratas controles son alimentadas con dieta estándar, sin suplemento de calcio (E).
2.-Grupo estándar control doble Ca	Las ratas controles son alimentadas con dieta estándar, enriquecida con el doble de los requerimientos de calcio (E ⁺).
3.-Grupo estándar anémicas normal Ca	Las ratas anémicas son alimentadas con dieta estándar sin suplemento de calcio (E).
4.-Grupo estándar anémicas doble Ca	Las ratas anémicas son alimentadas con dieta estándar, con una cantidad de calcio equivalente al doble de los requerimientos (E ⁺).
5.-Grupo vaca control normal Ca	Las ratas controles son alimentadas con dieta basada en leche de vaca sin enriquecer con calcio (V).
6.-Grupo vaca control doble Ca	Las ratas controles son alimentadas con dieta preparada con leche de vaca, con el doble de los requerimientos de calcio (V ⁺).
7.-Grupo vaca anémicas normal Ca	Las ratas anémicas son alimentadas con dieta basada en leche de vaca, sin suplemento de calcio (V).
8.-Grupo vaca anémicas doble Ca	Las ratas anémicas son alimentadas con dieta basada en leche de vaca, con el doble de los requerimientos de calcio (V ⁺).
9.-Grupo cabra control normal Ca	Las ratas controles son alimentadas con dieta preparada con leche de cabra, sin suplementar con calcio (C).
10.-Grupo cabra control doble Ca	Las ratas controles son alimentadas con dieta basada en leche de cabra, suplementada con el doble de los requerimientos de calcio (C ⁺).
11.-Grupo cabra anémicas normal Ca	Las ratas anémicas son alimentadas con dieta basada en leche de cabra sin suplemento de calcio (C).
12.-Grupo cabra anémicas doble Ca	Las ratas anémicas son alimentadas con dieta basada en leche de cabra, con el doble de los requerimientos de calcio (C ⁺).

Se utiliza la técnica biológica adaptada de Thomas-Mitchell (1923) en la que los 7 primeros días son de adaptación a la dieta a ensayar, seguidos del período principal de 7 días. Los animales tienen acceso a la dieta “*ad libitum*” y diariamente se controla la ingesta, además de recolectar por separado heces y orina. La orina se recolecta sobre una solución ácida de HCl y el volumen total de diuresis obtenido durante los 7 días se conserva en el frigorífico a $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior análisis. Las heces se recogen durante los 7 días del periodo principal y conservan en un congelador a $-20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ para su posterior análisis.

Tras el periodo principal, todos los animales son sacrificados el día 54 de la experiencia (siguiendo el Protocolo del Comité de Ética de la Universidad de Granada). Se anestesia el animal con pentobarbital sódico (SIGMA, St Louis, MI, USA) a una dosis de 5 mg/100 g de peso por vía intraperitoneal y se canula la aorta abdominal, obteniéndose una alícuota de sangre en tubos con anticoagulante (EDTA) para determinar Mg y parámetros hematológicos (recuento de hematíes, volumen corpuscular medio, hemoglobina, hematocrito y plaquetas). El resto de sangre se recoge en tubos sin anticoagulante y se centrifuga a 3000 r.p.m. durante 10 minutos. Con una pipeta pasteur se extrae el suero, que se conservará congelado a $-20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, hasta ser utilizado para la determinación de Fe, Ca (iónico y total), P, hormonas (parathormona y corticosterona), ferritina, saturación de la transferrina y capacidad total de unión al Fe (TIBC).

Después se procede a la extracción y congelación de los distintos órganos objeto de estudio: hígado, bazo, cerebro, músculo *Longissimus dorsi*, ambos riñones, ambos fémur y esternón para determinar el contenido de Fe, Ca, P y Mg tras el adecuado procesamiento de la muestra. También se analiza el contenido de dichos minerales en los seis tipos de dieta, heces y orina. En cada uno de los experimentos se han llevado a cabo las siguientes determinaciones analíticas:

- Dietas: humedad, Fe, Ca, P y Mg.
- Heces: humedad, Fe, Ca, P y Mg.
- Orina: Fe, Ca, P y Mg.

-
- Suero: Fe, Ca, P, parathormona (PTH), corticosterona, saturación de la transferrina, ferritina, TIBC.
 - Sangre total: Mg.
 - Sangre periférica: determinación de hemoglobina, recuento de hematíes, hematocrito, volumen corpuscular medio (VCM) y plaquetas.
 - Depósito de Fe en hígado, fémur, bazo y esternón.
 - Depósito de Ca en fémur, esternón y músculo *longissimus dorsi*.
 - Depósito de P en fémur, músculo *longissimus dorsi*, cerebro, bazo y riñones.
 - Depósito de Mg en fémur, esternón y músculo *longissimus dorsi*.

3.2. DIETAS UTILIZADAS

Las dietas semisintéticas ensayadas han sido las siguientes:

- Dieta estándar: preparada con un 10% de grasa procedente de aceite de oliva virgen y un 20% de proteína (caseína) y los requerimientos vitamínicos han sido ajustados a las directrices del IAN (Reeves y col., 1993). Para la dieta estándar normal (E), el suplemento mineral se elabora de manera que cubra los requerimientos de todos los minerales para la dieta normal (E) y con el doble de los requerimientos de Ca para la dieta suplementada (E⁺).
- Dieta basada en leche de vaca: constituida mayoritariamente por liofilizado de leche de vaca. Está preparada con un 10% de grasa (procedente exclusivamente de leche de vaca) y un 20% de proteína (procedente de leche de vaca y complementada con caseína). Asimismo, las cantidades de vitaminas se han ajustado hasta cubrir los requerimientos del IAN (Reeves y col., 1993). El suplemento mineral se elabora de manera que cubra los requerimientos de todos los minerales para la dieta normal (V) y con el doble de los requerimientos de Ca para la dieta suplementada (V⁺).

- Dieta basada en leche de cabra: constituida fundamentalmente por liofilizado de leche de cabra. Está elaborada con un 10% de grasa (procedente en su totalidad de leche de cabra) y un 20% de proteína (procedente de leche de cabra y suplementada con caseína). También se han ajustado las cantidades de vitaminas a la pauta marcada por el IAN (Reeves y col., 1993). El suplemento mineral se prepara de manera que cubra los requerimientos de todos los minerales para la dieta normal (C) y con el doble de los requerimientos de Ca para la dieta suplementada (C⁺).

Para asegurar que los liofilizados mantienen constantes las características nutricionales a lo largo de todo el desarrollo experimental, se conservan envasados al vacío y congelados a $-20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de la elaboración de la dieta.

Las dietas son elaboradas según las directrices del IAN (Reeves y col., 1993), excepto el nivel de grasa en la dieta que es un 10% en lugar de un 7%, con lo que se pretende que el liofilizado de leche constituya una tercera parte de las dietas basadas en leche y que la procedencia de la grasa sea en su totalidad proveniente de la leche. Para las dietas enriquecidas en Ca se emplea un corrector mineral que aporta el doble de las recomendaciones, es decir, 10000 mg Ca/Kg de dieta.

Las dietas basadas en leche (dietas V, V⁺, C y C⁺), son preparadas usando **liofilizado** de leche de vaca y cabra respectivamente. El liofilizado se analiza para determinar el contenido graso, proteico, vitaminas, aminoácidos, lactosa y la composición mineral. De este análisis se derivan los siguientes datos:

COMPOSICIÓN DEL LIOFILIZADO		
	Cantidades por 100 g de liofilizado	
	Leche de Vaca	Leche de Cabra
<i>Proteína (g)</i>	24.84	23.36
<i>Lípidos (g)</i>	28.76	30.69
<i>Lactosa (g)</i>	40.75	39.20
<i>Ca (mg)</i>	1030	1319
<i>P (mg)</i>	782	813
<i>Mg (mg)</i>	85.2	89.5
<i>Fe (mg)</i>	0.87	1.23
<i>Cu (mg)</i>	0.14	0.25
<i>Zn (mg)</i>	3.5	4.1
<i>Vitamina C (mg)</i>	10.3	14.1
<i>Vitamina A (mg)</i>	0.24	0.43
<i>Vitamina D (mg)</i>	0.50	0.74
<i>Ácidos Grasos Saturados (g)</i>		
<i>C4</i>	0.83	0.98
<i>C6</i>	0.25	0.36
<i>C8</i>	0.26	0.65
<i>C10</i>	0.64	2.08
<i>C12</i>	0.59	0.78
<i>C14</i>	2.73	2.70
<i>C16</i>	7.35	7.57
<i>C18</i>	2.89	3.18
<i>Ácidos Grasos Monosaturados (g)</i>		
<i>C16:1</i>	1.27	1.30
<i>C18:1</i>	7.23	8.46
<i>Ácidos Grasos Poliinsaturados (g)</i>		
<i>C18:2</i>	0.52	0.71
<i>C18:3</i>	0.19	0.18
<i>Aminoácidos (g)</i>		
<i>Alanina</i>	0.87	0.90
<i>Arginina</i>	0.90	0.91
<i>Ácido Aspártico</i>	1.87	1.75
<i>Ácido Glutámico</i>	5.47	5.23
<i>Cistina</i>	0.32	0.21
<i>Fenilalanina</i>	1.18	1.20
<i>Glicina</i>	0.53	0.48
<i>Histidina</i>	0.62	0.61
<i>Isoleucina</i>	1.58	1.64
<i>Leucina</i>	2.39	2.28
<i>Lisina</i>	1.93	2.14
<i>Metionina</i>	0.61	0.60
<i>Prolina</i>	2.39	2.75
<i>Serina</i>	1.41	1.42
<i>Treonina</i>	1.14	1.24
<i>Tirosina</i>	1.23	1.38
<i>Valina</i>	0.94	0.10

Atendiendo principalmente al contenido graso, se determinan las cantidades adecuadas de liofilizado de vaca o cabra para obtener unas dietas con un **10% de grasa**. Para alcanzar el **20% de contenido proteico**, se suplementa la dieta con caseína (Musal & Chemical, Granada, Spain). Se añaden 124 g de caseína por Kg para las dietas V, V⁺ y 145 g de caseína por Kg para las dietas C, C⁺, puesto que la proteína aportada por el liofilizado es insuficiente.

- En las dietas elaboradas con liofilizado de leche de vaca (dietas V y V⁺), empleamos 42.55 g de liofilizado por 100 g de dieta para ajustar la grasa al 10%.
- En las dietas preparadas con liofilizado de leche de cabra (dietas C y C⁺), para ajustar el contenido graso a un 10%, usamos 40.08 g de dicho liofilizado por 100 g de dieta.

Los **hidratos de carbono** en la dieta estándar son aportados por azúcar (sacarosa), almidón y fibra (celulosa micronizada). En las dietas basadas en leche (dietas V, V⁺, C y C⁺), hay un aporte de lactosa proveniente del liofilizado, que tenemos en cuenta al añadir el azúcar y almidón, para así obtener la misma proporción de hidratos de carbono que tiene la dieta estándar.

Las dietas semisintéticas (E, E⁺, V, V⁺, C y C⁺), están elaboradas de acuerdo con la siguiente composición:

DIETAS ESTÁNDAR (E y E⁺)	
	CANTIDAD (g/Kg dieta)
Proteína	
-Caseína	200
Grasa	
-Aceite de oliva	100
Hidratos de Carbono	
-Almidón de maíz	501
-Sacarosa	100
Fibra	
-Celulosa micronizada	50
Corrector Mineral	35
Corrector Vitamínico	10
Cloruro de Colina	2.5
L-Cisteína	1.5

DIETAS BASADAS EN LECHE DE VACA (V y V⁺)	
	CANTIDAD (g/Kg dieta)
Proteína	
-Proteína procedente de liofilizado + caseína	200
Grasa	
-Procedente del liofilizado	100
Hidratos de Carbono	
-Almidón de maíz	307
-Lactosa	194
-Sacarosa	100
Fibra	
-Celulosa micronizada	50
Corrector Mineral	35
Corrector Vitamínico	10
Cloruro de Colina	2.5
L-Cisteína	1.5

DIETAS BASADAS EN LECHE DE CABRA (C y C⁺)	
	CANTIDAD (g/Kg dieta)
Proteína	
-Proteína procedente de liofilizado + caseína	200
Grasa	
-Procedente del liofilizado	100
Hidratos de Carbono	
-Almidón de maíz	302
-Lactosa	199
-Sacarosa	100
Fibra	
-Celulosa micronizada	50
Corrector Mineral	35
Corrector Vitamínico	10
Cloruro de Colina	2.5
L-Cisteína	1.5

El **corrector vitamínico** utilizado en las tres dietas ha sido elaborado con la siguiente composición:

CORRECTOR VITAMÍNICO	
	g/Kg de corrector
<i>Clorhidrato de tiamina</i>	0.600
<i>Riboflavina</i>	0.600
<i>Clorhidrato de piridoxina</i>	0.700
<i>Ácido nicotínico</i>	3.000
<i>Pantotenato cálcico</i>	1.600
<i>Ácido fólico</i>	0.200
<i>Biotina</i>	0.025
<i>Cianocobalamina</i>	0.002
<i>Vitamina A (acetato de retinol)</i>	0.800
<i>Vitamina D₃ (colecalfiferol)</i>	0.250
<i>Vitamina E (tocoferol)</i>	15.00
<i>Vitamina K (menadiona)</i>	0.075
<i>Sacarosa finamente dividida c.s.p.</i>	1000

El **corrector mineral** se prepara de acuerdo a las recomendaciones del IAN (1993) para la dieta estándar (E). Para las dietas basadas en leche, se emplean unos correctores específicos diseñados especialmente, que se elaboran teniendo en cuenta el aporte mineral de los liofilizados de leche empleados. Estos correctores constituyen el complemento mineral que les falta a las distintas dietas, para alcanzar las cantidades dictadas por el IAN (1993), en las dietas normales en Ca (E, V y C), mientras que se ha empleado un corrector que aportaba el doble de los requerimientos de Ca para las dietas suplementadas (E⁺, V⁺ y C⁺).

- Los requerimientos de Fe, Ca, P y Mg para la rata son:

Hierro: 45 mg/Kg dieta

Calcio: 5000 mg/Kg dieta

Fósforo: 3000 mg/Kg dieta

Magnesio: 513 mg/Kg dieta

CORRECTOR MINERAL			
	g/kg de corrector mineral		
	D. Estándar (E)	D. Leche Vaca(V)	D. Leche Cabra (C)
<i>Carbonato cálcico anhidro (40.4% Ca)*</i>	357.000*	54.660*	27.310*
<i>Fosfato potásico monobásico (22.76% P; 28.73% K)</i>	250.000	-	137.410
<i>Cloruro Sódico (39.34% Na; 60.66% Cl)</i>	74.000	74.000	74.000
<i>Sulfato potásico (44.87% K; 18.39% S)</i>	46.600	46.600	46.600
<i>Citrato potásico monohidratado (36.16% K)</i>	28.000	28.000	-
<i>Óxido de Magnesio (60.32 % Mg)</i>	24.000	4.620	-
<i>Citrato férrico (16.5% Fe)</i>	6.060	3.270	4.880
<i>Carbonato de cinc (52.14% Zn)</i>	1.650	0.770	1.060
<i>Carbonato de manganeso (47.79% Mn)</i>	0.630	0.630	0.630
<i>Carbonato cúprico (57.47% Cu)</i>	0.300	0.250	0.280
<i>Ioduro potásico (59.3% I)</i>	0.010	0.010	0.010
<i>Selenito sódico anhidro (41.79% Se)</i>	0.010	0.010	0.010
<i>Paramolibdato de amonio tetrahidratado (54.34% Mo)</i>	0.008	0.008	0.008
<i>Sacarosa finamente dividida c.s.p.</i>	1000	1000	1000

*Para las dietas enriquecidas en calcio (E⁺, V⁺, C⁺) la cantidad de carbonato cálcico empleado es el doble de los requerimientos para esta especie, obteniéndose así una dieta suplementada en calcio. Paralelamente, se ha ajustado el resto de componentes del corrector para que aporten la cantidad recomendada por el IAN (Reeves y col., 1993).

Se han determinado las concentraciones de Fe, Ca, P y Mg en las distintas dietas ensayadas cuya riqueza en mg/kg de dieta, queda reflejada en la siguiente tabla:

DIETAS CON CONTENIDO NORMAL DE CALCIO				
	Fe	Ca	P	Mg
ESTÁNDAR (E)	46.09	5400	3100	502
VACA (V)	44.71	5700	4000	528
CABRA (C)	44.14	5200	4000	504
DIETAS CON CONTENIDO DOBLE DE CALCIO				
ESTÁNDAR (E ⁺)	44.00	9720	3100	498
VACA (V ⁺)	44.79	10958	3800	525
CABRA (C ⁺)	46.00	10436	3930	502

3.3. TÉCNICAS ANÁLITICAS

3.3.1. MATERIA SECA

Es determinada como la parte de sustancia que no desaparece al someter la muestra a una temperatura de $105 \pm 2^{\circ}\text{C}$, hasta que alcance un peso constante. La materia seca se determina en las distintas dietas ensayadas, heces y en los órganos objeto de estudio.

3.3.2. LIOFILIZACIÓN

Para las dietas basadas en leche usamos como componente fundamental liofilizado de leche de vaca o cabra. La liofilización es un proceso que consiste en desecar un producto previamente congelado, lográndose la sublimación del hielo bajo vacío. Es por tanto el paso directo del hielo (sólido) a gas (vapor), sin que en ningún momento aparezca el agua en su estado líquido. Se obtiene una masa seca, esponjosa de más o menos el mismo tamaño que la masa congelada original, mejorando su estabilidad y siendo fácilmente redisuelta en agua. Se realiza a temperaturas inferiores a la de solidificación total, es decir, la leche está congelada a temperaturas entre 10 y 15 °C por debajo de su temperatura eutéctica para evitar la formación de coágulos. El proceso puede esquematizarse en tres etapas:

a) Congelación inicial: es una operación previa y obligatoria. Una congelación adecuada es la base de que el producto liofilizado presente óptimas condiciones de aspectos, conservación de sus propiedades originales y rápida rehidratación.

b) Sublimación o desecación primaria: es la etapa en la que la mayor parte del agua libre pasa a vapor. Los parámetros temperatura, presión y tiempo pueden ser modificados independientemente pero están íntimamente relacionados, no es posible modificar, sin que se afecten los otros, por lo que en todo momento deben ser considerados conjuntamente y analizados sus efectos.

c) Desorción o desecación secundaria: Su misión es eliminar las últimas trazas de vapor de agua, evaporando el agua no congelada ligada al producto. Se lleva a cabo a una temperatura inferior a la de desnaturalización del producto y se logra una humedad final hasta valores inferiores al 1 %.

En nuestro caso, la liofilización es llevada a cabo en un liofilizador modelo FTS SYSTEM TDS-3D-MP (FTS, New York, USA).

3.3.3. MATERIA GRASA

El contenido graso de los liofilizados y las dietas fue determinado tras hidrólisis hidroc্লórica por extracción con éter de petróleo (Fanderson, 1986).

3.3.4. ÁCIDOS GRASOS

El patrón de ácidos grasos de los liofilizados fue determinado por cromatografía de gas-líquido (GLC) según la técnica de Lepage y Roy (1986). La cromatografía de gases es una técnica cromatográfica en la que la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de gas inerte.

3.3.5. CONTENIDO EN NITRÓGENO Y COMPOSICIÓN DE AMINOÁCIDOS

El contenido en nitrógeno de los liofilizados y dietas se determina por el método Kjeldahl usando un factor de conversión de 6.25 para la dieta estándar y 6.38 para la proteína aportada por los liofilizados y las dietas basadas en leche (Kjeldahl, 1883). La composición de aminoácidos de las proteínas se determina por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) según el método Pico-Tag descrito previamente por Bennett y Solomon, (1986). Los liofilizados se homogeneizan en medio ácido para favorecer la solubilización de los péptidos más pequeños mientras que las proteínas de alto peso molecular, precipitan. El sobrenadante homogeneizado se somete a extracción en fase inversa con cartuchos C18 SEP-PAK (Waters,

Milford, MA). El eludido resultante ha sido fraccionado mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC). Las fracciones individuales son digeridas, tratadas con fenilisotiocianato (PITC) y sujetas a extracción con acetato de etilo en condiciones básicas. Los aminoácidos derivados de feniltiocarbamil se separan en la fase orgánica, mientras que los otros productos de digestión permanecen en la fase acuosa. La fase orgánica se analiza por RP-HPLC en una columna de análisis PICO-TAG (Waters, Milford, MA), monitorizando el eludido a 254 nm. Los aminoácidos son identificados y cuantificados comparando sus posiciones de elución y las áreas bajo las curvas con la de los patrones.

3.3.6. VITAMINAS A, D₃ y C

Las vitaminas A y D₃ (colecalfiferol) de los liofilizados son determinadas por Cromatografía Líquida-Espectrometría de Masas (LC-MS) según el método de Heudi y col., (2004). Los liofilizados son saponificados y las vitaminas son separadas mediante extracción en fase sólida en una columna CHROMABOND XTR (Macherey-Nagel, Düren, Germany). La detección y cuantificación de las vitaminas se ha realizado con un espectrómetro de masas MICROMASS modelo AUTOSPEC-Q (Micromass UK Ltd, Manchester, UK). El contenido en vitamina C de los liofilizados se determina mediante una reacción colorimétrica usando un kit comercial BOEHRINGER MANNHEIM (Boehringer Mannheim, Germany).

3.3.7. MINERALES TOTALES

Se determinan por mineralización total de la muestra por vía húmeda de uno o dos gramos de muestra (en el caso de la dieta, heces y hígado), de la pieza íntegra (en el resto de órganos) o de 0.5 mL (de sangre total). La muestra se coloca en un vaso de precipitado, se añaden 10-12 mL de ácido nítrico concentrado (riqueza del 69%) y se tapa con un vidrio de reloj. Se coloca en un baño de arena SELECTA (Selecta, Barcelona, España) a una temperatura de 70-80°C y se espera la aparición de vapores rojizos/anaranjados de óxido nítrico. Se añaden 2 mL de nítrico a la muestra, tantas veces como se necesario hasta la aparición de vapores blanquecinos. En este momento se comienza a añadir 10 mL de mezcla nítrico/perclórico (4:1,

v/v) en alícuotas de 2mL cada vez, hasta completar la mineralización. Una vez finalizada la mineralización, se deja enfriar, se filtra en papel Whatman del nº 41 (libre de cenizas), y se enrasa hasta un volumen final de 25 mL en un matraz aforado. Como resultado final obtenemos una solución transparente que emplearemos en la posterior determinación de minerales.

3.3.7.1. HIERRO, CALCIO Y MAGNESIO

Las concentraciones de Fe, Ca y Mg en dietas, órganos, heces y orina, así como la concentración de Mg en sangre total se determinan por espectrofotometría de absorción atómica (AAS) (PERKIN ELMER 1100B, Norwalk, USA) a partir de una muestra adecuada, previamente mineralizada por vía húmeda y diluida convenientemente, comparándose frente a una serie de patrones de concentración conocida. En la espectroscopía atómica se consigue que los átomos individuales de una especie interactúen con la radiación electromagnética.

La espectroscopia de absorción atómica, por tanto, consiste en la absorción de elementos. Si se aplica energía a un átomo, esta puede ser absorbida y un electrón externo puede ser promovido a una configuración conocida como estado excitado; dado que ese estado es inestable, el átomo retornará inmediatamente al estado fundamental, emitiendo energía.

La característica de interés en las medidas de absorción atómica, es la cantidad de luz absorbida por un mineral, a la longitud de onda resonante, cuando pasa a través de una nube atómica. A medida que el número de átomos se incrementa en el paso de la luz, la cantidad de luz absorbida también aumenta.

La ley de Beer, muestra la relación entre absorbancia y concentración del mineral, mediante la ecuación:

$$A = a \times b \times c$$

Donde:

A = absorbancia

a = coeficiente de absortividad (constante)

b = longitud del camino óptico

c = concentración

3.3.7.2. FÓSFORO

La concentración de P en dietas, heces, orina, fémur, músculo *longissimus dorsi*, cerebro, bazo y riñones se analiza por espectrofotometría visible mediante la técnica de Fiske-Subbarow (1925).

3.3.8. CALCIO Y FÓSFORO EN SUERO

Las concentraciones séricas de estos dos minerales se determinaron por colorimetría utilizando el método de Sarkar y Chauhan (1967) para el Ca y el método de Drewes (1972) para el P. El Ca iónico se determina con un autoanalizador, usando un electrodo selectivo NOVA 7 (Nova Biomedical, Wathman, MA, USA).

3.3.9. PARATHORMONA (PTH)

Los niveles séricos de PTH se determinan mediante radioinmunoensayo para el fragmento C-terminal de la hormona (Nichols Institute, San Juan Capistrano, CA, USA), medida con un contador PACKARD (Packard, Meriden, CT, USA).

3.3.10. CORTICOSTERONA

Los niveles séricos de corticosterona son determinados mediante un kit comercial de radioinmunoensayo ICN (ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa; CA, USA).

3.3.11. RECUENTO DE HEMATIES, HEMOGLOBINA, HEMATOCRITO, VOLUMEN CORPUSCULAR MEDIO Y PLAQUETAS

Efectuado en los días 40 y 54 a partir de sangre periférica obtenida de la vena caudal y recogida en un tubo con EDTA. Las determinaciones se han llevado a cabo con un autoanalizador hematológico SYSMEX KX-21 (Sysmex, Tokyo, Japan).

3.3.12. FERRITINA SÉRICA

Los niveles de ferritina sérica se determinan usando un sistema de quimioluminiscencia CHIRON DIAGNOSTICS ACS: 180 (Chiron Diagnostics Corporation, Norwood, MA, USA). La quimioluminiscencia es el fenómeno de emisión de radiación electromagnética, ultravioleta o visible, que se observa cuando una especie electrónicamente excitada, producida por una reacción química a temperatura ambiente regresa a su estado fundamental. En este caso la intensidad de emisión de luz es función de la concentración de la ferritina.

3.3.13. HIERRO SÉRICO, TIBC (CAPACIDAD TOTAL DE UNIÓN AL HIERRO) Y PORCENTAJE DE SATURACIÓN DE LA TRANSFERRINA

Para calcular la tasa de saturación de transferrina, primero se determina el TIBC colorimétricamente (capacidad total de fijación al Fe) y los niveles de Fe sérico enzimáticamente, usando un kit comercial SIGMA iron and total iron-binding capacity (Sigma Diagnostics, St. Louis, MI, USA). El porcentaje de saturación de la transferrina ha sido calculado usando la siguiente ecuación:

$$\text{Saturación de transferrina (\%)} = \text{concentración de Fe sérico } [\mu\text{g/l}] / \text{TIBC } [\mu\text{g/l}] \times 100$$

3.4. ÍNDICES BIOLÓGICOS

La metodología utilizada en el cálculo de los diferentes índices empleados es la siguiente:

* **Coefficiente de Digestibilidad Aparente (C.D.A.):**

$$C.D.A. = \frac{A}{I} \times 100$$

$$A = I - F$$

* **Balance (B):**

$$B = I - (F + U)$$

* **Ratio retención frente a ingesta (R/I):**

$$\% R/I = I - (F + U) \times 100/I$$

Las siglas empleadas en estas fórmulas, son las indicadas por la FAO/OMS (1966):

A = Absorbido

I = Ingerido

F = Excreción fecal

U = Excreción urinaria

B = Balance

*** Eficacia de Regeneración de Hemoglobina (E.R.H.) (Mahoney and Hendricks, 1982):**

$$\% E.R.H. = \frac{mg Fe Hb Final - mg Fe Hb Inicial}{mg Fe ingerido} \times 100$$

$$mg Fe Hb Inicial = Peso Inicial \times \frac{mL sangre}{g Peso corporal} \times \frac{Hb Inicial}{100} \times \frac{mg Fe}{g Hb}$$

$$mg Fe Hb Final = Peso Final \times \frac{mL sangre}{g Peso corporal} \times \frac{Hb Final}{100} \times \frac{mg Fe}{g Hb}$$

Se asume que mL de sangre/g de Peso corporal = 0.067 y que mg Fe/ g Hb = 3.35, de manera que las ecuaciones quedan:

$$mg Fe Hb Inicial = Peso Inicial \times 0.067 \times \frac{Hb Inicial}{100} \times 3.35$$

$$mg Fe Hb Final = Peso Final \times 0.067 \times \frac{Hb Final}{100} \times 3.35$$

3.5. CONTROL DE CALIDAD

Dada la importancia de una exacta determinación de los distintos parámetros estudiados se ha llevado a cabo un control de calidad de estas determinaciones. Este control incluye el análisis de un conjunto de patrones primarios y muestras problemas. Los estándar primarios son de dos tipos: propios de cada determinación y sueros controles liofilizados (BCR certified reference material CRM 063R; Community Bureau of Reference, Brussels, Belgium). Los valores derivados del análisis de este material de referencia son:

-
- Fe: 2.23 ± 0.29 $\mu\text{g/g}$ (valor certificado: 2.32 ± 0.23 $\mu\text{g/g}$).
 - Ca: 13.21 ± 0.15 mg/g (valor certificado: 13.49 ± 0.10 mg/g).
 - P: 10.97 ± 0.17 mg/g (valor certificado: 11.10 ± 0.13 mg/g).
 - Mg: 1.238 ± 0.030 mg/g (valor certificado: 1.263 ± 0.024 mg/g).

En nuestro caso, tanto la desviación estándar de la media de los patrones primarios entre ellos, como en relación con las muestras problema no fueron significativos en ningún caso a lo largo de todo el tiempo de experimentación en que se ha realizado el trabajo.

3.6. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Se ha calculado el valor medio (\bar{x}) y el error estándar de la media (E.E.M.) para cada parámetro estudiado.

$$E.E.M. = \frac{\sigma_{n-1}}{\sqrt{n}}$$

Se usa el análisis de la varianza (One-Way ANOVA) y el test “*post hoc*” de Tukey para comparar las diferentes dietas suministradas en los distintos grupos (controles y anémicas o contenido normal y doble de Ca en la dieta).

Para comparar entre grupos de animales dentro de la misma dieta (controles frente a anémicas y nivel normal de Ca frente a doble de Ca), usamos el test de la “*t de Student*” para muestras independientes.

Para determinar los efectos de la anemia, tipo de dieta y sus interacciones (dieta x anemia), los datos son analizados mediante Two-Way ANOVA. Las diferencias son consideradas significativas para todos los tratamientos estadísticos a un nivel de $P < 0.05$. Todos los análisis se han efectuado con el paquete estadístico “Statistical Package for Social Sciences” (SPSS, versión 14.0, 2006).



Resultados y Discusión

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. TABLAS Y FIGURAS

TABLA 1- PARÁMETROS HEMATÓLOGICOS EN EL DIA 40 EN RATAS ALIMENTADAS CON UNA DIETA NORMAL O CARENTE DE HIERRO (MODELO DE ANEMIA FEROPÉNICA)

PARÁMETRO	GRUPO CONTROL DIETA CON CONTENIDO NORMAL DE HIERRO (n =60)	GRUPO FERRODEFICIENTE DIETA CON BAJO CONTENIDO DE HIERRO (n =60) *
Recuento hematíes (10 ¹² /L)	7.10 ± 0.14	6.48 ± 0.16
VCM (fL)	55.11 ± 0.22	39.38 ± 0.71
Hematocrito (%)	38.60 ± 0.77	27.59 ± 0.48
Plaquetas (10 ⁹ /L)	738 ± 24.5	1360 ± 67.1
Concentración de Hemoglobina (g/L)	128.5 ± 2.8	78.4 ± 2.6
Fe sérico (µg/L)	1392 ± 123	698 ± 56
Ferritina sérica (µg/L)	82.32 ± 2.71	50.21 ± 1.28
Saturación de transferrina (%)	47.32 ± 7.19	3.71 ± 0.31
TIBC (µg/L)	2837 ± 205	17915 ± 733

* Todos los parámetros hematológicos son significativamente distintos de sus respectivos controles (P<0.001) mediante *Student's t Test*.

TABLA 2.- UTILIZACIÓN DIGESTIVA Y METABÓLICA DE HIERRO EN RATAS CONTROLES Y FERRODEFICIENTES ALIMENTADAS CON DISTINTAS DIETAS Y CONTENIDO NORMAL O DOBLE DE CALCIO

CONTENID O DE CALCIO EN LA DIETA	DIETA ESTÁNDAR (E)		DIETA LECHE VACA (V)		DIETA LECHE CABRA (C)	
	GRUPO CONTROL	GRUPO ANEMICAS	GRUPO CONTROL	GRUPO ANEMICAS	GRUPO CONTROL	GRUPO ANEMICAS
S.S. ingerida (g/día)	17.23 ± 0.51	19.02 ± 0.88	14.67 ± 0.61	15.44 ± 0.23	14.01 ± 0.51	13.77 ± 0.22
	17.22 ± 0.42	17.58 ± 0.74	14.71 ± 0.59	15.93 ± 0.52	14.63 ± 0.44	14.47 ± 0.76
Ingerido (µg/día)	792.75 ± 23.36	874.93 ± 13.05	655.950 ± 27.21	685.424 ± 25.41	614.67 ± 22.42	605.91 ± 9.72
	757.71 ± 18.51	773.51 ± 32.32	656.67 ± 26.27	711.27 ± 23.16	673.16 ± 20.29	665.42 ± 34.88
Fecal (µg/día)	577.40 ± 35.04	510.71 ± 13.58	461.52 ± 25.88	381.17 ± 13.06	387.62 ± 17.34	286.69 ± 6.10
	579.40 ± 20.88	506.12 ± 31.59	495.28 ± 16.96	446.01 ± 17.03	417.85 ± 19.76	299.55 ± 19.77
Absorbido (µg/día)	215.36 ± 21.43	364.21 ± 12.90	194.43 ± 13.43	304.25 ± 19.00	227.02 ± 10.68	302.27 ± 9.71
	212.69 ± 16.05	332.55 ± 14.07	161.39 ± 13.88	285.67 ± 15.05	255.30 ± 21.79	365.87 ± 17.19
CDA (%)	27.47 ± 2.91	41.58 ± 1.28	29.92 ± 1.98	44.03 ± 1.91	36.98 ± 1.33	52.62 ± 0.90
	23.59 ± 2.01	34.58 ± 1.89	24.22 ± 1.68	37.61 ± 1.59	37.78 ± 2.21	55.20 ± 1.02
Urinario (µg/día)	5.96 ± 0.69	8.91 ± 1.25	4.51 ± 0.55	4.30 ± 0.50	4.62 ± 0.27	6.81 ± 1.09
	6.16 ± 0.49	6.29 ± 0.77	3.19 ± 0.27	3.92 ± 0.58	5.59 ± 1.13	3.15 ± 0.53
Retenido (µg/día)	209.40 ± 21.71	355.27 ± 12.81	189.92 ± 13.51	299.95 ± 18.80	222.40 ± 10.68	295.46 ± 9.64
	206.53 ± 16.09	326.26 ± 14.26	156.20 ± 13.85	280.76 ± 15.03	249.72 ± 21.82	362.72 ± 17.05
R/I (%)	26.71 ± 2.94	40.59 ± 1.41	29.21 ± 1.97	43.40 ± 1.90	36.22 ± 1.34	51.50 ± 0.81
	22.70 ± 2.00	43.81 ± 1.81	24.31 ± 1.51	36.72 ± 1.58	36.94 ± 2.84	54.72 ± 1.01

TABLA 3.- DEPÓSITO DE HIERRO EN ÓRGANOS DE RATAS CONTROLES Y FERRODEFICIENTES ALIMENTADAS CON DISTINTAS DIETAS Y CONTENIDO NORMAL O DOBLE DE CALCIO

		DIETA ESTÁNDAR (E)		DIETA LECHE VACA (V)		DIETA LECHE CABRA (C)	
CONTENIDO DE CALCIO EN LA DIETA	GRUPO CONTROL	GRUPO ANEMICAS	GRUPO CONTROL	GRUPO ANEMICAS	GRUPO CONTROL	GRUPO ANEMICAS	GRUPO ANEMICAS
Estémón (µg/g SS)	146.01 ± 5.39	158.71 ± 11.28	109.91 ± 2.58	78.88 ± 2.47	148.20 ± 4.27	111.29 ± 2.68	114.19 ± 8.28
Bazo (µg/g SS)	2397.31 ± 180.32	826.59 ± 100.79	2483.32 ± 124.48	405.01 ± 54.29	2810.42 ± 277.43	718.85 ± 68.47	703.51 ± 67.29
Hígado (µg/g SS)	816.51 ± 49.11	558.01 ± 45.11	655.02 ± 41.29	338.87 ± 19.69	692.80 ± 32.91	367.82 ± 38.64	452.73 ± 48.28

TABLA 4.- PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS EN RATAS CONTROLADAS Y FERRODEFICIENTES ALIMENTADAS CON DISTINTAS DIETAS Y CONTENIDO NORMAL O DOBLE DE CALCIO

	DIETA ESTÁNDAR (E)		DIETA LECHE VACA (V)		DIETA LECHE CABRA (C)	
	GRUPO CONTROL	GRUPO ANEMICAS	GRUPO CONTROL	GRUPO ANEMICAS	GRUPO CONTROL	GRUPO ANEMICAS
Recuento hemáticos (10¹²/L)						
NORMAL	7.38 ± 0.20	7.81 ± 0.23	6.90 ± 0.21	7.25 ± 0.08	7.44 ± 0.17	8.24 ± 0.19
DOBLE	6.19 ± 0.15	8.19 ± 0.19	6.16 ± 0.13	6.24 ± 0.24	6.22 ± 0.11	7.25 ± 0.20
VCM (fL)						
NORMAL	55.8 ± 0.7	49.0 ± 0.7	53.3 ± 0.5	45.7 ± 0.8	54.7 ± 0.5	48.8 ± 1.1
DOBLE	54.2 ± 0.5	46.8 ± 0.4	57.1 ± 0.61	42.0 ± 0.8	53.6 ± 0.6	50.3 ± 0.8
Hematocrito (%)						
NORMAL	44.1 ± 1.5	41.6 ± 1.0	41.6 ± 1.5	39.7 ± 1.0	43.0 ± 1.1	42.0 ± 1.4
DOBLE	32.4 ± 0.9	38.3 ± 0.8	33.3 ± 1.0	33.5 ± 0.9	32.4 ± 0.9	39.6 ± 1.1
Plaquetas (10⁹/L)						
NORMAL	666 ± 22	859 ± 44	589 ± 30	918 ± 55	713 ± 31	886 ± 50
DOBLE	810 ± 11	840 ± 55	848 ± 23	1003 ± 16	769 ± 27	870 ± 30
ERH (%)						
NORMAL	15.71 ± 0.90	26.90 ± 1.12	16.70 ± 1.31	29.01 ± 1.21	21.39 ± 1.48	35.82 ± 1.62
DOBLE	14.01 ± 1.0	24.49 ± 1.71	14.91 ± 1.32	24.89 ± 3.22	17.89 ± 1.21	39.12 ± 1.89
Fe sérico (µg/L)						
NORMAL	1819 ± 136	1431 ± 103	1524 ± 91	884 ± 14	1795 ± 84	1731 ± 90
DOBLE	1410 ± 118	1088 ± 91	1308 ± 50	726 ± 69	1566 ± 125	1582 ± 103
Ferritina sérica (µg/L)						
NORMAL	98.6 ± 2.7	79.0 ± 1.9	87.1 ± 2.2	65.8 ± 1.3	108.1 ± 3.9	98.0 ± 4.2
DOBLE	80.8 ± 2.3	63.7 ± 1.4	76.3 ± 1.4	55.8 ± 3.1	95.8 ± 3.7	90.2 ± 2.6
Saturación de transferrina (%)						
NORMAL	54.8 ± 6.1	48.7 ± 4.5	48.3 ± 5.8	32.2 ± 3.1	55.2 ± 5.5	51.7 ± 5.2
DOBLE	44.9 ± 5.8	39.3 ± 3.8	42.3 ± 5.3	27.3 ± 2.7	48.9 ± 5.3	47.6 ± 5.2
TIBC (µg/L)						
NORMAL	3319 ± 229	2938 ± 197	3155 ± 217	2745 ± 241	3252 ± 221	3348 ± 240
DOBLE	3042 ± 213	2563 ± 178	2945 ± 198	2610 ± 233	3023 ± 214	3197 ± 235

TABLA 5.- UTILIZACIÓN DIGESTIVA Y METABÓLICA DE CALCIO EN RATAS CONTROLADAS Y FERRODEFICIENTES ALIMENTADAS CON DISTINTAS DIETAS Y CONTENIDO NORMAL O DOBLE DE CALCIO

CONTENIDO DE CALCIO EN LA DIETA	DIETA ESTÁNDAR (E)		DIETA LECHE VACA (V)		DIETA LECHE CABRA (C)	
	GRUPO CONTROL	GRUPO ANEMICAS	GRUPO CONTROL	GRUPO ANEMICAS	GRUPO CONTROL	GRUPO ANEMICAS
S.S. ingerida (g/día)						
NORMAL	17.23 ± 0.51	19.02 ± 0.88	14.67 ± 0.61	15.44 ± 0.23	14.01 ± 0.51	13.77 ± 0.22
DOBLE	17.22 ± 0.42	17.58 ± 0.74	14.71 ± 0.59	15.93 ± 0.52	14.63 ± 0.44	14.47 ± 0.76
Ingerido (mg/día)						
NORMAL	93.07 ± 2.74	102.71 ± 1.53	82.89 ± 3.44	86.62 ± 3.21	69.62 ± 4.01	71.61 ± 1.15
DOBLE	167.38 ± 4.10	170.88 ± 7.15	161.20 ± 6.45	174.61 ± 5.69	139.86 ± 4.24	151.14 ± 7.92
Fecal (mg/día)						
NORMAL	45.63 ± 2.69	61.52 ± 1.73	39.12 ± 1.82	49.30 ± 1.99	23.79 ± 2.20	29.53 ± 6.11
DOBLE	120.05 ± 3.66	127.91 ± 5.34	112.25 ± 4.47	127.40 ± 5.21	77.26 ± 4.20	95.35 ± 6.84
Absorbido (mg/día)						
NORMAL	44.44 ± 3.32	41.19 ± 2.10	43.28 ± 2.48	37.32 ± 1.39	45.83 ± 2.34	42.08 ± 2.16
DOBLE	47.33 ± 2.66	42.96 ± 2.00	48.95 ± 2.76	47.20 ± 1.99	62.61 ± 3.89	55.78 ± 7.10
CDA (%)						
NORMAL	50.84 ± 2.79	40.03 ± 1.77	52.65 ± 1.45	43.11 ± 0.61	66.26 ± 1.72	58.57 ± 2.41
DOBLE	28.26 ± 1.26	25.11 ± 0.44	30.30 ± 0.97	27.15 ± 0.96	44.77 ± 2.57	36.59 ± 2.65
Urinario (mg/día)						
NORMAL	8.02 ± 0.85	7.38 ± 0.95	3.12 ± 0.66	5.72 ± 0.81	4.79 ± 0.57	5.66 ± 0.82
DOBLE	7.20 ± 0.42	8.13 ± 0.91	5.62 ± 1.13	8.03 ± 1.40	5.17 ± 0.58	6.56 ± 1.03
Retenido (mg/día)						
NORMAL	39.43 ± 3.45	33.82 ± 2.42	40.66 ± 2.35	31.59 ± 1.46	41.05 ± 1.97	36.41 ± 2.31
DOBLE	40.14 ± 2.77	34.84 ± 2.06	43.33 ± 2.85	39.18 ± 2.65	57.44 ± 3.77	49.22 ± 6.44
R/I (%)						
NORMAL	42.32 ± 3.31	32.82 ± 2.15	48.92 ± 1.53	36.46 ± 1.16	59.55 ± 1.95	50.65 ± 2.75
DOBLE	23.96 ± 1.50	20.31 ± 0.77	26.71 ± 1.07	22.49 ± 1.47	41.06 ± 2.49	32.25 ± 3.45

TABLA 6.- UTILIZACIÓN DIGESTIVA Y METABÓLICA DE FÓSFORO EN RATAS CONTROLADAS Y FERRODEFICIENTES ALIMENTADAS CON DISTINTAS DIETAS Y CONTENIDO NORMAL O DOBLE DE CALCIO

	DIETA ESTÁNDAR (E)		DIETA LECHE VACA (V)		DIETA LECHE CABRA (C)	
	GRUPO CONTROL	GRUPO ANEMICAS	GRUPO CONTROL	GRUPO ANEMICAS	GRUPO CONTROL	GRUPO ANEMICAS
CONTENIDO DE CALCIO EN LA DIETA						
NORMAL	17.23 ± 0.51	19.02 ± 0.88	14.67 ± 0.61	15.44 ± 0.23	14.01 ± 0.51	13.77 ± 0.22
DOBLE	17.22 ± 0.42	17.58 ± 0.74	14.71 ± 0.59	15.93 ± 0.52	14.63 ± 0.44	14.47 ± 0.76
S.S. ingerida (g/día)						
NORMAL	53.42 ± 1.57	58.96 ± 0.88	58.86 ± 2.44	61.51 ± 2.28	56.05 ± 2.04	55.25 ± 0.89
DOBLE	53.38 ± 1.31	54.50 ± 2.28	55.67 ± 2.23	60.29 ± 1.96	57.51 ± 1.53	56.85 ± 2.98
Ingerido (mg/día)						
NORMAL	16.77 ± 0.55	21.37 ± 0.78	23.89 ± 1.38	29.00 ± 0.53	9.00 ± 0.56	11.04 ± 0.74
DOBLE	26.44 ± 0.91	33.88 ± 1.75	32.92 ± 1.09	43.30 ± 1.16	17.18 ± 0.73	24.47 ± 1.06
Absorbido (mg/día)						
NORMAL	36.65 ± 1.12	37.59 ± 0.88	34.98 ± 1.78	32.50 ± 2.01	47.04 ± 1.88	44.21 ± 1.14
DOBLE	26.94 ± 1.35	20.62 ± 0.95	22.74 ± 1.46	17.00 ± 0.97	40.34 ± 1.75	32.38 ± 2.21
CDA (%)						
NORMAL	68.60 ± 0.47	63.76 ± 1.18	59.40 ± 1.63	52.42 ± 1.43	83.85 ± 0.95	79.98 ± 1.38
DOBLE	50.34 ± 1.78	39.18 ± 1.73	40.53 ± 1.40	28.04 ± 0.87	69.98 ± 1.43	56.61 ± 2.36
Urinario (mg/día)						
NORMAL	13.96 ± 0.88	18.68 ± 0.86	15.58 ± 1.63	17.25 ± 0.43	21.05 ± 1.77	22.81 ± 1.89
DOBLE	10.51 ± 0.37	6.65 ± 0.73	10.21 ± 1.28	8.60 ± 0.62	21.08 ± 0.43	16.35 ± 0.33
Retenido (mg/día)						
NORMAL	22.69 ± 1.24	18.92 ± 1.18	19.40 ± 1.28	15.25 ± 1.68	25.99 ± 1.56	21.40 ± 2.10
DOBLE	16.44 ± 1.09	13.98 ± 1.01	12.53 ± 0.75	8.39 ± 0.73	19.26 ± 1.99	16.03 ± 2.35
R/I (%)						
NORMAL	42.34 ± 1.47	32.10 ± 1.97	33.28 ± 2.06	24.21 ± 1.91	46.61 ± 2.57	38.59 ± 3.64
DOBLE	30.64 ± 1.55	25.57 ± 1.37	22.63 ± 1.22	13.88 ± 1.09	33.04 ± 2.59	27.04 ± 2.66

TABLA 7.- DEPOSITO DE CALCIO EN ORGANOS DE RATAS CONTROLES Y FERRODEFICIENTES ALIMENTADAS CON DISTINTAS DIETAS Y CONTENIDO NORMAL O DOBLE DE CALCIO

CONTENIDO DE CALCIO EN LA DIETA	DIETA ESTÁNDAR (E)		DIETA LECHE VACA (V)		DIETA LECHE CABRA (C)	
	GRUPO CONTROL	GRUPO ANEMICAS	GRUPO CONTROL	GRUPO ANEMICAS	GRUPO CONTROL	GRUPO ANEMICAS
Fémur (mg./g SS)	176.94 ± 2.93	183.15 ± 5.48	223.31 ± 3.62	202.11 ± 2.53	247.84 ± 2.30	245.14 ± 3.70
	203.24 ± 3.75	174.60 ± 4.86	206.21 ± 2.34	223.38 ± 2.91	234.77 ± 3.63	251.22 ± 3.17
Esternón (mg./g SS)	79.58 ± 1.73	77.94 ± 1.61	79.89 ± 2.68	77.81 ± 2.10	88.97 ± 1.17	87.88 ± 1.28
	83.71 ± 2.59	98.85 ± 3.16	89.31 ± 2.19	80.11 ± 2.93	93.39 ± 3.3	83.13 ± 2.59
Músculo (mg./g SS)	4.98 ± 0.37	6.24 ± 0.36	5.57 ± 0.83	6.61 ± 0.52	6.64 ± 0.64	8.51 ± 0.33
	3.06 ± 0.25	5.40 ± 0.54	6.23 ± 0.69	7.98 ± 0.97	9.02 ± 1.04	12.22 ± 0.68

TABLA 8- DEPÓSITO DE FÓSFORO EN ÓRGANOS DE RATAS CONTROLES Y FERRODEFICIENTES ALIMENTADAS CON DISTINTAS DIETAS Y CONTENIDO NORMAL O DOBLE DE CALCIO

CONTENIDO DE CALCIO EN LA DIETA	DIETA ESTÁNDAR (E)		DIETA LECHE VACA (V)		DIETA LECHE CABRA (C)	
	GRUPO CONTROL	GRUPO ANEMICAS	GRUPO CONTROL	GRUPO ANEMICAS	GRUPO CONTROL	GRUPO ANEMICAS
Fémur (mg/g SS)	126.52 ± 3.17	159.02 ± 9.16	102.23 ± 3.11	106.01 ± 2.79	114.38 ± 2.82	132.03 ± 2.51
Músculo (mg/g SS)	125.49 ± 4.25	110.89 ± 4.49	115.79 ± 2.63	108.15 ± 1.11	126.78 ± 2.22	114.97 ± 3.63
Cerebro (mg/g SS)	9.92 ± 0.33	10.98 ± 0.54	11.15 ± 0.50	10.71 ± 0.49	13.68 ± 0.71	13.09 ± 0.86
Bazo (mg/g SS)	9.72 ± 0.50	9.48 ± 0.45	12.96 ± 0.88	10.79 ± 0.51	12.75 ± 0.50	14.31 ± 0.37
Riñones (mg/g SS)	13.01 ± 0.41	15.01 ± 0.39	10.30 ± 0.21	13.98 ± 0.29	14.91 ± 0.49	17.89 ± 0.99
Hígado (mg/g SS)	14.51 ± 0.55	14.49 ± 0.66	14.32 ± 0.41	14.39 ± 0.32	15.14 ± 0.67	16.88 ± 0.82
Testículo (mg/g SS)	15.76 ± 0.43	14.38 ± 0.45	15.18 ± 0.79	14.30 ± 0.31	15.43 ± 0.81	16.62 ± 0.73
Óvulo (mg/g SS)	14.93 ± 0.36	15.05 ± 0.35	15.44 ± 0.84	15.55 ± 0.48	17.44 ± 0.60	19.86 ± 0.99
Corazón (mg/g SS)	9.80 ± 0.30	11.21 ± 0.72	10.81 ± 0.32	10.42 ± 0.11	11.49 ± 0.32	12.23 ± 0.43
Esplén (mg/g SS)	11.14 ± 0.44	10.89 ± 0.42	11.12 ± 0.51	11.39 ± 0.41	12.05 ± 0.37	11.39 ± 0.23

TABLA 9- CONCENTRACIONES SÉRICAS DE CALCIO (IÓNICO Y TOTAL), FOSFORO, PTH, CORTICOSTERONA Y MAGNESIO EN SANGRE TOTAL DE RATAS CONTROLES Y FERRODEFICIENTES ALIMENTADAS CON DISTINTAS DIETAS Y CONTENIDO NORMAL O DOBLE DE CALCIO

CONTENIDO DE CALCIO EN LA DIETA	DIETA ESTÁNDAR (E)		DIETA LECHE VACA (V)		DIETA LECHE CABRA (C)	
	GRUPO CONTROL	GRUPO ANEMICAS	GRUPO CONTROL	GRUPO ANEMICAS	GRUPO CONTROL	GRUPO ANEMICAS
Ca total (mg/L)	NORMAL	98.3 ± 1.2	96.9 ± 0.8	94.2 ± 1.8	109.9 ± 1.7	106.3 ± 0.8
	DOBLE	93.1 ± 3.0	96.4 ± 1.4	95.7 ± 1.0	112.1 ± 1.8	107.0 ± 1.8
Ca ionizado (mg/L)	NORMAL	56.1 ± 0.9	53.5 ± 0.5	53.7 ± 1.1	62.6 ± 0.9	58.0 ± 0.5
	DOBLE	53.1 ± 0.7	54.4 ± 0.6	54.5 ± 0.7	63.5 ± 0.8	61.1 ± 0.8
P sérico (mg/L)	NORMAL	78.3 ± 1.3	74.5 ± 1.8	69.7 ± 1.4	87.2 ± 1.1	86.2 ± 1.3
	DOBLE	66.1 ± 0.6	62.8 ± 1.52	58.0 ± 1.4	74.9 ± 1.8	72.8 ± 1.8
Parathormona (pg/mL)	NORMAL	115.7 ± 2.4	120.3 ± 3.5	121.8 ± 4.3	96.8 ± 2.9	98.6 ± 3.5
	DOBLE	118.3 ± 2.9	117.8 ± 2.7	120.3 ± 3.9	94.3 ± 2.5	95.7 ± 2.9
Corticosterona (pg/mL)	NORMAL	1039 ± 82	1147 ± 26	1057 ± 67	1034 ± 43	1090 ± 47
	DOBLE	1066 ± 35	1106 ± 26	1154 ± 31	1037 ± 23	1063 ± 27
Mg sangre total (mg/L)	NORMAL	8.33 ± 0.31	8.74 ± 0.84	8.43 ± 0.25	8.16 ± 0.51	9.04 ± 0.40
	DOBLE	9.19 ± 0.42	9.15 ± 0.47	8.74 ± 0.74	8.34 ± 0.63	8.63 ± 0.50

TABLA 10.- UTILIZACIÓN DIGESTIVA Y METABÓLICA DE MAGNESIO EN RATAS CONTROLES Y FERRODEFICIENTES ALIMENTADAS CON DISTINTAS DIETAS Y CONTENIDO NORMAL O DOBLE DE CALCIO

CONTENIDO DE CALCIO EN LA DIETA	DIETA ESTÁNDAR (E)		DIETA LECHE VACA (V)		DIETA LECHE CABRA (C)	
	GRUPO CONTROL	GRUPO ANEMICAS	GRUPO CONTROL	GRUPO ANEMICAS	GRUPO CONTROL	GRUPO ANEMICAS
S.S. ingerida (g/día)	17.23 ± 0.51	19.02 ± 0.88	14.67 ± 0.61	15.44 ± 0.23	14.01 ± 0.51	13.77 ± 0.22
Ingerido (mg/día)	17.22 ± 0.42	17.58 ± 0.74	14.71 ± 0.59	15.93 ± 0.52	14.63 ± 0.44	14.47 ± 0.76
Fecal (mg/día)	8.65 ± 0.25	9.55 ± 0.14	7.81 ± 0.33	8.12 ± 0.29	7.04 ± 0.26	6.94 ± 0.11
Absorbido (mg/día)	8.58 ± 0.21	8.78 ± 0.37	7.69 ± 0.34	8.39 ± 0.30	7.35 ± 0.22	7.26 ± 0.38
Fecal (mg/día)	3.27 ± 0.24	3.87 ± 0.21	2.78 ± 0.20	3.59 ± 0.14	1.02 ± 0.11	1.33 ± 0.14
Absorbido (mg/día)	4.06 ± 0.12	4.38 ± 0.40	3.03 ± 0.18	4.46 ± 0.21	1.58 ± 0.13	1.80 ± 0.19
Absorbido (mg/día)	5.38 ± 0.23	5.68 ± 0.42	5.03 ± 0.26	4.53 ± 0.22	6.02 ± 0.19	5.61 ± 0.13
Absorbido (mg/día)	4.52 ± 0.16	4.40 ± 0.12	4.66 ± 0.25	3.93 ± 0.17	5.77 ± 0.23	5.46 ± 0.19
CDA (%)	62.24 ± 2.33	59.63 ± 1.70	64.31 ± 1.83	56.21 ± 1.11	85.70 ± 1.17	82.01 ± 1.93
Urinario (mg/día)	52.60 ± 1.06	50.27 ± 1.12	54.71 ± 1.60	46.79 ± 1.29	79.71 ± 2.04	75.88 ± 1.46
Retenido (mg/día)	2.83 ± 0.13	2.81 ± 0.19	2.62 ± 0.15	3.06 ± 0.07	2.68 ± 0.23	2.24 ± 0.17
R/I (%)	2.30 ± 0.12	3.09 ± 0.11	3.11 ± 0.37	3.02 ± 0.15	2.35 ± 0.27	2.16 ± 0.18
R/I (%)	2.55 ± 0.19	2.87 ± 0.22	2.41 ± 0.17	1.24 ± 0.20	3.34 ± 0.20	2.92 ± 0.19
R/I (%)	2.15 ± 0.13	0.91 ± 0.19	1.55 ± 0.30	1.04 ± 0.41	3.42 ± 0.24	3.10 ± 0.22
R/I (%)	29.42 ± 1.95	30.71 ± 2.17	30.41 ± 1.89	19.38 ± 1.49	47.80 ± 2.78	47.19 ± 2.30
R/I (%)	25.10 ± 1.42	14.19 ± 1.12	24.10 ± 4.19	14.07 ± 1.66	44.71 ± 2.69	45.58 ± 1.09

TABLA 11.- DEPOSITO DE MAGNESIO EN ORGANOS DE RATAS CONTROLES Y FERRODEFICIENTES ALIMENTADAS CON DISTINTAS DIETAS Y CONTENIDO NORMAL O DOBLE DE CALCIO

CONTENIDO DE CALCIO EN LA DIETA	DIETA ESTÁNDAR (E)		DIETA LECHE VACA (V)		DIETA LECHE CABRA (C)	
	GRUPO CONTROL	GRUPO ANEMICAS	GRUPO CONTROL	GRUPO ANEMICAS	GRUPO CONTROL	GRUPO ANEMICAS
Fémur (mg/g SS)						
NORMAL	4.30 ± 0.21	3.72 ± 0.18	4.25 ± 0.04	3.67 ± 0.07	4.43 ± 0.11	3.95 ± 0.08
DOBLE	4.00 ± 0.21	4.10 ± 0.25	4.20 ± 0.05	3.48 ± 0.08	4.11 ± 0.06	4.16 ± 0.10
Esternón (mg/g SS)						
NORMAL	2.40 ± 0.05	2.25 ± 0.08	2.24 ± 0.03	2.33 ± 0.07	2.18 ± 0.05	2.16 ± 0.05
DOBLE	2.04 ± 0.03	2.21 ± 0.06	2.14 ± 0.02	2.11 ± 0.04	2.07 ± 0.05	2.05 ± 0.06
Músculo (mg/g SS)						
NORMAL	1.00 ± 0.04	0.89 ± 0.03	1.01 ± 0.04	0.93 ± 0.04	0.90 ± 0.03	0.85 ± 0.03
DOBLE	1.02 ± 0.07	0.92 ± 0.03	0.99 ± 0.03	0.96 ± 0.02	0.99 ± 0.02	0.90 ± 0.04

LEYENDAS USADAS







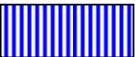





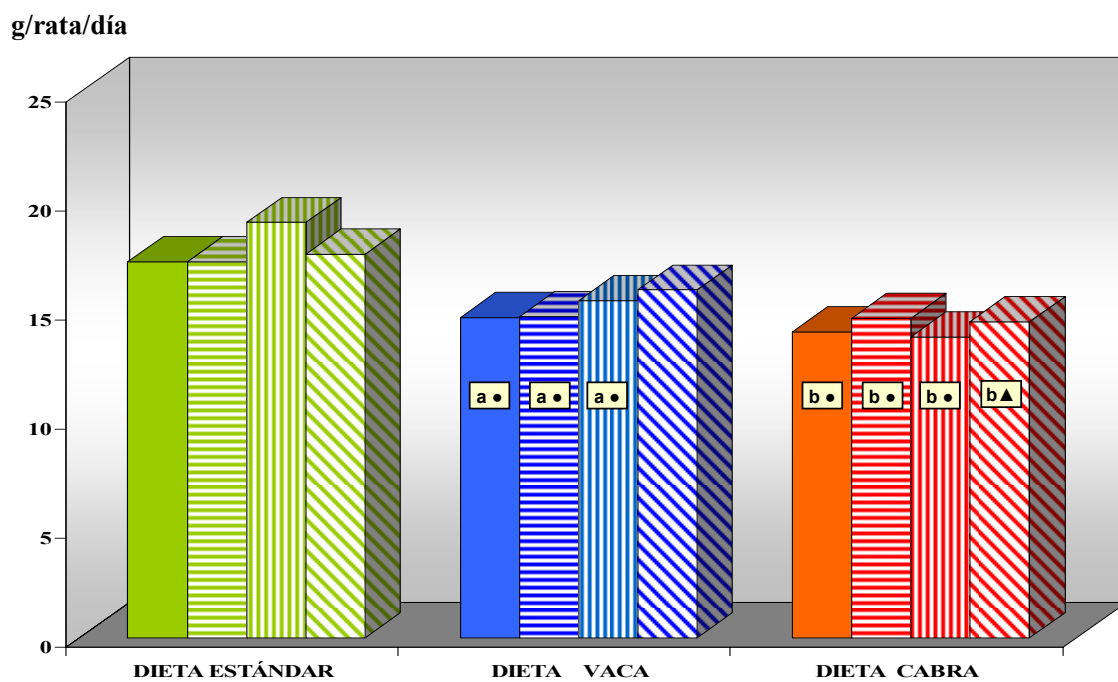
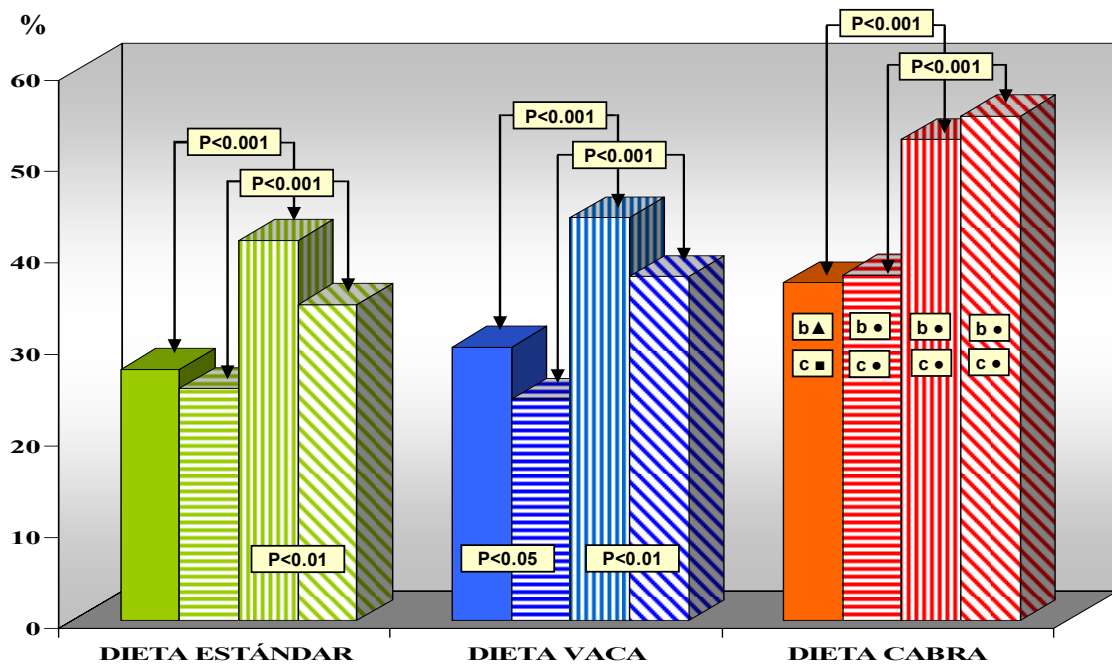
DIETA ESTÁNDAR	{		Grupo Control Normal
			Grupo Control Doble
			Grupo Anémicas Normal
			Grupo Anémicas Doble
DIETA VACA	{		Grupo Control Normal
			Grupo Control Doble
			Grupo Anémicas Normal
			Grupo Anémicas Doble
DIETA CABRA	{		Grupo Control Normal
			Grupo Control Doble
			Grupo Anémicas Normal
			Grupo Anémicas Doble
COMPARACIÓN ENTRE DIETAS	{	a: Estándar-Vaca	NIVEL DE SIGNIFICACIÓN: ● : p< 0.001 ▲ : p< 0.01 ■ : p< 0.05
		b: Estándar-Cabra	
		c: Vaca-Cabra	

Fig. 1.- DIETA INGERIDA



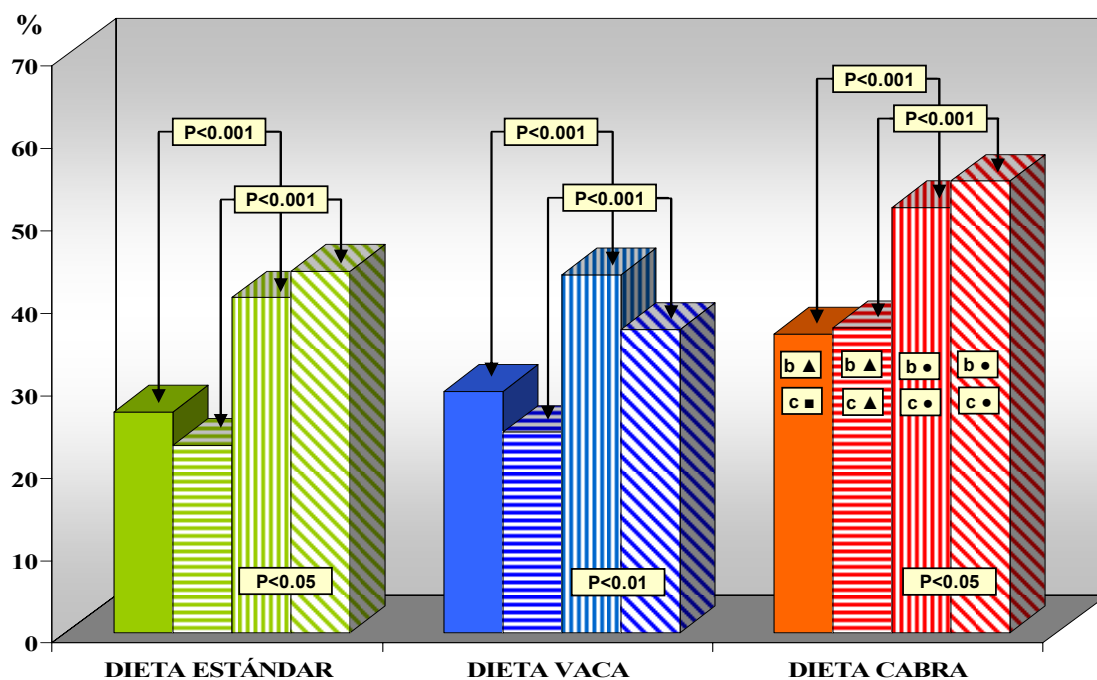
TWO-WAY ANOVA			
CONTENIDO DE Ca EN LA DIETA	DIETA	ANEMIA	DIETA X ANEMIA
NORMAL	P<0.001	P<0.01	NS
DOBLE	P<0.001	P<0.01	NS

Fig. 2.- CDA DE HIERRO



TWO-WAY ANOVA			
CONTENIDO DE Ca EN LA DIETA	DIETA	ANEMIA	DIETA X ANEMIA
NORMAL	P<0.001	P<0.001	NS
DOBLE	P<0.001	P<0.001	NS

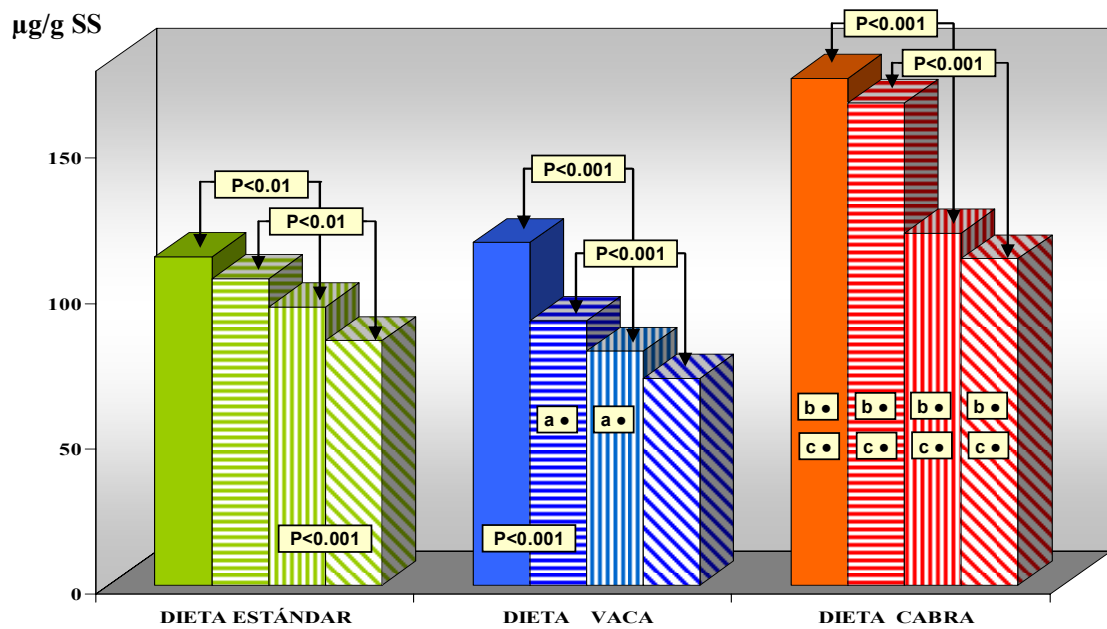
Fig. 3.- R/I DE HIERRO



TWO-WAY ANOVA			
CONTENIDO DE Ca EN LA DIETA	DIETA	ANEMIA	DIETA X ANEMIA
NORMAL	P<0.001	P<0.001	NS
DOBLE	P<0.001	P<0.01	NS

Fig.4.- DEPÓSITO DE HIERRO EN ÓRGANOS

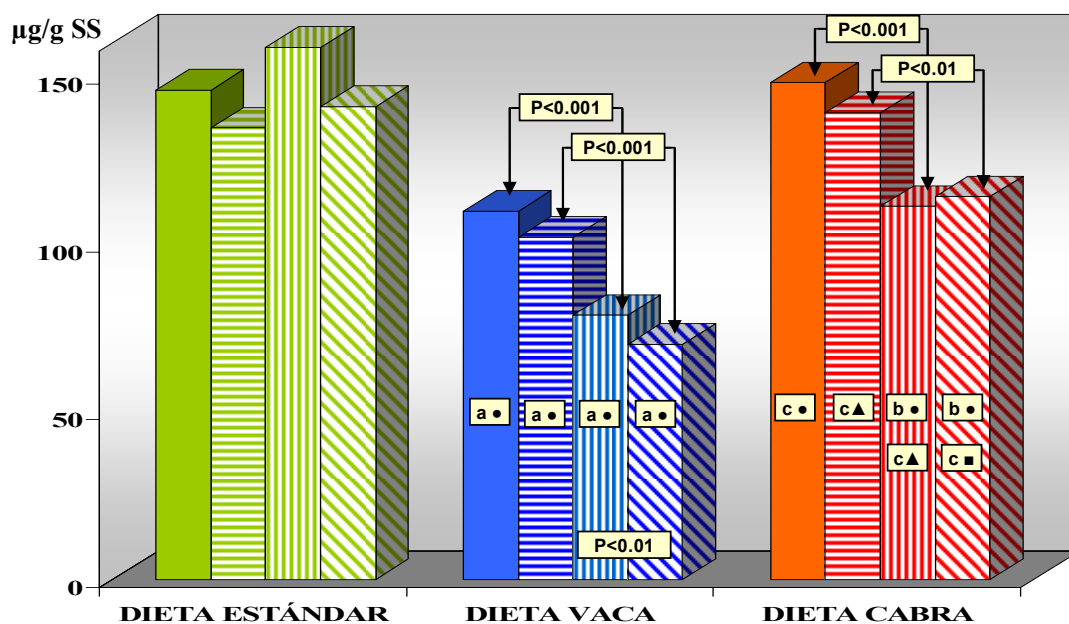
Fig. 4a.- Fémur



TWO-WAY ANOVA			
CONTENIDO DE Ca EN LA DIETA	DIETA	ANEMIA	DIETA X ANEMIA
NORMAL	P<0.001	P<0.001	P<0.01
DOBLE	P<0.001	P<0.001	P<0.01

Fig.4.- DEPÓSITO DE HIERRO EN ÓRGANOS

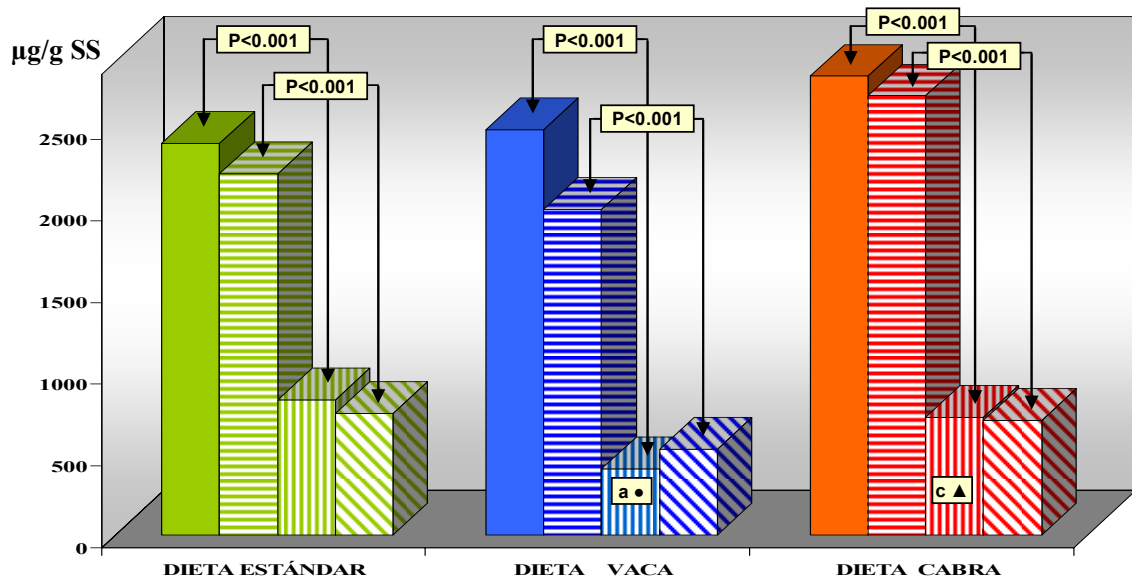
Fig. 4b.- Esternón



TWO-WAY ANOVA			
CONTENIDO DE Ca EN LA DIETA	DIETA	ANEMIA	DIETA X ANEMIA
NORMAL	P<0.001	P<0.001	P<0.001
DOBLE	P<0.001	P<0.001	P<0.001

Fig.4.- DEPÓSITO DE HIERRO EN ÓRGANOS

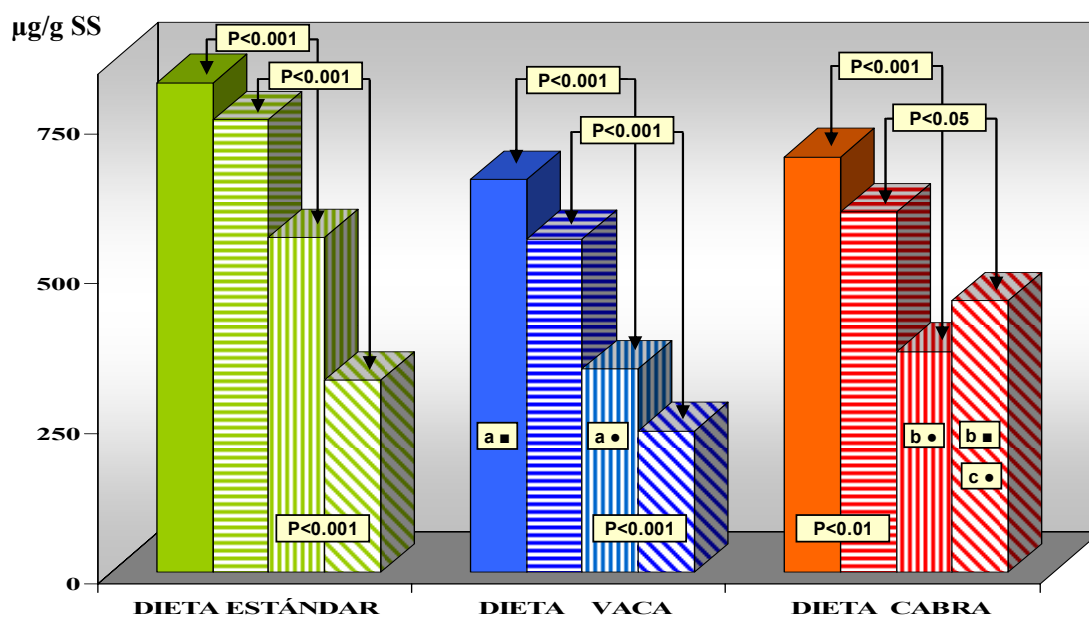
Fig. 4c.- Bazo



TWO-WAY ANOVA			
CONTENIDO DE Ca EN LA DIETA	DIETA	ANEMIA	DIETA X ANEMIA
NORMAL	NS	$P<0.001$	NS
DOBLE	NS	$P<0.001$	NS

Fig.4.- DEPÓSITO DE HIERRO EN ÓRGANOS

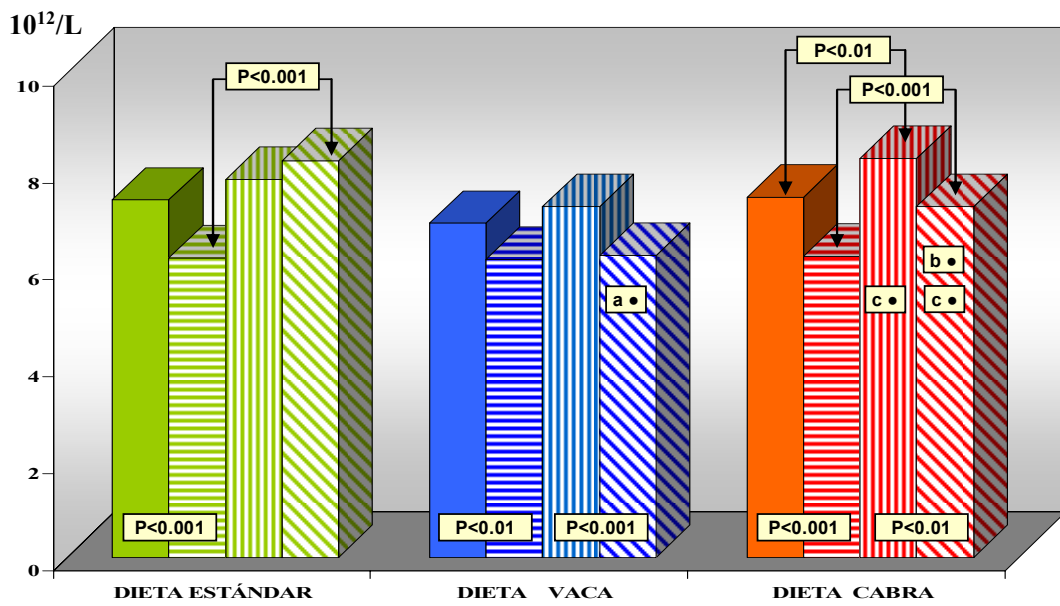
Fig. 4d.- Hígado



TWO-WAY ANOVA			
CONTENIDO DE Ca EN LA DIETA	DIETA	ANEMIA	DIETA X ANEMIA
NORMAL	P<0.001	P<0.001	NS
DOBLE	P<0.05	P<0.001	NS

Fig.5.- PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS

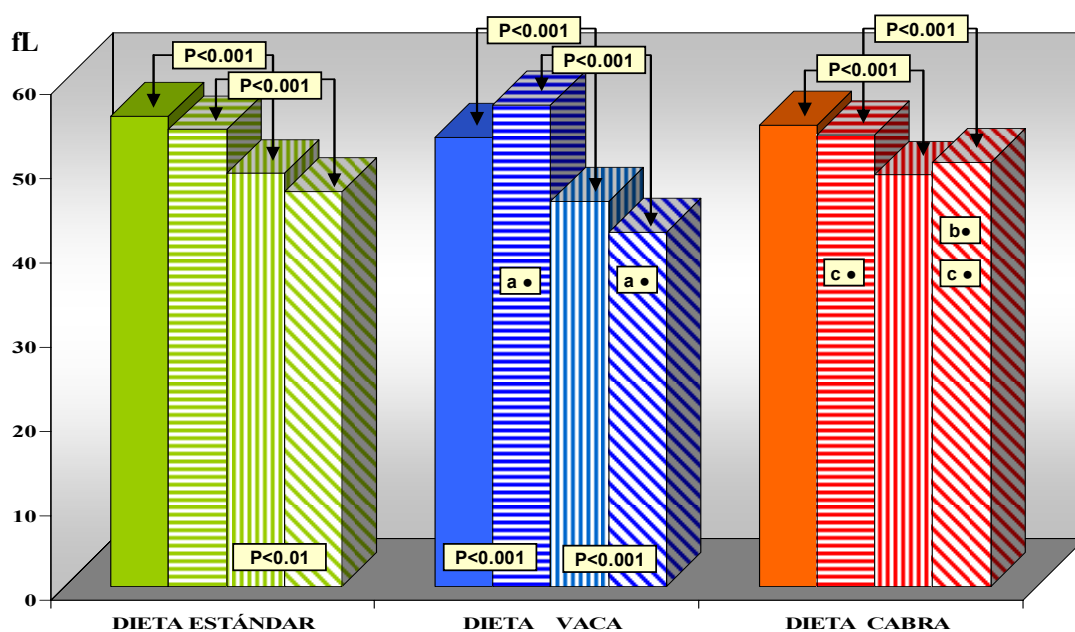
Fig. 5a.- Recuento de hematíes



TWO-WAY ANOVA			
CONTENIDO DE Ca EN LA DIETA	DIETA	ANEMIA	DIETA X ANEMIA
NORMAL	P<0.001	P<0.001	NS
DOBLE	P<0.001	P<0.001	P<0.001

Fig.5.- PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS

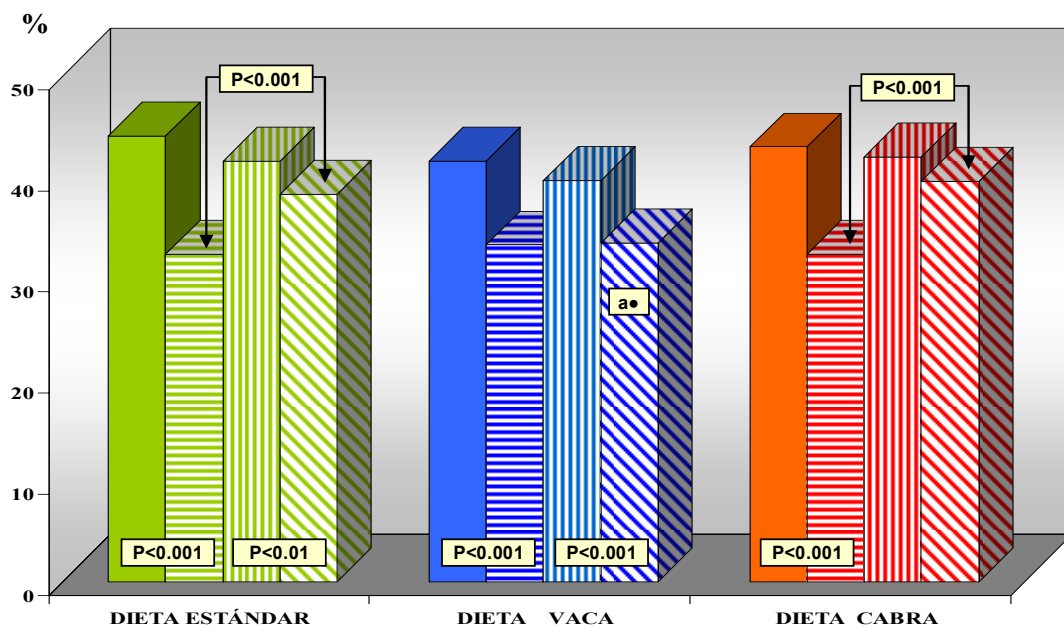
Fig. 5b.- VCM



TWO-WAY ANOVA			
CONTENIDO DE Ca EN LA DIETA	DIETA	ANEMIA	DIETA X ANEMIA
NORMAL	P<0.001	P<0.001	P<0.001
DOBLE	P<0.001	P<0.001	P<0.001

Fig.5.- PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS

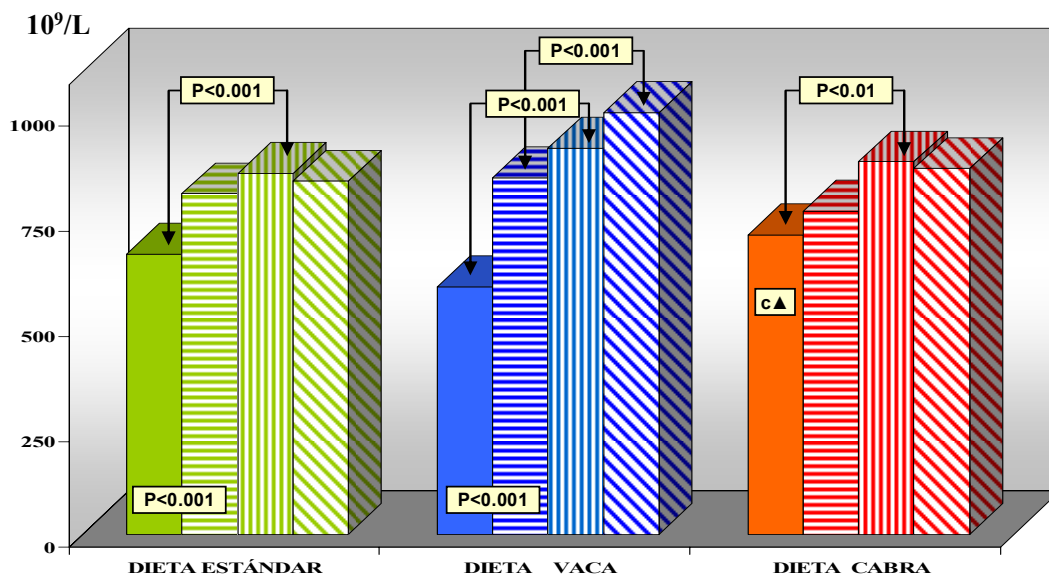
Fig. 5c.- Hematocrito



TWO-WAY ANOVA			
CONTENIDO DE Ca EN LA DIETA	DIETA	ANEMIA	DIETA X ANEMIA
NORMAL	NS	P<0.001	P<0.001
DOBLE	NS	P<0.01	P<0.01

Fig. 5.- PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS

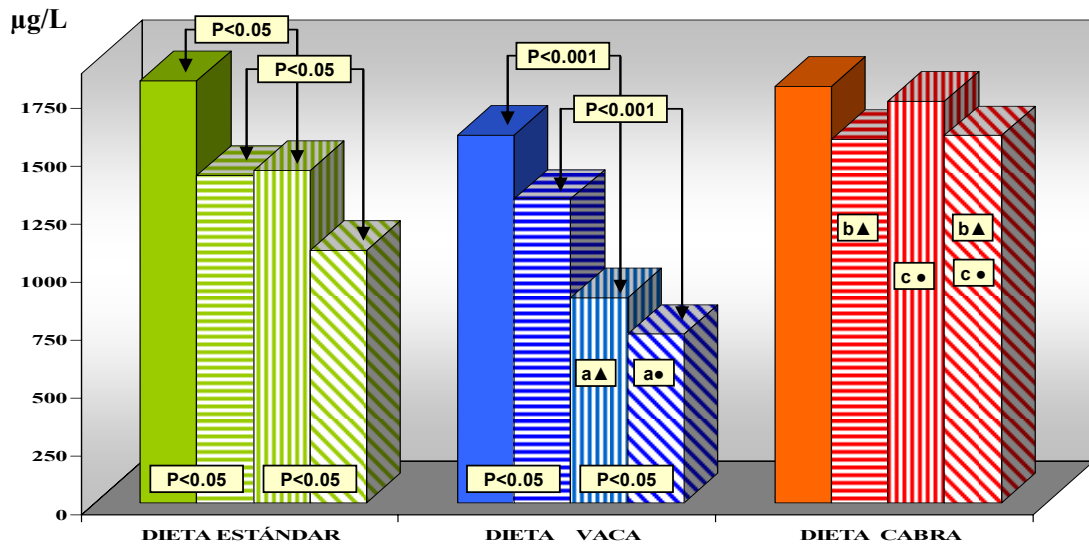
Fig. 5d.- Plaquetas



TWO-WAY ANOVA			
CONTENIDO DE Ca EN LA DIETA	DIETA	ANEMIA	DIETA X ANEMIA
NORMAL	NS	$P < 0.001$	NS
DOBLE	NS	$P < 0.001$	NS

Fig. 5.- PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS

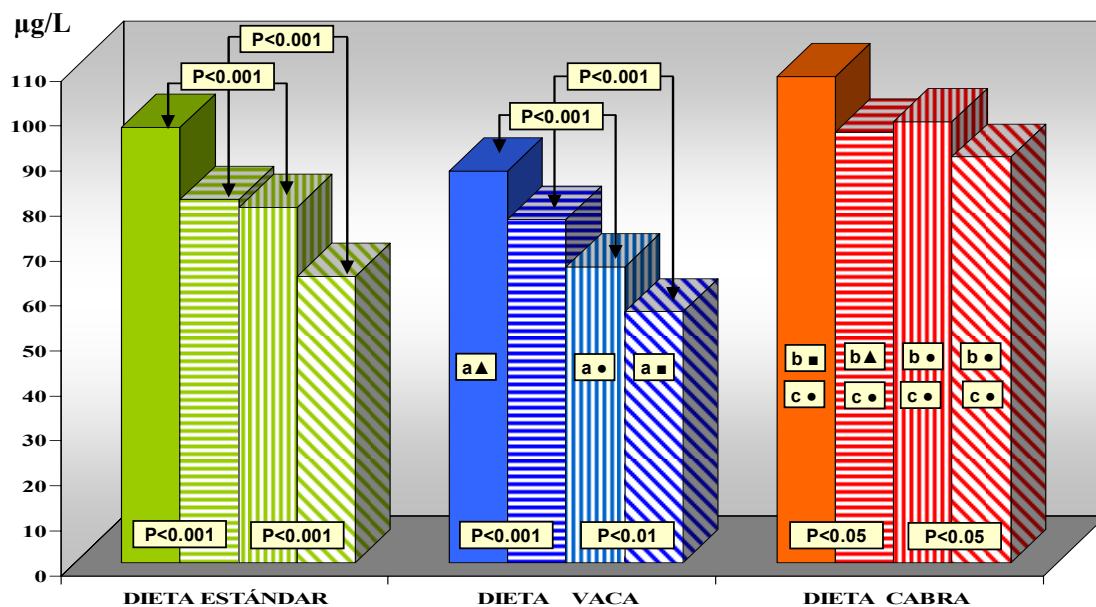
Fig. 5e.- Fe sérico



TWO-WAY ANOVA			
CONTENIDO DE Ca EN LA DIETA	DIETA	ANEMIA	DIETA X ANEMIA
NORMAL	P<0.001	P<0.001	P<0.01
DOBLE	P<0.001	P<0.001	P<0.01

Fig. 5.- PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS

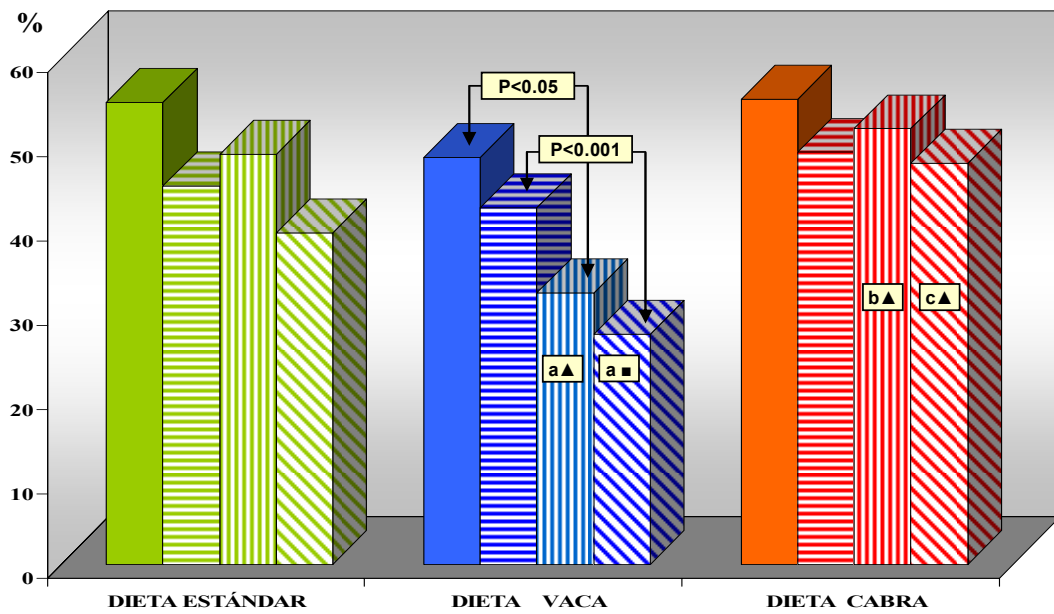
Fig. 5f.- Ferritina sérica



TWO-WAY ANOVA			
CONTENIDO DE Ca EN LA DIETA	DIETA	ANEMIA	DIETA X ANEMIA
NORMAL	P<0.001	P<0.001	P<0.01
DOBLE	P<0.001	P<0.001	P<0.01

Fig. 5.- PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS

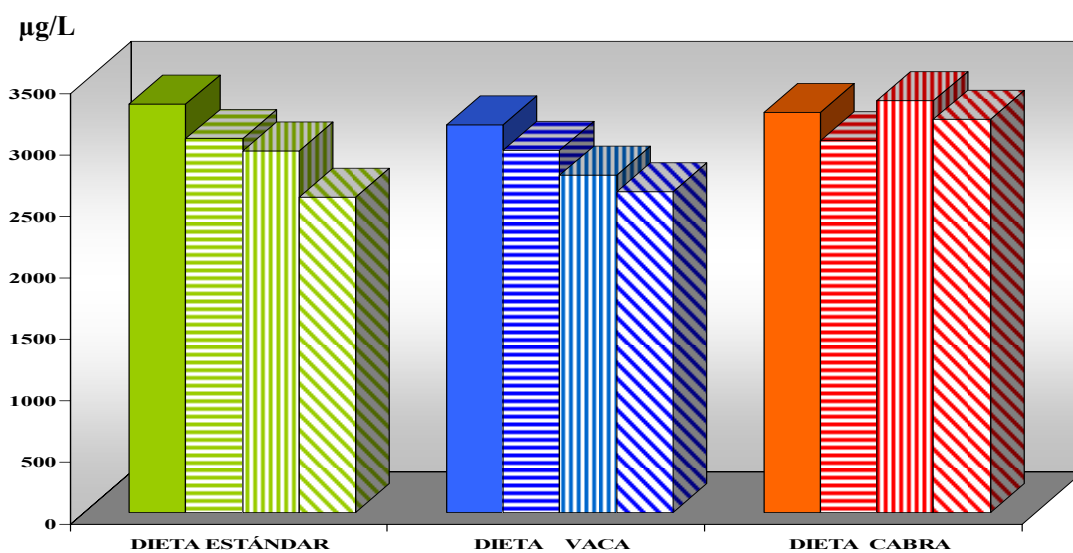
Fig. 5g.- Saturación de la transferrina



TWO-WAY ANOVA			
CONTENIDO DE Ca EN LA DIETA	DIETA	ANEMIA	DIETA X ANEMIA
NORMAL	NS	P<0.01	NS
DOBLE	NS	P<0.01	NS

Fig. 5.- PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS

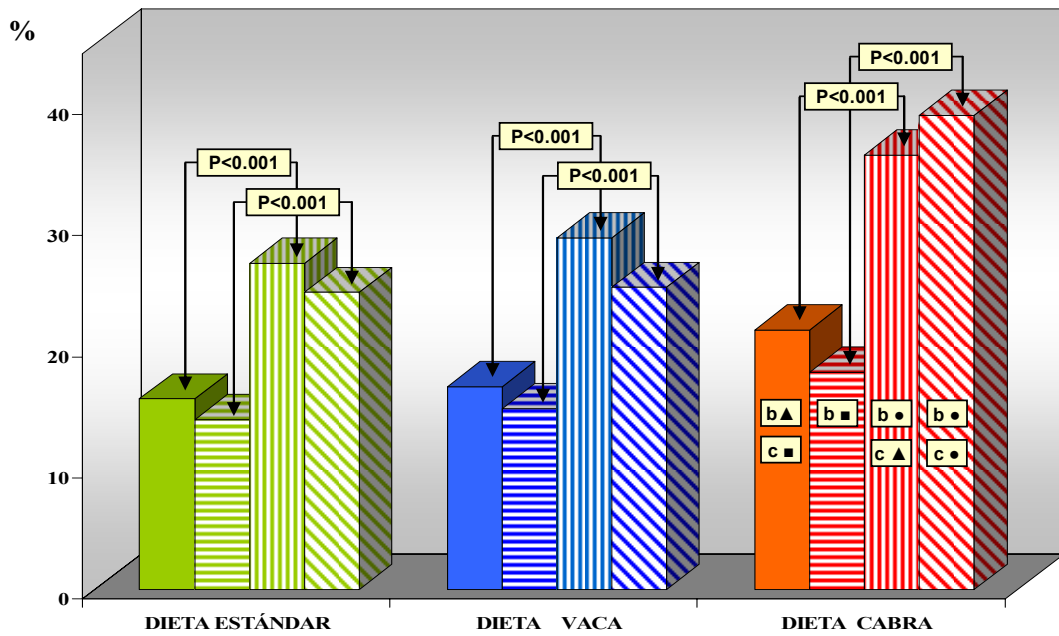
Fig. 5h.- TIBC



TWO-WAY ANOVA			
CONTENIDO DE Ca EN LA DIETA	DIETA	ANEMIA	DIETA X ANEMIA
NORMAL	NS	NS	NS
DOBLE	NS	NS	NS

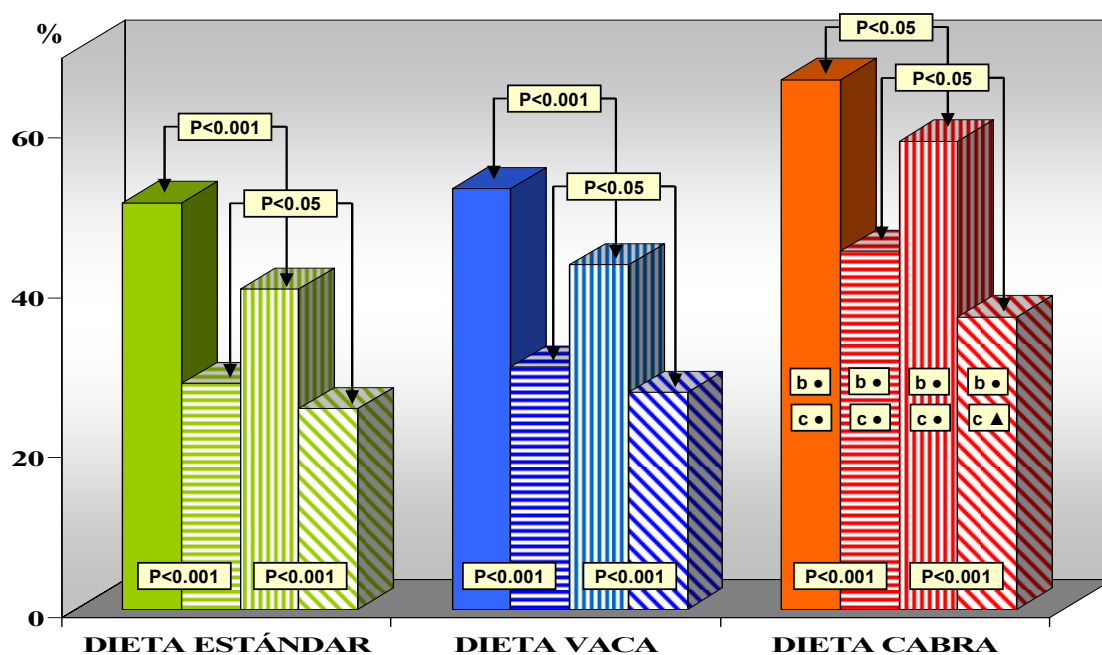
Fig. 5.- PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS

Fig. 5i.- ERH



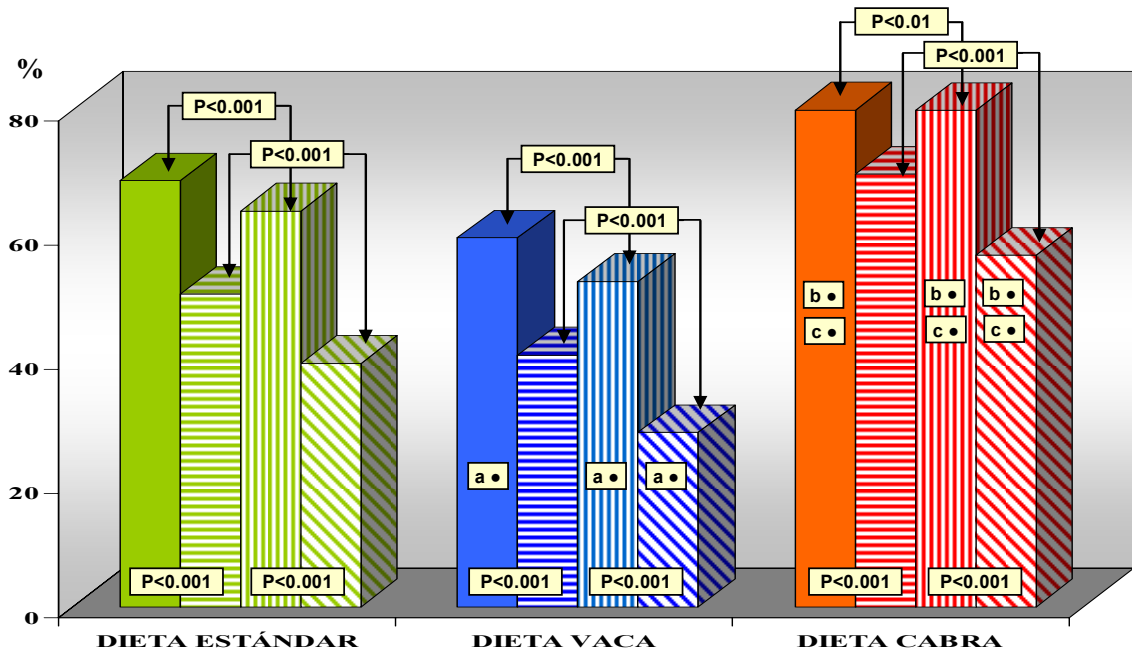
TWO-WAY ANOVA			
CONTENIDO DE Ca EN LA DIETA	DIETA	ANEMIA	DIETA X ANEMIA
NORMAL	$P<0.001$	$P<0.001$	NS
DOBLE	$P<0.01$	$P<0.001$	NS

Fig. 6.- CDA DE CALCIO



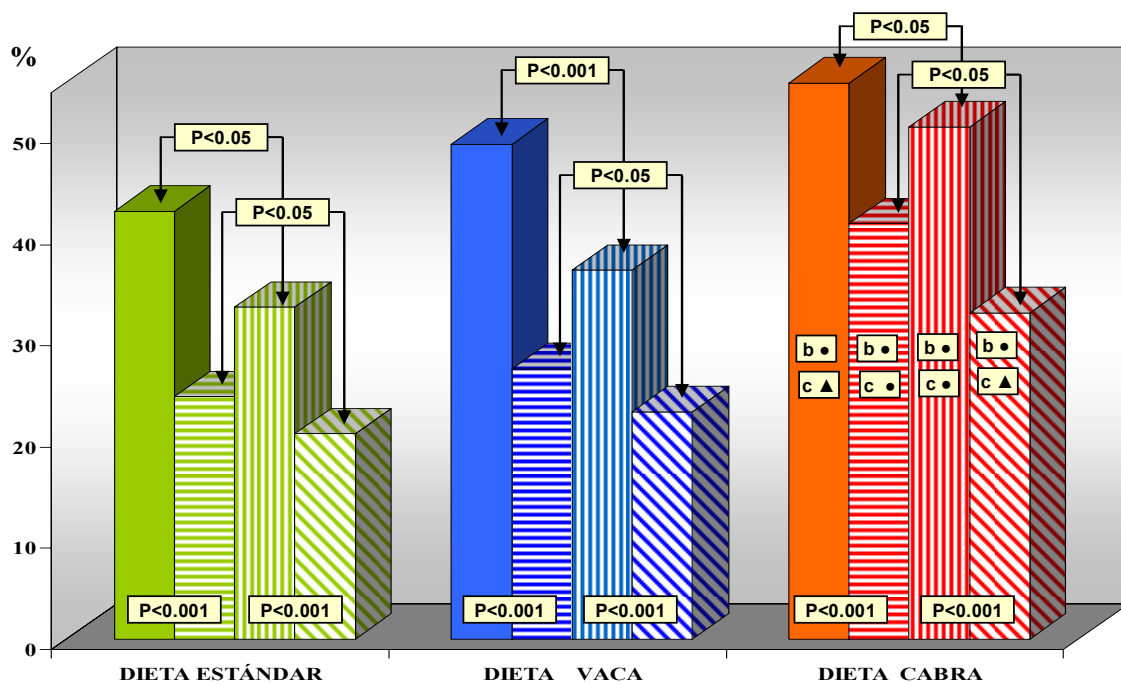
TWO-WAY ANOVA			
CONTENIDO DE Ca EN LA DIETA	DIETA	ANEMIA	DIETA X ANEMIA
NORMAL	P<0.001	P<0.001	NS
DOBLE	P<0.001	P<0.05	NS

Fig. 7.- CDA DE FÓSFORO



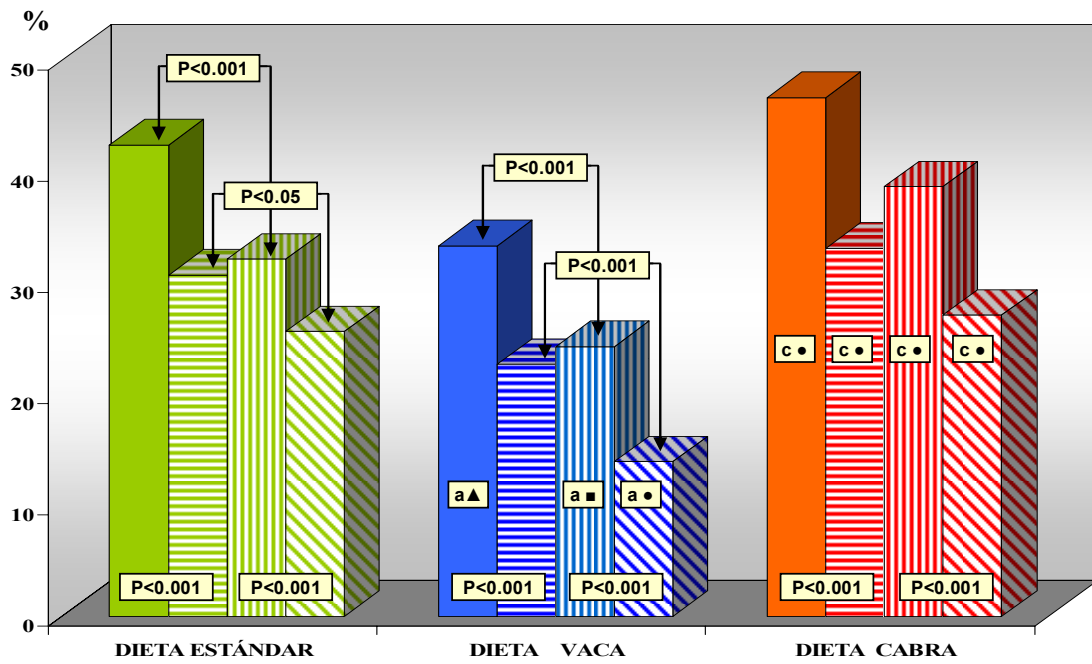
TWO-WAY ANOVA			
CONTENIDO DE Ca EN LA DIETA	DIETA	ANEMIA	DIETA X ANEMIA
NORMAL	P<0.001	P<0.001	NS
DOBLE	P<0.001	P<0.001	NS

Fig. 8.- R/I DE CALCIO



TWO-WAY ANOVA			
CONTENIDO DE Ca EN LA DIETA	DIETA	ANEMIA	DIETA X ANEMIA
NORMAL	P<0.001	P<0.001	NS
DOBLE	P<0.001	P<0.01	NS

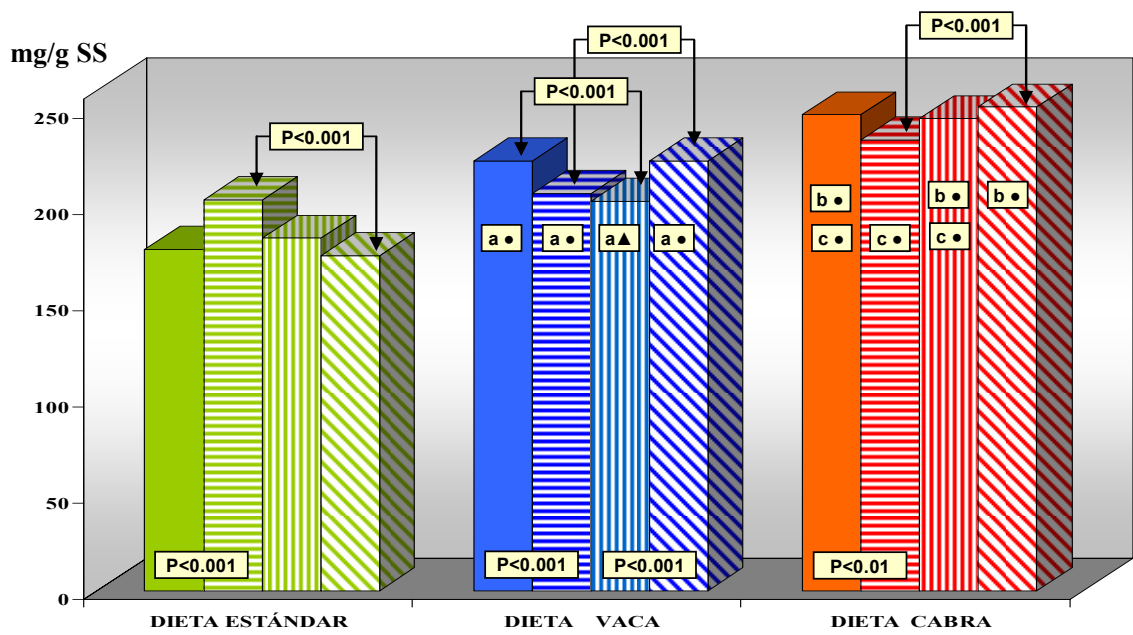
Fig. 9.- R/I DE FÓSFORO



TWO-WAY ANOVA			
CONTENIDO DE Ca EN LA DIETA	DIETA	ANEMIA	DIETA X ANEMIA
NORMAL	P<0.001	P<0.001	NS
DOBLE	P<0.001	P<0.01	NS

Fig.10.- DEPÓSITO DE CALCIO EN ÓRGANOS

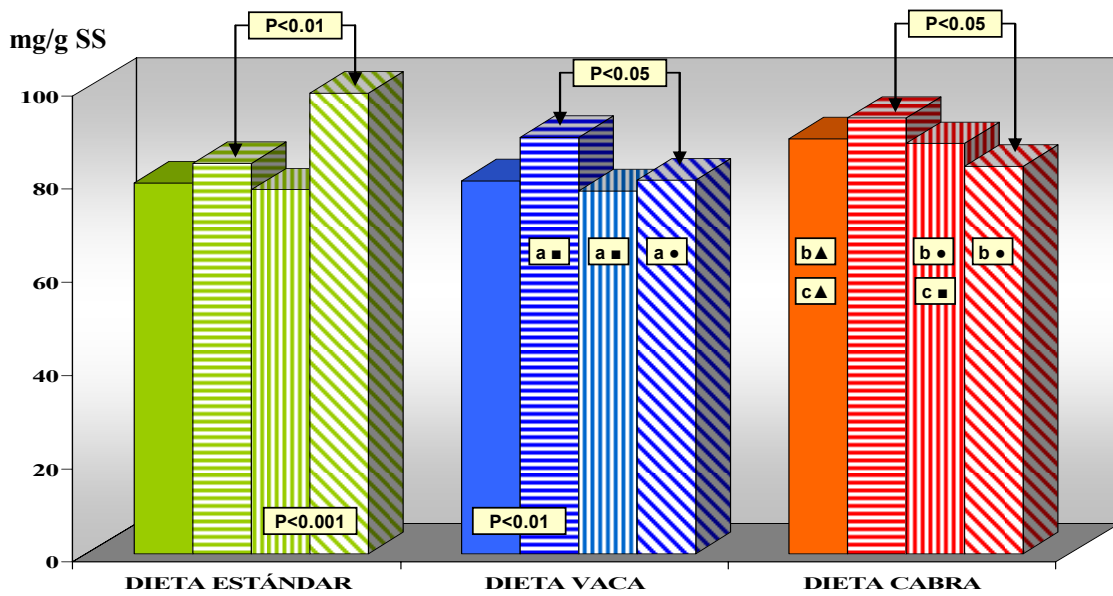
Fig. 10a.- Fémur



TWO-WAY ANOVA			
CONTENIDO DE Ca EN LA DIETA	DIETA	ANEMIA	DIETA X ANEMIA
NORMAL	P<0.001	P<0.05	P<0.05
DOBLE	P<0.01	NS	NS

Fig.10.- DEPÓSITO DE CALCIO EN ÓRGANOS

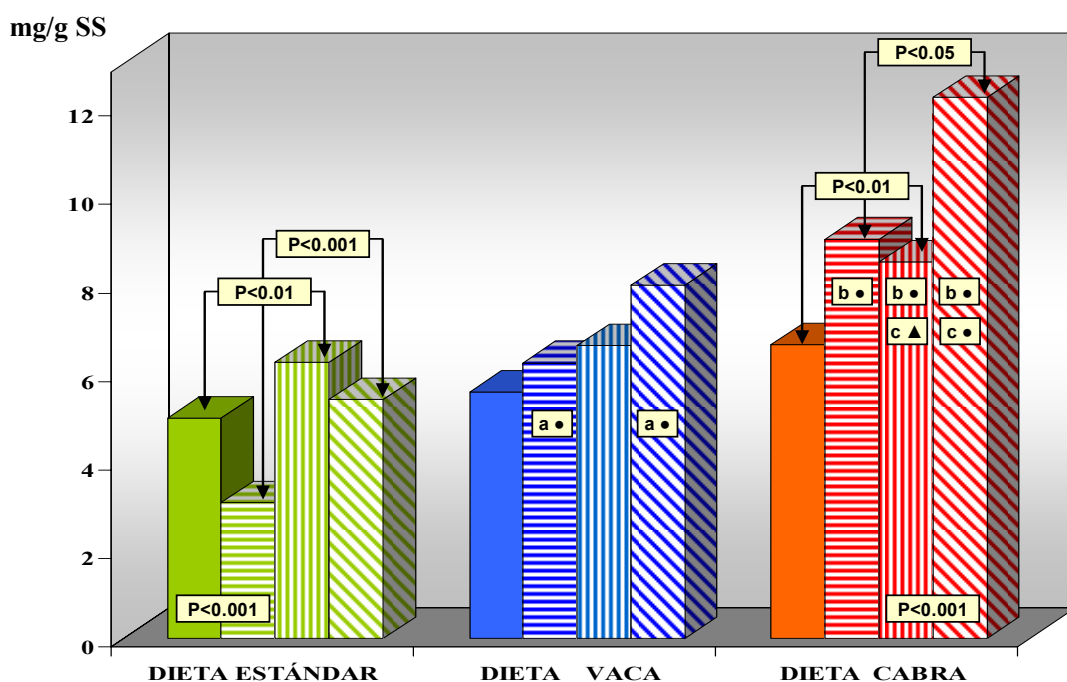
Fig. 10b.- Esternón



TWO-WAY ANOVA			
CONTENIDO DE Ca EN LA DIETA	DIETA	ANEMIA	DIETA X ANEMIA
NORMAL	NS	NS	P<0.01
DOBLE	NS	P<0.05	P<0.01

Fig.10.- DEPÓSITO DE CALCIO EN ÓRGANOS

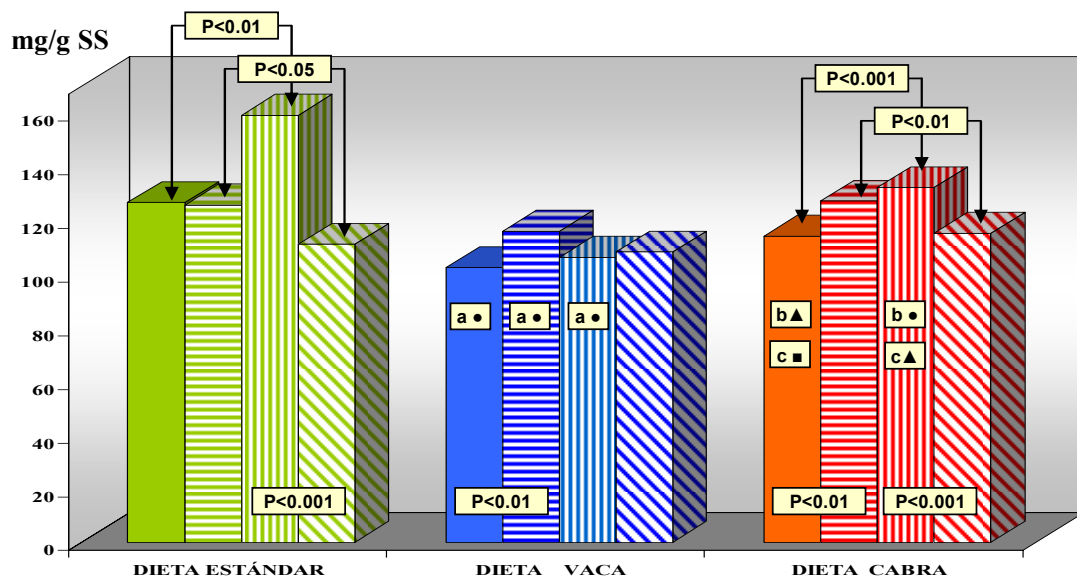
Fig. 10c.- Músculo L. D.



TWO-WAY ANOVA			
CONTENIDO DE Ca EN LA DIETA	DIETA	ANEMIA	DIETA X ANEMIA
NORMAL	P<0.001	P<0.01	NS
DOBLE	P<0.001	P<0.01	NS

Fig.11.- DEPÓSITO DE FÓSFORO EN ÓRGANOS

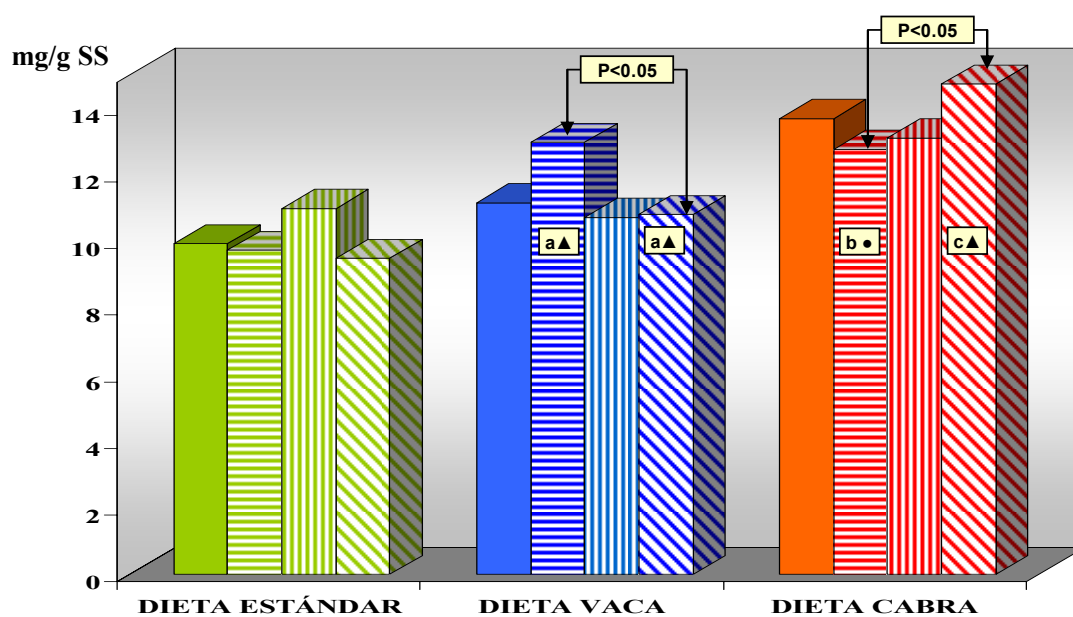
Fig. 11a.- Fémur



TWO-WAY ANOVA			
CONTENIDO DE Ca EN LA DIETA	DIETA	ANEMIA	DIETA X ANEMIA
NORMAL	P<0.001	P<0.01	P<0.001
DOBLE	P<0.001	P<0.01	P<0.001

Fig.11.- DEPÓSITO DE FÓSFORO EN ÓRGANOS

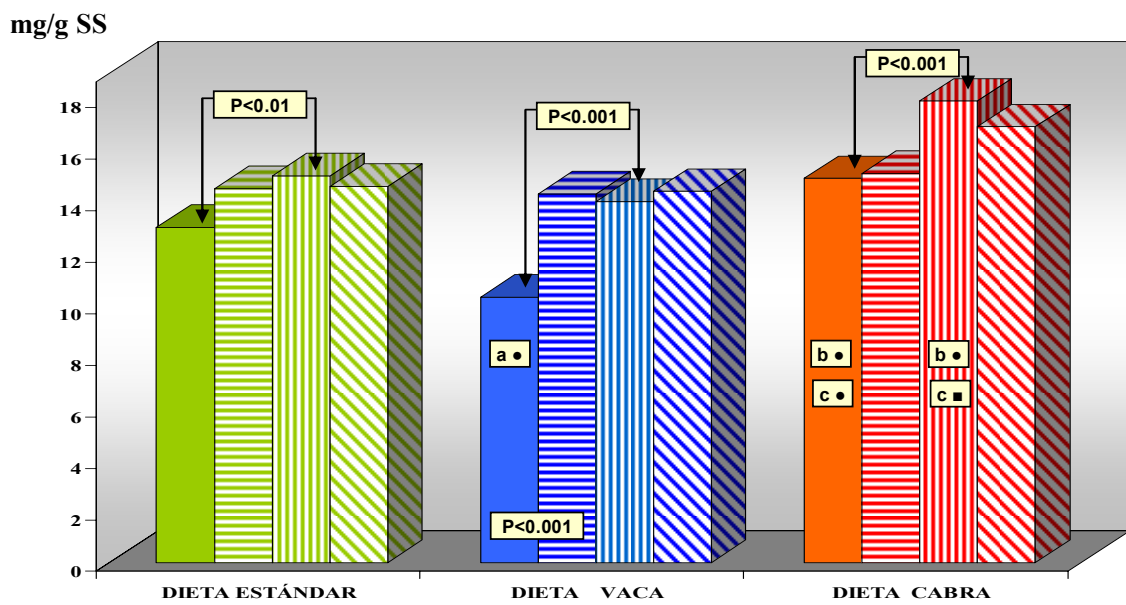
Fig. 11b.- Músculo L.D.



TWO-WAY ANOVA			
CONTENIDO DE Ca EN LA DIETA	DIETA	ANEMIA	DIETA X ANEMIA
NORMAL	P<0.001	NS	NS
DOBLE	P<0.001	P<0.01	P<0.01

Fig.11.- DEPÓSITO DE FÓSFORO EN ÓRGANOS

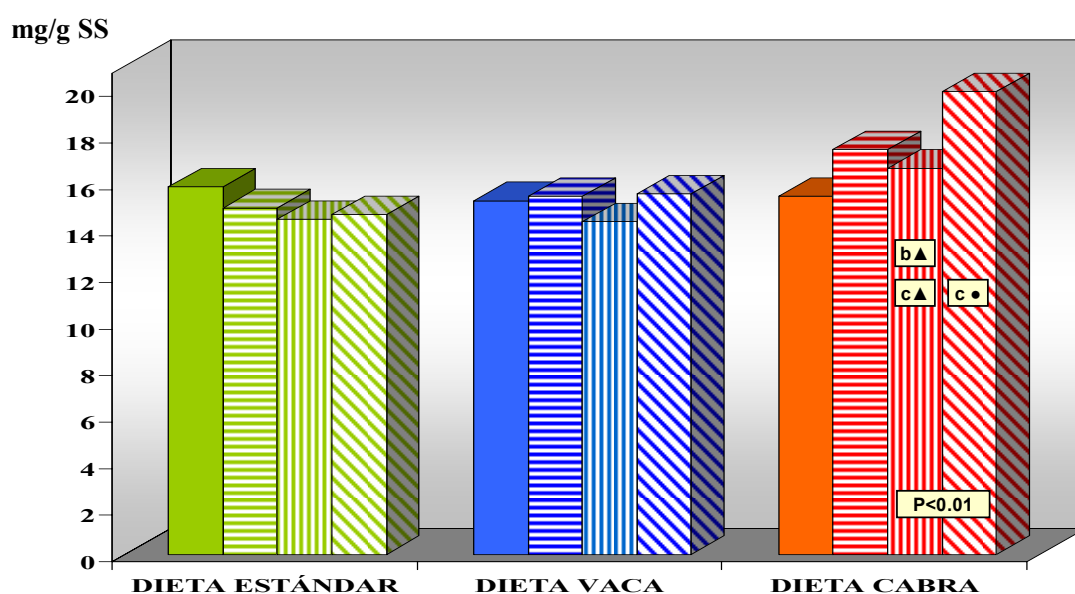
Fig. 11c.- Cerebro



TWO-WAY ANOVA			
CONTENIDO DE Ca EN LA DIETA	DIETA	ANEMIA	DIETA X ANEMIA
NORMAL	P<0.001	NS	P<0.001
DOBLE	P<0.01	NS	P<0.01

Fig.11.- DEPÓSITO DE FÓSFORO EN ÓRGANOS

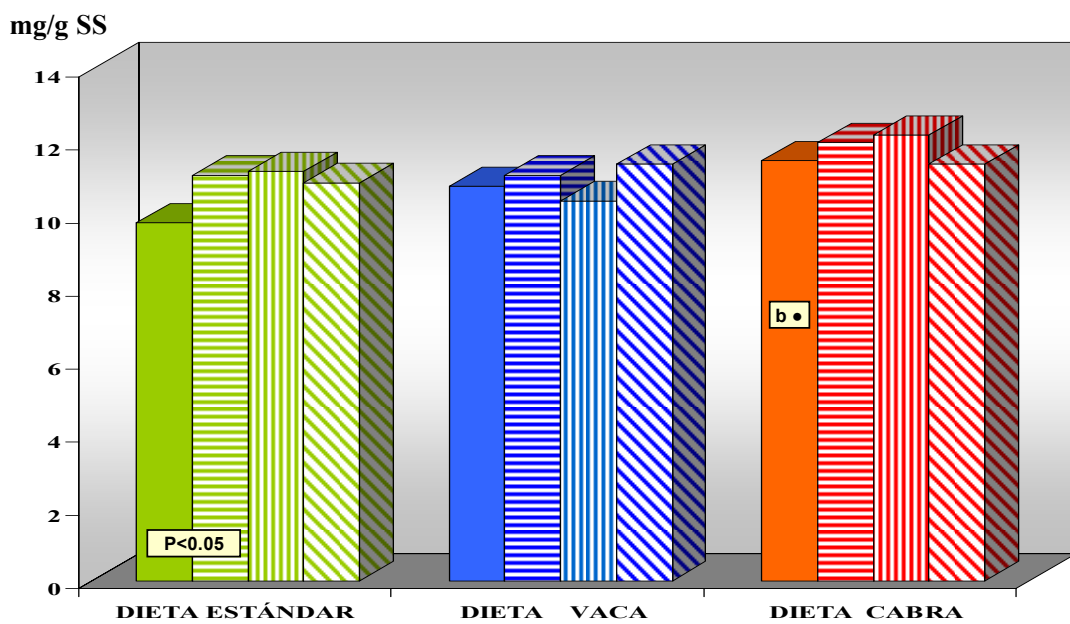
Fig. 11d.- Bazo



TWO-WAY ANOVA			
CONTENIDO DE Ca EN LA DIETA	DIETA	ANEMIA	DIETA X ANEMIA
NORMAL	NS	NS	NS
DOBLE	P<0.01	NS	NS

Fig.11.- DEPÓSITO DE FÓSFORO EN ÓRGANOS

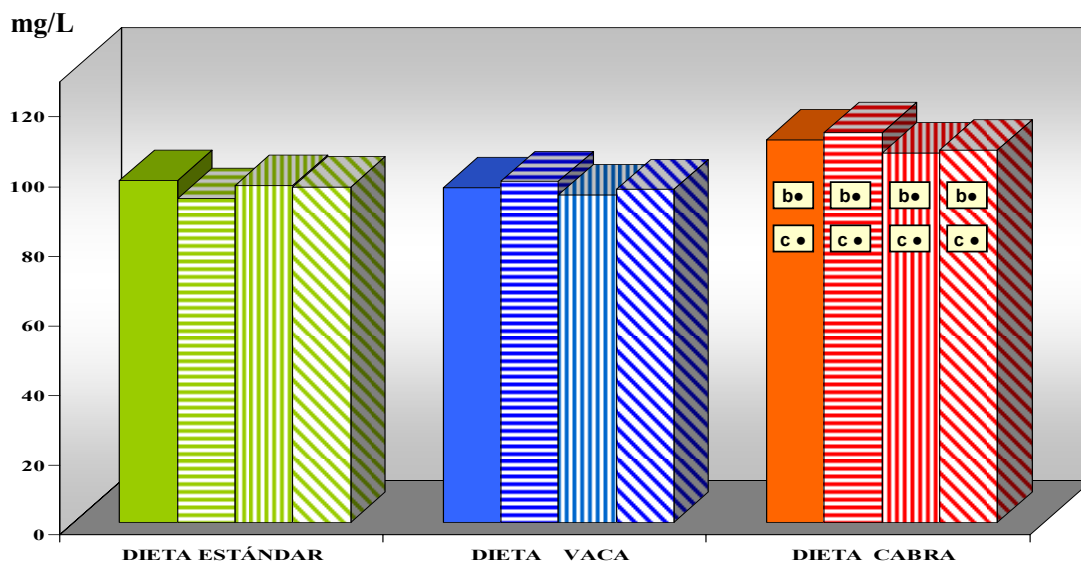
Fig. 11e.- Riñones



TWO-WAY ANOVA			
CONTENIDO DE Ca EN LA DIETA	DIETA	ANEMIA	DIETA X ANEMIA
NORMAL	P<0.001	NS	NS
DOBLE	NS	NS	NS

Fig. 12.- NIVELES SÉRICOS

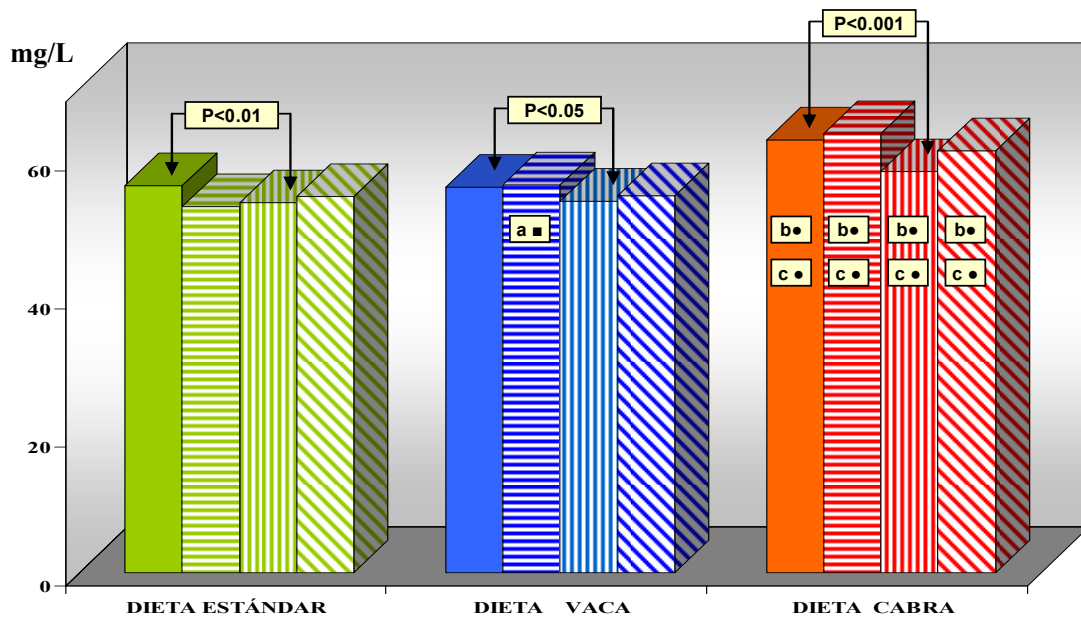
Fig. 12a.- Calcio total



TWO-WAY ANOVA			
CONTENIDO DE Ca EN LA DIETA	DIETA	ANEMIA	DIETA X ANEMIA
NORMAL	P<0.001	NS	P<0.01
DOBLE	P<0.001	NS	P<0.01

Fig. 12.- NIVELES SÉRICOS

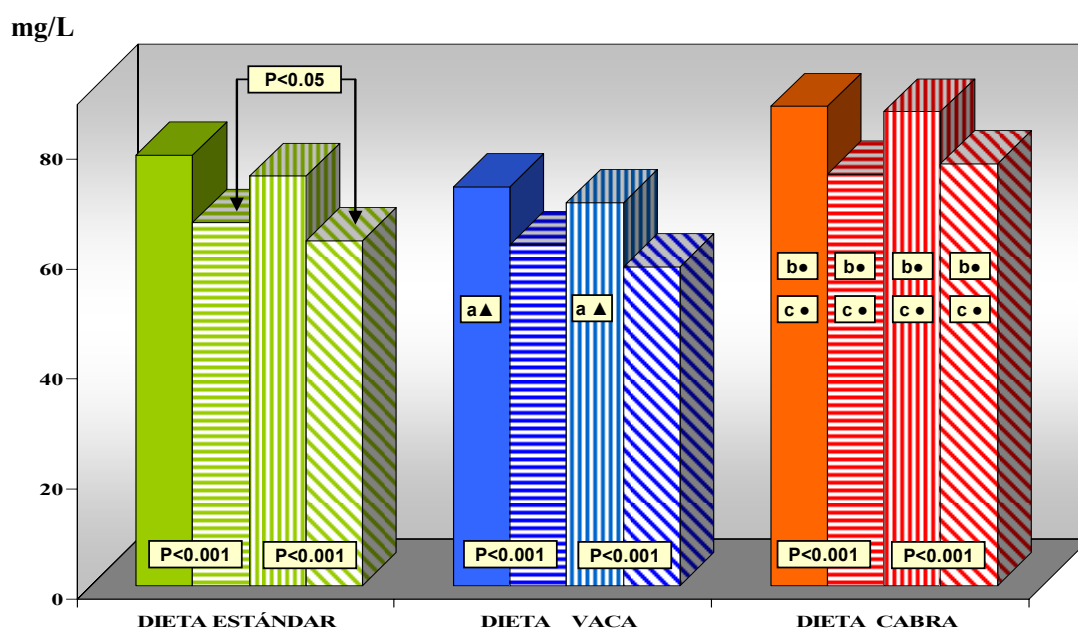
Fig. 12b.- Calcio iónico



TWO-WAY ANOVA			
CONTENIDO DE Ca EN LA DIETA	DIETA	ANEMIA	DIETA X ANEMIA
NORMAL	P<0.001	NS	P<0.05
DOBLE	P<0.001	NS	P<0.05

Fig. 12.- NIVELES SÉRICOS

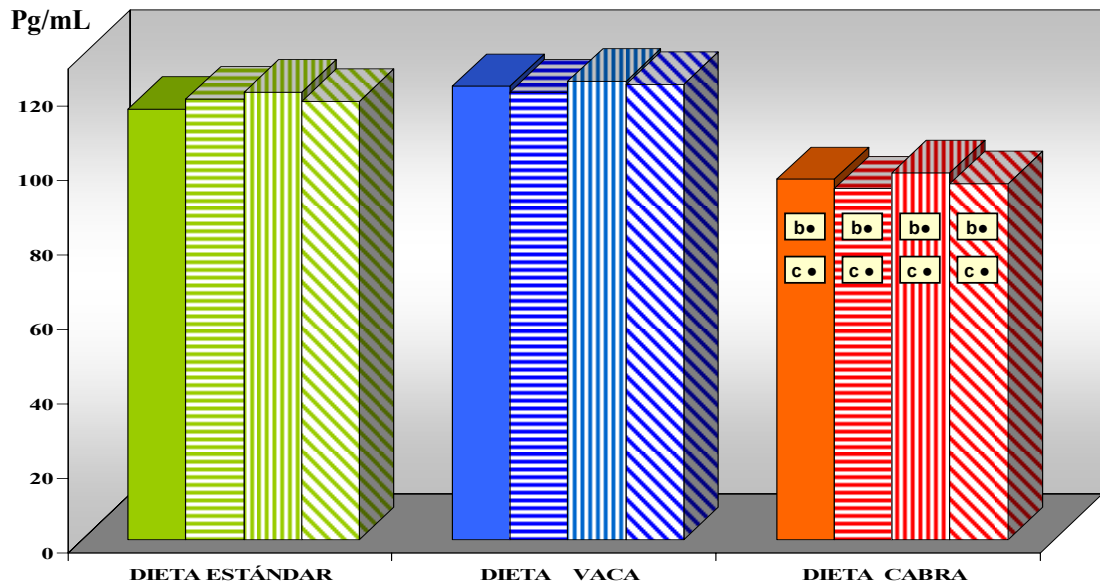
Fig. 12c.- Fósforo



TWO-WAY ANOVA			
CONTENIDO DE Ca EN LA DIETA	DIETA	ANEMIA	DIETA X ANEMIA
NORMAL	P<0.001	NS	NS
DOBLE	P<0.001	NS	NS

Fig. 12.- NIVELES SÉRICOS

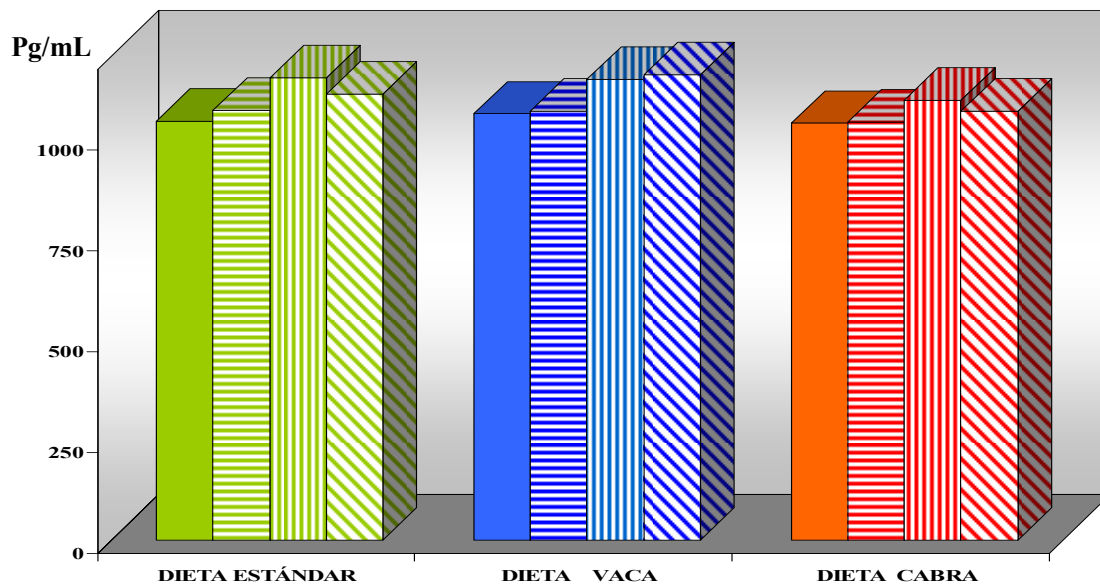
Fig. 12d.- PTH



TWO-WAY ANOVA			
CONTENIDO DE Ca EN LA DIETA	DIETA	ANEMIA	DIETA X ANEMIA
NORMAL	P<0.01	NS	P<0.01
DOBLE	P<0.01	NS	P<0.01

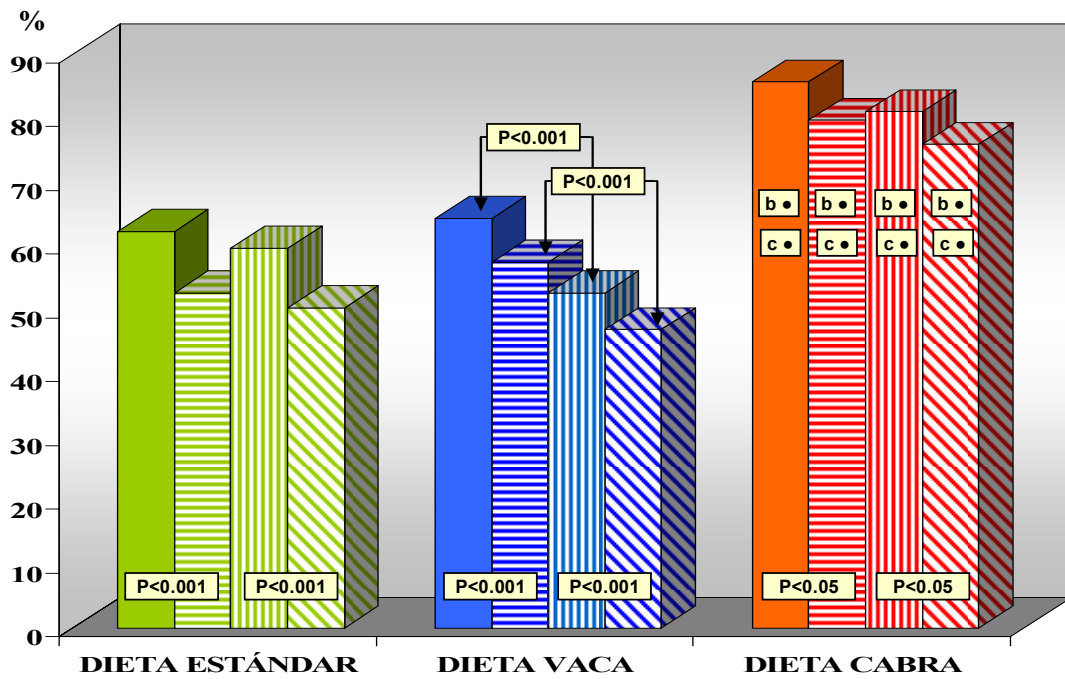
Fig. 12.- NIVELES SÉRICOS

Fig. 12e.- Corticosterona



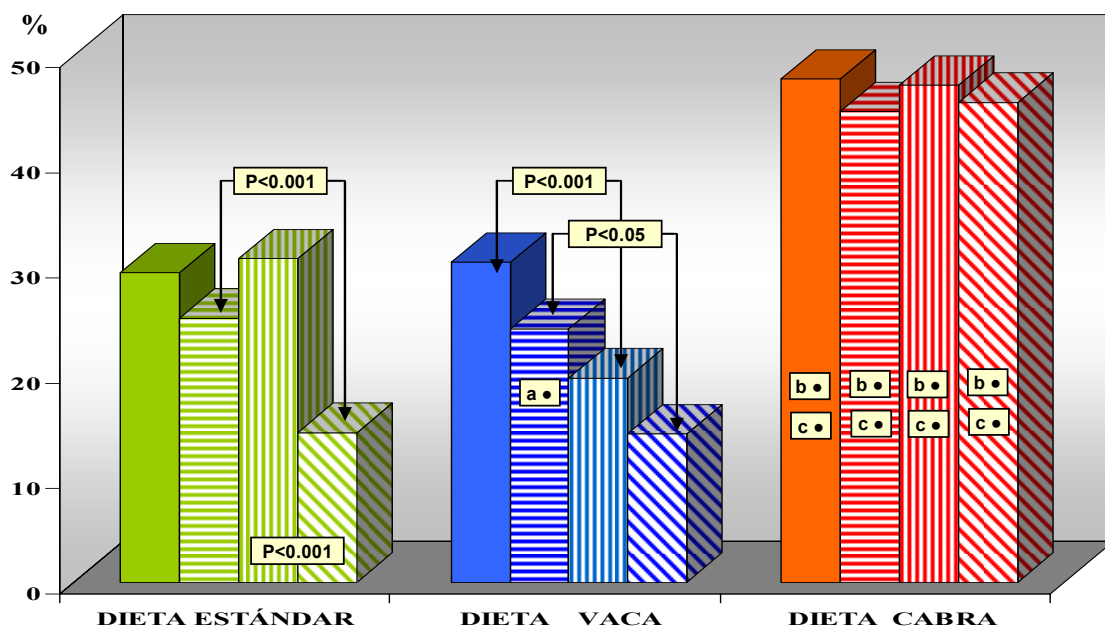
TWO-WAY ANOVA			
CONTENIDO DE Ca EN LA DIETA	DIETA	ANEMIA	DIETA X ANEMIA
NORMAL	P<0.01	NS	P<0.01
DOBLE	NS	NS	NS

Fig. 13.- CDA DE MAGNESIO



TWO-WAY ANOVA			
CONTENIDO DE Ca EN LA DIETA	DIETA	ANEMIA	DIETA X ANEMIA
NORMAL	P<0.001	P<0.001	NS
DOBLE	P<0.001	P<0.001	P<0.001

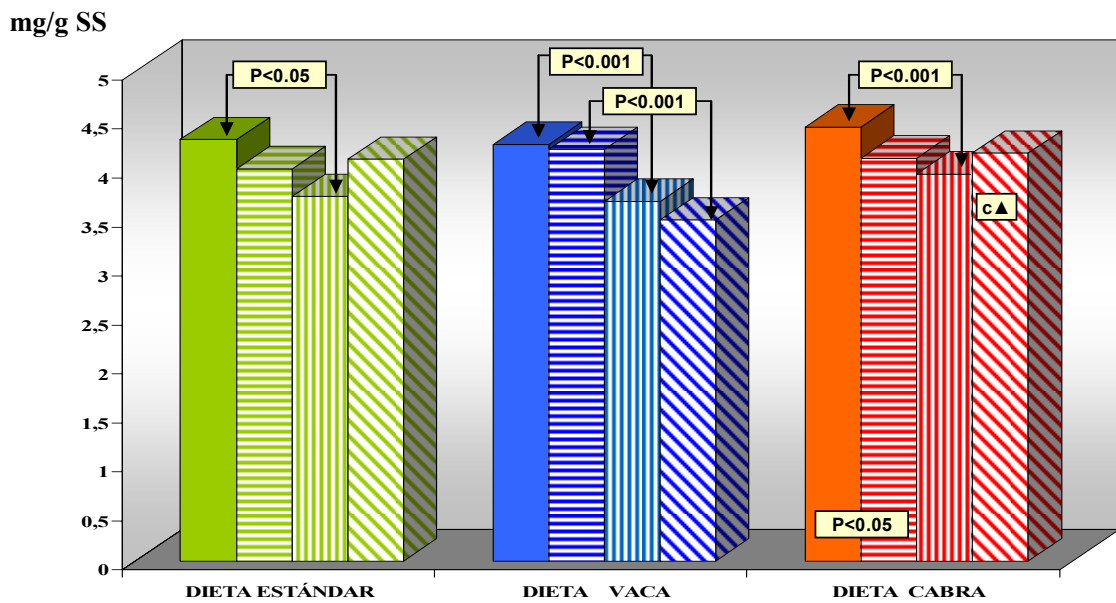
Fig. 14.- R/I DE MAGNESIO



TWO-WAY ANOVA			
CONTENIDO DE Ca EN LA DIETA	DIETA	ANEMIA	DIETA X ANEMIA
NORMAL	P<0.001	P<0.05	P<0.001
DOBLE	P<0.001	P<0.001	P<0.05

Fig.15.- DEPÓSITO DE MAGNESIO EN ÓRGANOS

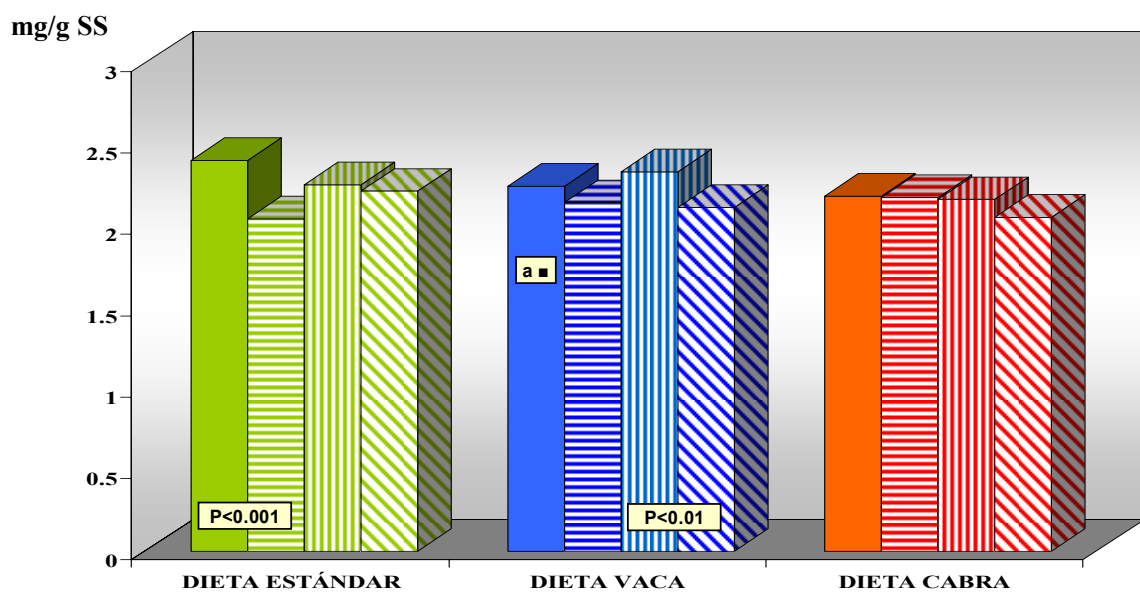
Fig. 15a.- Fémur



TWO-WAY ANOVA			
CONTENIDO DE Ca EN LA DIETA	DIETA	ANEMIA	DIETA X ANEMIA
NORMAL	NS	P<0.001	NS
DOBLE	NS	NS	P<0.001

Fig.15.- DEPÓSITO DE MAGNESIO EN ÓRGANOS

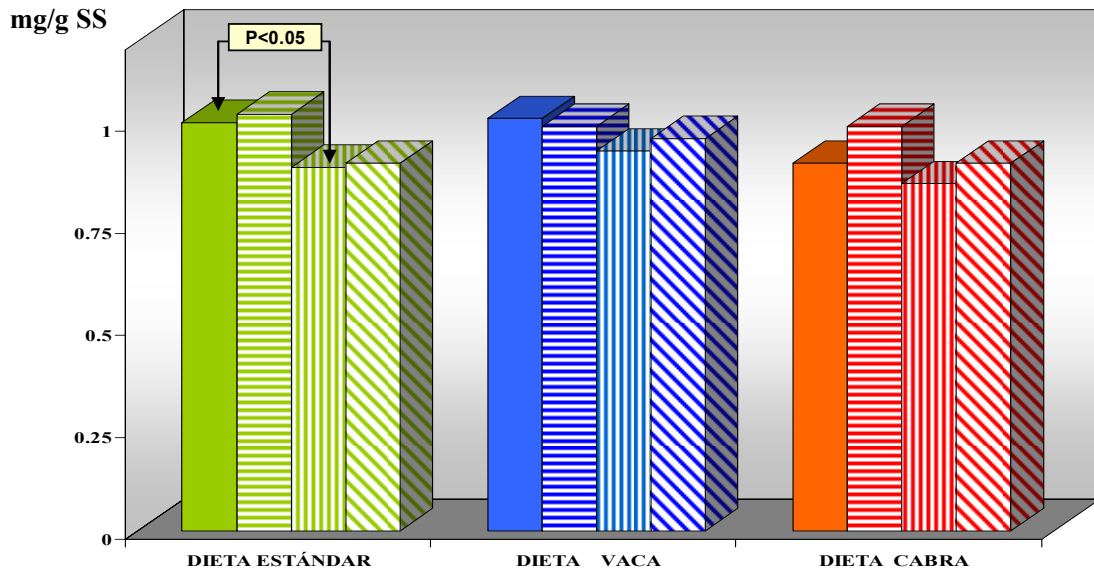
Fig. 15b.- Esternón



TWO-WAY ANOVA			
CONTENIDO DE Ca EN LA DIETA	DIETA	ANEMIA	DIETA X ANEMIA
NORMAL	NS	NS	NS
DOBLE	NS	NS	P<0.05

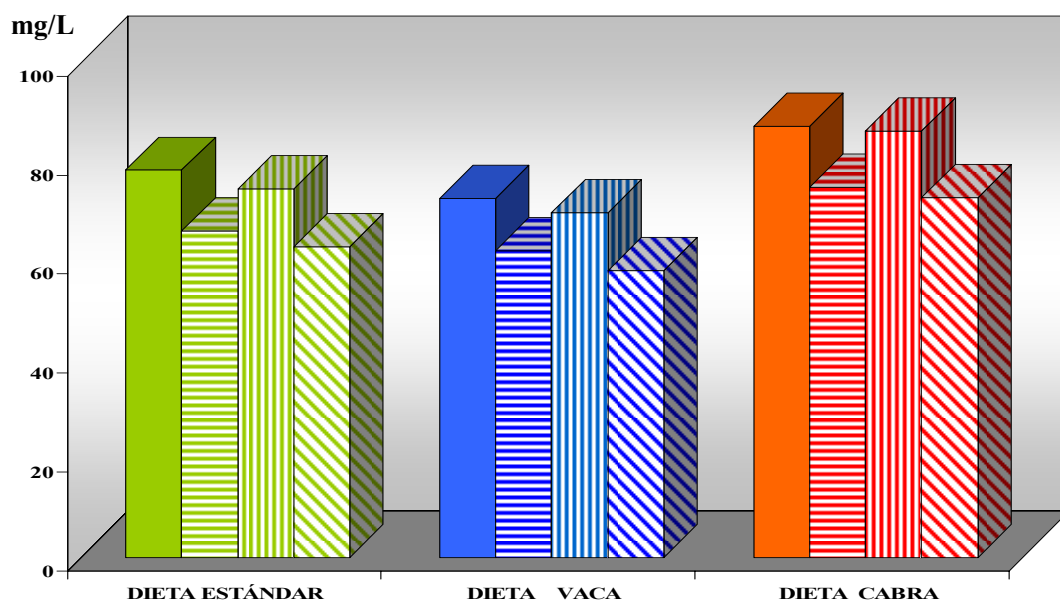
Fig.15.- DEPÓSITO DE MAGNESIO EN ÓRGANOS

Fig. 15c.- Músculo L.D.



TWO-WAY ANOVA			
CONTENIDO DE Ca EN LA DIETA	DIETA	ANEMIA	DIETA X ANEMIA
NORMAL	NS	NS	NS
DOBLE	NS	NS	P<0.05

Fig. 16.- MAGNESIO EN SANGRE TOTAL



TWO-WAY ANOVA			
CONTENIDO DE Ca EN LA DIETA	DIETA	ANEMIA	DIETA X ANEMIA
NORMAL	P<0.05	NS	NS
DOBLE	P<0.05	NS	NS

4.2. INGESTA DE ALIMENTO

La ingesta de alimento es del mismo orden en ratas controles y anémicas, independientemente del tipo de dieta suministrada. La ingesta es mayor en ambos grupos de animales que consumen la dieta estándar (E), en comparación con las dietas basadas en leche de vaca (V) y cabra (C) ($P < 0.001$), tanto con un contenido normal, como suplementadas en Ca (ingesta de alimento: $E, E^+ > V, V^+ = C, C^+$) (Tabla 1; Figura 1). En el presente estudio la menor ingesta de alimento de las ratas, tanto controles como ferodeficientes, alimentadas con las dietas basadas en leche en comparación con la dieta estándar, puede ser debida a las especiales características organolépticas que le confieren los liofilizados a las dietas, especialmente en la dieta basada en leche de cabra, como ha sido observado previamente por nosotros (Alfárez y col., 2001; López-Aliaga y col., 2003). A pesar de la baja ingesta de alimento observada para los animales alimentados con las dietas basadas en leche de vaca y cabra, la cantidad consumida cubre los requerimientos nutricionales para esta especie (Reeves y col., 1993).

4.3. UTILIZACIÓN DIGESTIVA Y METABÓLICA DE HIERRO

El Two-Way ANOVA revela que no existe interacción dieta x anemia (para los diferentes parámetros relacionados con la utilización digestiva y metabólica del Fe. La utilización digestiva (CDA) del Fe está afectada por la dieta y por la anemia (Two-Way ANOVA, $P < 0.001$). El CDA y la relación R/I de Fe son mayores en ratas anémicas que en sus respectivos controles con las tres dietas ensayadas, tanto con contenido normal como suplementadas con Ca ($P < 0.001$) (Tabla 2; Figuras 2 y 3). Este hecho pone de manifiesto que existe una mayor avidez de Fe entre las ratas anémicas, debido a que la anemia incrementa la síntesis de la proteína DMT1 (Transportador de Metales Divalentes 1) (Yeh y col., 2000), así como la expresión de la ferroportina 1 (Morgan y Oates, 2002). Por tanto, estos receptores incrementan la absorción intestinal de Fe en situación de anemia (Forellat y col., 2000). Este incremento en el CDA del Fe es similar al encontrado previamente por nosotros (Pallarés y col., 1993). En ambos grupos de animales, controles y ferodeficientes, el CDA y la relación R/I de Fe son mejores en las ratas alimentadas con la dieta basada en leche de cabra (C) ($P < 0.001$),

mientras que no existen diferencias en el CDA ni en el ratio R/I de Fe de las ratas alimentadas con las dietas estándar y basadas en leche de vaca (CDA y R/I de Fe: C, C⁺ > E, E⁺ = V, V⁺). La suplementación con Ca en la dieta basada en leche de vaca para ambos grupos de animales (controles y ferodeficientes) produce una disminución del CDA y de la relación R/I de Fe, en comparación con una dieta con contenido normal de Ca. Sin embargo, este efecto negativo no se observa cuando se suministra la dieta basada en leche de cabra suplementada en Ca (C⁺), llegando incluso la relación R/I a alcanzar valores superiores en ratas anémicas, con respecto a las que consumen una dieta con contenido normal de Ca. Por otra parte, el suplemento de Ca no afecta al CDA ni a la relación R/I de Fe en ratas controles alimentadas con las dietas estándar y basada en leche de cabra suplementadas en Ca (E⁺ y C⁺) (Tabla 2; Figuras 2 y 3).

La mayor utilización nutritiva de Fe encontrada con las dietas basadas en leche de cabra (C, C⁺), puede ser debida a varios factores nutricionales que se encuentran en la leche de cabra. La proteína de esta leche es más soluble y contiene una mayor proporción de otras proteínas solubles (β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina y seroalbúmina (Boza y Sanz-Sampelayo, 1997). Por tanto, esta proteína aportada por la leche de cabra, puede favorecer la absorción de Fe, debido a su elevada solubilidad y origen animal (Sharp y col., 2003). Además, la calidad lipídica de la grasa es distinta en las tres dietas: la leche de cabra es más rica en triglicéridos de cadena media (MCT) que la leche de vaca (36% frente al 21%) (Alfárez y col., 2001). Los MCT de la dieta son rápidamente absorbidos a nivel intestinal y metabolizados para obtener energía (García-Unciti, 1996), lo cual contribuiría a incrementar la síntesis de proteínas transportadoras y por tanto la absorción de Fe.

Numerosos componentes dietarios son capaces de reducir el Fe³⁺ a Fe²⁺, incluyendo el ácido ascórbico (Wienk y col., 1999) y aminoácidos como la lisina (Van Campen, 1973) y cisteína (Glahn y Van Campen, 1997). Todos estos factores nutricionales están presentes en cantidades superiores en la leche de cabra que en la leche de vaca (Alfárez y col., 2006).

Otro factor a tener en cuenta es que la leche de cabra tiene casi dos veces más vitamina A que la de vaca (Alfárez y col., 2006). La vitamina A puede movilizar el Fe disponible desde

los depósitos, para su posterior utilización en la síntesis de hemoglobina (Bloem, 1995). Por otra parte, el β -caroteno mejora la absorción de Fe y contribuye a prevenir el efecto inhibitorio que ejercen determinadas sustancias (García-Casal y col., 2000). Gargari y col. (2006) han demostrado que un incremento en la ingesta de vitamina A puede ser considerado como un método eficaz para incrementar la biodisponibilidad de Fe, y así combatir de manera simultánea el déficit de Fe y vitamina A.

Además, la leche de cabra tiene mayor contenido en vitamina D que la de vaca (Alfárez y col., 2006). El papel positivo de la vitamina D como promotora del componente activo en el proceso de absorción del Fe ha sido demostrado previamente por nuestro grupo de investigación (Gómez-Ayala y col., 1998).

Algunos autores defienden que la ingesta simultánea de Fe y Ca en el mismo alimento, inhibe la absorción de Fe (Reddy y Cook, 1997). Sin embargo, estudios a largo plazo indican que no existe una disminución en los niveles de Fe absorbido (Minihane y Fairweather-Tait, 1998). Roughead y col. (2005) observaron en estudios realizados en humanos que la suplementación con Ca reduce la absorción de Fe hemo y de Fe total, sin afectar de manera significativa la absorción de Fe no hemo, independientemente de la biodisponibilidad en el alimento. También encontraron que el Ca inhibía la absorción de Fe hemo en la membrana apical en lugar de la transferencia en la membrana basolateral.

Nuestros resultados evidencian que el consumo de dietas con altos niveles de Ca durante 14 días no tienen efecto adverso en la absorción de Fe no hemo, ni en la relación R/I del Fe en ratas controles. Estos resultados están de acuerdo con los postulados por otros autores (Grinder-Pendersen y col., 2004), excepto en el caso de la dieta basada en leche de vaca suplementada con Ca (V^+), donde se encuentra un descenso significativo en el CDA de Fe, en comparación con una dieta con un aporte normal de Ca, como también fue descrito por Minihane y Fairweather-Tait (1998). Sin embargo, en ratas ferodeficientes alimentadas con las dietas estándar o vaca suplementadas en Ca (E^+ o V^+), el CDA de Fe, disminuye. Wienk y col. (1999) describieron el mecanismo del efecto inhibitorio de una ingesta elevada de CO_3Ca sobre la

biodisponibilidad de Fe en ratas anémicas. La disminución en la transferencia de Fe inducida por el CO_3Ca a través del citoplasma o de la membrana basolateral del enterocito puede ser la causa de la disminución en la biodisponibilidad de Fe.

Además es de destacar que, en ratas anémicas, la suplementación con Ca tiene un efecto positivo en el CDA y en la relación R/I de Fe, cuando se suministra la dieta basada en leche de cabra (C). Esto puede ser debido a las excepcionales características nutricionales de la leche de cabra (López-Aliaga y col., 2000; Alférez y col., 2006), la cual minimiza las interacciones Ca-Fe, incluso cuando la cantidad de Ca en la dieta es el doble de los requerimientos para la rata.

4.4. CONCENTRACIÓN HIERRO EN ÓRGANOS

El Two-Way ANOVA muestra que tanto la dieta como la anemia tienen un efecto significativo sobre los depósitos de Fe en los distintos órganos estudiados (excepto la dieta en el bazo). Además, se observa una interacción dieta x anemia con respecto al depósito de Fe en fémur ($P < 0.01$) y esternón ($P < 0.001$), tanto para los animales que reciben dietas normales como suplementadas en Ca. En general, en todos los órganos estudiados, las concentraciones de Fe son menores en las ratas anémicas que en sus respectivos controles para las tres dietas ensayadas (tanto normales como suplementadas con Ca) ($P < 0.001$), excepto en el esternón de ratas alimentadas con dieta estándar, donde no se observaron diferencias significativas. Este hecho puede ser debido a que el suministro de las distintas dietas durante 14 días no es suficiente para restaurar los depósitos de este mineral. Las concentraciones de Fe en el hígado y bazo son utilizados habitualmente como marcadores de rutina para evaluar los depósitos de Fe en el organismo (Whittaker y col., 1996). El marcado descenso en la concentración de Fe en hígado y bazo, sugiere que existe una depleción de los almacenes de Fe en ratas anémicas. Bajo nuestras condiciones experimentales, las concentraciones más altas de Fe se encuentran en el bazo, e hígado, seguido de otros órganos como esternón y fémur. (Tabla 3; Figuras 4a-d).

La comparación de las dietas basadas en leche, revela que el contenido de Fe en los órganos es superior para ambos grupos de animales (controles y ferodeficientes) alimentados con las dietas de leche de cabra (tanto normal como con un contenido doble de Ca) que para

aquellos alimentados con las dietas basadas en leche de vaca, particularmente en el esternón, fémur e hígado. La comparación de las dietas estándar y basadas en leche de cabra muestra que el contenido de Fe en fémur es superior para ambos grupos de animales que reciben las dietas constituidas con leche de cabra (normal o suplementada) ($P < 0.001$). No obstante, la comparación entre las dietas vaca y estándar pone de manifiesto que en ambos grupos (controles y ferodeficientes), las concentraciones de Fe son menores en todos los órganos estudiados para la dieta basada en leche de vaca, especialmente en el esternón ($P < 0.001$). La suplementación con 5000 mg Ca/Kg dieta con respecto a una dieta con un nivel normal de Ca no tiene efecto significativo en el contenido de Fe en los diferentes órganos estudiados, tanto en controles como ferodeficientes, para las ratas que reciben la dieta basada en leche de cabra, mientras que para las dietas estándar y vaca, los depósitos de Fe son sensiblemente menores. Este hecho está de acuerdo con la mejor relación R/I de Fe obtenida con la dieta elaborada con leche de cabra, incluso cuando está suplementada con Ca.

4.5. PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS

En ratas controles, todos los parámetros hematológicos estudiados (recuento de hematíes, VCM, hematocrito, plaquetas, Hb, Fe sérico, ferritina sérica, porcentaje de saturación de la transferrina y TIBC) están dentro de los límites normales para esta especie al comienzo y al final del periodo principal de la experiencia. Después de consumir una dieta con bajo contenido en Fe durante 40 días, las ratas eran anémicas, con una concentración de Hb media de 78.4 ± 2.6 g/L. Además, el hematocrito, el Fe sérico, VCM, ferritina sérica y la saturación de la transferrina eran bajos, mientras que los niveles de plaquetas y TIBC estaban elevados, hallazgos consistentes con la anemia inducida en las ratas (Tabla 1).

El Two-Way ANOVA revela que la eficacia de regeneración de la hemoglobina (ERH) está afectada por la dieta y por la anemia. Como era previsible, para las tres dietas ensayadas, la ERH es mayor en las ratas ferodeficientes que entre sus controles ($P < 0.001$). Por otra parte, la ERH es más alta para las ratas que consumen la dieta elaborada con leche de cabra que en aquellas que consumen las otras dietas (tanto con un contenido normal como doble de Ca), en

las que la ERH era similar entre ellas (ERH: C, C⁺ > E, E⁺ = V, V⁺) (Tabla 4; Figura 5i). La ERH en animales controles es similar a la que muestran otros autores (Matsumoto y col., 2003). La mayor utilización digestiva de Fe en las ratas anémicas se refleja en la ERH, la cual se incrementa de forma acusada con las tres dietas. Estos valores son similares a los obtenidos por nosotros en estudios previos (Pallarés y col., 1993). La ERH es claramente superior en ratas ferodeficientes alimentadas con las dietas basadas en leche de cabra, lo cual puede ser debido, en parte, a la mejor utilización digestiva de Fe en los animales que consumen estas dietas.

Es un hecho aceptado la secuencia cronológica de eventos que tienen lugar durante el tratamiento oral de la anemia ferropénica: primero se normalizan los niveles de Hb, y posteriormente se restauran los depósitos de Fe (Bothwell y Finch, 1962). Bajo nuestras condiciones experimentales, existe una correlación inversa entre la ERH y los depósitos de Fe en bazo e hígado en ratas anémicas con todas las dietas ensayadas. Este hecho sugiere que, aunque las ratas anémicas responden rápidamente a la repleción dietaria con respecto a la hematología y depósito de Fe en órganos, sin embargo muestran una concentración de Fe significativamente menor que sus controles. Estos resultados indican una restauración incompleta de los depósitos de Fe durante los 14 días del período principal de estos experimentos.

El Two-Way ANOVA revela que, en general, todos los parámetros hematológicos están afectados por la anemia, por la dieta (recuento de hematíes, VCM, Fe sérico, ferritina sérica) y también se observa un efecto de interacción dieta x anemia (recuento de hematíes, VCM, hematocrito, Fe sérico y ferritina sérica), tanto con contenido normal como doble de Ca (Figuras 5a-i). En ratas ferodeficientes, el recuento de hematíes y el hematocrito es menor que para sus controles para los tres tipos de dieta (tanto normal como suplementada en Ca) al comienzo del período experimental (P<0.001), consecuente con la anemia ferropénica inducida. Las ratas anémicas alimentadas con dietas normales o con doble de Ca muestran una completa recuperación del recuento de hematíes, hematocrito y VCM, después de consumir las distintas dietas (E, E⁺, V, V⁺, C, C⁺), especialmente en las ratas que consumen las dietas basadas en leche de cabra (C y C⁺) frente a aquellas alimentadas con las dietas elaboradas con leche de vaca (V, V⁺) (P<0.001) (Figuras 5a-c).

La ferropdeficiencia tiene un claro efecto sobre el recuento de plaquetas, duplicando su número con respecto a los controles. La administración de los distintos tipos de dietas ensayadas reduce estos niveles a valores prácticamente similares a sus controles, especialmente con las dietas estándar suplementada en Ca (E^+) y basada en leche de cabra suplementada en Ca (C^+), mientras que con la dieta elaborada con leche de vaca suplementada (V^+) el descenso es mucho menos acusado, siendo incluso más altos los niveles de plaquetas en las ratas anémicas que en los controles ($P < 0.001$). Estos resultados indican que hay una menor recuperación de la anemia entre los animales que reciben las dietas elaboradas con leche de vaca, de hecho estudios previos de nuestro grupo de investigación manifiestan que los niveles de plaquetas son un fiel reflejo del status del Fe en el organismo (Campos y col., 1998). En ratas controles alimentadas con dietas suplementadas en Ca, los niveles de plaquetas son superiores a las que reciben dietas con un contenido normal de Ca, para las dietas estándar y elaborada con leche de vaca ($P < 0.001$). Este último resultado es destacable, ya que refleja lo que sucede en la utilización nutritiva de Fe y confirma la interacción entre Fe y Ca, que es minimizada cuando se suministra la dieta basada en leche de cabra. Sin embargo, en ratas anémicas los niveles de plaquetas no se afectan por el contenido de Ca en la dieta, probablemente como consecuencia del desajuste en el metabolismo del Fe en esta situación (Pallarés y col., 1993; Viteri, 1993).

En relación a los niveles de Fe sérico, se observa una acusada disminución en las ratas anémicas que reciben las dietas basadas en leche de vaca (V, V^+) ($P < 0.001$) o estándar (E, E^+) tanto normales como suplementadas en Ca ($P < 0.05$) en comparación con sus respectivos controles. Sin embargo, cuando suministramos las dietas basadas en leche de cabra (con aporte normal o suplementada con Ca), no se observan diferencias entre grupos. Los niveles de Fe sérico son similares para todas las dietas ensayadas en las ratas controles, en cambio, el Fe sérico en ratas anémicas es significativamente mayor para las que reciben las dietas basadas en leche de cabra ($P < 0.001$) o estándar ($P < 0.01$) que para aquellas que reciben las dietas basadas en leche de vaca, tanto normales como suplementadas en Ca (Fe sérico: $C, C^+ = E, E^+ > V, V^+$). La ferropdeficiencia provoca una drástica disminución en los niveles séricos de Fe, que permanecen bajos tras consumir las elaboradas con leche de vaca (V, V^+). Sin embargo, cuando las ratas anémicas son alimentadas con las dietas basada en leche de cabra (C) y estándar (E), éstos

valores se recuperan, en especial con la dieta de leche de cabra (C) que llega a alcanzar valores similares a sus respectivos controles. Además, el suplemento de Ca en las dietas, en el caso de la dieta de leche de cabra (C⁺) no afecta a los valores de Fe sérico. Estos resultados pueden ser debidos al hecho de que la leche de cabra mejora la utilización nutritiva de Fe y minimiza las interacciones con el Ca (Barrionuevo y col., 2002).

La ferritina sérica (Tabla 4; Figura 5f) es otro índice que es considerado muy útil ya que es un fiel reflejo de los depósitos de Fe en el organismo (Walters y col., 1973). Nuestros resultados revelan que la ferritina sérica es significativamente mayor en las ratas controles que en las anémicas al comienzo del periodo principal ($P < 0.001$). La influencia de la ingesta dietaria de Fe durante 14 días es especialmente significativa en las ratas alimentadas con la dieta elaborada con leche de cabra (C), donde los valores de ferritina sérica en ratas anémicas se igualan a los de sus controles, mientras que con las dietas estándar y las basadas en leche de vaca, la recuperación es menor, en especial con las dietas de leche de vaca (V, V⁺). La suplementación con Ca en la dieta produce una disminución en los niveles de ferritina sérica con todas las tres dietas ensayadas (E⁺, V⁺, C⁺), aunque este descenso es mucho menos acusado en los animales que consumen dieta elaborada con leche de cabra (C⁺). Este hecho revela que la inclusión de la leche de cabra en la dieta no solo restaura los depósitos de Fe en ratas anémicas, sino que este efecto positivo se mantiene incluso cuando la cantidad de Ca en la dieta es el doble de los requerimientos para esta especie.

La saturación de la transferrina (Tabla 4; Figura 5g) disminuye drásticamente con la anemia, como ha sido revelado también por otros autores (Erikson y col., 1997). Después de consumir las dietas basadas en leche de vaca (V, V⁺), la transferrina permanece baja en las ratas anémicas, mientras que no se observan diferencias entre ratas anémicas y controles que consumen las dietas estándar (E, E⁺) y basadas en leche de cabra (C, C⁺). Este hallazgo revela que la leche de vaca no ayuda a recuperar la anemia, como indican los parámetros hematológicos, que permanecen bajos. La suplementación con Ca en la dieta no afecta significativamente a la saturación de la transferrina, con ninguna de las dietas estudiadas.

El TIBC (Tabla 4; Figura 5h) es menor en ratas controles que en anémicas al comienzo del periodo experimental. Después del consumo de las distintas dietas ensayadas, el TIBC no se afecta significativamente por el tipo de dieta, ni por el contenido de Ca en las mismas, lo cual es bastante lógico ya que este índice relaciona el Fe sérico con el porcentaje de saturación de la transferrina.

4.6. UTILIZACIÓN DIGESTIVA Y METABÓLICA DE CALCIO Y FÓSFORO

El Two-Way ANOVA muestra que el CDA y la relación R/I de Ca y P están afectados por la dieta y por la anemia. Después de suministrar las distintas dietas ensayadas (con contenido normal o suplementadas con Ca), el CDA y la relación R/I de Ca y P es menor en las ratas ferodeficientes que para sus respectivos controles, independientemente del tipo de dieta consumida, salvo en las dietas basadas en leche de cabra (C, C⁺), donde no existen diferencias significativas con los controles para el R/I del P (Tablas 5 y 6; Figuras 6 - 9).

Si se comparan los efectos de las tres dietas (tanto normales como suplementadas con Ca) en ratas controles y anémicas, se observa que el CDA de Ca y P es mayor cuando los animales reciben la dieta basada en leche de cabra ($P < 0.001$), excepto en el caso de animales controles alimentados con dietas suplementadas con Ca, donde no existen diferencias significativas entre dietas para el CDA de P. La relación R/I de Ca y P es mayor cuando se suministra la dieta elaborada con leche de cabra respecto a la basada en leche de vaca, tanto con contenido normal como doble de Ca. Cuando se suplementan las tres dietas con Ca, desciende el CDA y la relación R/I de Ca y P, tanto en ratas controles como en ferodeficientes ($P < 0.001$).

El menor CDA de Ca en los animales ferodeficientes puede deberse a que la anemia produce un incremento en la utilización digestiva de Fe y por tanto disminuye la del Ca. A pesar de todo, se ha encontrado una mejor utilización digestiva y metabólica para el Ca y P, tanto en ratas ferodeficientes como controles alimentadas con las dietas basadas en leche de cabra (C, C⁺). Esta significativa ventaja puede ser debida a que el consumo de la dieta basada en leche de cabra produce una mejor recuperación del metabolismo del Fe y ERH y por tanto

bajo estas condiciones, la cantidad de oxígeno disponible y de ATP se incrementa, recuperándose los transportadores de Ca de forma más eficiente, lo cual favorece la absorción de Ca por transporte activo (Conrad y Umbreit, 1993). Una sucesión de eventos similares tiene lugar con el P, ya que la absorción de este elemento se realiza, en parte, a través de transporte activo (López-Aliaga y col., 1994). Además, como se ha observado previamente en ratas controles, la dieta basada en leche de cabra (C) reduce la interacción entre Fe y Ca y por tanto se incrementa la utilización nutritiva de ambos (Barrionuevo y col., 2002; Campos y col., 2003). La menor interacción Ca-Fe en animales alimentados con la dieta elaborada con leche de cabra puede contribuir a la mejor utilización nutritiva de Ca en situación de anemia, alcanzando el CDA de Ca valores que incluso superan a los encontrados para ratas controles alimentados con la dieta estándar (E). Esta menor interacción Ca-Fe, se puede explicar por las peculiares características nutricionales de la leche de cabra con respecto a la de vaca. La leche de cabra tiene un alto contenido en Vitamina D, vitamina que favorece el transporte transcelular saturable de Ca dependiente de energía. Otro factor que puede contribuir a esta mayor absorción de Ca con la dieta basada en leche de cabra (C), es su mayor contenido en lisina con respecto a la leche de vaca, aminoácido que está implicado en el transporte pasivo de Ca (Alfárez y col., 2006; Barrionuevo y col., Campos y col., 2003). Por otra parte, la lactosa presente en la leche de cabra es más digestiva y su absorción es óptima (Martínez-Férez, 2004) y de acuerdo con Heaney (1996), el Ca de la leche puede absorberse bajo la influencia de la lactosa en el intestino delgado distal, a través de la vía paracelular. Por tanto, la leche de cabra proporciona Ca con una “absorción asegurada”, que es generalmente insensible a factores externos.

4.7. DEPÓSITO DE CALCIO Y FÓSFORO EN ÓRGANOS

La anemia produce una clara desmineralización ósea, como se puede deducir del menor depósito de Ca en fémur de ratas anémicas (Campos et al., 2006). Después de alimentar ambos grupos de ratas (controles y anémicas) con las tres dietas experimentales con un aporte normal en Ca, se observa que el contenido de Ca en fémur es similar a sus respectivos controles, en ratas anémicas alimentadas con las dietas estándar y basada en leche de cabra (E y C). Sin embargo,

cuando se duplica el contenido de Ca en la dieta, el depósito de Ca en fémur de ratas anémicas es superior a sus controles para las dietas basadas en leche, pero no para la dieta estándar (E), donde se observa que el contenido de Ca en este órgano es menor en ratas anémicas que en sus controles (Tabla 7; Figura 10a).

En general, el depósito de Ca en fémur es superior cuando se suministran las dietas basadas en leche de cabra (C, C⁺), con respecto a las otras dietas ensayadas. Así pues, el suplemento de Ca en la dieta eleva el depósito de Ca en fémur de ratas anémicas cuando se alimentan con dietas basadas en leche, en especial con la leche de cabra, efecto que no se observa para la dieta estándar (E). Los menores niveles de PTH encontrados en ambos grupos de animales alimentados con la dieta basada en leche de cabra (Tabla 9; Figura 12d), junto con la mayor biodisponibilidad de Ca presente en este tipo de leche podrían explicar el mayor depósito de este mineral en fémur.

En el caso del músculo *longissimus dorsi*, el depósito de Ca es más alto en ratas anémicas que en controles, siendo esta diferencia estadísticamente significativa para las dietas estándar (E, E⁺) y las dietas basadas en leche de cabra (C, C⁺). En líneas generales, el depósito de Ca en el músculo es superior con las dietas elaboradas a partir de leche de cabra (C, C⁺) que con las otras dietas estudiadas. Cuando se duplica el contenido de Ca en la dieta, se eleva el contenido en Ca del músculo *longissimus dorsi* en ratas anémicas alimentadas con dietas basadas en leche, especialmente con la dieta elaborada a partir de leche de cabra (C⁺) (Tabla 7; Figura 10c).

La comparación de las dietas con un contenido normal de Ca, muestra que la dieta basada en leche de cabra favorece el depósito de Ca en esternón de ratas anémicas respecto a sus controles, hecho que no se observa con las dietas suplementadas en Ca. Este incremento del depósito de Ca en el esternón favorece la eritropoyesis, que estaba disminuida en las ratas con ferropdeficiencia (Tabla 7; Figura 10b).

En relación al contenido de P en fémur, es de resaltar, que cuando se duplica el contenido de Ca en la dieta basada en leche de cabra, el depósito de este mineral es mayor en ratas anémicas que en controles, al contrario de lo que sucede con la dieta basada en leche de vaca (Tabla 8; Figura 11a). Por otra parte, la leche de cabra enriquecida en Ca favorece el depósito de P en músculo de ratas anémicas, con respecto a la leche de vaca (Tabla 8; Figura 11b). El depósito de P en cerebro es mayor en ratas anémicas para las tres dietas ensayadas con nivel normal de Ca (Tabla 8; Figura 11c). Al comparar las dietas basadas en leche, se observa que el depósito de P en cerebro es mayor en los animales alimentados con las dietas basadas en leche de cabra (C, C⁺). El contenido de P en bazo y riñones no se afecta por la anemia, la dieta, ni el suplemento de Ca, permaneciendo en todo momento dentro de los márgenes normales descritos para esta especie en la bibliografía (Campos y col., 1998; Barrionuevo y col., 2002; Alférez y col., 2006) (Tabla 8; Figura 11d y e).

Después de recuperarse de una situación de anemia, el Ca (fundamental para el proceso de contracción muscular) es transportado hacia el tejido muscular en mayores cantidades en las ratas ferodeficientes que en las controles, ya que el músculo es un compartimento implicado en la homeostasis plasmática de dicho catión (Van Beresteijn y col., 1993). Estos resultados parecen evidenciar que tras la recuperación de la ferodeficiencia se incrementa la actividad muscular, actividad que esta reducida en la anemia por la menor cantidad de oxígeno aportado al tejido. Además tras la recuperación de la anemia, el músculo tiene una mayor necesidad de Ca. El mayor contenido de P en músculo y cerebro de ratas anémicas con respecto a sus controles alimentadas con la dieta basada en leche de cabra, es un hecho bastante destacable. Este efecto positivo es lógico, porque la anemia por deficiencia de Fe reduce el aporte de oxígeno a todas las células del organismo, lo cual limita la producción de ATP, pudiendo afectar a ambos órganos. Por tanto, el mayor depósito de P en músculo y cerebro es importante para compensar el elevado consumo de ATP de estos tejido tras la recuperación de la anemia (Campos y col., 2006).

4.8. NIVELES SÉRICOS DE CALCIO, FÓSFORO, PTH Y CORTICOSTERONA

Después de alimentar a los animales con las distintas dietas ensayadas, los niveles de Ca iónico en suero son menores en ratas anémicas que en sus controles, sin embargo los niveles de Ca total y P séricos no se afectan por la anemia. Con respecto al tipo de dieta, se observa que existen unas concentraciones significativamente superiores en los niveles séricos de Ca y P de ambos grupos de animales alimentados con las dietas basadas en leche de cabra (C, C⁺), respecto a los que consumen las dietas estándar (E, E⁺), o basadas en leche de vaca (V, V⁺). El efecto de los diferentes tipos de dieta sobre el Ca total muestra un patrón similar al del Ca iónico (Tabla 9; Figuras 12a-c).

El Two-Way ANOVA revela que el Ca (total e iónico), el P sérico y la PTH están afectados por la dieta, tanto en dietas normales como suplementadas en Ca. Los niveles de Ca iónico reflejan fielmente lo que tiene lugar a nivel digestivo. Los menores niveles de Ca iónico encontrados en ambos grupos de animales alimentados con las dietas estándar (E) y basada en leche de vaca (V), se acompaña de un incremento en los niveles de PTH (Tabla 9; Figura 12d), siendo esta disminución en los niveles séricos de Ca iónico el principal estímulo para la secreción de esta hormona (Masuyama y col., 2000). Estudios previos demostraron que una disminución en la tasa de secreción de PTH conlleva un incremento en la utilización de Ca, resultante del incremento en la absorción de dicho mineral (Calvo, 1994). Bajo nuestras condiciones experimentales, la inclusión de leche caprina en la dieta produce un incremento en la absorción de Ca, acompañado de una disminución en los niveles séricos de PTH.

Como es sabido, la anemia provoca un aumento en los niveles plasmáticos de corticosterona (Campos y col., 1998). El suministro de las diferentes dietas con un aporte adecuado de Fe normaliza los niveles de esta hormona (Tabla 9; Figura 12e).

4.9. UTILIZACIÓN DIGESTIVA Y METABÓLICA DE MAGNESIO

La utilización digestiva de Mg (CDA) está afectada por la dieta, la anemia en los animales alimentados con las dietas tanto normales como suplementadas en Ca y sólo se observa interacción dieta x anemia en los animales alimentados con dietas suplementadas en Ca (Two-Way ANOVA, $P < 0.001$). El CDA de Mg es menor en ratas anémicas que en controles sólo para las dietas basadas en leche de vaca (V, V⁺) ($P < 0.001$). En relación al tipo de dieta suministrada, en ambos grupos de animales alimentados con dietas con un contenido normal o doble de Ca, el CDA de Mg es mejor en las ratas alimentadas con la dieta basada en leche de cabra con respecto a las otras dietas ensayadas ($P < 0.001$) (CDA Mg: C, C⁺ > E, E⁺ = V, V⁺). El suplemento de Ca en la dieta conduce a un menor CDA de Mg en ratas controles y anémicas alimentadas con las distintas estandar (E⁺) y la elaborada con leche de vaca (V⁺) ($P < 0.001$) y en menor medida con la dieta de leche de cabra (C⁺) ($P < 0.05$) (Tabla 10; Figura 13).

La absorción de Mg a través del borde en cepillo o membrana apical del enterocito no requiere energía metabólica, puesto que dicho elemento se mueve gracias al gradiente electroquímico (Schweigel y col., 1999) y por arrastre de disolvente (Hardwick y col., 1990). Es un hecho reconocido que la mejora de las funciones digestivas conducirá a mejorar la absorción intestinal de este mineral. El mayor CDA de Mg para las dietas elaboradas con leche de cabra (C y C⁺) se debe a varias características nutricionales presentes en esta leche que favorecen el proceso digestivo, como es su grasa rica en MCT y su proteína más soluble que, como ha sido descrito previamente, favorece la absorción intestinal de Mg (López-Aliaga y col., 2003).

Otro factor que podría contribuir a la mejora hallada en el CDA de Mg con la dieta basada en leche de cabra en ratas anémicas es la mejor recuperación del metabolismo del Fe, como indica el CDA y la ERH observados en los animales alimentados con la dieta basada en leche de cabra, con respecto a las otras dietas ensayadas. Esto se debe a que, con un mejor metabolismo de Fe, la cantidad de oxígeno disponible y ATP se incrementa, por tanto los receptores de Mg se recuperan de manera más eficiente, lo cual favorece su absorción por transporte activo, como ha sido descrito por otros autores (Conrad y Umbreit, 1993). Otra

consecuencia de la mejor recuperación del metabolismo de Fe con las dietas de leche de cabra, es que el componente pasivo de la absorción de Mg está menos influenciado por la presencia de citrato libre en el lumen intestinal, que produce un complejo Mg-citrato de baja solubilidad (López de Novales, 1974). Este hecho es debido a que parte del citrato es absorbido por transporte activo como un complejo de Fe (Fe-citrato), retirándose del lumen intestinal y evitando así la formación de complejos insolubles con el Mg. Además, esta explicación está apoyada por resultados previos obtenidos por nuestro grupo de investigación en ratas controles y anémicas (Campos et al., 1996), donde una dieta con proteína férrica producía una mejor absorción de Fe, acompañada de un incremento en la absorción de Mg.

La relación R/I de Mg está afectada por la dieta, por la anemia y por su interacción en las dietas con un aporte normal y doble de Ca. La relación R/I de Mg es significativamente menor en ratas anémicas que en sus controles para las dietas basadas en leche de vaca con un contenido normal de Ca ($P < 0.001$) y suplementada en Ca ($P < 0.05$) y para la dieta estándar suplementada en Ca ($P < 0.001$). El R/I de Mg es superior en las ratas alimentadas con la dieta basada en leche de cabra, que en las alimentadas con la dieta estándar y la basada en leche de vaca ($P < 0.001$). Por último, la relación R/I de Mg tiende a disminuir en ratas controles y anémicas alimentadas con las dietas estándar y la basada en leche de vaca suplementadas en Ca (E^+ y V^+) en comparación con estas dietas con un contenido normal de Ca (E y V) (significativa para la dieta E en ratas anémicas, $P < 0.001$) (Tabla 10; Figura 14). Es de destacar, que la retención de Mg (R/I) es significativamente mayor ($P < 0.001$) cuando las ratas son alimentadas con las dietas basadas en leche de cabra, ya sea con contenido normal o doble de Ca.

Uno de los resultados mas relevantes es que la utilización digestiva de Mg con la leche de cabra suplementada en Ca (C^+) está mucho menos afectada negativamente que con las otras dietas suplementadas en Ca (E^+ y V^+). El suplemento de Ca en la dieta conduce a una menor absorción de Mg, consecuencia, en parte, a que el Ca disminuye la permeabilidad de las uniones entre células intestinales y, por tanto, reduce el movimiento paracelular de Mg (Kimura, 2007). Las menores interacciones minerales en los animales alimentados con la

dieta elaborada con leche de cabra, incrementa su utilización nutritiva, lo que contribuye a la mejor relación R/I de Mg en situación de anemia y suplementación de Ca, con valores que duplican los resultados encontrados para la dieta de leche de vaca, e incluso la dieta estándar. De hecho, las peculiares características nutricionales de la leche de cabra con respecto a la de vaca podrían contribuir a explicar la menor interacción mineral encontrada para las dietas basadas en leche de cabra (Barrionuevo et al., 2002; Campos y col., 2003; Campos y col., 2006).

El proceso de excreción urinaria es el mecanismo regulador más importante para la homeostasis del Mg. Las pérdidas urinarias de Mg están estrechamente relacionadas con los niveles séricos de Mg. Bajo nuestras condiciones experimentales, la suplementación con Ca tiende a disminuir la retención de Mg, excepto para los animales alimentados con dietas basadas en leche de cabra, normal o doble de Ca. Unas menores pérdidas urinarias de Mg debidas a una menor ingesta de Mg, ha sido descrita previamente por otros autores (Brink y col., 1992), sin embargo, este hecho por si solo no justifica los mejores resultados obtenidos con la dieta basada en leche de cabra. Una vez más, las beneficiosas características nutricionales de este tipo de leche justifican los mejores resultados obtenidos con respecto al metabolismo de Mg. De hecho, la mejor calidad de la proteína presente en la leche de cabra en comparación a la de vaca, puede ser parcialmente responsable de la disminución de la excreción urinaria de Mg en los animales alimentados con este tipo de leche, ya que la proteinuria causada por el consumo de proteína de baja calidad inhibe la reabsorción tubular de Mg, incrementando las pérdidas urinarias del mismo. Además el mayor contenido en vitamina D de la leche de cabra, también contribuye a este efecto beneficioso, ya que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ promueve la reabsorción de Mg en el túbulo distal, dado la inducción de la calbindina 9K estimula el transporte transcelular en este túbulo (Ritchie y col., 2001).

4.10. DEPÓSITO DE MAGNESIO EN ÓRGANOS

El depósito de Mg en fémur es menor en ratas anémicas que en sus controles para las tres dietas ensayadas con aporte normal de Ca (E, V y C), así como para los animales

alimentados con la dieta basada en leche de vaca suplementada en Ca (V^+). Sin embargo, en general en esternón y músculo *longissimus dorsi*, la anemia no modifica el depósito de Mg con respecto a sus controles con las diferentes dietas estudiadas (Tabla 11; Figuras 15a-c).

En general, la comparación de las seis dietas ensayadas indica que el contenido de Mg en órganos no muestra diferencias significativas en ambos grupos de animales, tanto en dietas con aporte normal como suplementadas en Ca.

El suplemento de Ca provoca una disminución en el contenido de Mg en esternón de ratas controles alimentadas con la dieta estándar suplementada (E^+) ($P < 0.001$) y ratas anémicas alimentadas con la dieta basada en leche de vaca suplementada en Ca (V^+) ($P < 0.01$) (Tabla 11; Figura 15b). El compartimento óseo (fémur y esternón) es el destino preferente para el depósito de Mg en ratas controles y anémicas alimentadas con todas las dietas ensayadas. Bajo nuestras condiciones experimentales, la anemia provoca un descenso en los niveles de Mg en fémur, lo cual está de acuerdo con resultados previos de nuestro grupo de investigación (Campos y col., 1998) y de otros autores (Medeiros y col., 2002), quienes encontraron que en las ratas ferodeficientes disminuye la masa ósea y se incrementa su fragilidad.

En ratas anémicas, el enriquecimiento en Ca de la leche de cabra conduce a una recuperación del contenido de Mg en fémur, hecho que no se observa cuando se alimentan los animales con la dieta basada en leche de vaca. La menor interacción mineral explica, de nuevo, este efecto beneficioso de la leche de cabra sobre el depósito de Mg óseo.

En general, tras los 14 días de suministro de las distintas dietas ensayadas, no se observan cambios importantes en los depósitos de Mg en órganos, lo cual se puede deber a que este periodo de tiempo no es suficiente para que se refleje en los órganos lo que sucede a nivel digestivo como ya indicaron Lerma y col. en 1993.

En relación al nivel de Mg en sangre total, se observa una cierta tendencia a ser mayor en los animales alimentados con las dietas basadas en leche de cabra (C, C⁺), hecho que confirma lo que ocurre a nivel digestivo y metabólico (Tabla 9; Figura 16).



Resumen y Conclusiones

5. RESUMEN Y CONCLUSIONES

La investigación llevada a cabo estudia la utilización digestiva y metabólica de Fe, Ca, P y Mg, así como los parámetros hematológicos relacionados con el metabolismo del Fe en ratas controles y con anemia ferropénica nutricional inducida experimentalmente, alimentadas con dietas estándar (E), basada en leche de vaca (V) o basada en leche de cabra (C), con un aporte normal o con el doble de los requerimientos de Ca.

Para realizar el estudio, las dietas se han preparado con igual contenido de grasa (10%) y proteína (20%), pero distinta calidad lipídica y proteica (aceite de oliva y caseína para la dieta estándar; grasa y proteína procedente de leche de vaca para la dieta elaborada con leche de vaca; grasa y proteína procedente de leche de cabra para la dieta basada en leche de cabra).

El estudio consta de 12 experimentos de 10 animales por grupo, para las seis dietas ensayadas. Después de alimentar a los animales durante 40 días con una dieta estándar (AIN93-G) con contenido normal o bajo contenido en Fe, se utiliza la técnica de Thomas-Mitchell para los estudios de utilización nutritiva.

En todos los experimentos se determina la concentración de Fe, Ca, P y Mg en dieta, heces, orina y en los correspondientes órganos diana. Además, se determinan los siguientes parámetros hematológicos: recuento de hematíes, volumen corpuscular medio, hematocrito, plaquetas y hemoglobina, así como los niveles séricos de Fe, Ca (total e iónico), P, parathormona, corticosterona, saturación de la transferrina, ferritina y TIBC. Por último, también se determina la concentración de Mg en sangre total.

Tras la discusión de los resultados obtenidos, se ha llegado a las siguientes CONCLUSIONES:

CONCLUSIÓN PRIMERA

La recuperación de la anemia es mejor cuando se suministra la dieta basada en leche de cabra, normal o enriquecida en Ca, como se pone de manifiesto por la elevación de la ERH y la disminución de los niveles de plaquetas.

CONCLUSIÓN SEGUNDA

La desmineralización ósea provocada por la anemia ferropénica nutricional se recupera mejor con las dietas basadas en leche, especialmente con la de cabra, debido a la mayor biodisponibilidad de calcio y fósforo, junto con los menores niveles de PTH encontrados en los animales que consumen este alimento.

CONCLUSIÓN TERCERA

En animales controles y ferrodeficientes, la inclusión de leche de cabra en la dieta, con un contenido normal o doble de calcio, favorece la utilización digestiva (CDA) y metabólica (R/I) de hierro, así como su depósito en hígado, esternón y fémur.

CONCLUSIÓN CUARTA

En general, el consumo habitual de leche de cabra, normal o enriquecida en calcio, aumenta la utilización nutritiva de calcio, fósforo y magnesio (CDA y R/I), ya sea en situación normal o de ferropénica. Este hecho, en el caso de calcio y fósforo, se refleja a nivel de su destino metabólico en músculo *longissimus dorsi* y fémur. Además, el mayor depósito de fósforo en músculo y cerebro, de ratas anémicas alimentadas con la dieta basada en leche de cabra, es importante para compensar el elevado consumo de ATP de estos tejidos en la recuperación de la anemia.

CONCLUSIÓN QUINTA

La leche de cabra, incluso enriquecida en calcio, minimiza las interacciones Ca-Fe ya que favorece la utilización nutritiva de hierro y no afecta negativamente su depósito en los diferentes órganos estudiados, hecho que es evidente en animales controles y especialmente en situación de ferropénica.

CONCLUSIÓN GENERAL

El consumo habitual de leche de cabra, alimento natural con unas características nutricionales altamente beneficiosas, tiene efectos positivos sobre el metabolismo mineral, la recuperación de la anemia ferropénica y la mineralización ósea. Además, su enriquecimiento con calcio no interfiere en la biodisponibilidad de los minerales estudiados, a diferencia de lo observado con la leche de vaca. Por tanto, sería aconsejable la inclusión de la leche caprina en la dieta, tanto en la población general como en la afectada por anemia ferropénica nutricional.

A decorative graphic featuring several red blood cells of varying sizes and orientations. To the left of the cells is a vertical bar chart with four bars of increasing height, topped with plus signs. The letters 'Hb' are positioned to the left of the cells. The entire graphic is set against a horizontal gradient bar that transitions from light to dark red.

Summary

6. SUMMARY

6.1. ABBREVIATIONS USED

- AAS**: Atomic absorption spectrophotometry.
- ADC**: Apparent digestibility coefficient.
- AIN**: American Institute of Nutrition.
- C diet**: Cow milk-based diet, with normal-Ca content.
- C⁺ diet**: Cow milk-based diet, Ca-supplemented.
- DM**: Dry matter.
- EP**: Experimental period.
- FAO**: Food and Agriculture Organization.
- G diet**: Goat milk-based diet, with normal-Ca content.
- G⁺ diet**: Goat milk-based diet, Ca-supplemented.
- GLC**: Gas-liquid chromatography.
- Hb**: Haemoglobin.
- HPLC**: High performance liquid chromatography.
- HRE**: Haemoglobin regeneration efficiency.
- IDA**: Iron deficiency anaemia.
- LC**: Liquid Chromatography.
- MCV**: Mean corpuscular volume.
- MCT**: Medium chain triglycerides.
- MS**: Mass spectrophotometry.
- NFA**: Nutritional ferropenic anaemia.
- PCV**: Packed cell volume (haemaocrit).
- PEP**: pre-experimental period.
- PITC**: Phenylisothiocyanate.
- PTH**: Parathormone.
- RBC**: Red blood cells.
- R/I**: Retention versus intake ratio.
- S diet**: Standard diet, with normal-Ca content.
- S⁺ diet**: Standard diet, Ca-supplemented.
- TIBC**: Total iron binding capacity.
- WHO**: World Health Organization.

6.2. TABLES AND FIGURES

TABLE 1- HAEMATOLOGICAL PARAMETERS ON DAY 40 OF PEP IN RATS FED WITH A NORMAL OR LOW-IRON DIET (NUTRITIONAL FERROPENIC ANAEMIA MODEL)

PARAMETER	CONTROL GROUP NORMAL -Fe DIET (n =60)	ANAEMIC GROUP LOW-Fe DIET (n =60) *
RBC (10 ¹² /L)	7.10 ± 0.14	6.48 ± 0.16
MCV (fL)	55.11 ± 0.22	39.38 ± 0.71
Haematocrit (PCV) (%)	38.60 ± 0.77	27.59 ± 0.48
Plateletes (10 ⁹ /L)	738 ± 24.5	1360 ± 67.1
Hb Concentration (g/L)	128.5 ± 2.8	78.4 ± 2.6
Serum Fe (µg/L)	1392 ± 123	698 ± 56
Serum Ferritin (µg/L)	82.32 ± 2.71	50.21 ± 1.28
Transferrin saturation (%)	47.32 ± 7.19	3.71 ± 0.31
TIBC (µg/L)	2837 ± 205	17915 ± 733

* All haematological parameters were statistically different from their respective controls (P<0.001) by *Student's t Test*.

TABLE 2.- DIGESTIVE AND METABOLIC UTILIZATION OF IRON IN CONTROL AND ANAEMIC RATS FED DIFFERENT DIETS WITH NORMAL OR DOUBLE-Ca CONTENT

Ca-CONTENT IN THE DIET	STANDARD DIET (S)		COW MILK-BASED DIET (C)		GOAT MILK-BASED DIET (G)	
	CONTROL GROUP	ANAEMIC GROUP	CONTROL GROUP	ANAEMIC GROUP	CONTROL GROUP	ANAEMIC GROUP
Food intake (g/dia)						
NORMAL	17.23 ± 0.51	19.02 ± 0.88	14.67 ± 0.61	15.44 ± 0.23	14.01 ± 0.51	13.77 ± 0.22
DOUBLE	17.22 ± 0.42	17.58 ± 0.74	14.71 ± 0.59	15.93 ± 0.52	14.63 ± 0.44	14.47 ± 0.76
Intake (µg/day)						
NORMAL	792.75 ± 23.36	874.93 ± 13.05	655.950 ± 27.21	685.424 ± 25.41	614.67 ± 22.42	605.91 ± 9.72
DOUBLE	757.71 ± 18.51	773.51 ± 32.32	656.67 ± 26.27	711.27 ± 23.16	673.16 ± 20.29	665.42 ± 34.88
Faecal (µg/day)						
NORMAL	577.40 ± 35.04	510.71 ± 13.58	461.52 ± 25.88	381.17 ± 13.06	387.62 ± 17.34	286.69 ± 6.10
DOUBLE	579.40 ± 20.88	506.12 ± 31.59	495.28 ± 16.96	446.01 ± 17.03	417.85 ± 19.76	299.55 ± 19.77
Absorbed (µg/day)						
NORMAL	215.36 ± 21.43	364.21 ± 12.90	194.43 ± 13.43	304.25 ± 19.00	227.02 ± 10.68	302.27 ± 9.71
DOUBLE	212.69 ± 16.05	332.55 ± 14.07	161.39 ± 13.88	285.67 ± 15.05	255.30 ± 21.79	365.87 ± 17.19
ADC (%)						
NORMAL	27.47 ± 2.91	41.58 ± 1.28	29.92 ± 1.98	44.03 ± 1.91	36.98 ± 1.33	52.62 ± 0.90
DOUBLE	23.59 ± 2.01	34.58 ± 1.89	24.22 ± 1.68	37.61 ± 1.59	37.78 ± 2.21	55.20 ± 1.02
Urinary (µg/dia)						
NORMAL	5.96 ± 0.69	8.91 ± 1.25	4.51 ± 0.55	4.30 ± 0.50	4.62 ± 0.27	6.81 ± 1.09
DOUBLE	6.16 ± 0.49	6.29 ± 0.77	3.19 ± 0.27	3.92 ± 0.58	5.59 ± 1.13	3.15 ± 0.53
Retention (µg/dia)						
NORMAL	209.40 ± 21.71	355.27 ± 12.81	189.92 ± 13.51	299.95 ± 18.80	222.40 ± 10.68	295.46 ± 9.64
DOUBLE	206.53 ± 16.09	326.26 ± 14.26	156.20 ± 13.85	280.76 ± 15.03	249.72 ± 21.82	362.72 ± 17.05
R/I (%)						
NORMAL	26.71 ± 2.94	40.59 ± 1.41	29.21 ± 1.97	43.40 ± 1.90	36.22 ± 1.34	51.50 ± 0.81
DOUBLE	22.70 ± 2.00	43.81 ± 1.81	24.31 ± 1.51	36.72 ± 1.58	36.94 ± 2.84	54.72 ± 1.01

TABLE 3.- IRON CONTENT IN ORGANS OF RATS FED DIFFERENT DIETS WITH NORMAL OR DOUBLE-Ca CONTENT

Ca-CONTENT IN THE DIET	STANDARD DIET (S)		COW MILK-BASED DIET (C)		GOAT MILK-BASED DIET (G)	
	CONTROL GROUP	ANAEMIC GROUP	CONTROL GROUP	ANAEMIC GROUP	CONTROL GROUP	ANAEMIC GROUP
Femur						
NORMAL	112.81 ± 6.50	95.61 ± 1.88	117.71 ± 6.22	80.39 ± 2.89	174.23 ± 6.58	120.88 ± 8.12
DOUBLE	105.25 ± 1.72	83.99 ± 6.00	90.89 ± 4.02	71.91 ± 2.01	165.72 ± 3.91	112.21 ± 2.14
Sternum						
NORMAL	146.01 ± 5.39	158.71 ± 11.28	109.91 ± 2.58	78.88 ± 2.47	148.20 ± 4.27	111.29 ± 2.68
DOUBLE	134.69 ± 7.19	141.03 ± 7.28	102.11 ± 5.49	70.11 ± 1.81	139.21 ± 5.00	114.19 ± 8.28
Spleen						
NORMAL	2397.31 ± 180.32	826.59 ± 100.79	2483.32 ± 124.48	405.01 ± 54.29	2810.42 ± 277.43	718.85 ± 68.47
DOUBLE	2214.41 ± 127.51	745.21 ± 81.79	1993.88 ± 233.61	525.69 ± 89.91	2689.59 ± 246.61	703.51 ± 67.29
Liver						
NORMAL	816.51 ± 49.11	558.01 ± 45.11	655.02 ± 41.29	338.87 ± 19.69	692.80 ± 32.91	367.82 ± 38.64
DOUBLE	754.42 ± 81.77	320.09 ± 28.51	556.02 ± 38.67	235.49 ± 12.11	601.14 ± 24.47	452.73 ± 48.28

TABLE 4.- HEMATOLOGICAL PARAMETERS OF CONTROL AND ANAEMIC RATS FED WITH DIFFERENT NORMAL OR DOUBLE-Ca CONTEN DIETS

Ca-CONTENT IN THE DIET	STANDARD DIET (S)		COW MILK-BASED DIET (C)		GOAT MILK-BASED DIET (G)	
	CONTROL GROUP	ANAEMIC GROUP	CONTROL GROUP	ANAEMIC GROUP	CONTROL GROUP	ANAEMIC GROUP
Serum Fe (µg/L)	1819 ± 136	1431 ± 103	1524 ± 91	884 ± 14	1795 ± 84	1731 ± 90
HRE (%)	1410 ± 118	1088 ± 91	1308 ± 50	726 ± 69	1566 ± 125	1582 ± 103
MCV (fL)	15.71 ± 0.90	26.90 ± 1.12	16.70 ± 1.31	29.01 ± 1.21	21.39 ± 1.48	35.82 ± 1.62
Serum ferritin (µg/L)	14.01 ± 1.0	24.49 ± 1.71	14.91 ± 1.32	24.89 ± 3.22	17.89 ± 1.21	39.12 ± 1.89
Transferrin saturation (%)	55.8 ± 0.7	49.0 ± 0.7	53.3 ± 0.5	45.7 ± 0.8	54.7 ± 0.5	48.8 ± 1.1
TIBC (µg/L)	54.2 ± 0.5	46.8 ± 0.4	57.1 ± 0.61	42.0 ± 0.8	53.6 ± 0.6	50.3 ± 0.8
Platelets (10⁹/L)	98.6 ± 2.7	79.0 ± 1.9	87.1 ± 2.2	65.8 ± 1.3	108.1 ± 3.9	98.0 ± 4.2
Haematocrit (%)	80.8 ± 2.3	63.7 ± 1.4	76.3 ± 1.4	55.8 ± 3.1	95.8 ± 3.7	90.2 ± 2.6
	54.8 ± 6.1	48.7 ± 4.5	48.3 ± 5.8	32.2 ± 3.1	55.2 ± 5.5	51.7 ± 5.2
	44.9 ± 5.8	39.3 ± 3.8	42.3 ± 5.3	27.3 ± 2.7	48.9 ± 5.3	47.6 ± 5.2
	3319 ± 229	2938 ± 197	3155 ± 217	2745 ± 241	3252 ± 221	3348 ± 240
	3042 ± 213	2563 ± 178	2945 ± 198	2610 ± 233	3023 ± 214	3197 ± 235
	7.38 ± 0.20	7.81 ± 0.23	6.90 ± 0.21	7.25 ± 0.08	7.44 ± 0.17	8.24 ± 0.19
	6.19 ± 0.15	8.19 ± 0.19	6.16 ± 0.13	6.24 ± 0.24	6.22 ± 0.11	7.25 ± 0.20
	666 ± 22	859 ± 44	589 ± 30	918 ± 55	713 ± 31	886 ± 50
	810 ± 11	840 ± 55	848 ± 23	1003 ± 16	769 ± 27	870 ± 30
	44.1 ± 1.5	41.6 ± 1.0	41.6 ± 1.5	39.7 ± 1.0	43.0 ± 1.1	42.0 ± 1.4
	32.4 ± 0.9	38.3 ± 0.8	33.3 ± 1.0	33.5 ± 0.9	32.4 ± 0.9	39.6 ± 1.1

TABLE 5.- DIGESTIVE AND METABOLIC UTILIZATION OF CALCIUM IN CONTROL AND ANAEMIC RATS FED WITH DIFFERENT NORMAL OR DOUBLE-Ca DIETS

	STANDARD DIET (S)		COW MILK-BASED DIET (C)		GOAT MILK-BASED DIET (G)	
	CONTROL GROUP	ANAEMIC GROUP	CONTROL GROUP	ANAEMIC GROUP	CONTROL GROUP	ANAEMIC GROUP
Food intake (g/day)						
NORMAL	17.23 ± 0.51	19.02 ± 0.88	14.67 ± 0.61	15.44 ± 0.23	14.01 ± 0.51	13.77 ± 0.22
DOUBLE	17.22 ± 0.42	17.58 ± 0.74	14.71 ± 0.59	15.93 ± 0.52	14.63 ± 0.44	14.47 ± 0.76
Intake (mg/dia)						
NORMAL	93.07 ± 2.74	102.71 ± 1.53	82.89 ± 3.44	86.62 ± 3.21	69.62 ± 4.01	71.61 ± 1.15
DOUBLE	167.38 ± 4.10	170.88 ± 7.15	161.20 ± 6.45	174.61 ± 5.69	139.86 ± 4.24	151.14 ± 7.92
Faecal (mg/day)						
NORMAL	45.63 ± 2.69	61.52 ± 1.73	39.12 ± 1.82	49.30 ± 1.99	23.79 ± 2.20	29.53 ± 6.11
DOUBLE	120.05 ± 3.66	127.91 ± 5.34	112.25 ± 4.47	127.40 ± 5.21	77.26 ± 4.20	95.35 ± 6.84
Absorbed (mg/day)						
NORMAL	44.44 ± 3.32	41.19 ± 2.10	43.28 ± 2.48	37.32 ± 1.39	45.83 ± 2.34	42.08 ± 2.16
DOUBLE	47.33 ± 2.66	42.96 ± 2.00	48.95 ± 2.76	47.20 ± 1.99	62.61 ± 3.89	55.78 ± 7.10
ADC (%)						
NORMAL	50.84 ± 2.79	40.03 ± 1.77	52.65 ± 1.45	43.11 ± 0.61	66.26 ± 1.72	58.57 ± 2.41
DOUBLE	28.26 ± 1.26	25.11 ± 0.44	30.30 ± 0.97	27.15 ± 0.96	44.77 ± 2.57	36.59 ± 2.65
Urinary (mg/dia)						
NORMAL	8.02 ± 0.85	7.38 ± 0.95	3.12 ± 0.66	5.72 ± 0.81	4.79 ± 0.57	5.66 ± 0.82
DOUBLE	7.20 ± 0.42	8.13 ± 0.91	5.62 ± 1.13	8.03 ± 1.40	5.17 ± 0.58	6.56 ± 1.03
Retention (mg/day)						
NORMAL	39.43 ± 3.45	33.82 ± 2.42	40.66 ± 2.35	31.59 ± 1.46	41.05 ± 1.97	36.41 ± 2.31
DOUBLE	40.14 ± 2.77	34.84 ± 2.06	43.33 ± 2.85	39.18 ± 2.65	57.44 ± 3.77	49.22 ± 6.44
R/I (%)						
NORMAL	42.32 ± 3.31	32.82 ± 2.15	48.92 ± 1.53	36.46 ± 1.16	59.55 ± 1.95	50.65 ± 2.75
DOUBLE	23.96 ± 1.50	20.31 ± 0.77	26.71 ± 1.07	22.49 ± 1.47	41.06 ± 2.49	32.25 ± 3.45

TABLE 6.- DIGESTIVE AND METABOLIC UTILIZATION OF PHOSPHORUS IN CONTROL AND ANAEMIC RATS FED DIFFERENT DIETS WITH NORMAL OR DOUBLE-Ca CONTENT

	STANDARD DIET (S)		COW MILK-BASED DIET (C)		GOAT MILK-BASED DIET (G)	
	CONTROL GROUP	ANAEMIC GROUP	CONTROL GROUP	ANAEMIC GROUP	CONTROL GROUP	ANAEMIC GROUP
Food intake (g/day)						
NORMAL	17.23 ± 0.51	19.02 ± 0.88	14.67 ± 0.61	15.44 ± 0.23	14.01 ± 0.51	13.77 ± 0.22
DOUBLE	17.22 ± 0.42	17.58 ± 0.74	14.71 ± 0.59	15.93 ± 0.52	14.63 ± 0.44	14.47 ± 0.76
Intake (mg/day)						
NORMAL	53.42 ± 1.57	58.96 ± 0.88	58.86 ± 2.44	61.51 ± 2.28	56.05 ± 2.04	55.25 ± 0.89
DOUBLE	53.38 ± 1.31	54.50 ± 2.28	55.67 ± 2.23	60.29 ± 1.96	57.51 ± 1.53	56.85 ± 2.98
Faecal (mg/day)						
NORMAL	16.77 ± 0.55	21.37 ± 0.78	23.89 ± 1.38	29.00 ± 0.53	9.00 ± 0.56	11.04 ± 0.74
DOUBLE	26.44 ± 0.91	33.88 ± 1.75	32.92 ± 1.09	43.30 ± 1.16	17.18 ± 0.73	24.47 ± 1.06
Absorbido (mg/day)						
NORMAL	36.65 ± 1.12	37.59 ± 0.88	34.98 ± 1.78	32.50 ± 2.01	47.04 ± 1.88	44.21 ± 1.14
DOUBLE	26.94 ± 1.35	20.62 ± 0.95	22.74 ± 1.46	17.00 ± 0.97	40.34 ± 1.75	32.38 ± 2.21
ADC (%)						
NORMAL	68.60 ± 0.47	63.76 ± 1.18	59.40 ± 1.63	52.42 ± 1.43	83.85 ± 0.95	79.98 ± 1.38
DOUBLE	50.34 ± 1.78	39.18 ± 1.73	40.53 ± 1.40	28.04 ± 0.87	69.98 ± 1.43	56.61 ± 2.36
Urinary (mg/day)						
NORMAL	13.96 ± 0.88	18.68 ± 0.86	15.58 ± 1.63	17.25 ± 0.43	21.05 ± 1.77	22.81 ± 1.89
DOUBLE	10.51 ± 0.37	6.65 ± 0.73	10.21 ± 1.28	8.60 ± 0.62	21.08 ± 0.43	16.35 ± 0.33
Retention (mg/day)						
NORMAL	22.69 ± 1.24	18.92 ± 1.18	19.40 ± 1.28	15.25 ± 1.68	25.99 ± 1.56	21.40 ± 2.10
DOUBLE	16.44 ± 1.09	13.98 ± 1.01	12.53 ± 0.75	8.39 ± 0.73	19.26 ± 1.99	16.03 ± 2.35
R/I (%)						
NORMAL	42.34 ± 1.47	32.10 ± 1.97	33.28 ± 2.06	24.21 ± 1.91	46.61 ± 2.57	38.59 ± 3.64
DOUBLE	30.64 ± 1.55	25.57 ± 1.37	22.63 ± 1.22	13.88 ± 1.09	33.04 ± 2.59	27.04 ± 2.66

TABLE 7.- CALCIUM CONTENT IN ORGANS OF CONTROL AND ANAEMIC RATS FED DIFFERENT NORMAL OR DOUBLE-Ca DIETS

Ca-CONTENT IN THE DIET	STANDARD DIET (S)		COW MILK-BASED DIET (C)		GOAT MILK-BASED DIET (G)	
	CONTROL GROUP	ANAEMIC GROUP	CONTROL GROUP	ANAEMIC GROUP	CONTROL GROUP	ANAEMIC GROUP
Femur (mg /g SS)						
NORMAL	176.94 ± 2.93	183.15 ± 5.48	223.31 ± 3.62	202.11 ± 2.53	247.84 ± 2.30	245.14 ± 3.70
DOUBLE	203.24 ± 3.75	174.60 ± 4.86	206.21 ± 2.34	223.38 ± 2.91	234.77 ± 3.63	251.22 ± 3.17
Sternum (mg/g SS)						
NORMAL	79.58 ± 1.73	77.94 ± 1.61	79.89 ± 2.68	77.81 ± 2.10	88.97 ± 1.17	87.88 ± 1.28
DOUBLE	83.71 ± 2.59	98.85 ± 3.16	89.31 ± 2.19	80.11 ± 2.93	93.39 ± 3.3	83.13 ± 2.59
Muscle (mg /g SS)						
NORMAL	4.98 ± 0.37	6.24 ± 0.36	5.57 ± 0.83	6.61 ± 0.52	6.64 ± 0.64	8.51 ± 0.33
DOUBLE	3.06 ± 0.25	5.40 ± 0.54	6.23 ± 0.69	7.98 ± 0.97	9.02 ± 1.04	12.22 ± 0.68

TABLE 8- PHOSPHORUS CONTENT IN ORGANS OF CONTROL AND ANAEMIC RATS FED DIFFERENT NORMAL OR DOUBLE-Ca DIETS

Ca-CONTENT IN THE DIET	STANDARD DIET (S)		COW MILK-BASED DIET (C)		GOAT MILK-BASED DIET (G)	
	CONTROL GROUP	ANAEMIC GROUP	CONTROL GROUP	ANAEMIC GROUP	CONTROL GROUP	ANAEMIC GROUP
Femur (mg/g SS)						
NORMAL	126.52 ± 3.17	159.02 ± 9.16	102.23 ± 3.11	106.01 ± 2.79	114.38 ± 2.82	132.03 ± 2.51
DOUBLE	125.49 ± 4.25	110.89 ± 4.49	115.79 ± 2.63	108.15 ± 1.11	126.78 ± 2.22	114.97 ± 3.63
Muscle (mg/g SS)						
NORMAL	9.92 ± 0.33	10.98 ± 0.54	11.15 ± 0.50	10.71 ± 0.49	13.68 ± 0.71	13.09 ± 0.86
DOUBLE	9.72 ± 0.50	9.48 ± 0.45	12.96 ± 0.88	10.79 ± 0.51	12.75 ± 0.50	14.31 ± 0.37
Brain (mg/g SS)						
NORMAL	13.01 ± 0.41	15.01 ± 0.39	10.30 ± 0.21	13.98 ± 0.29	14.91 ± 0.49	17.89 ± 0.99
DOUBLE	14.51 ± 0.55	14.49 ± 0.66	14.32 ± 0.41	14.39 ± 0.32	15.14 ± 0.67	16.88 ± 0.82
Spleen (mg/g SS)						
NORMAL	15.76 ± 0.43	14.38 ± 0.45	15.18 ± 0.79	14.30 ± 0.31	15.43 ± 0.81	16.62 ± 0.73
DOUBLE	14.93 ± 0.36	15.05 ± 0.35	15.44 ± 0.84	15.55 ± 0.48	17.44 ± 0.60	19.86 ± 0.99
Kidneys (mg/g SS)						
NORMAL	9.80 ± 0.30	11.21 ± 0.72	10.81 ± 0.32	10.42 ± 0.11	11.49 ± 0.32	12.23 ± 0.43
DOUBLE	11.14 ± 0.44	10.89 ± 0.42	11.12 ± 0.51	11.39 ± 0.41	12.05 ± 0.37	11.39 ± 0.23

TABLE 9- SERUM LEVELS OF CALCIUM (IONIC AND TOTAL), PHOSPHORUS, PTH, CORTICOSTERONE AND MAGNESIUM IN TOTAL BLOOD IN CONTROL AND ANAEMIC RATS FED DIFFERENT NORMAL OR DOUBLE-Ca DIETS

Ca-CONTENT IN THE DIET	STANDARD DIET (S)		COW MILK-BASED DIET (C)		GOAT MILK-BASED DIET (G)	
	CONTROL GROUP	ANAEMIC GROUP	CONTROL GROUP	ANAEMIC GROUP	CONTROL GROUP	ANAEMIC GROUP
Total Ca (mg/L)	98.3 ± 1.2	96.9 ± 0.8	96.3 ± 1.1	94.2 ± 1.8	109.9 ± 1.7	106.3 ± 0.8
IonicCa (mg/L)	93.1 ± 3.0	96.4 ± 1.4	98.0 ± 1.9	95.7 ± 1.0	112.1 ± 1.8	107 ± 1.8
Serum P (mg/L)	56.1 ± 0.9	53.5 ± 0.5	55.8 ± 0.8	53.7 ± 1.1	62.6 ± 0.9	58.0 ± 0.5
	53.1 ± 0.7	54.4 ± 0.6	56.1 ± 0.9	54.5 ± 0.7	63.5 ± 0.8	61.1 ± 0.8
	78.3 ± 1.3	74.5 ± 1.8	72.6 ± 1.2	69.7 ± 1.4	87.2 ± 1.1	86.2 ± 1.3
	66.1 ± 0.6	62.8 ± 1.52	62.0 ± 1.5	58.0 ± 1.4	74.9 ± 1.8	72.8 ± 1.8
Mg in total blood (mg/L)	8.33 ± 0.31	8.74 ± 0.84	8.43 ± 0.25	8.23 ± 0.75	8.16 ± 0.51	9.04 ± 0.40
	9.19 ± 0.42	9.15 ± 0.47	8.74 ± 0.74	8.00 ± 0.70	8.34 ± 0.63	8.63 ± 0.50
Parathormone (pg/mL)	115.7 ± 2.4	120.3 ± 3.5	121.8 ± 4.3	123.2 ± 3.9	96.8 ± 2.9	98.6 ± 3.5
	118.3 ± 2.9	117.8 ± 2.7	120.3 ± 3.9	122.4 ± 3.6	94.3 ± 2.5	95.7 ± 2.9
Corticosterone (pg/mL)	1039 ± 82	1147 ± 26	1057 ± 67	1143 ± 51	1034 ± 43	1090 ± 47
	1066 ± 35	1106 ± 26	1064 ± 30	1154 ± 31	1037 ± 23	1063 ± 27

TABLE 10.- DIGESTIVE AND METABOLIC UTILIZATION OF MAGNESIUM IN CONTROL AND ANAEMIC RATS FED DIFFERENT NORMAL OR DOUBLE-Ca DIETS

Ca-CONTENT IN THE DIET	STANDARD DIET (S)		COW MILK-BASED DIET (C)		GOAT MILK-BASED DIET (G)	
	CONTROL GROUP	ANAEMIC GROUP	CONTROL GROUP	ANAEMIC GROUP	CONTROL GROUP	ANAEMIC GROUP
Food intake (g/day)						
NORMAL	17.23 ± 0.51	19.02 ± 0.88	14.67 ± 0.61	15.44 ± 0.23	14.01 ± 0.51	13.77 ± 0.22
DOUBLE	17.22 ± 0.42	17.58 ± 0.74	14.71 ± 0.59	15.93 ± 0.52	14.63 ± 0.44	14.47 ± 0.76
Intake (mg/day)						
NORMAL	8.65 ± 0.25	9.55 ± 0.14	7.81 ± 0.33	8.12 ± 0.29	7.04 ± 0.26	6.94 ± 0.11
DOUBLE	8.58 ± 0.21	8.78 ± 0.37	7.69 ± 0.34	8.39 ± 0.30	7.35 ± 0.22	7.26 ± 0.38
Faecal (mg/day)						
NORMAL	3.27 ± 0.24	3.87 ± 0.21	2.78 ± 0.20	3.59 ± 0.14	1.02 ± 0.11	1.33 ± 0.14
DOUBLE	4.06 ± 0.12	4.38 ± 0.40	3.03 ± 0.18	4.46 ± 0.21	1.58 ± 0.13	1.80 ± 0.19
Absorbido (mg/day)						
NORMAL	5.38 ± 0.23	5.68 ± 0.42	5.03 ± 0.26	4.53 ± 0.22	6.02 ± 0.19	5.61 ± 0.13
DOUBLE	4.52 ± 0.16	4.40 ± 0.12	4.66 ± 0.25	3.93 ± 0.17	5.77 ± 0.23	5.46 ± 0.19
ADC (%)						
NORMAL	62.24 ± 2.33	59.63 ± 1.70	64.31 ± 1.83	56.21 ± 1.11	85.70 ± 1.17	82.01 ± 1.93
DOUBLE	52.60 ± 1.06	50.27 ± 1.12	54.71 ± 1.60	46.79 ± 1.29	79.71 ± 2.04	75.88 ± 1.46
Urinary (mg/day)						
NORMAL	2.83 ± 0.13	2.81 ± 0.19	2.62 ± 0.15	3.06 ± 0.07	2.68 ± 0.23	2.24 ± 0.17
DOUBLE	2.30 ± 0.12	3.09 ± 0.11	3.11 ± 0.37	3.02 ± 0.15	2.35 ± 0.27	2.16 ± 0.18
Retention (mg/day)						
NORMAL	2.55 ± 0.19	2.87 ± 0.22	2.41 ± 0.17	1.24 ± 0.20	3.34 ± 0.20	2.92 ± 0.19
DOUBLE	2.15 ± 0.13	0.91 ± 0.19	1.55 ± 0.30	1.04 ± 0.41	3.42 ± 0.24	3.10 ± 0.22
R/I (%)						
NORMAL	29.42 ± 1.95	30.71 ± 2.17	30.41 ± 1.89	19.38 ± 1.49	47.80 ± 2.78	47.19 ± 2.30
DOUBLE	25.10 ± 1.42	14.19 ± 1.12	24.10 ± 4.19	14.07 ± 1.66	44.71 ± 2.69	45.58 ± 1.09

TABLE-11 - MAGNESIUM CONTENT IN ORGANS OF CONTROL AND ANAEMIC RATS FED DIFFERENT NORMAL OR DOUBLE-Ca DIETS

Ca-CONTENT IN THE DIET	STANDARD DIET (S)		COW MILK-BASED DIET (C)		GOAT MILK-BASED DIET (G)		
	CONTROL GROUP	ANAEMIC GROUP	CONTROL GROUP	ANAEMIC GROUP	CONTROL GROUP	ANAEMIC GROUP	
Femur (mg/g SS)	NORMAL	4.30 ± 0.21	3.72 ± 0.18	4.25 ± 0.04	3.67 ± 0.07	4.43 ± 0.11	3.95 ± 0.08
	DOBLE	4.00 ± 0.21	4.10 ± 0.25	4.20 ± 0.05	3.48 ± 0.08	4.11 ± 0.06	4.16 ± 0.10
Sternum (mg/g SS)	NORMAL	2.40 ± 0.05	2.25 ± 0.08	2.24 ± 0.03	2.33 ± 0.07	2.18 ± 0.05	2.16 ± 0.05
	DOBLE	2.04 ± 0.03	2.21 ± 0.06	2.14 ± 0.02	2.11 ± 0.04	2.07 ± 0.05	2.05 ± 0.06
Muscle (mg/g SS)	NORMAL	1.00 ± 0.04	0.89 ± 0.03	1.01 ± 0.04	0.93 ± 0.04	0.90 ± 0.03	0.85 ± 0.03
	DOBLE	1.02 ± 0.07	0.92 ± 0.03	0.99 ± 0.03	0.96 ± 0.02	0.99 ± 0.02	0.90 ± 0.04

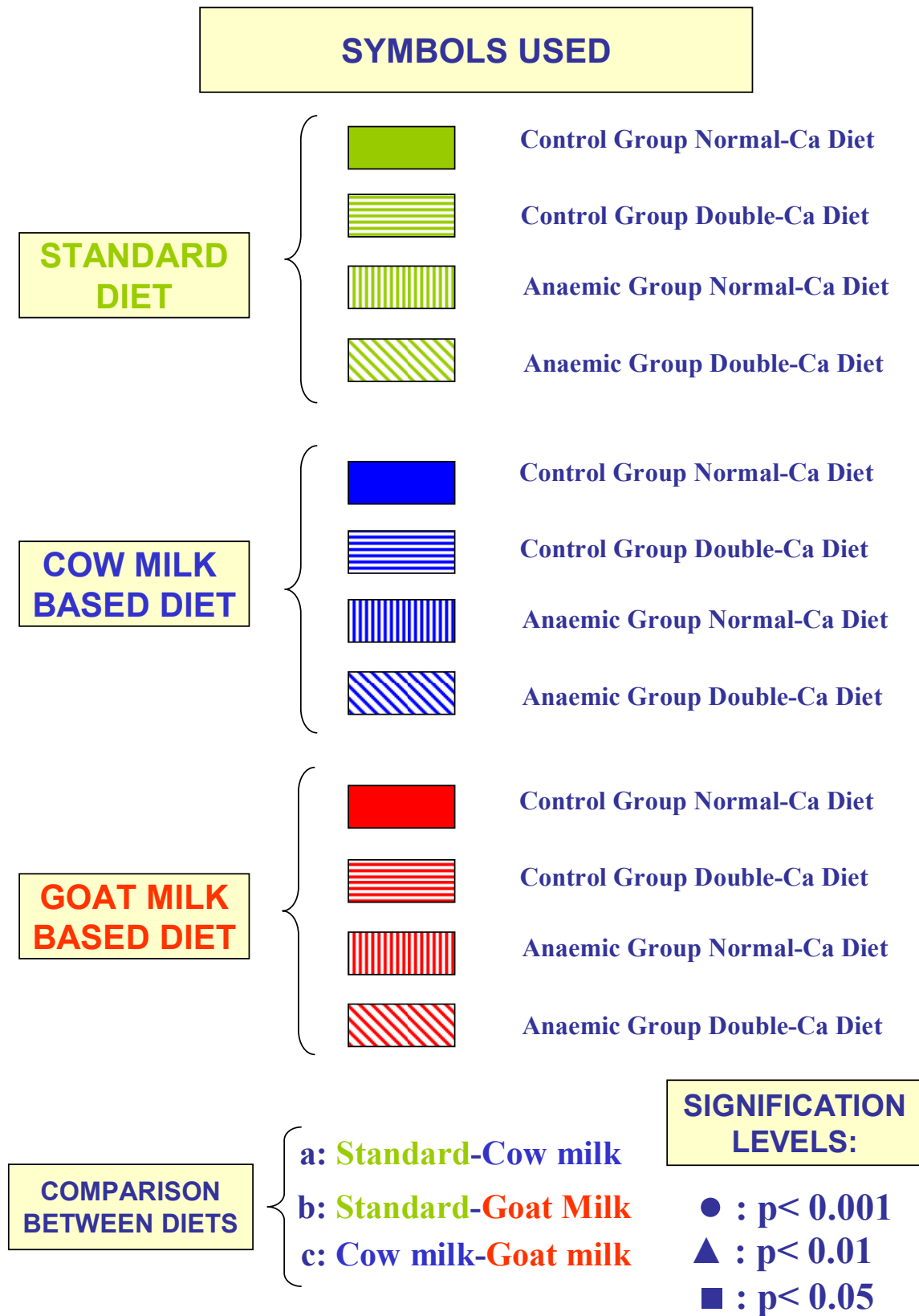
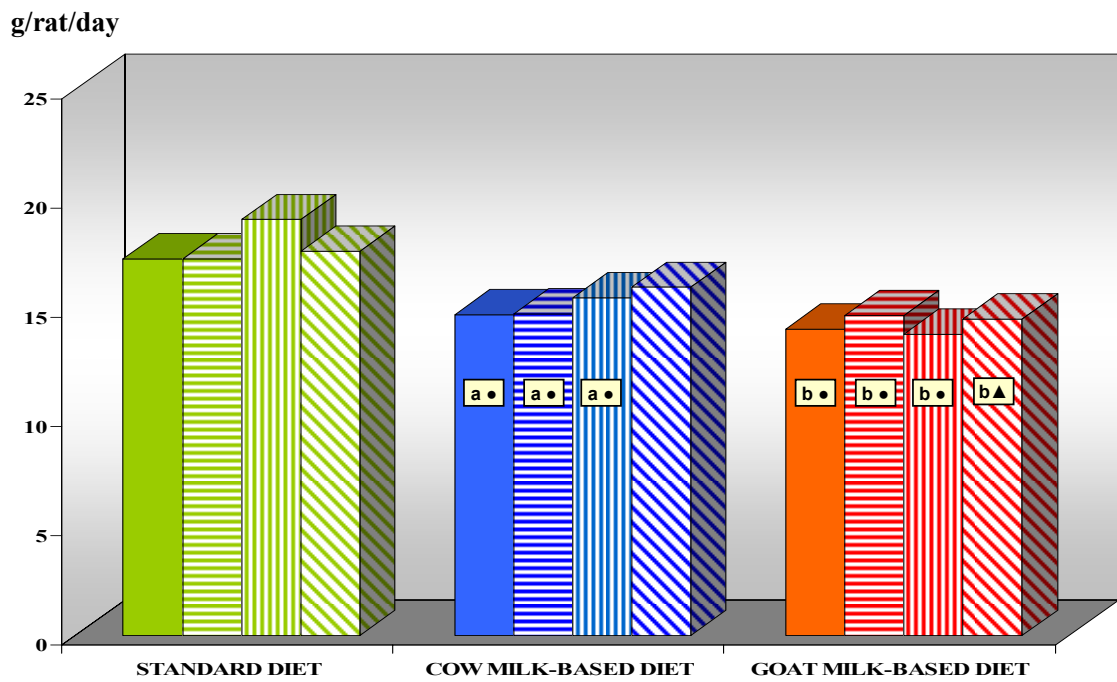
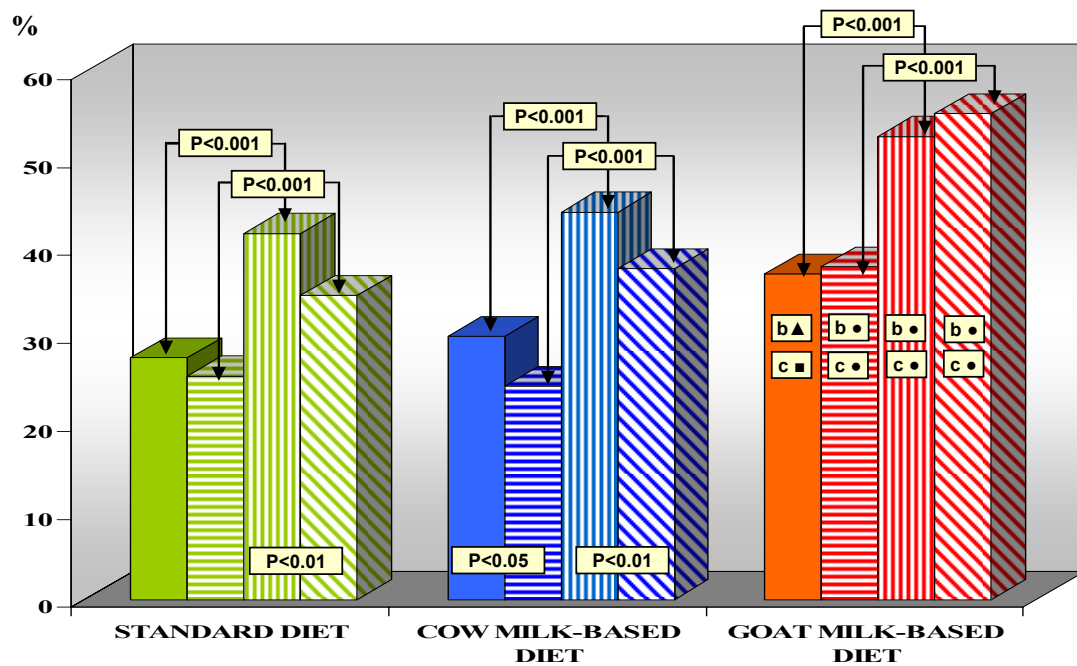


Fig. 1.- FOOD INTAKE



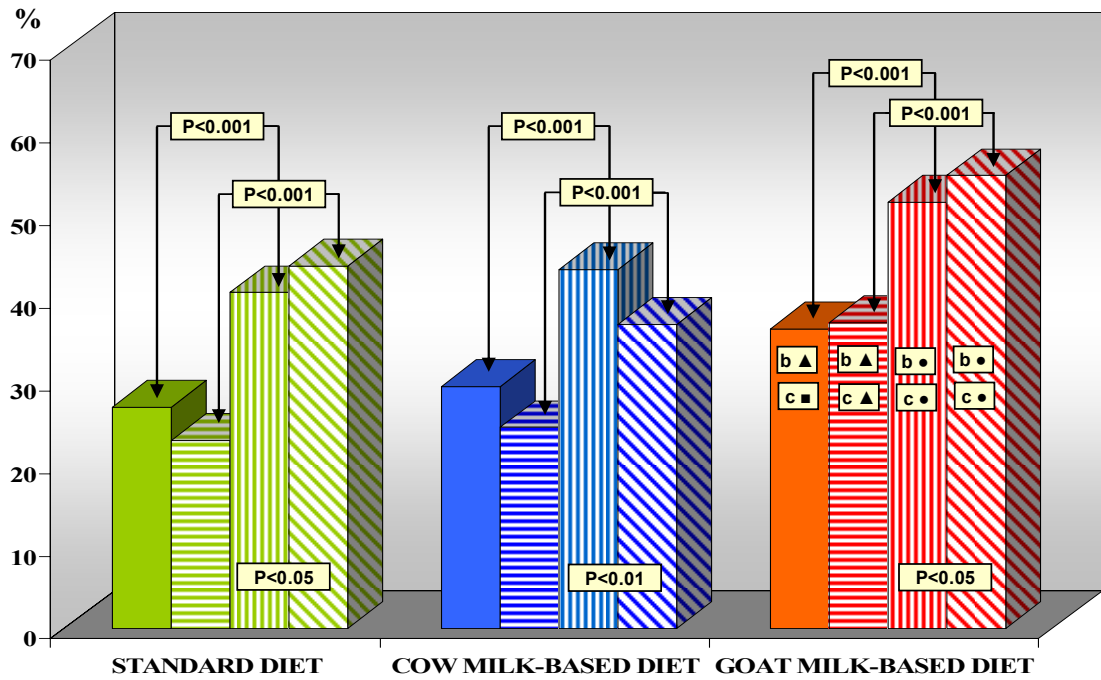
TWO-WAY ANOVA			
Ca-CONTENT IN THE DIET	DIET	ANAEMIA	DIET X ANAEMIA
NORMAL	P<0.001	P<0.01	NS
DOUBLE	P<0.001	P<0.01	NS

Fig. 2.- ADC OF IRON



TWO-WAY ANOVA			
Ca-CONTENT IN THE DIET	DIET	ANAEMIA	DIET X ANAEMIA
NORMAL	P<0.001	P<0.001	NS
DOUBLE	P<0.001	P<0.001	NS

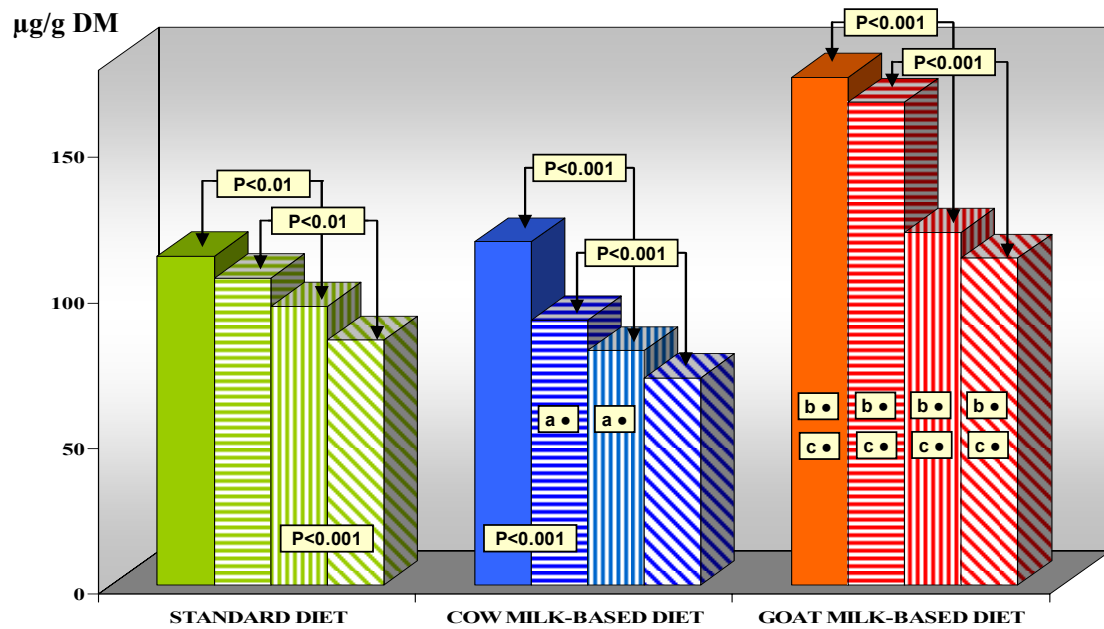
Fig. 3.- R/I OF IRON



TWO-WAY ANOVA			
Ca-CONTENT IN THE DIET	DIET	ANAEMIA	DIET X ANAEMIA
NORMAL	P<0.001	P<0.001	NS
DOUBLE	P<0.001	P<0.01	NS

Fig.4.- IRON CONTENT IN ORGANS

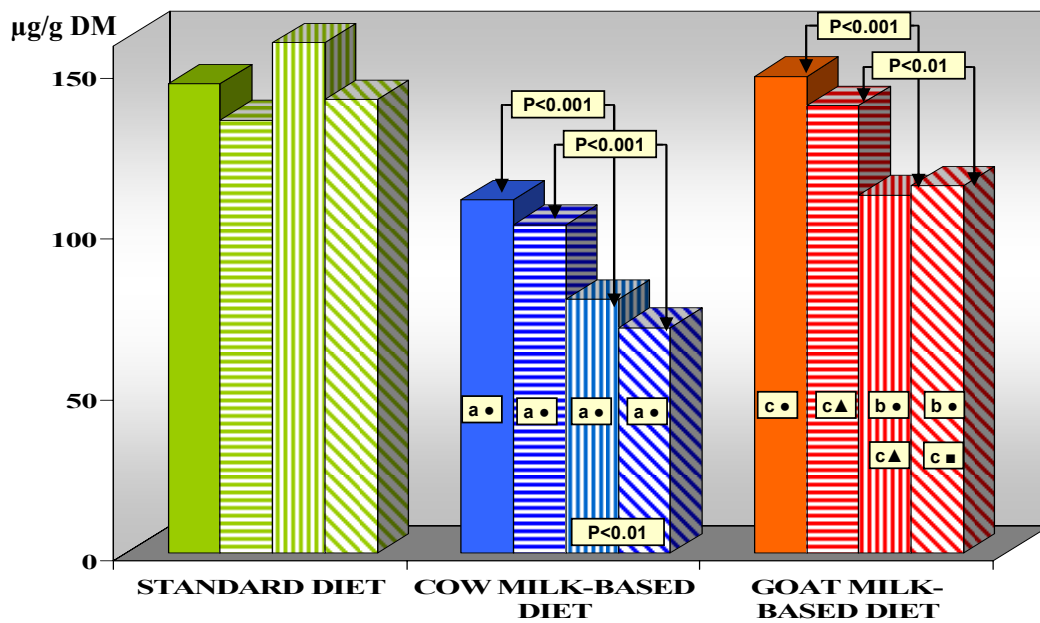
Fig. 4a.- Femur



TWO-WAY ANOVA			
Ca-CONTENT IN THE DIET	DIET	ANAEMIA	DIET X ANAEMIA
NORMAL	P<0.001	P<0.001	P<0.01
DOUBLE	P<0.001	P<0.001	P<0.01

Fig.4.- IRON CONTENT IN ORGANS

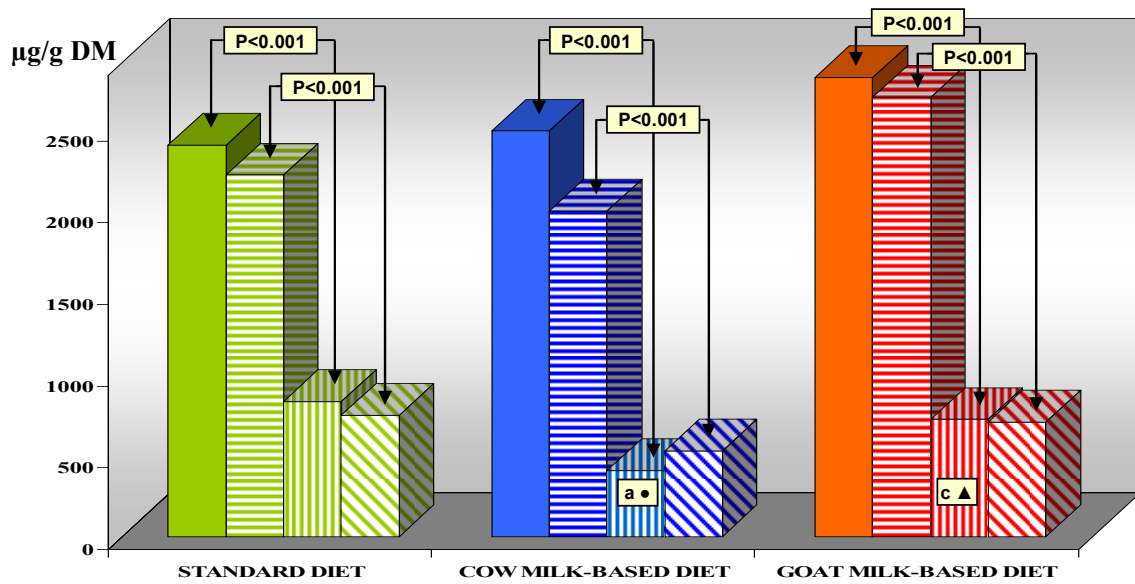
Fig. 4b.- Sternum



TWO-WAY ANOVA			
Ca-CONTENT IN THE DIET	DIET	ANAEMIA	DIET X ANAEMIA
NORMAL	P<0.001	P<0.001	P<0.001
DOUBLE	P<0.001	P<0.001	P<0.001

Fig.4.- IRON CONTENT IN ORGANS

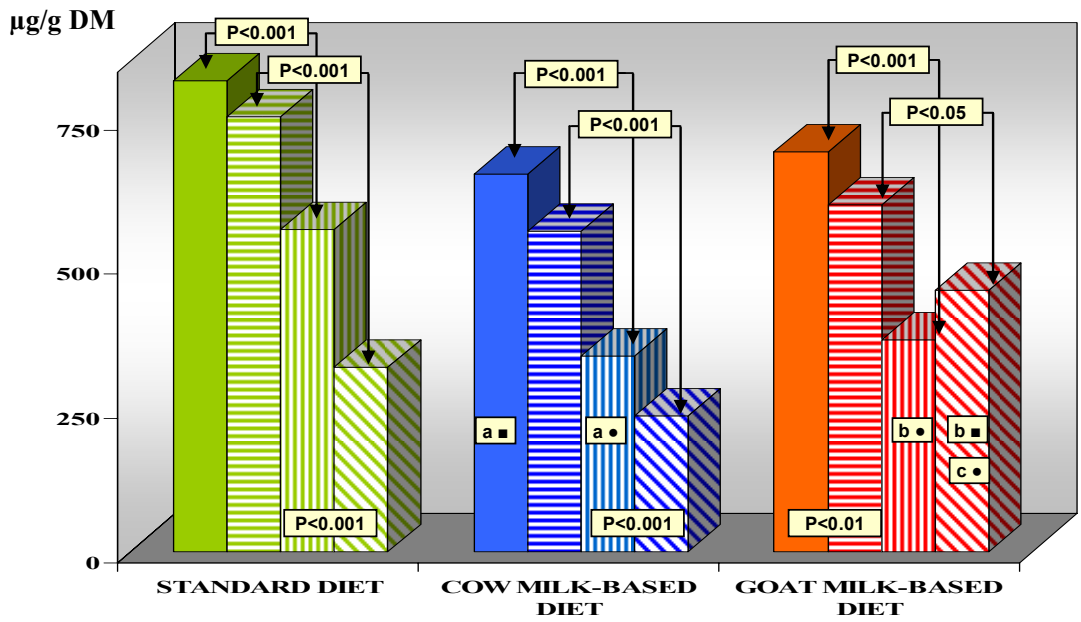
Fig. 4c.- Spleen



TWO-WAY ANOVA			
Ca-CONTENT IN THE DIET	DIET	ANAEMIA	DIET X ANAEMIA
NORMAL	NS	P<0.001	NS
DOBLE	NS	P<0.001	NS

Fig.4.- IRON CONTENT IN ORGANS

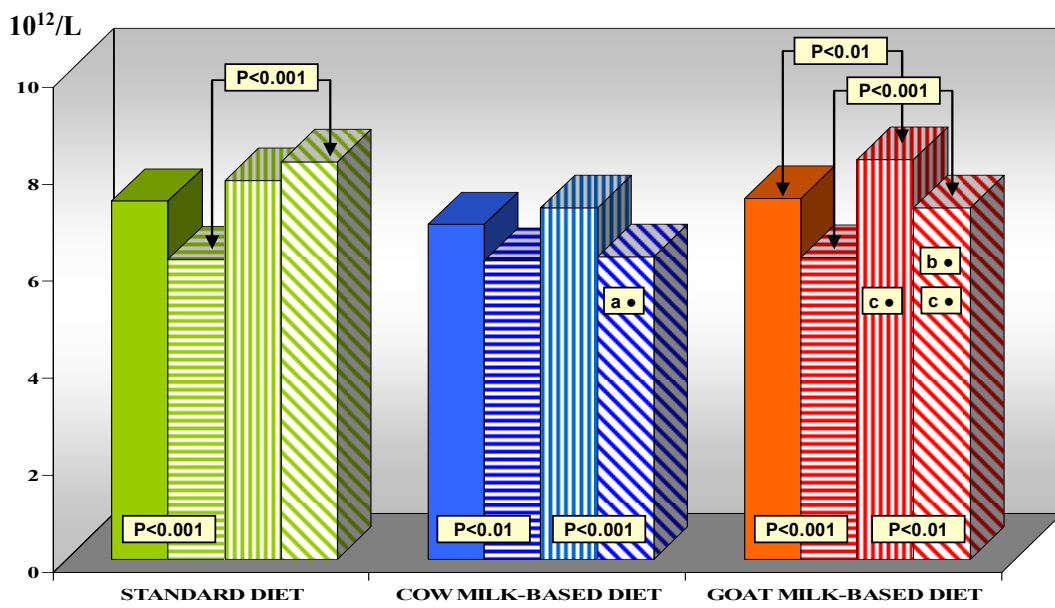
Fig. 4d.- Liver



TWO-WAY ANOVA			
Ca-CONTENT IN THE DIET	DIET	ANAEMIA	DIET X ANAEMIA
NORMAL	P<0.001	P<0.001	NS
DOUBLE	P<0.05	P<0.001	NS

Fig.5.- HAEMATOLOGICAL PARAMETERS

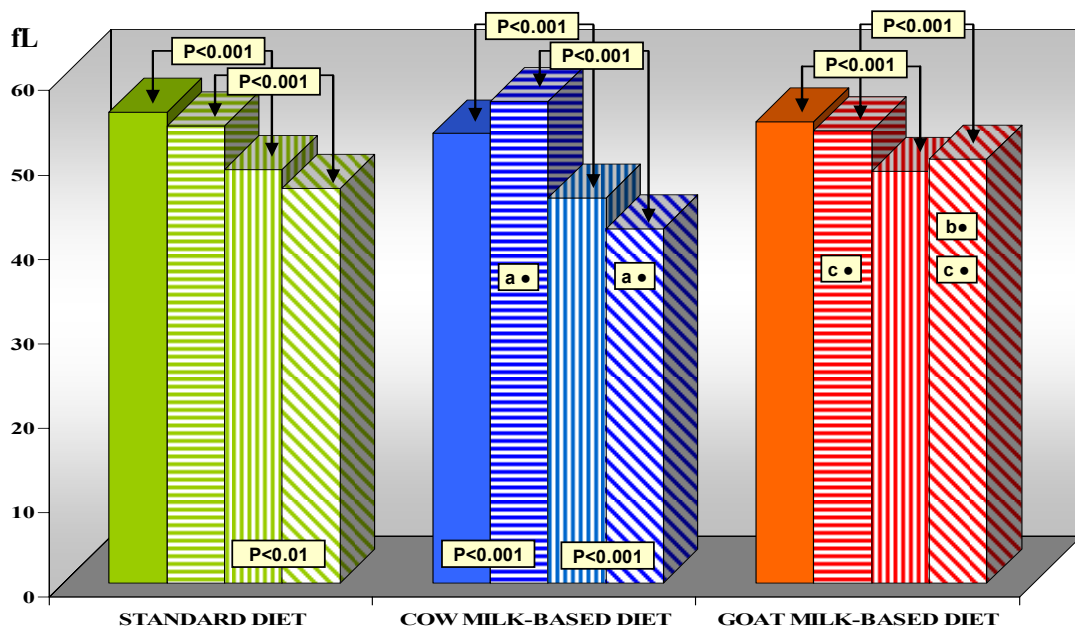
Fig. 5a.- RBC



TWO-WAY ANOVA			
Ca-CONTENT IN THE DIET	DIET	ANAEMIA	DIET X ANAEMIA
NORMAL	P<0.001	P<0.001	NS
DOUBLE	P<0.001	P<0.001	P<0.001

Fig.5.- HAEMATOLOGICAL PARAMETERS

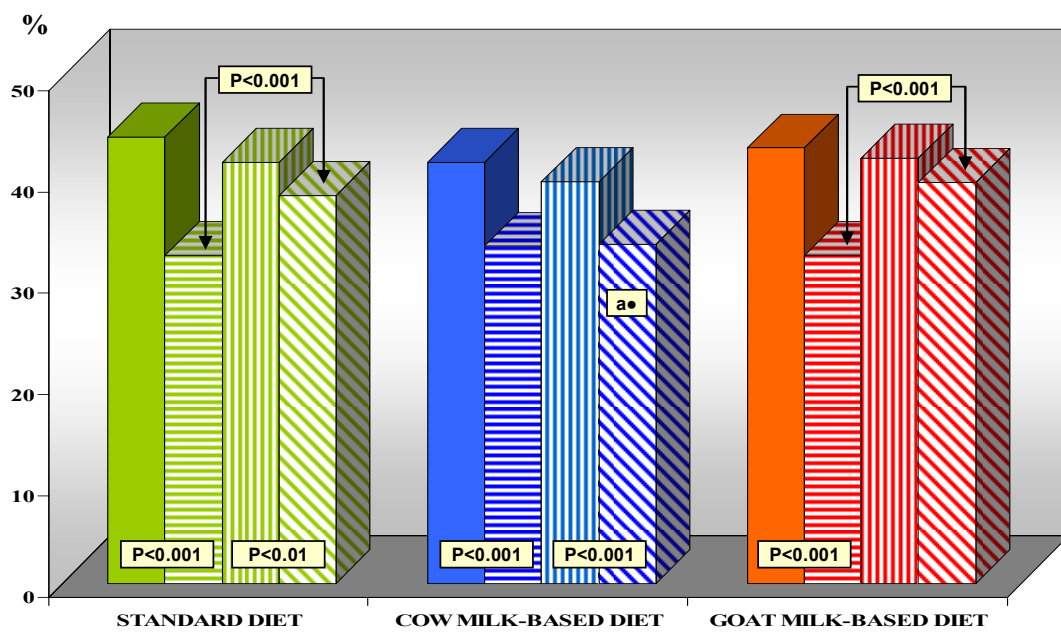
Fig. 5b.- MCV



TWO-WAY ANOVA			
Ca-CONTENT IN THE DIET	DIET	ANAEMIA	DIET X ANAEMIA
NORMAL	P<0.001	P<0.001	P<0.001
DOUBLE	P<0.001	P<0.001	P<0.001

Fig.5.- HAEMATOLOGICAL PARAMETERS

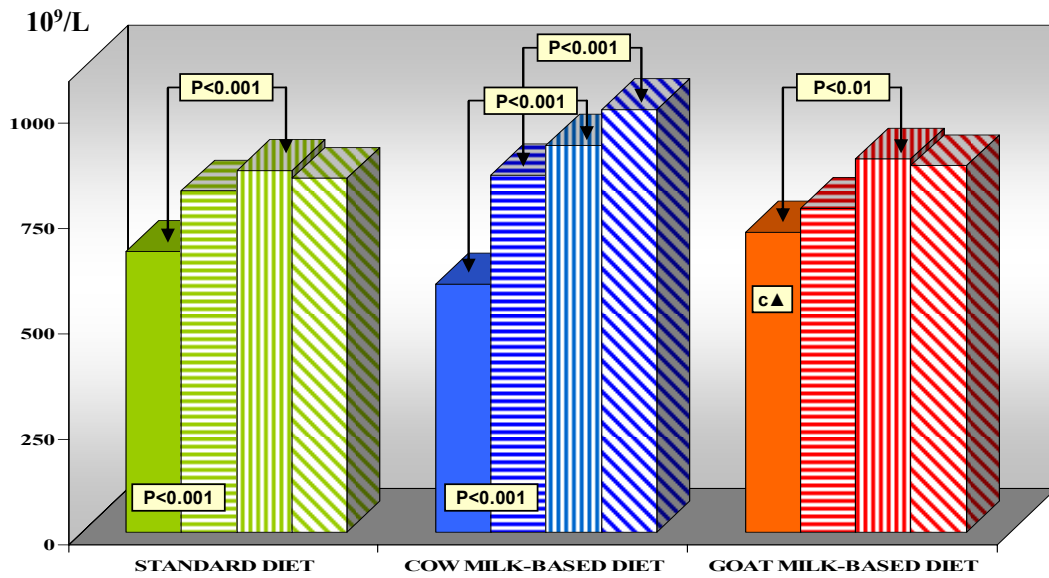
Fig. 5c.- Haematocrit (PCV)



TWO-WAY ANOVA			
Ca-CONTENT IN THE DIET	DIET	ANAEMIA	DIET X ANAEMIA
NORMAL	NS	P<0.001	P<0.001
DOUBLE	NS	P<0.01	P<0.01

Fig. 5.- HAEMTAOLOGICAL PARAMETERS

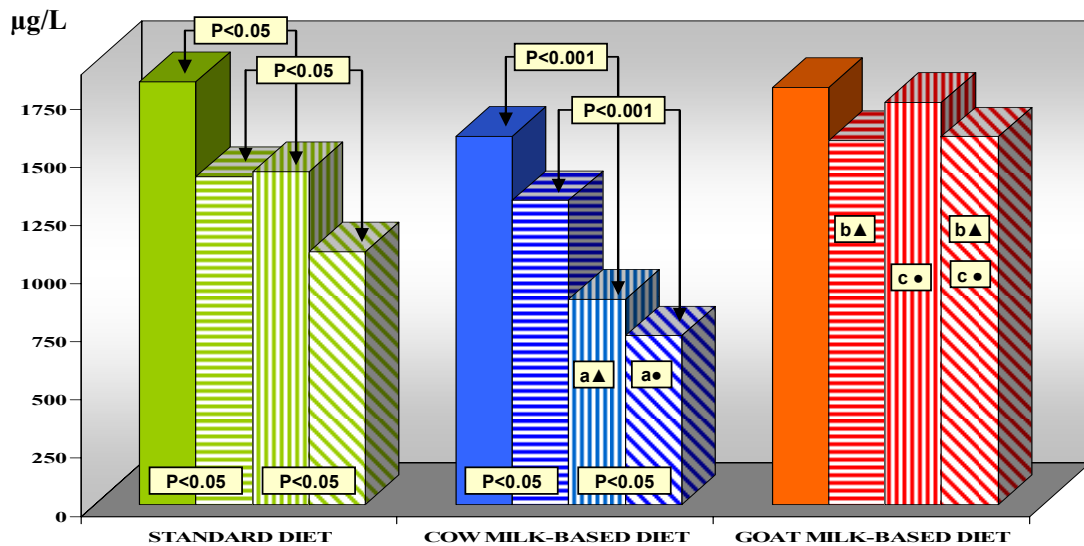
Fig. 5d.- Platelets



TWO-WAY ANOVA			
Ca-CONTENT IN THE DIET	DIET	ANAEMIA	DIET X ANAEMIA
NORMAL	NS	$P < 0.001$	NS
DOUBLE	NS	$P < 0.001$	NS

Fig. 5.- HAEMATOLOGICAL PARAMETERS

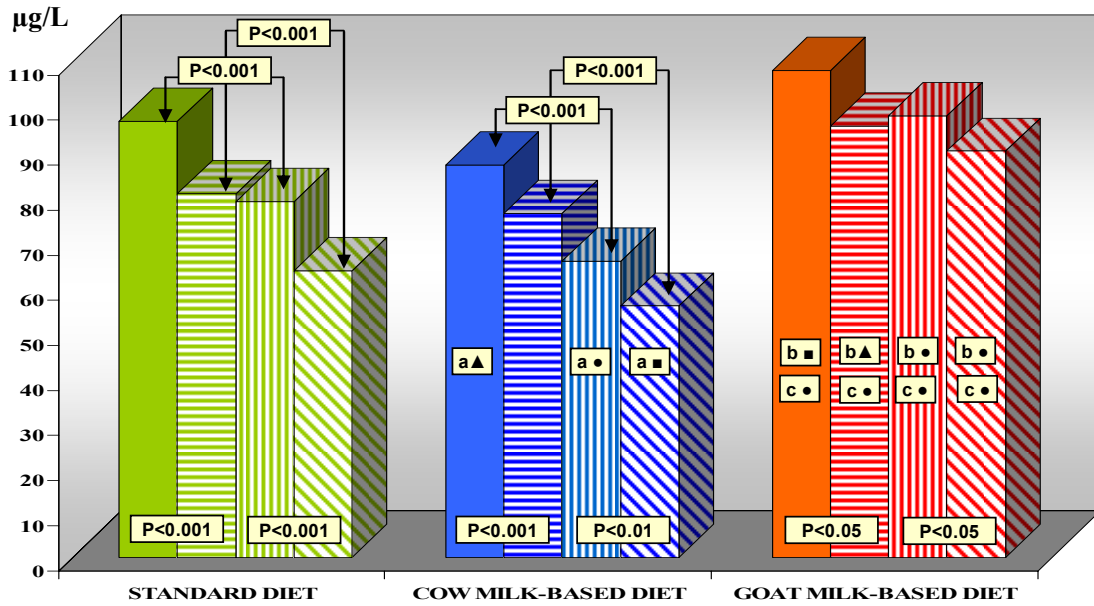
Fig. 5e.- Serum Fe



TWO-WAY ANOVA			
Ca-CONTENT IN THE DIET	DIET	ANAEMIA	DIET X ANAEMIA
NORMAL	P<0.001	P<0.001	P<0.01
DOUBLE	P<0.001	P<0.001	P<0.01

Fig. 5.- HAEMATOLOGICAL PARAMETERS

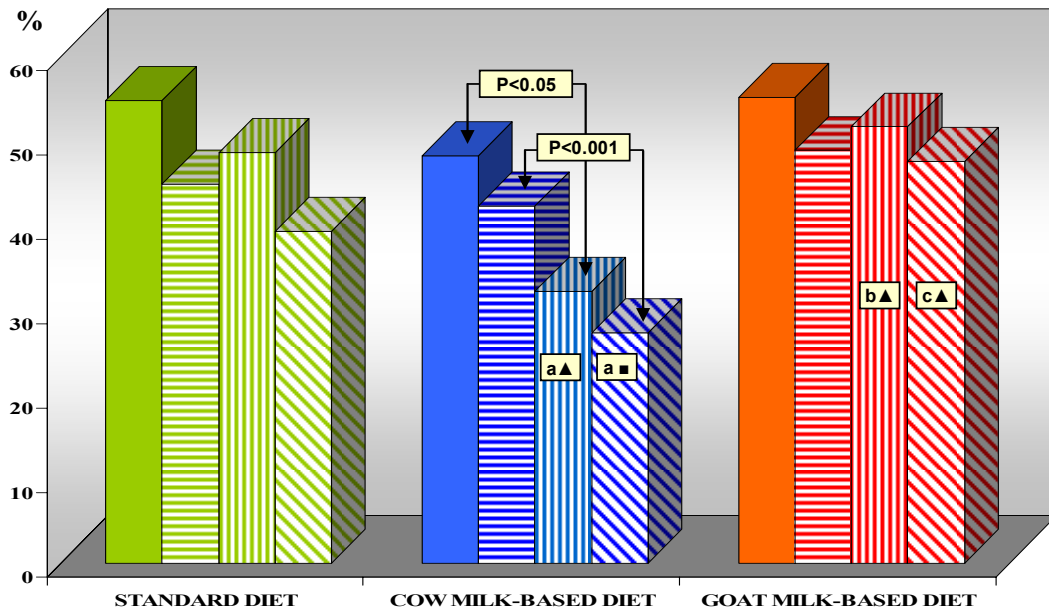
Fig. 5f.- Serum ferritin



TWO-WAY ANOVA			
Ca-CONTENT IN THE DIET	DIET	ANAEMIA	DIET X ANAEMIA
NORMAL	P<0.001	P<0.001	P<0.01
DOUBLE	P<0.001	P<0.001	P<0.01

Fig. 5.- HAEMATOLOGICAL PARAMETERS

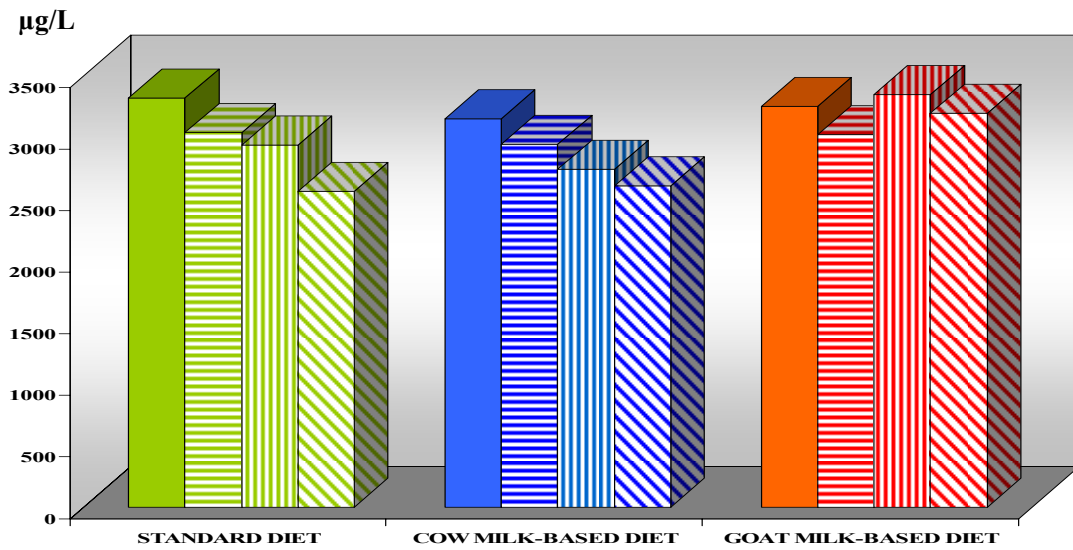
Fig. 5g.- Transferrin Saturation percentage



TWO-WAY ANOVA			
Ca-CONTENT IN THE DIET	DIET	ANAEMIA	DIET X ANAEMIA
NORMAL	NS	P<0.01	NS
DOUBLE	NS	P<0.01	NS

Fig. 5.- HAEMATOLOGICAL PARAMETERS

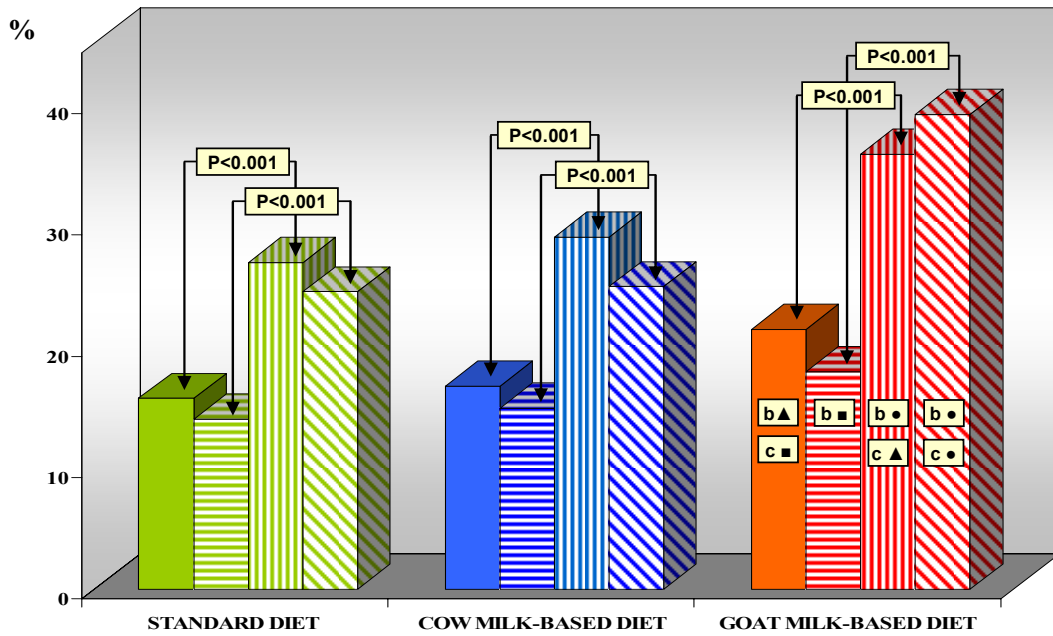
Fig. 5h.- TIBC



TWO-WAY ANOVA			
Ca-CONTENT IN THE DIET	DIET	ANAEMIA	DIET X ANAEMIA
NORMAL	NS	NS	NS
DOUBLE	NS	NS	NS

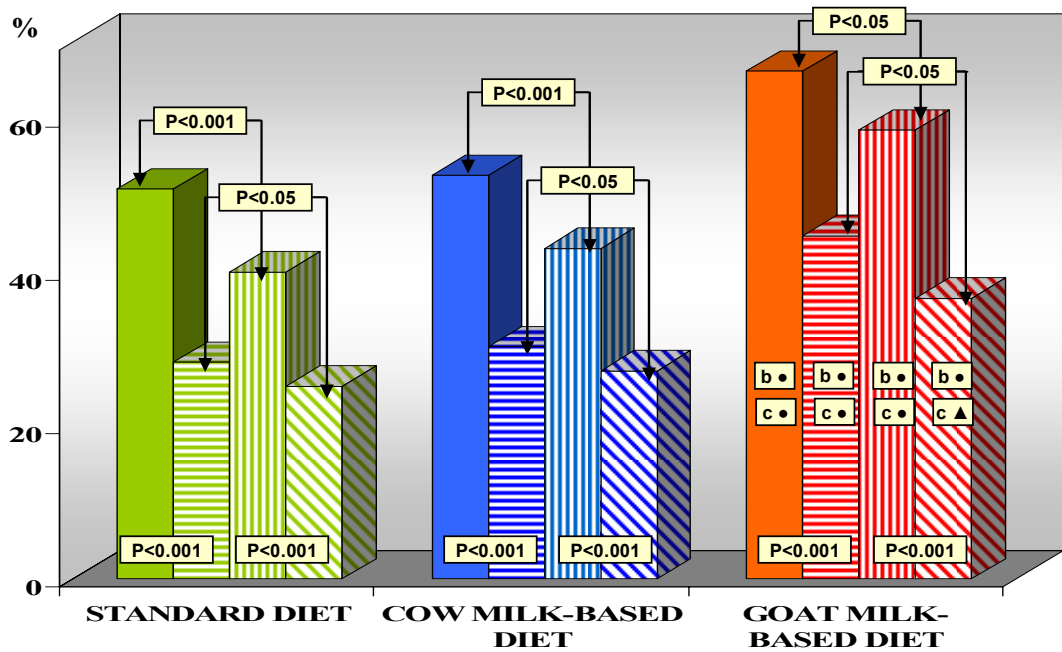
Fig. 5.- HAEMATOLOGICAL PARAMETERS

Fig. 5i.- HRE



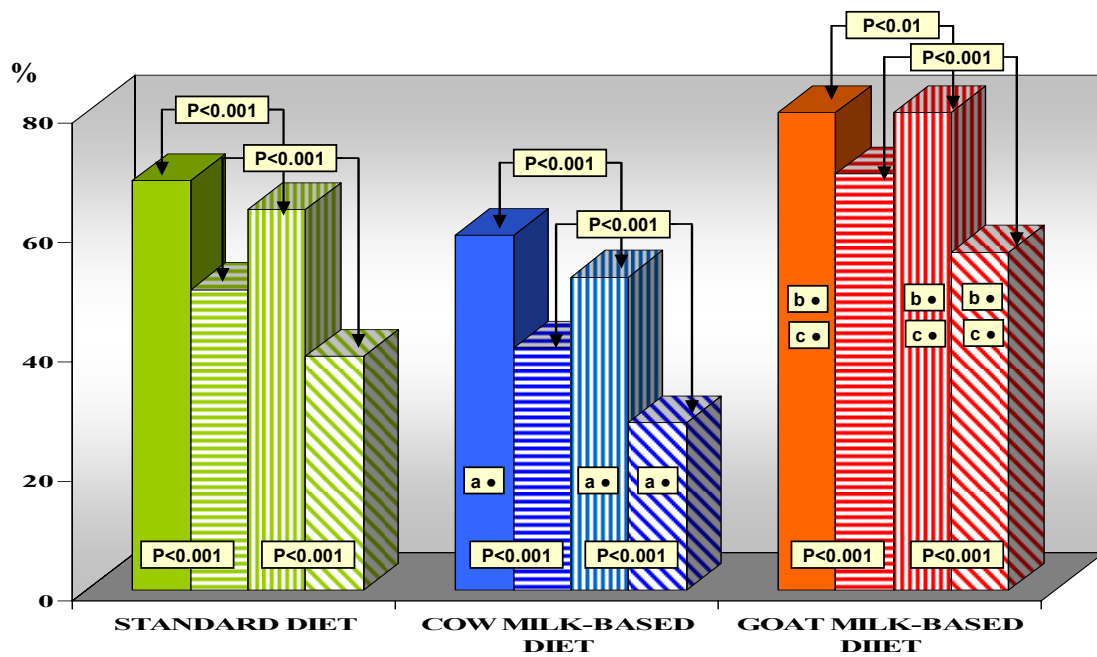
TWO-WAY ANOVA			
Ca-CONTENT IN THE DIET	DIET	ANAEMIA	DIET X ANAEMIA
NORMAL	$P < 0.001$	$P < 0.001$	NS
DOUBLE	$P < 0.01$	$P < 0.001$	NS

Fig. 6.- ADC OF CALCIUM



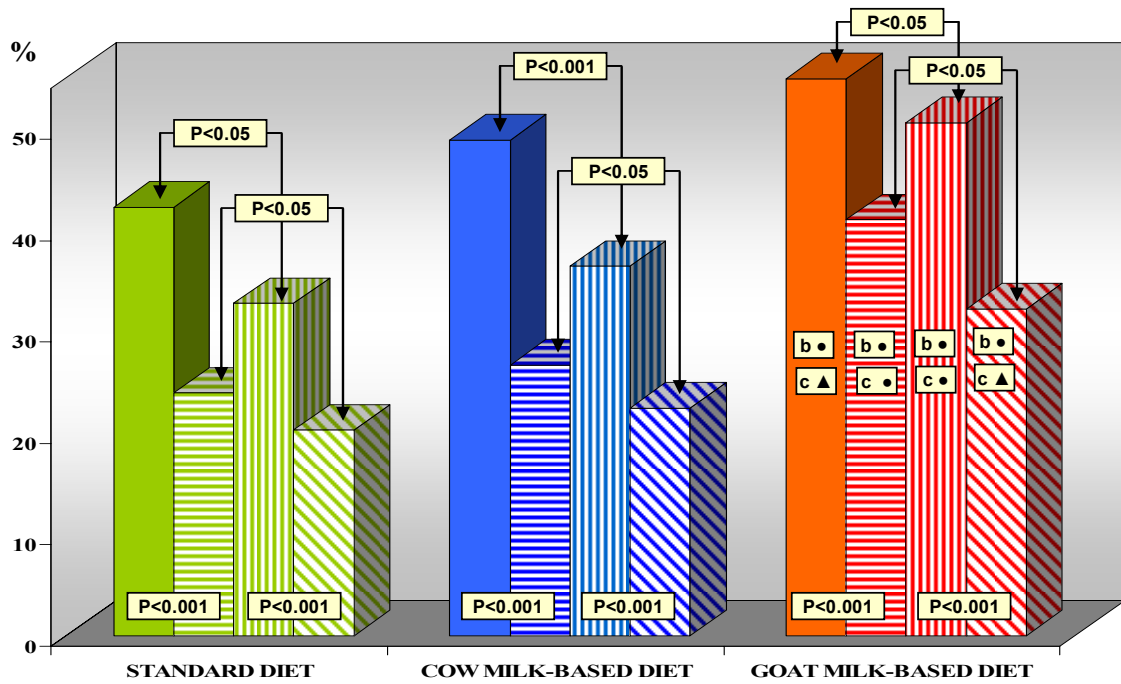
TWO-WAY ANOVA			
Ca-CONTENT IN THE DIET	DIET	ANAEMIA	DIET X ANAEMIA
NORMAL	P<0.001	P<0.001	NS
DOUBLE	P<0.001	P<0.05	NS

Fig. 7.- ADC OF PHOSPHORUS



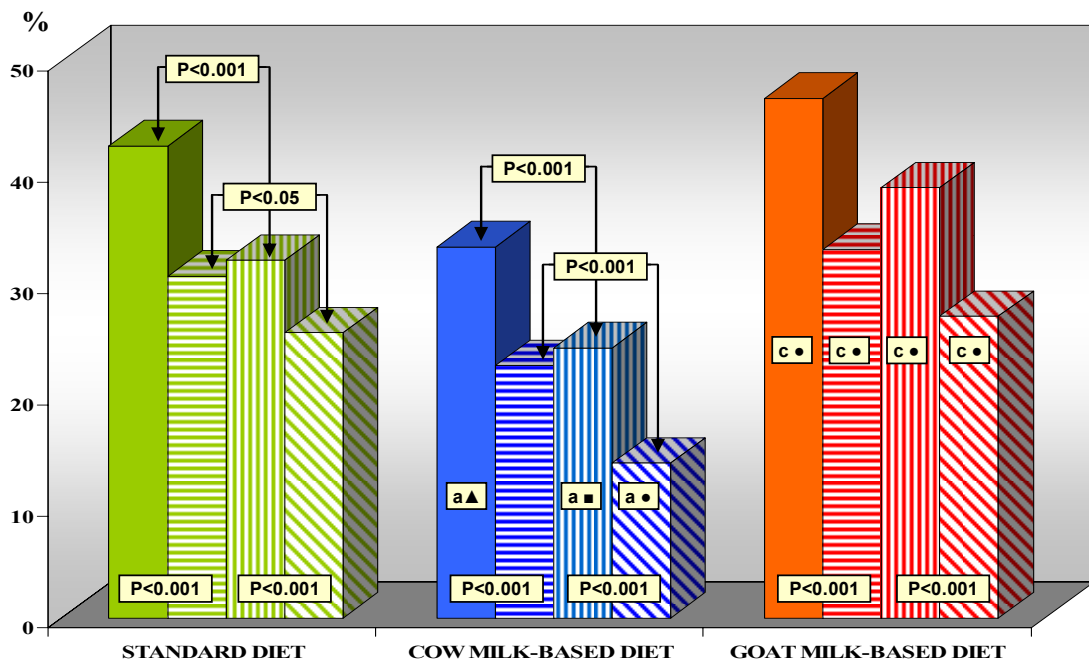
TWO-WAY ANOVA			
Ca-CONTENT IN THE DIET	DIET	ANAEMIA	DIET X ANAEMIA
NORMAL	P<0.001	P<0.001	NS
DOUBLE	P<0.001	P<0.001	NS

Fig. 8.- R/I OF CALCIUM



TWO-WAY ANOVA			
Ca-CONTENT IN THE DIET	DIET	ANAEMIA	DIET X ANAEMIA
NORMAL	P<0.001	P<0.001	NS
DOUBLE	P<0.001	P<0.01	NS

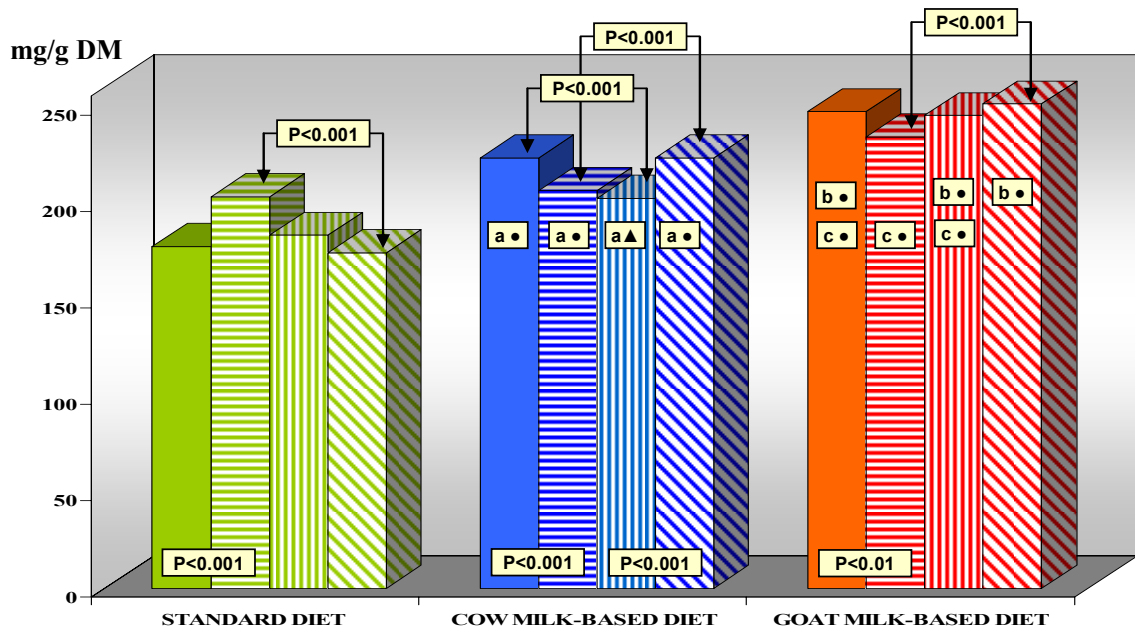
Fig. 9.- R/I OF PHOSPHORUS



TWO-WAY ANOVA			
Ca-CONTENT IN THE DIET	DIET	ANAEMIA	DIET X ANAEMIA
NORMAL	P<0.001	P<0.001	NS
DOUBLE	P<0.001	P<0.01	NS

Fig.10.- CALCIUM CONTENT IN ORGANS

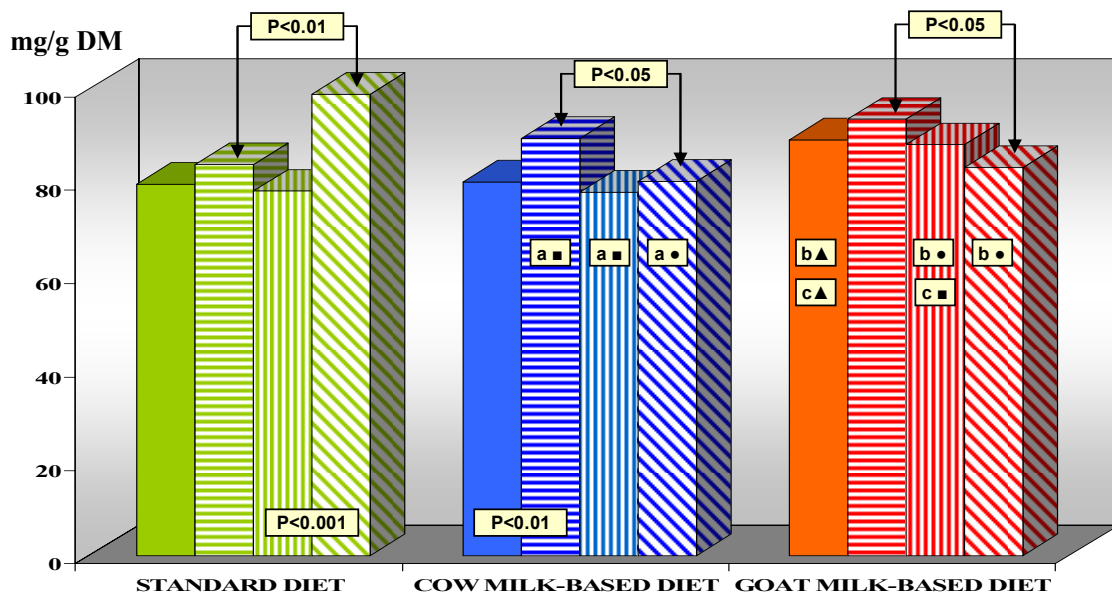
Fig. 10a.- Femur



TWO-WAY ANOVA			
Ca-CONTENT IN THE DIET	DIET	ANAEMIA	DIET X ANAEMIA
NORMAL	P<0.001	P<0.05	P<0.05
DOUBLE	P<0.01	NS	NS

Fig.10.- CALCIUM CONTENT IN ORGANS

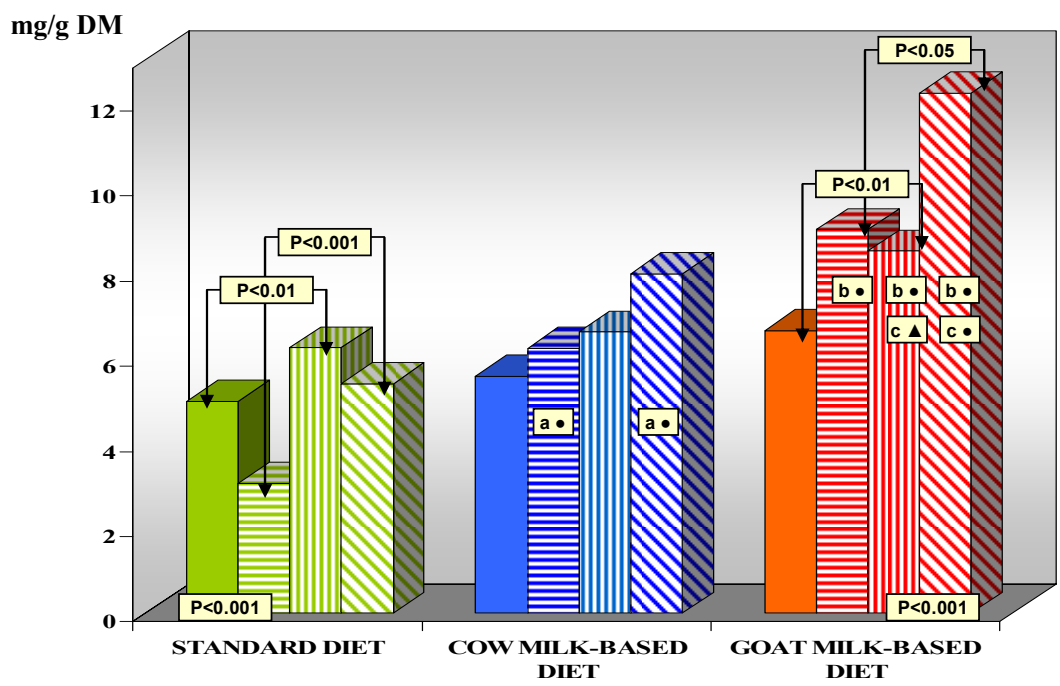
Fig. 10b.- Sternum



TWO-WAY ANOVA			
Ca-CONTENT IN THE DIET	DIET	ANAEMIA	DIET X ANAEMIA
NORMAL	NS	NS	P<0.01
DOuBLE	NS	P<0.05	P<0.01

Fig.10.- CALCIUM CONTENT IN ORGANS

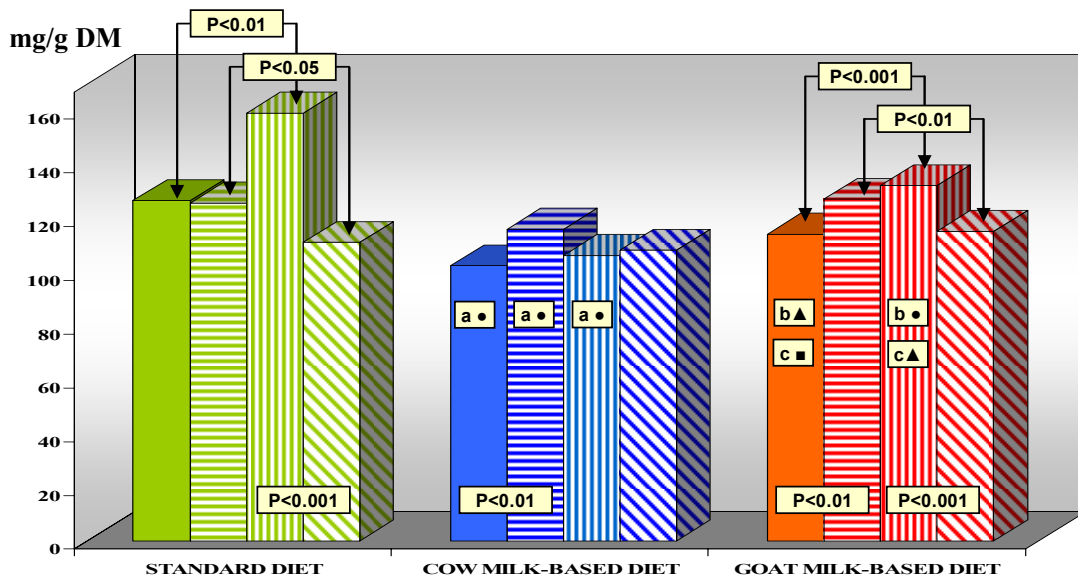
Fig. 10c.- Muscle L. D.



TWO-WAY ANOVA			
Ca-CONTENT IN THE DIET	DIET	ANAEMIA	DIET X ANAEMIA
NORMAL	P<0.001	P<0.01	NS
DOUBLE	P<0.001	P<0.01	NS

Fig.11.- PHOSPHORUS CONTENT IN ORGANS

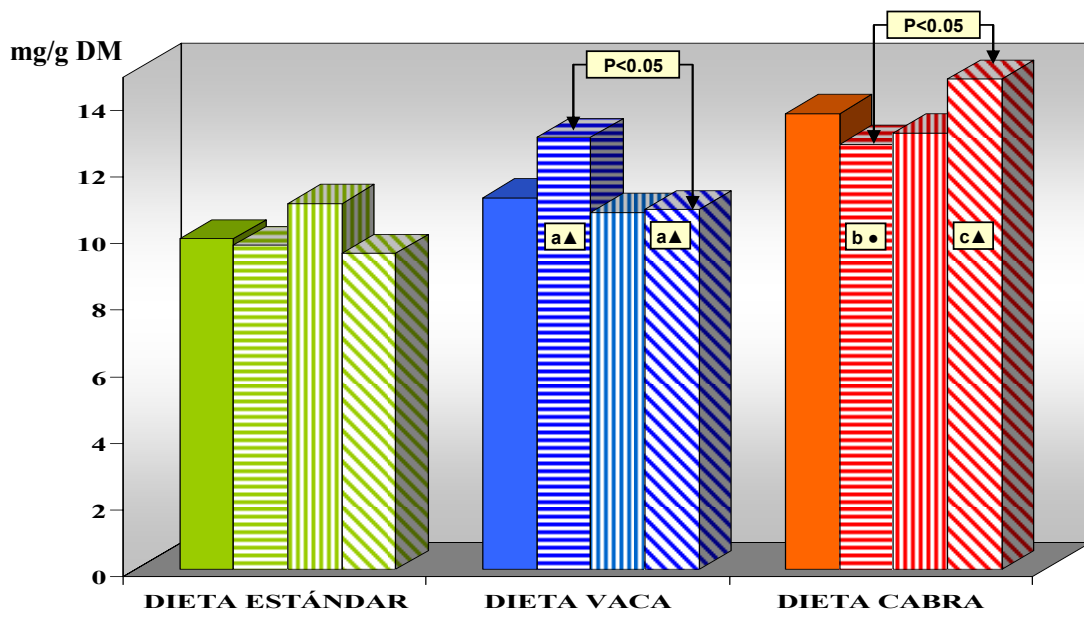
Fig. 11a.- Femur



TWO-WAY ANOVA			
Ca-CONTENT IN THE DIET	DIET	ANAEMIA	DIET X ANAEMIA
NORMAL	P<0.001	P<0.01	P<0.001
DOUBLE	P<0.001	P<0.01	P<0.001

Fig.11.- PHOSPHORUS CONTENT IN ORGANS

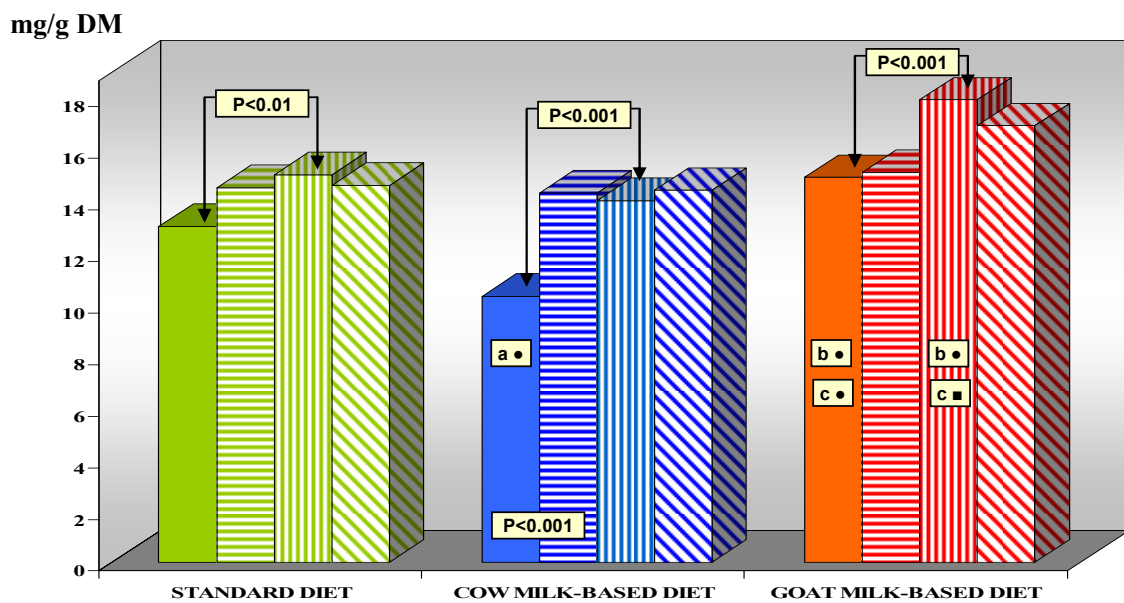
Fig. 11b.- Muscle L.D.



TWO-WAY ANOVA			
Ca-CONTENT IN THE DIET	DIET	ANAEMIA	DIET X ANAEMIA
NORMAL	P<0.001	NS	NS
DOUBLE	P<0.001	P<0.01	P<0.01

Fig.11.- PHOSPHORUS CONTENT IN ORGANS

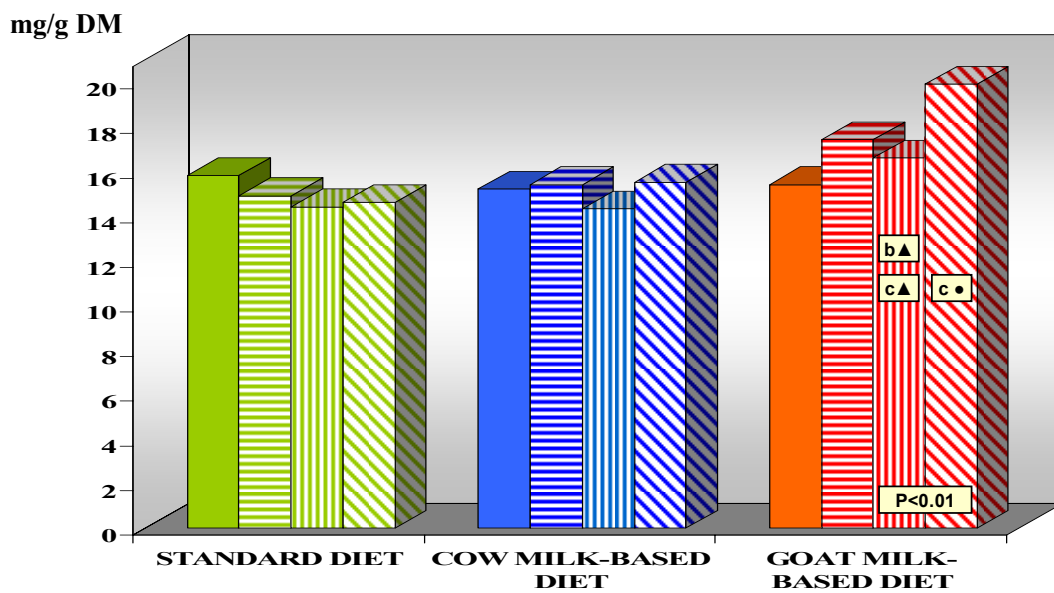
Fig. 11c.- Brain



TWO-WAY ANOVA			
Ca-CONTENT IN THE DIET	DIET	ANAEMIA	DIET X ANAEMIA
NORMAL	P<0.001	NS	P<0.001
DOUBLE	P<0.01	NS	P<0.01

Fig.11.- PHOSPHORUS CONTENT IN ORGANS

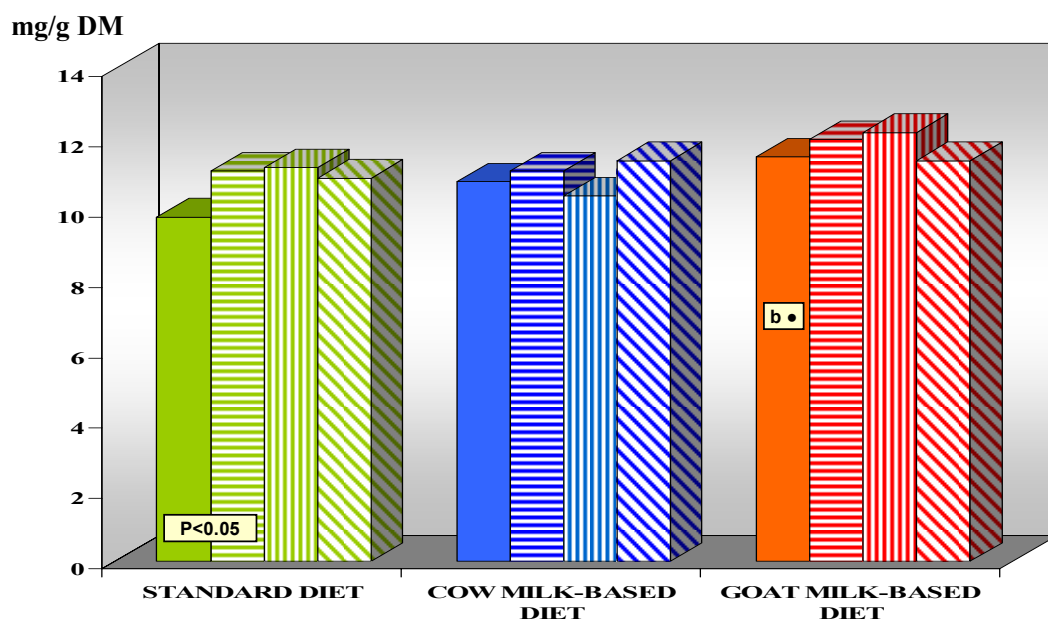
Fig. 11d.- Spleen



TWO-WAY ANOVA			
Ca-CONTENT IN THE DIET	DIET	ANAEMIA	DIET X ANAEMIA
NORMAL	NS	NS	NS
DOUBLE	P<0.01	NS	NS

Fig.11.- PHOSPHORUS CONTENT IN ORGANS

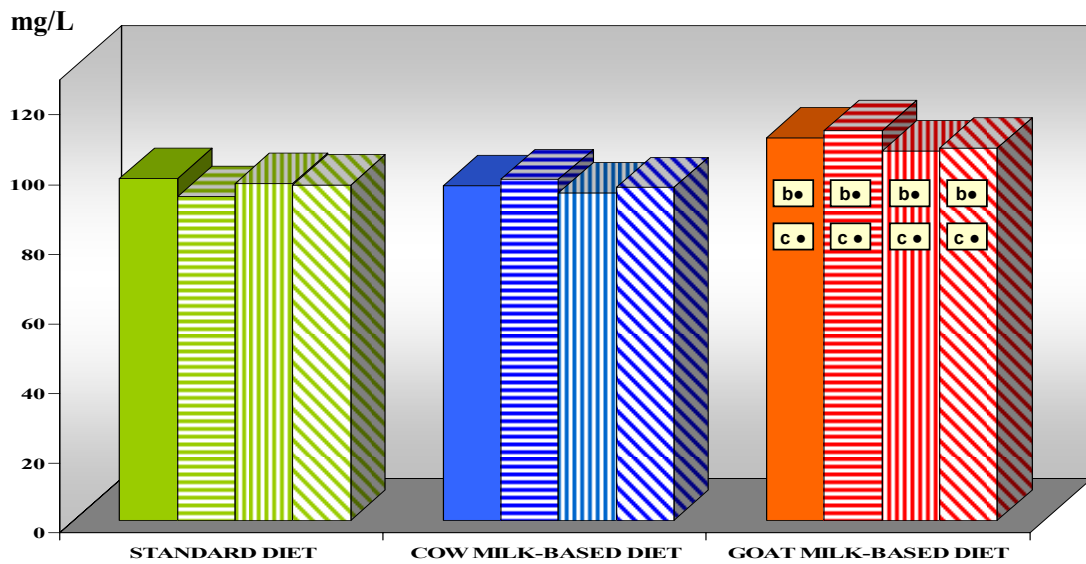
Fig. 11e.- Kidneys



TWO-WAY ANOVA			
Ca-CONTENT IN THE DIET	DIET	ANAEMIA	DIET X ANAEMIA
NORMAL	P<0.001	NS	NS
DOUBLE	NS	NS	NS

Fig. 12.- SERUM LEVELS

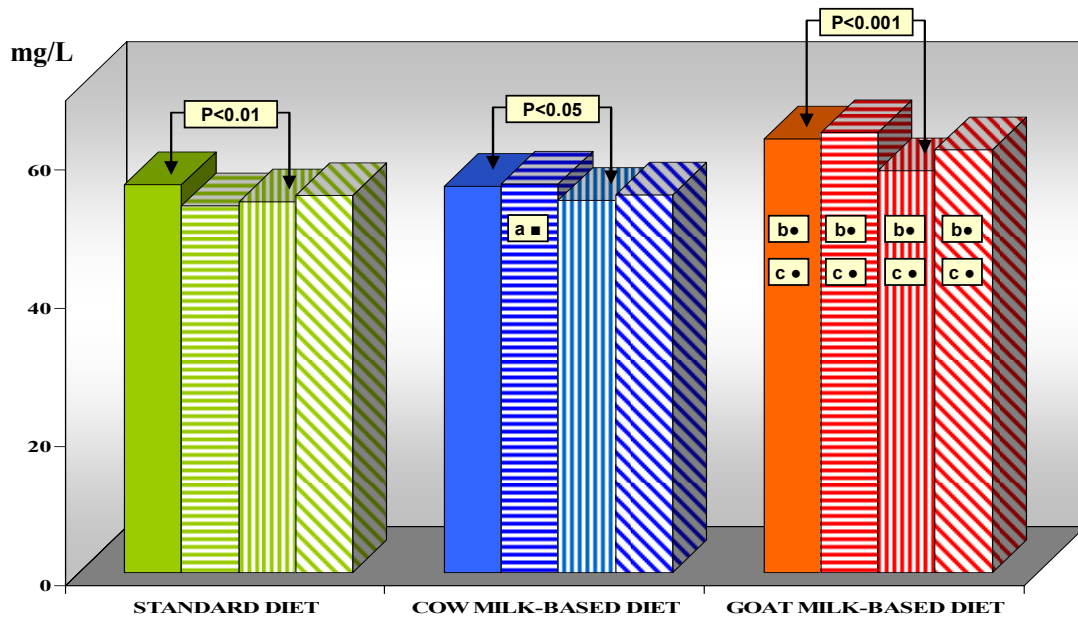
Fig. 12a.- Total Calcium



TWO-WAY ANOVA			
Ca-CONTENT IN THE DIET	DIET	ANAEMIA	DIET X ANAEMIA
NORMAL	P<0.001	NS	P<0.01
DOUBLE	P<0.001	NS	P<0.01

Fig. 12.- SERUM LEVELS

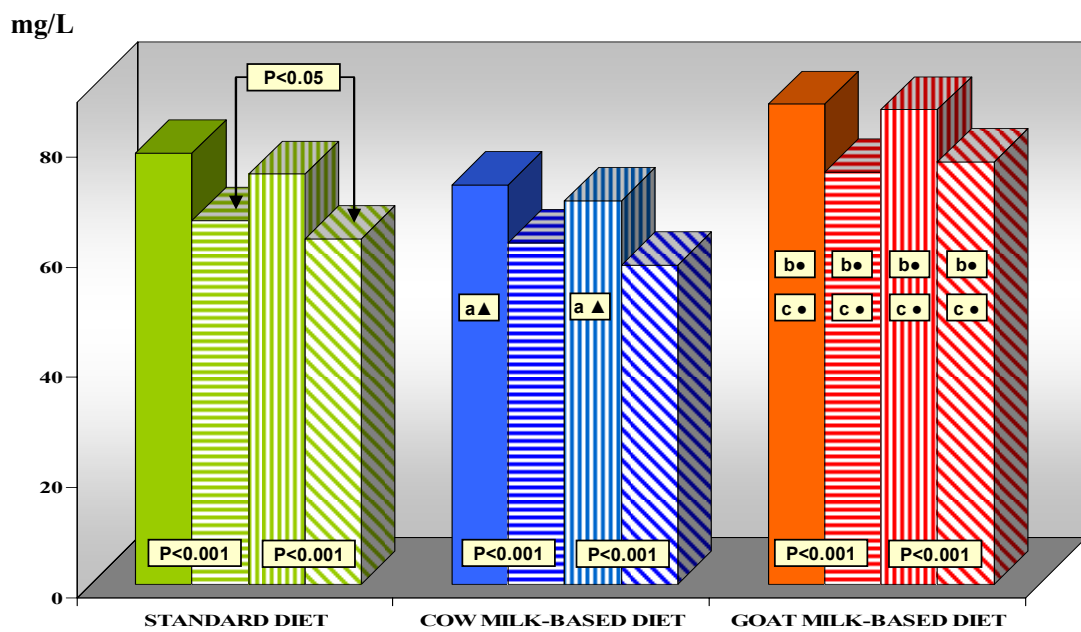
Fig. 12b.- Ionic Calcium



TWO-WAY ANOVA			
Ca-CONTENT IN THE DIET	DIET	ANAEMIA	DIET X ANAEMIA
NORMAL	P<0.001	NS	P<0.05
DOUBLE	P<0.001	NS	P<0.05

Fig. 12.- SERUM LEVELS

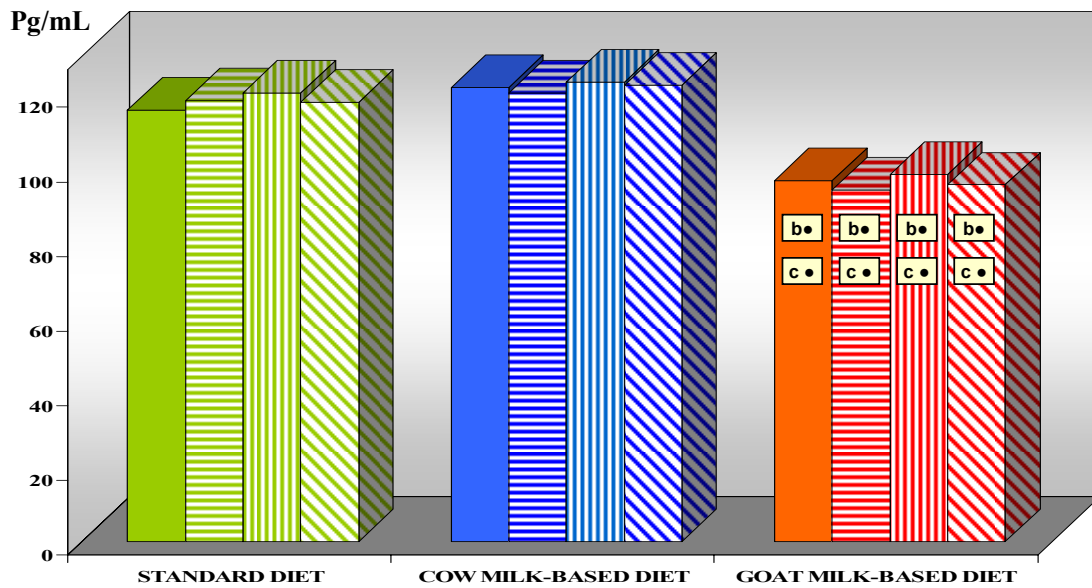
Fig. 12c.- Phosphorus



TWO-WAY ANOVA			
Ca-CONTENT IN THE DIET	DIET	ANAEMIA	DIET X ANAEMIA
NORMAL	P<0.001	NS	NS
DOUBLE	P<0.001	NS	NS

Fig. 12.- SERUM LEVELS

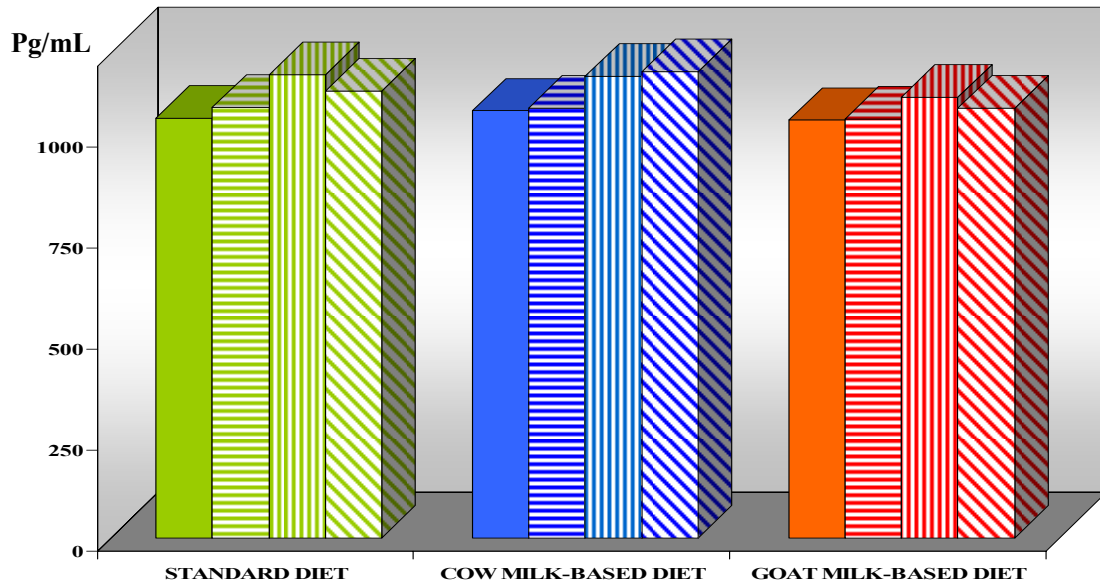
Fig. 12d.- PTH



TWO-WAY ANOVA			
Ca-CONTENT IN THE DIET	DIET	ANAEMIA	DIET X ANAEMIA
NORMAL	P<0.01	NS	P<0.01
DOUBLE	P<0.01	NS	P<0.01

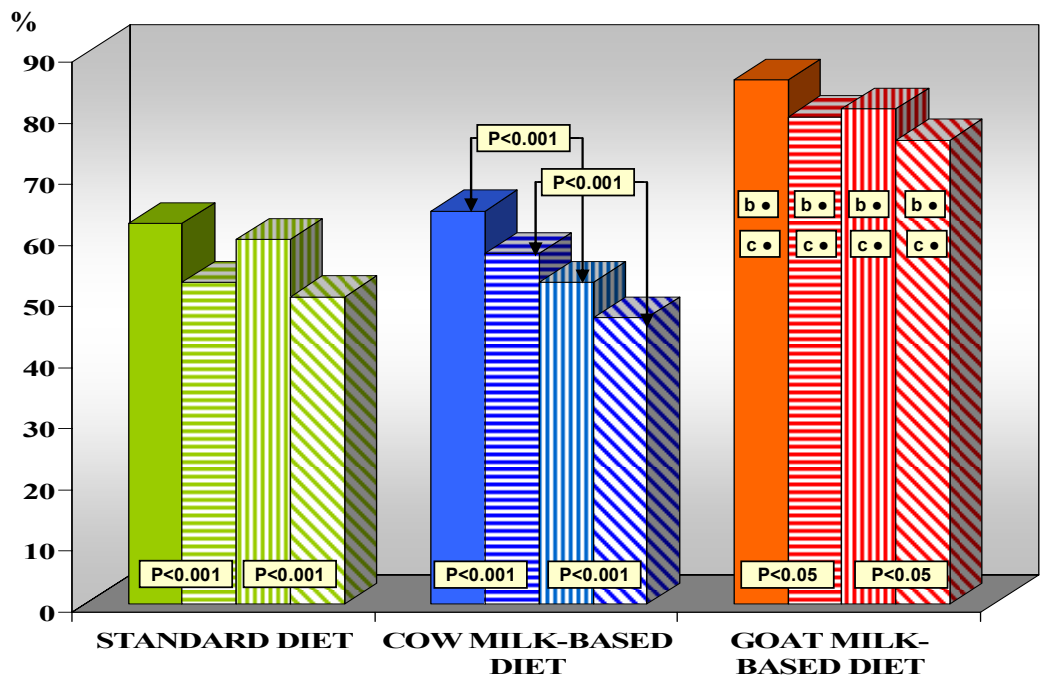
Fig. 12.- SERUM LEVELS

Fig. 12e.- Corticosterone



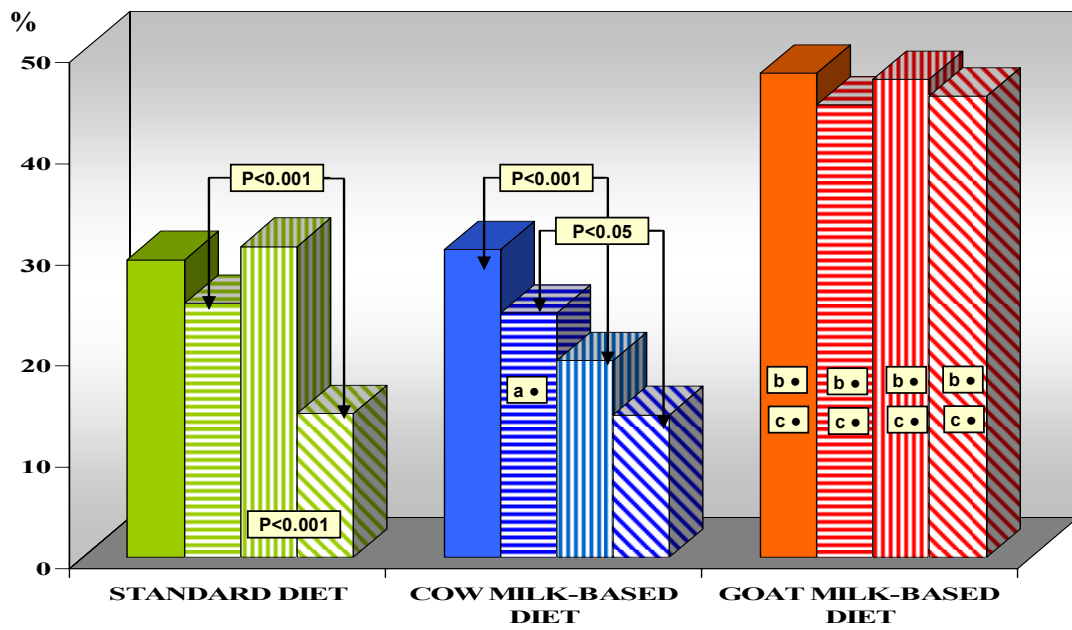
TWO-WAY ANOVA			
Ca-CONTENT IN THE DIET	DIET	ANAEMIA	DIET X ANAEMIA
NORMAL	P<0.01	NS	P<0.01
DOUBLE	NS	NS	NS

Fig. 13.- ADC OF MAGNESIUM



TWO-WAY ANOVA			
Ca-CONTENT IN THE DIET	DIET	ANAEMIA	DIET X ANAEMIA
NORMAL	P<0.001	P<0.001	NS
DOUBLE	P<0.001	P<0.001	P<0.001

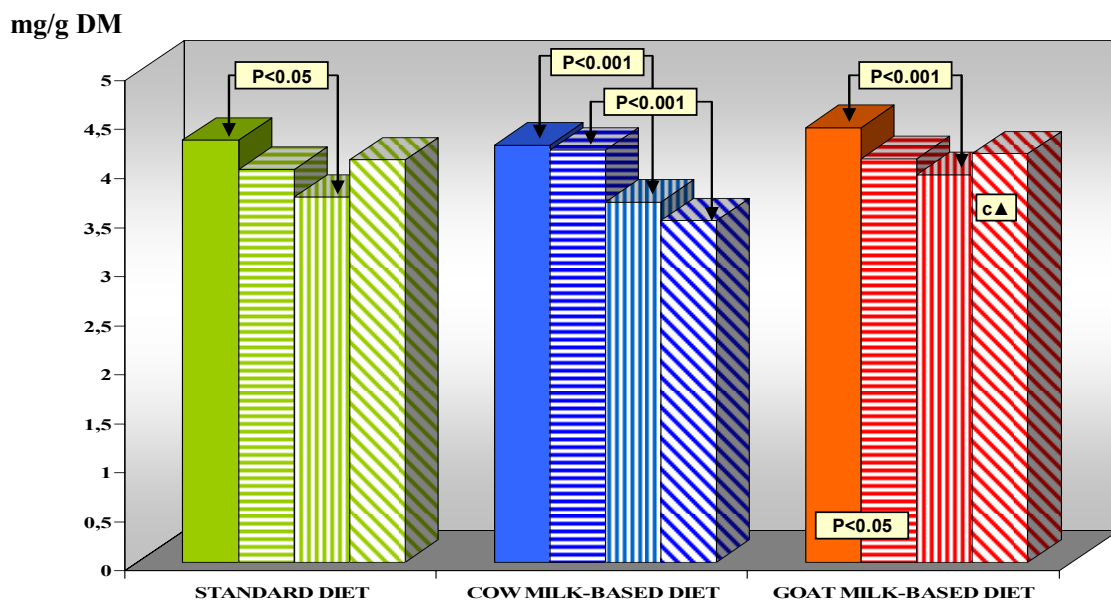
Fig. 14.- R/I OF MAGNESIUM



TWO-WAY ANOVA			
Ca-CONTENT IN THE DIET	DIET	ANAEMIA	DIET X ANAEMIA
NORMAL	P<0.001	P<0.05	P<0.001
DOUBLE	P<0.001	P<0.001	P<0.05

Fig.15.- MAGNESIUM CONTENT IN ORGANS

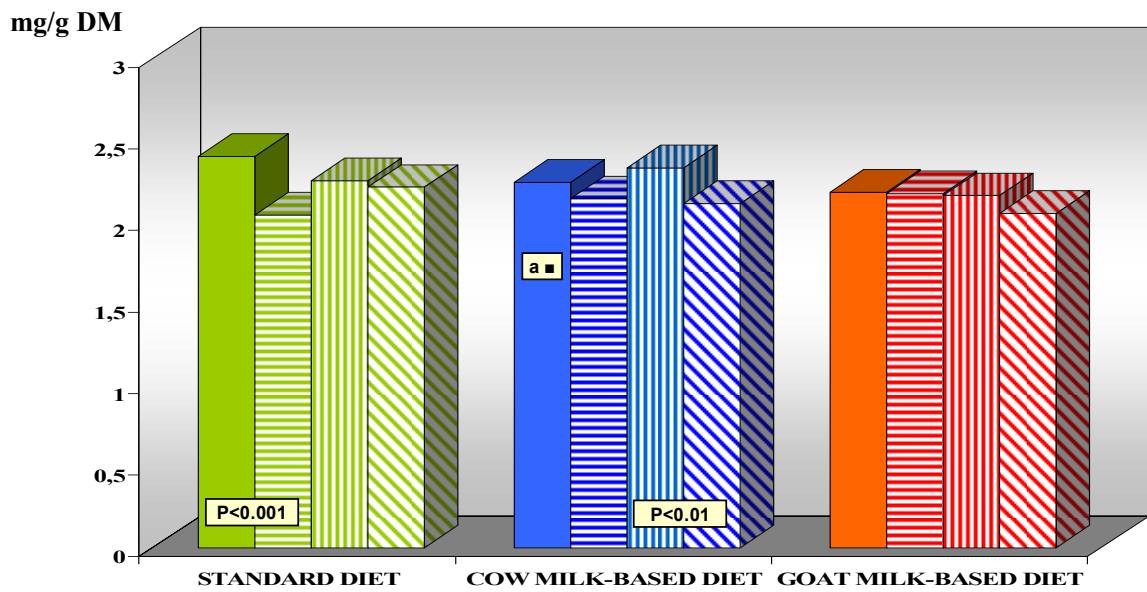
Fig. 15a.- Femur



TWO-WAY ANOVA			
Ca-CONTENT IN THE DIET	DIET	ANAEMIA	DIET X ANAEMIA
NORMAL	NS	P<0.001	NS
DOUBLE	NS	NS	P<0.001

Fig.15.- MAGNESIUM CONTENT IN ORGANS

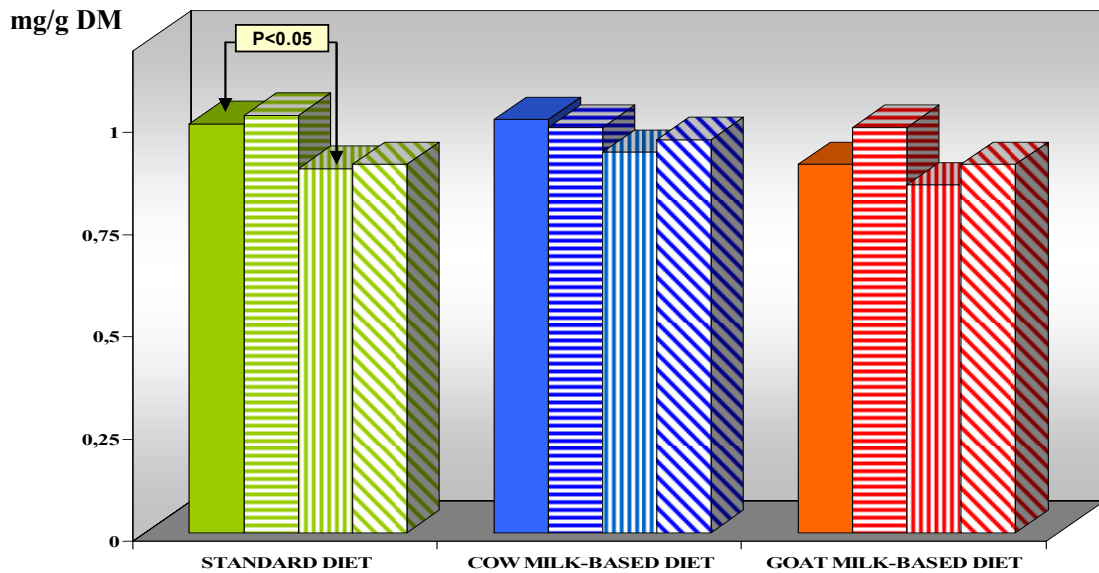
Fig. 15b.- Sternum



TWO-WAY ANOVA			
Ca-CONTENT IN THE DIET	DIET	ANAEMIA	DIET X ANAEMIA
NORMAL	NS	NS	NS
DOUBLE	NS	NS	P<0.05

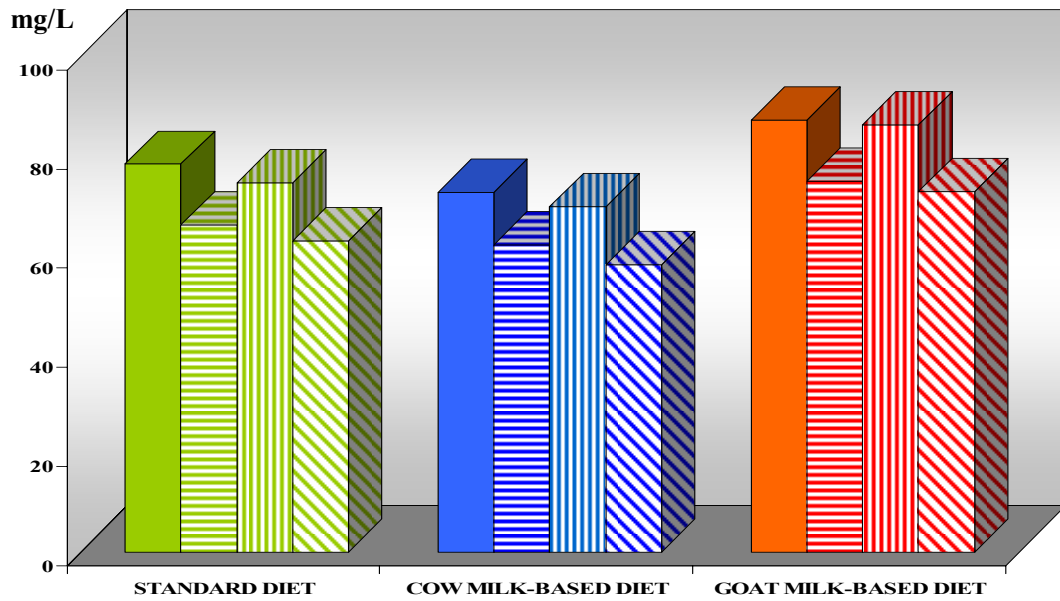
Fig.15.- MAGNESIUM CONTENT IN ORGANS

Fig. 15c.- Muscle L.D.



TWO-WAY ANOVA			
Ca-CONTENT IN THE DIET	DIET	ANAEMIA	DIET X ANAEMIA
NORMAL	NS	NS	NS
DOUBLE	NS	NS	P<0.05

Fig. 16.- MAGNESIUM IN TOTAL BLOOD



TWO-WAY ANOVA			
Ca-CONTENT IN THE DIET	DIET	ANAEMIA	DIET X ANAEMIA
NORMAL	P<0.05	NS	NS
DOUBLE	P<0.05	NS	NS

6.3. INTRODUCTION

Advances in food technology, with a population each time more concerned in health and life quality, have led the nutrition science to the search of new foods with added values, which has health benefits and help to retard or even avoid the emergence of some diseases. In this context, goat milk, natural food with excellent nutritional properties, which confer it a high interest as a food and research subject. In spite of its low consumption, goat's milk is acquiring great interest in the current tendency of looking for healthier foods in developed countries.

Goat milk is a natural food, with an easy digestion and a high nutritional value. It is an excellent source of protein of high quality and easy absorption, it has medium and short chain fatty acids (caproic, caprylic and capric) which contributes to an easier and faster digestion, as well as essential fatty acids such as linoleic, linolenic and arachidonic. Concerning the minerals, it is noteworthy calcium and phosphorus with high digestibility, in part because they are associated to the milk casein. Also is a good source of vitamins such as A, D, E thiamin, riboflavin and niacin.

Previous studies reported by our research group in animal models reveals the beneficial effect of goat milk versus cow milk on the nutritive utilization of protein, fat and minerals in malabsorption syndrome, accompanied by a descent in LDL-cholesterol levels, remaining within the physiological range triglycerides, HDL-cholesterol and transaminases.

In the 50's decade several entities, like the World Health Organization (WHO), executed food enrichment programs to palliate the malnutrition in depressed zones of the planet. In the last years, a real "boom" has occurred with the enriched meals (vitamins, minerals, fiber, fatty acids...), which has begun to be part of the habitual diet. At the same time, it is becoming more usual the consumption of natural foods. These two tendencies are complementary and they reflect the restlessness about the nutrition as a source of health.

There is no doubt that iron deficiency is the cause of most forms of anaemia. According to the WHO, Fe-deficiency anaemia (IDA) is one of the most important nutritional

public health problems in the world and the first cause of haematological consultation. This deficiency is characterized by the reduction or absence of Fe stores, low serum concentration of Fe, poor Hb concentration, low transferrin saturation, haematocrit reduction and an increased platelet count.

Otherwise, our research group has developed studies revealing that nutritional ferropenic anaemia (NFA) provokes important disturbances in the calcium/phosphate metabolism, with a high urinary excretion, that leads to a high degree of bone demineralization.

Because of the actual tendency of supplementing foods and the increase on its consumption, it is necessary to establish the potential negative effects due to its interaction with other minerals, especially with iron, a fact that is extremely important in the NFA.

However, chronic Ca-supplementation effects over mineral status remains unclear and little information exists about the effects of a high intake of this mineral over the bioavailability and body stores of iron, calcium, phosphorus and magnesium.

Taking into account these considerations, the aim of this work is focused in the comparative study of the goat milk versus cow milk, with a normal Ca-content or enriched, over the digestive and metabolic utilization of iron, calcium, phosphorus and magnesium, following the metabolic balance method, in control rats and with induced nutritional ferropenic anaemia. Moreover, to determine the influence of the nutritive utilization of these minerals on its distribution and metabolic use, it has been measured its concentration in the target organs involved on their homeostatic regulation. Otherwise, another haematological parameters related with iron metabolism have been determined, to evaluate whether iron status is affected, as well as serum levels of Ca (total and ionic), P, PTH and Mg concentration in whole blood, related with the metabolism of the other minerals studied.

6.4. EXPERIMENTAL DESIGN

-Animals:

Male albino Wistar rats ($n = 120$), aged about 3 weeks, purchased from the University of Granada Laboratory Animal Service were used for this study. Animal care procedures and experimental protocols were approved by the University of Granada Ethics Committee according to European Community guidelines.

-Nutritional ferropenic anaemia model:

After weaning, the rats were randomly divided into two groups: a control group (45 mg Fe/Kg diet) and the anaemic group (5 mg Fe/Kg diet). Dietary Fe deficiency was induced by a technique we had previously developed (Pallarés *et al.*, 1993). After a pre-experimental period (PEP) receiving the low-Fe diet for 40 days, the rats were anaemic, with low levels of serum iron, Hb, MCV, and high levels of platelets, consistent with Fe-deficiency-induced anaemia in rats.

After the pre-experimental period (PEP) of 40 days, both the control and anaemic groups were divided into six groups, which were fed during the 14-day experimental period (EP) with six different types of diet (S, S⁺, C, C⁺, G and G⁺) with a normal Fe (45 mg/kg diet) and Ca content (5000 mg/kg diet) or double Ca content (10000 mg/kg diet). From the start of the study, the animals were housed in individual, ventilated, heat regulated cages ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) with a 12 h light-dark period and 55-60 % humidity. Diet and mineral-free water was available *ad libitum* to all rats. Food intake was measured and urine and faeces were collected daily during the EP. Body weight was recorded at the beginning and end. On day 14 of EP, the rats fasted overnight and were then anaesthetized by intraperitoneal injection of 5 mg/100 g body weight of sodium pentobarbital (Sigma Chemical Co, St Louis, MI, USA). After median laparotomy, the rats were totally bled by cannulation of the abdominal aorta and aliquots were analyzed for measuring RBC, MCV, hematocrit, platelets and Hb concentration. The remaining blood was centrifuged at 1500 g for 15 min at 4°C to separate cells from serum for subsequent

analysis. Organs were removed, frozen immediately in liquid nitrogen and then stored at -20°C for subsequent analysis.

-Diets:

The diets and mineral and vitamin supplements during the EP were prepared according to AIN93-G recommendations (Reeves *et al.*, 1993), except for the source (olive oil instead of soybean oil) and level of fat (10% rather than 7%), and the Ca-supplemented diets, where a mineral premix was prepared using double the animals' requirements (10000 mg Kg⁻¹ diet).

The milk-based diets were made with lyophilized cow's or goat's milk (diets C, C⁺, G and G⁺ respectively). These lyophilates were analyzed to determine fat content (cow's milk: 28.76%; goat's milk: 30.69%), protein content (cow's milk: 24.84%; goat's milk: 23.36%), lactose content (cow's milk: 40.75%; goat's milk: 39.20%) and mineral composition (mg/Kg of lyophilate) (cow's milk: Ca: 10305, P: 7819, Mg: 852.5, Fe: 8.7, Cu: 1.4 and Zn: 35.1; goat's milk: Ca: 13190, P: 8133, Mg: 895, Fe: 12.3, Cu: 2.5 and Zn: 40.9) .

The average composition of the lyophilates is:

COMPOSITION OF THE LYOPHILATES		
	Amounts in 100 g of lyophilate	
	Goat's milk	Cow's milk
<i>Protein (g)</i>	23.36	24.84
<i>Lipids (g)</i>	30.69	28.76
<i>Lactose (g)</i>	39.20	40.75
<i>Ca (mg)</i>	1319	1030
<i>P (mg)</i>	813	782
<i>Mg (mg)</i>	89.5	85.2
<i>Fe (mg)</i>	1.23	0.87
<i>Cu (mg)</i>	0.25	0.14
<i>Zn (mg)</i>	4.1	3.5
<i>Vitamin C (mg)</i>	14.1	10.3
<i>Vitamin A (mg)</i>	0.43	0.24
<i>Vitamin D (mg)</i>	0.74	0.50
<i>Saturated fatty acids (g)</i>		
<i>C4</i>	0.98	0.83
<i>C6</i>	0.36	0.25
<i>C8</i>	0.65	0.26
<i>C10</i>	2.08	0.64
<i>C12</i>	0.78	0.59
<i>C14</i>	2.70	2.73
<i>C16</i>	7.57	7.35
<i>C18</i>	3.18	2.89
<i>Monounsaturated fatty acids (g)</i>		
<i>C16:1</i>	1.30	1.27
<i>C18:1</i>	8.46	7.23
<i>Polyunsaturated fatty acids (g)</i>		
<i>C18:2</i>	0.71	0.52
<i>C18:3</i>	0.18	0.19
<i>Amino acids (g)</i>		
<i>Alanine</i>	0.90	0.87
<i>Arginine</i>	0.91	0.90
<i>Aspartic acid</i>	1.75	1.87
<i>Cystine</i>	0.32	0.21
<i>Glutamic acid</i>	5.23	5.47
<i>Glycine</i>	0.48	0.53
<i>Histidine</i>	0.61	0.62
<i>Isoleucine</i>	1.64	1.58
<i>Leucine</i>	2.28	2.39
<i>Lysine</i>	2.14	1.93
<i>Methionine</i>	0.60	0.61
<i>Phenylalanine</i>	1.18	1.20
<i>Proline</i>	2.75	2.39
<i>Serine</i>	1.42	1.41
<i>Threonine</i>	1.24	1.14
<i>Tyrosine</i>	1.38	1.23
<i>Valine</i>	0.10	0.94

The necessary quantities of lyophilized cow's or goat's milk were taken to obtain a diet with a 10% fat content. To obtain a protein content of 20% the diet was supplemented with casein, 124 g/kg of diet for C and C⁺ diet and 145 g/kg of diet for G and G⁺ diet, as the protein provided by the lyophilate used for the milk-based diets was insufficient. Fe and Ca content (mg/kg diet) in the diets used during the EP after analysis was as follows:

NORMAL-Ca DIETS				
	Fe	Ca	P	Mg
STANDARD (S)	46.09	5400	3100	502
COW'S MILK (C)	44.71	5700	4000	528
GOAT'S MILK (V)	44.14	5200	4000	504
DOUBLE-Ca DIETS				
STANDARD (S ⁺)	44.00	9720	3100	498
COW'S MILK (C ⁺)	44.79	10958	3800	525
GOAT'S MILK (V ⁺)	46.00	10436	3930	502

Composition of the experimental diets in the PEP:

AIN-93 G Diet^a	
	AMOUNT (g/Kg diet)
Casein	200
Olive oil	70
Wheat starch	530
Constant ingredients^b	200

^aNormal-Fe (45 mg Kg⁻¹ diet) for control rats or low-Fe (5mg Kg⁻¹ diet) for anaemic rats. ^bThe constant ingredients consisted of (g Kg⁻¹ diet): fibre (micronised cellulose) 50, sucrose 100, choline chloride 2.5, L-cystine 3 for growing and 1.8 for adult rats, mineral premix 35, vitamin premix 10. The mineral and vitamin premix for normal Ca diets were prepared according to the recommendations of the American Institute of Nutrition (Reeves *et al.*, 1993).

Composition of the experimental diets in the EP:

Diet S, S⁺ (non-milk standard)^c	
	AMOUNT (g/Kg diet)
Casein	200
Olive oil	100
Wheat starch	501
Constant ingredients^d	199

Diet C, C⁺ (cow milk)^c	
	AMOUNT (g/Kg diet)
Protein cow milk + casein	200
Cow milk fat	100
Wheat starch	307
Lactose	194
Constant ingredients^d	199

Diet G, G⁺ (goat milk)^c	
	AMOUNT (g/Kg diet)
Protein goat milk + casein	200
Goat milk fat	100
Wheat starch	311
Lactose	190
Constant ingredients^d	199

^cNormal-Fe (45 mg Kg⁻¹ diet). ^dThe constant ingredients consisted of (g Kg⁻¹ diet): fibre (micronised cellulose) 50, sucrose 100, choline chloride 2.5, L-cystine 1.8, mineral premix 35, vitamin premix 10. The mineral and vitamin premix for the normal Ca diets were prepared according to the recommendations of the American Institute of Nutrition (Reeves *et al.*, 1993) for standard diet and mineral and vitamin specific supplements for diets C and G were formulated considering the mineral content of the lyophilized milks supplied in order to meet these recommendations. The mineral premix for double-Ca diets was prepared using double the animals' requirements (10000 mg Kg⁻¹ diet).

6.5. MATERIAL AND METHODS

-Dry matter:

The water content of the diet, faeces, liver, sternum, femur and spleen were determined by drying the materials at $105 \pm 2^\circ\text{C}$ until weight remained constant.

-Iron, Calcium and Magnesium determination:

The concentration of Fe, Ca, and Mg in the diets, faeces, urine, organs and Mg concentration in total blood were determined by atomic absorption spectrophotometry (Perkin Elmer 1100B, Norwalk, CT, USA). The samples had been previously mineralised by a wet method in a sand bath (Bunsen, SA, Madrid, Spain) placing samples into a resistant flask and dissolving in nitric acid, follow by mixture with $\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$ (1:4 v/v) until the total elimination of organic matter. Finally, samples were diluted with milli-Q water, filtered with a No. 41 Whatman filter and taken to an adequate volume.

-Phosphorus determination:

The concentrations of P in the diet, faeces, urine, serum and the different organs were analyzed by visible spectrophotometry (Perkin Elmer UV/VIS spectrometer Lambda 16, Rochester, NY, USA) using the Fiske-Subbarow method (Fiske and Subbarow, 1925).

-Serum calcium and phosphorus:

The levels of serum Ca and P were determined by a colorimetric reaction, using the Sarkar y Chauhan method (Sarkar and Chauhan, 1967) for Ca and the Drewes method (Drewes, 1972) for P. Ionic Ca was measured with an autoanalyzer using a Nova 7 selective electrode (Nova Biomedical, Wathman, MA, USA).

-Serum parathormone:

Serum PTH was determined with a radioimmunoassay for the C-terminal/half molecule of the hormone (Nichols Institute, San Juan Capistrano, CA, USA), measured with a Packard counter (Packard, Meriden, CT, USA).

-Serum corticosterone:

Serum corticosterone levels were determined with a radioimmunoassay kit (ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA, USA).

-Nitrogen content:

Nitrogen content in the lyophilates and diets was determined by Kjeldahl's method, using a protein conversion factor of 6.25 for S diet and 6.38 for the lyophilates and milk-based diets (Kjeldahl, 1883).

-Amino acid composition:

The amino acid composition of the proteins was determined by high-performance liquid chromatography using the Waters PICO-TAG method with precolumn derivatization and phenylisothiocyanate (PITC) as previously described (Bennett and Solomon, 1986).

-Vitamins A, D3 and C:

The vitamin A and D3 (cholecalciferol) content of the lyophilates was measured by LC-MS according to the method of Heudi *et al.*, (2004). The vitamin C content of the lyophilates was measured by a colorimetric method using a commercial kit (Boehringer Mannheim, Germany).

-Fat content:

The fat content in the lyophilates and diets was determined after hydrochloric hydrolysis by extraction with petroleum ether, boiling point: 40-60°C, (Fanderson, 1986).

-Fatty Acids:

The fatty-acid patterns of the lyophilates were determined by gas-liquid chromatography (GLC) using the method of Lepage and Roy (1986).

-Haematological test:

RBC, MCV, PCV, platelets, Hb, in heparinised blood samples were measured by using an automated haematology analyzer (Sysmex KX-21, Tokyo, Japan).

- Serum ferritin:

Serum ferritin concentration was determined using the Chiron Diagnostics ACS:180® Automated Chemiluminescence System (Chiron Diagnostics Corporation, Norwood, MA, USA).

- Serum iron, transferrin saturation and TIBC:

To calculate the rate of transferrin saturation, TIBC and serum iron levels were determined colorimetrically and enzymatically, using Sigma Diagnostics Iron and Total Iron-Binding Capacity reagents (Sigma Diagnostics, St. Louis, MI, USA). The rate of transferrin saturation was subsequently calculated using the following equation:

$$\text{Transferrin saturation (\%)} = \text{serum iron concentration } [\mu\text{g/l}] / \text{TIBC } [\mu\text{g/l}] \times 100.$$

-Biological indices:

The following indices and parameters were determined for each group, according to the formulas given below: intake (expressed as dry weight), body weight, apparent digestibility coefficient (ADC, eq. 1) and percent of iron retention / iron intake (% R/I, eq. 2).

$$(1) \quad \text{ADC} = (I - F) \times 100 / I$$

$$(2) \quad \% \text{ R/I} = I - (F + U) \times 100 / I$$

where, I = intake, F = faecal excretion and U = urinary excretion.

The HRE was calculated as described by Mahoney and Hendricks (1982):

$$\% HRE = \frac{mg Hb - Fe (final) - mg Hb - Fe (initial)}{mg Fe consumed} \times 100$$

$$mg Hb - Fe initial = initial body weight \times \frac{ml blood}{g body weight} \times \frac{Initial Hb}{100} \times \frac{mg Fe}{g Hb}$$

$$mg Hb - Fe final = final body weight \times \frac{ml blood}{g body weight} \times \frac{Final Hb}{100} \times \frac{mg Fe}{g Hb}$$

assuming that the total blood volume of the rat is 6.7% of body weight and haemoglobin iron is 3.35 mg Fe per g of haemoglobin:

$$Hb - Fe = body weight \times 0.067 \times \frac{Hb}{100} \times 3.35$$

-Quality control:

Given the importance of obtaining an accurate determination of the different parameters studied, a quality control test of these determinations was carried out. This consisted of analyzing a lyophilized bovine liver (BCR certified reference material CRM 063R; Community Bureau of Reference, Brussels, Belgium), which yielded the following values:

- Fe: $2.23 \pm 0.29 \mu\text{g/g}$ (certified value: $2.32 \pm 0.23 \mu\text{g/g}$).
- Ca: $13.21 \pm 0.15 \text{ mg/g}$ (certified value: $13.49 \pm 0.10 \text{ mg/g}$).
- P: $10.97 \pm 0.17 \text{ mg/g}$ (certified value: $11.10 \pm 0.13 \text{ mg/g}$).
- Mg: $1.238 \pm 0.030 \text{ mg/g}$ (certified value: $1.263 \pm 0.024 \text{ mg/g}$).

-Statistical Analysis:

Data are reported as means \pm S.E.M. Differences between groups (control vs. anaemic and normal-Ca vs. double-Ca) were tested for statistical significance with student's *t* test. Variance analyses by one-way methods were used to compare the different diets supplied to the two groups of animals (control and anaemic) in the EP. Individual means were tested by pairwise comparison with Tukey's multiple comparison test when main effects and interactions were significant. Data were analyzed statistically by Two-Way ANOVA to determine the effects of anaemia, type of diet and their interaction (diet x anaemia). Differences were considered significant at $P < 0.05$. All statistical analyses were carried out using the SPSS computer program (SPSS, version 14.0, 2006; SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

6.6. RESULTS AND DISCUSSION**-Food intake:**

In the EP, the food intake was similar in the control group and the anaemic rats given the different diets. Food intake was higher in both groups of rats consuming diet S in comparison with the milk-based diets ($P < 0.001$), (Food intake: control and anaemic S, $S^+ > C, C^+ = G, G^+$). In this study, the lower food intake of the rats (both control and anaemic animals) fed the milk-based diets, in comparison to S diet, could have been caused by the particular sensory characteristics produced by the lyophilates used to process the diets, especially in the case of the G diet, as has been observed previously for goat's milk (Alferez *et al.*, 2001; Lopez Aliaga *et al.*, 2003). In spite of the lower food intake observed for the animals from C and G groups, the quantity consumed of both diets (C and G) supplies enough nutrients and energy to cover the rats' nutritional requirements (Table 1; Figure 1).

-Nutritive and metabolic utilization of Fe:

The two-way ANOVA showed that for the different parameters related to the digestive and metabolic utilization of Fe, there was no interaction effect between the diet and anaemia. The ADC of Fe was affected by both the diet and anaemia (Two-way ANOVA,

$P < 0.001$). The ADC of Fe was higher in anaemic rats than in the controls for the three diets assayed, ($P < 0.001$), for both normal and Ca-Supplemented diets (Table 2; Figures 2 and 3). This reveals that there is a greater avidity for Fe among anaemic rats, which might be because ferropernic anaemia increases the intestinal divalent metal transporter (DMT1) (Yeh et al. 2000) and ferroportin expression (Morgan and Oates, 2002). These receptors are affected by non-heme Fe absorption and thus increases Fe absorption (Forellat et al. 2000). The increase in the ADC of Fe in Fe-deficient rats is similar to that reported by Pallarés et al. (1993). In both control and anaemic rats, ADC of Fe were better in the rats fed the G diet, whereas in rats fed the S or C diets there were no differences in ADC of Fe (ADC of Fe: G, $G^+ > S$, $S^+ = C$, C^+). In control and anaemic rats, Ca-supplementation in the C^+ diet decreased Fe ADC in comparison with the normal-Ca diet ($P < 0.05$ for the control rats and $P < 0.01$ for the anaemic rats). However, this adverse effect was not observed when the G^+ diet was supplied. (Table 2; Figure 2).

The Fe R/I ratio was affected by the diet ($P < 0.001$) and anaemia ($P < 0.01$). R/I was significantly higher for anaemic rats than for their controls in the three experimental diets, both normal and Ca-supplemented ($P < 0.001$). The type of diet supplied influences Fe retention: R/I was higher for rats fed diet G than for either S diet or C diet (controls: $P < 0.01$ in the double-Ca diet, $P < 0.05$ in the normal-Ca diet and $P < 0.001$ in the anaemic rats fed both normal and Ca-supplemented) (R/I Fe: G, $G^+ > S$, $S^+ = C$, C^+). A comparison between the Ca-supplemented diet with the same diet but with normal-Ca content showed that the Fe R/I decreased in the anaemic rats fed the S diet ($P < 0.05$) or C diet ($P < 0.01$), whereas in anaemic rats fed the G diet the Fe R/I was even higher in the double-Ca group ($54.7 \pm 1.0\%$ vs. $51.5 \pm 0.8\%$) ($P < 0.05$). However, Ca supplementation did not affect the Fe R/I in control rats for the three assayed diets (Table 2; Figure 3).

The greater nutritive utilization of Fe found with diets G and G^+ , could be due to various nutritional factors; for example, the protein of this milk is more soluble and contains a higher proportion of other soluble proteins (β -lactoglobulin, α -lactoalbumin and serum albumin) (Boza and Sanz-Sampelayo, 1997). This protein supplied in the G diet, due to its

greater solubility and animal origin (Sharp *et al.*, 2003), could favour the absorption of Fe. Moreover, fat quality is different in the three diets; goat's milk fat is richer in medium chain triglycerides (MCT) than the fat obtained from cow's milk, 36% versus 21%, (Alferez *et al.*, 2001). The MCT in the diet are rapidly absorbed and metabolized to obtain energy (García-Unciti, 1996) and so could help to increase the synthesis of carrier proteins and thus Fe absorption.

Numerous dietary components are capable of reducing Fe (III) to Fe (II), including ascorbic acid (Wienk *et al.*, 1999), and amino acids such as lysine (Van Campen, 1973) and cysteine (Glahn and Van Campen, 1997). All these dietary components are present in greater quantities in the G diet than in the C diet (Alferez *et al.*, 2006).

Another factor to be taken into consideration is that goat's milk has almost twice the vitamin A content of cow's milk (Alferez *et al.*, 2006). Vitamin A may mobilize available Fe stores and use them to form haemoglobin (Bloem, 1995). On the other hand, β -carotene improves iron uptake and overcomes inhibition by potent iron absorption inhibitors (García-Casal *et al.*, 2000). Gargari *et al.* (2006) have shown that increasing vitamin A intake can be considered a method for increasing iron bioavailability, thus combating iron and vitamin A deficiencies simultaneously.

In addition, goat's milk has a higher vitamin D content than cow's milk (Alferez *et al.*, 2006). We previously reported the positive role of vitamin D as a promoter of the active component in the absorptive process of Fe (Gómez-Ayala *et al.*, 1998).

Several short-term studies have shown that the concurrent ingestion of Ca and Fe from the same meal inhibits Fe absorption (Reddy and Cook, 1997). Long-term studies of Ca supplementation, however, have not reported a consequent decrease in Fe status (Minihane and Fairweather-Tait, 1998). In human studies, Roughead *et al.* (2005) observed that Ca supplementation reduced heme and total Fe without significantly affecting non-heme Fe

absorption, regardless of meal bioavailability. Calcium was found to inhibit the initial mucosal uptake rather than the serosal transfer of heme Fe.

Our results show that the consumption of diets containing high levels of Ca for 14 d has no adverse effects on non-heme Fe absorption in control rats, these results being consistent with those reported by other authors (Grinder-Pedersen *et al.*, 2004) except in the case of the cow's milk-based diet, in which there was a significant fall in Fe ADC in comparison with a normal-Ca diet (Alferez *et al.*, 2006), as was also found by Minihane and Fairweather-Tait (1998). However, in rats with NFA fed the S or C diets with calcium supplementation, the ADC of Fe decreased. Wienk *et al.* (1999) described the mechanism of an inhibitory effect of high CaCO₃ intake on Fe bioavailability in anaemic rats. The CaCO₃-induced decrease in Fe transfer through the mucosal cytoplasm and/or basolateral membrane may have been responsible for the concurrent decrease in Fe bioavailability.

Moreover, in anaemic rats, Ca supplementation had no influence on ADC Fe when the G diet was provided. This could be due to the exceptional nutritional characteristics of this kind of milk (López-Aliaga *et al.*, 2000; Alferez *et al.*, 2006), which minimizes Ca-Fe interactions, even when the amount of Ca in the diet is double the requirements of the rat. In addition, in the control and anaemic rats fed the G diet, the Fe ADC was higher than in those fed the S or C diets.

-Fe deposit in organs:

The two-way ANOVA showed that both diet and anaemia had a significant effect on Fe deposits in organs. In addition, an interaction effect between diet (both normal and double-Ca) and anaemia was observed in the femur ($P < 0.01$) and sternum ($P < 0.001$) for Fe concentrations. In general, in all the organs studied (spleen, liver, sternum and femur), Fe concentrations were lower in the anaemic rats than in the controls for the three diets assayed (both normal and Ca-supplemented) ($P < 0.001$), except in the sternum for diet S, in which there were no differences. This is consistent with the lower Fe R/I ratio observed in anaemic rats in all the experiments. Liver and, to a lesser extent, spleen Fe concentrations are routinely

used as indicators of body Fe status in rats (Whittaker *et al.*, 1996). The marked decreases in Fe concentration in the liver and the spleen, as reported in this paper, are suggestive of the depletion of Fe storage in anaemic rats. Under our experimental conditions in control and anaemic rats, the highest Fe content was found in the spleen and liver, followed by other organs such as the sternum and the femur (Table 3; Figures 4a-d).

A comparison of the milk-based diets showed that the Fe content in organs was higher for both animal groups fed the G, G⁺ diet than for those fed the C, C⁺ diet, particularly in the sternum, femur and liver. A comparison of G and S diets (both normal and Ca-supplemented) shows that among the control and anaemic animals, the Fe content in the femur was greater for G, G⁺ diet (normal and Ca-Supplemented) (P<0.001). In general, Fe concentrations were lower in all the organs studied, especially in the sternum for C diet (P<0.001). Dietary supplementation with 10000 mg Ca/kg in comparison with a normal-Ca content diet had no significant effect on Fe content in the different organs studied, in either control or anaemic rats, for the animals given the G diet whereas for the S and C diets, Fe deposits were lower in general. This is consistent with the better Fe R/I ratio achieved with the G diet, even when it is supplemented with Ca.

-Haematological parameters:

Among the control rats, all the haematological parameters studied, namely Hb concentration, serum Fe, RBC, PCV and platelets, were within normal limits for this species at the start and end of the experimental period. After consuming the low-Fe diet for 40 d, the rats were anaemic, with a mean blood Hb concentration of 78.4.0 g L⁻¹. PCV and serum Fe were low, consistent with Fe-deficiency-induced anaemia in rats. The level of Hb increased after Fe-normal diets were provided (Table 1).

The HRE (haemoglobin-Fe gain/Fe intake) percentage was affected by the diet and anaemia (Two-Way ANOVA, P<0.001). For the three diets assayed, HRE in Fe- deficient rats was higher than among controls (P<0.001 for the normal-Ca diet and P<0.01 for the double-Ca diet). The HRE percentage was higher in anaemic rats consuming diet G, G⁺ than

in those given diets S, S⁺ or C, C⁺ which were all similar (HRE: G, G⁺ > S, S⁺, = C, C⁺) (Table 4; Figure 5i). The HRE percentage among the control groups was similar to that reported by other authors (Matsumoto *et al.*, 2003). Greater digestive utilization of Fe by anaemic rats is reflected in the HRE, which increased markedly for the three diets. These values are similar to those obtained in previous studies (Pallarés *et al.*, 1993). The HRE percentage was higher in b for the anaemic rats given diet G compared with diets S and C, which may be due, in part, to the higher nutritive utilization of Fe among the animals given diet G.

It is normally accepted that the sequence of events during oral treatment of Fe-deficiency anaemia is, first, the normalization of the Hb value, followed by restoration of Fe storage (Bothwell and Finch, 1962). Under our experimental conditions, there was an inverse correlation between Hb-Fe gain and spleen and liver stores. This means that although anaemic rats respond rapidly to Fe dietary repletion with respect to haematology and storage of non-heme organ Fe, the anaemic rats showed a significantly lower Fe concentration than did their controls. These results therefore indicate an incomplete restoration of Fe stores within the time frame (14 d) of this experiment.

With respect to the Two-Way ANOVA, in general all the parameters studied were affected by anaemia, diet (RBC, Serum Fe, ferritin) and an interactive effect between diet x anaemia was observed in RBC, PCV, serum Fe and ferritin, in both normal and Ca-supplemented diet (Figures 5a-i). Among Fe-deficient rats, RBC and PCV were lower than in the control rats for the three diets studied at the start of EP (P<0.001). The Fe-deficient rats showed complete recovery of RBC, PCV and MCV after consuming the different diets (S, S⁺ C, C⁺, G and G⁺), especially RBC and MCV in rats fed diet G, G⁺ versus those given diet C, C⁺ (both normal and Ca-supplemented) (P<0.001 for RBC) (Figuras 5a-c).

Fe-deficiency causes duplication in the platelet count, regarding the respective controls. The supply of the three diets tested reduced these levels to values almost similar to their controls, especially for the S⁺ and G⁺ diets, whereas with C diet, this descent was less pronounced. These results might mean there is less recovery from anaemia among the rats

given the C diet, because previously reported studies (Campos *et al.*, 1998) showed that platelet levels reflect iron status. In control rats fed double-Ca diets, platelet levels were higher than in those fed a normal-Ca diet for S and C diet ($P < 0.001$) (Alferez *et al.*, 2006). This last result is noteworthy, because it reflects what occurs in the nutritive utilization of Fe and confirms the interaction between Ca and Fe, which is minimized when diet G is supplied. However, in anaemic rats platelet levels were not affected by Ca supplementation in the diet, probably as a result of Fe metabolism being unbalanced (Pallarés *et al.*, 1993; Viteri, 1993).

Serum Fe decreased markedly among the anaemic rats given diet C ($P < 0.001$) or diet S (both normal and Ca-supplemented) ($P < 0.05$) in comparison with their controls; however, the goat's milk diet did not produce differences between groups. Among the control rats, serum levels of Fe were similar for all the diets assayed. Nevertheless, for the anaemic rats, serum Fe was significantly higher among those given diet G, G^+ ($P < 0.001$) or diet S, S^+ ($P < 0.01$) than diet C and C^+ (Serum iron: $G, G^+ = S, S^+ > C, C^+$). Fe deficiency caused a drastic decrease in serum Fe levels which remained low after consuming S and C diets. However, when the anaemic rats were fed the G diet these values were recovered and were similar to those of the control group. Moreover, Ca supplementation did not affect serum Fe values when the G diet was supplied. This could be due to the fact that dietary goat's milk improves the nutritive utilization of Fe and minimizes interference with Ca (Barrionuevo *et al.*, 2002).

Serum ferritin (Table 4; Figure 5f) is another index that is considered very useful because it is a reflection of Fe stores (Walters *et al.*, 1973). In this study, the mean value of serum ferritin in control rats was significantly higher than in Fe deficient rats. The influence of dietary Fe intake over 14 d was especially significant in the anaemic rats fed the G diet, with serum ferritin levels reaching 98 $\mu\text{g/L}$ with the normal-Ca diet and 90.2 $\mu\text{g/L}$ with the double-Ca diet, while they were much lower with the other diets assayed (S and C). The comparison between the double and normal-Ca diets showed that serum ferritin levels decreased significantly in both the control and the anaemic rats fed S^+ and C^+ diets, and to a lesser extent the G^+ diet. This shows that the goat's milk in the diet not only restored body Fe

stores in anaemic rats but even did so when the amount of Ca was double the requirements for this species.

Transferrin saturation (Table 4; Figure 5g) fell drastically with anaemia, as has been reported by other authors (Erikson *et al.*, 1997). After consumption of the normal-Fe diets by rats given the C,C⁺ diet, serum transferrin remained low in anaemic rats, while no differences were observed between the anaemic rats and their controls with S,S⁺ and G,G⁺ diets. This shows that dietary cow's milk does not aid recovery from anaemia, as levels of this haematological parameter remain low; Fe serum values continue to be low despite the supply of a diet with normal levels of Fe. Ca-supplementation did not affect transferrin for any of the diets assayed.

TIBC (Table 4; figure 5h) was lower in the control than in the anaemic rats. After a normal-Fe diet was consumed, in anaemic rats TIBC approached the values presented by the control animals for the three diets assayed. In general, no differences were observed between the control and anaemic rats concerning the diet supplied, as was confirmed by Two-Way ANOVA (TIBC: G, G⁺ = C, C⁺ = S, S⁺). Ca content in the diet did not affect the TIBC in the different experimental groups.

-Nutritive and metabolic utilization of Ca and P:

After the consumption of the normal or double-Ca diets, the ADC of Ca and P were lower for the Fe-deficient rats than for the controls, regardless of the type of diet consumed. On the other hand, Ca-supplementation had a negative effect on the digestive utilization of P in anaemic rats with respect their controls.

A comparison of the effects of the three diets (both normal or double-Ca content) revealed that, both among the controls and Fe-deficient rats, the ADC of Ca and P was greater when the animals were given the G diet (P<0.001), except for control rats fed double-Ca diets, where there were no differences between diets for the P. Ca-supplementation caused a descent in the ADC of Ca and P (P<0.001), in both controls and anaemic rats. The Two-

Way ANOVA revealed that the ADC and R/I of Ca and P were affected by both diet and anaemia. Anaemia caused a decrease in the R/I ratio of Ca and P (for both normal and Ca-supplemented diets), except in the G and G⁺ diets, where no differences were found between Fe-deficient and controls rats for The R/I of P (Tables 5 and 6; Figures 6, 7, 8 and 9).

A comparison of the milk-based diets (both normal and Ca-supplemented) revealed that the R/I ratio of Ca and P is higher in the G and G⁺ diets with respect to C and C⁺ diets in both groups of animals (Control and Fe-deficient).

After feeding the rats the different diets (S, C or G), the ADC of Ca was found to be lower in the anaemic rats, with respect to their controls, and at the same time the absorption (ADC) of P was lower, confirming the findings of Lisbona *et al.* (1999). The lower ADC of Ca could have occurred because anaemia promotes an increase in the digestive utilization of Fe, thus diminishing that of Ca. Notably better digestive and metabolic results were obtained for Ca and P, in both the control and the anaemic rats, after they were fed the G diet, compared with the other two diets tested. This improvement could be because consumption of the G diet produces a better recovery of Fe metabolism, as indicated by the ADC of Fe and haemoglobin regeneration efficiency (HRE) (Alferez *et al.*, 2006). In these conditions, the amount of available oxygen and ATP increases, and the Ca carriers recover more efficiently, which favours absorption of Ca by active transport (Conrad and Umbreit, 1993). A similar chain of events must occur with P, as there has been shown to be active transport in the process of P absorption (López-Aliaga *et al.*, 1994). Moreover, as has been shown previously with normal rats, the G diet reduces the interaction between Ca and Fe, thus increasing the nutritive utilization of both (Barrionuevo *et al.*, 2002; Campos *et al.*, 2003). The lower Ca–Fe interaction in animals fed the G diet could contribute to the better nutritive utilization of Ca in a situation of NFA, with values being reached that might even surpass those found in control rats fed the S diet. Furthermore, the lower Ca–Fe interaction might partly explain the particular nutritional characteristics of the G diet with respect to the C diet (Alferez *et al.*, 2006; Barrionuevo *et al.*, 2002; Campos *et al.*, 2003).

-Ca and P content of organs:

Anaemia causes bone demineralization in Fe-deficient rats (Campos *et al.*, 2006). After feeding both groups of rats (control and anaemic) the experimental diets, it was observed that the Ca content in the femur was similar to that of the respective controls in the anaemic animals fed the G and S diets with normal-Ca content. However, Ca-supplementation increased Fe deposits in the femur of Fe-deficient rats regarding their respective controls with the milk-based diets, but this effect was not observed with the S diet, where the Ca content in femur is lower for the anaemic rats than for the controls (Table 7; Figure 10a).

In general, Ca deposition in the femur is higher when the G or G⁺ diet is supplied, and Ca-supplementation increased Ca deposits in the femur of anaemic rats fed with milk-based diets, but this effect was not observed for the S diet. The lower levels of PTH found in both groups of animals fed with goat's milk-based diets (Table 9; Figure 12d), could explain the higher deposits of Ca in the femur.

In the case of the *longissimus dorsi* muscle, Ca deposition was higher in anaemic rats than in their controls, which was statistically significant for the S and G diet (both normal and Ca-supplemented). In general, Ca deposit in muscle is higher with G and G⁺ diets, relative to the other diets assayed. Ca-supplementation increased Ca content in the muscle of anaemic rats fed with the milk-based diets, especially for the G diet (Table 7; Figure 10c). A comparison of the normal-Ca diets revealed that the goat milk-based diet favoured Ca deposit in sternum of anaemic rats, and this fact was not observed for the Ca-supplemented diets (Table 7; Figure 10b).

When the Ca content in the diet is double the requirements in the goat's milk-based diet (G⁺), P deposit in femur is higher in anaemic rats than in their respective controls, but this effect was not observed for the cow's milk-based diet (Table 8; Figure 11a). Moreover, Ca-supplemented goat milk favoured P deposit in the *Longissimus dorsi* muscle of anaemic rats, compared with cow milk (Table 8; Figure 11b). P deposits in the brain (Table 8; Figure 11c) are

higher in anaemic rats for the three normal-Ca content diets assayed. P content in spleen and kidneys (Table 8; Figures 11d-e) was not affected by anaemia, the diet or Ca-supplementation; P content in both organs remained within normal limits for this species during the experiment. Moreover, when we compared the milk-based diets we observed that P deposit in brain is higher in rats fed with normal-Ca diet.

It is interesting to note that the content of Ca in the muscle and P in the brain is greater in anaemic than in the control rats, especially with the G diet. This positive effect is logical, because Fe-deficiency anaemia reduces oxygen supply to all body cells, thus limiting ATP formation; this would affect both the muscle and the brain. After recovery from a state of anaemia, furthermore, the Ca that is essential for the process of muscle contraction is transported towards the muscle in greater quantities in anaemic rats than in the controls, because the muscle is a compartment involved in maintaining plasma levels of the cation within physiological limits (Van Beresteijn *et al.*, 1993). These results seem to indicate that, after recovery from an anaemic state, muscle activity is increased, this activity having been reduced during anaemia by the smaller amount of oxygen supplied. Therefore, after recovery from anaemia, the muscle has a greater need for Ca. Apart from this, the larger deposits of P in the brain are needed to satisfy the organ's high consumption of ATP. A comparison of the normal-Ca diets showed that, in the sternum, the G diet favoured Ca deposition in the anaemic and control rats, but this tendency was not observed with the double-Ca diet.

-Serum Ca, P, PTH and corticosterone:

After feeding the animals the three diets with normal-Ca content, the level of ionized Ca in the serum was lower for the anaemic than the control rats. However, Ca and P levels in serum did not differ with regards to anaemia. With respect to type of diet, there were significantly greater serum Ca and P concentrations in the control and anaemic rats fed the G diet (both normal and Ca-supplemented) than in those fed the S diet or C diet (normal and Ca-supplemented). The effect of different types of diets on levels of ionic Ca showed a similar pattern to that of total serum Ca. Two-way ANOVA showed that the Ca (total and ionic) and P in serum were affected by the diet (Table 9; Figures 12a-c).

The levels of ionic Ca accurately reflect what occurs at a digestive level. The lower content of ionic Ca in both groups of animals fed with S and C, is accompanied by an increase in the levels of PTH, which is generally recognized to be the main stimulus for its secretion (Masuyama, *et al.*, 2000). Previous studies have reported that a decrease in PTH secretion reflects an increase in Ca utilization in rats, resulting from increased Ca absorption (Calvo, 1994); in our experimental conditions, the inclusion of goat's milk in the diet produced a greater absorption of Ca, accompanied by a fall in the levels of PTH in serum.

It is well known that Fe-deficiency anaemia causes an increase in the corticosterone levels (Campos *et al.*, 1998). When the different normal-Fe diets are supplied, the levels of corticosterone decrease to a normal limit (Table 9; Figure 12e).

-Nutritive and metabolic utilization of Mg:

The digestive use (ADC) of Mg was affected for the diet, anaemia and the diet x anaemia interaction (Two-Way ANOVA, $P < 0.001$) in the double-Ca group, but not for the diet x anaemia interaction in normal-Ca rats. The ADC of Mg was lower in anaemic rats than in controls only for the C diet both in the normal and double-Ca groups ($P < 0.001$). In relation to the diet supplied, in both control and anaemic rats, and for normal or double-Ca, the ADC of Mg was better in rats fed diet G compared with the diets S and C ($P < 0.001$), whereas in rats fed diets S or C there were no differences in ADC of Mg. Ca supplementation in the diet led to a lower ADC of Mg in controls and anaemic rats for all the diets assayed (Table 10; Figures 13).

Intestinal Mg absorption is essentially a passive intercellular process by electrochemical gradient and solvent drag at usual Mg intake (Schweigel *et al.*, 1999). Consequently, an improvement in overall digestive functions will led to a better Mg absorption. The greater Mg ADC for G diet is due to several nutritional characteristics of goat's milk which favour digestive processes such as fat rich in MCT and a more soluble protein, which has been previously described to favour Mg absorption (López-Aliaga *et al.*, 2003).

Another factor that could improve Mg ADC with the G diet in anaemic rats is the significantly better recovery of Fe metabolism, as indicated by ADC and the haemoglobin regeneration efficiency (HRE) observed for the goat's milk-based diet relative to the C and S diets. This could be due to the fact that with a better Fe metabolism, the amount of available oxygen and ATP increases, and the Mg receptors recover more efficiently, which favours their absorption by active transport, as has been described by other authors (Conrad and Umbreit, 1993). Another consequence of the better recovery of Fe metabolism with the G diet is that the passive absorption component of Mg is less influenced by the presence of free citrate in the intestinal lumen, which produces Mg citrate, a low-solubility complex (López de Novalés, 1974). This result is due to the fact that part of the citrate is absorbed by active transport as a Fe complex (Fe-citrate). Moreover, this explanation is supported by the results we previously obtained in control and anaemic rats (Campos *et al.*, 1996), where a ferric protein diet resulted in a greater recovery of Fe absorption accompanied by a greater absorption of Mg.

The R/I Mg ratio was affected by diet ($P<0.001$), anaemia ($P<0.05$) and their interaction ($P<0.001$) in normal-Ca diets and in double-Ca diets ($P<0.001$ for diet and anaemia, $P<0.05$ for interaction). R/I was significantly lower for anaemic rats than for their controls for the C diet ($P<0.001$ normal-Ca and $P<0.05$ double-Ca) and for S double-Ca diet ($P<0.001$). R/I was higher for rats fed diet G than for either diet S or diet C in all cases ($P<0.001$). The R/I Mg ratio tends to decrease in control and anaemic rats fed with diets S⁺ or C⁺ in comparison with S or C diets (the descent was significant for the S diet in anaemic groups, $P<0.001$) (Table 10; Figure 14).

One of the the most outstanding results regarding digestive utilization of Mg is that it is not harmed by Ca-enrichment of goat's milk; whereas the opposite occurs for S and C diets. Mg absorption is harmed by high Ca concentrations in rats. This interactive effect may be indirect, depending on the reduction of tight junction permeability with Ca and reducing of the paracellular Mg movement (Kimura, 2007). Less mineral interaction in animals fed the G

diet, increasing their nutritive utilization (Barrionuevo *et al.*, 2002; Campos *et al.*, 2003) could contribute to a better R/I Mg ratio in NFA and Ca supplementation situations, with values being reached that might even double those found in rats fed the S diet. Indeed, less mineral interaction might partly explain the particular nutritional characteristics of the G diet relative to the C diet (Barrionuevo *et al.*, 2002; Campos *et al.*, 2003; Campos *et al.*, 2006).

The urinary excretion process is the most powerful regulator for Mg homeostasis mechanism. Mg urinary losses are closely related with Mg serum levels and dietary Mg. Under our experimental conditions, Ca supplementation tends to diminish Mg retention, except for the G diet group. This is because, in spite of the lower Mg intake for the G group, there are no differences in urinary Mg loss in control rats, which are even lower for anaemic rats fed the G diet. Lower Mg urinary losses due to less Mg intake have been previously described by other authors (Brink *et al.*, 1992). However, this fact by itself does not justify the better results obtained with a goat's milk-based diet. Once again, the profitable nutritional characteristics of goat's milk explain the better results obtained in Mg metabolism. Indeed, the better quality of goat protein, in comparison with cow's milk, may have been partially responsible for the decrease in urinary Mg excretion of animals fed with this milk, because increased proteinuria caused by lower-quality dietary protein inhibits the tubular reabsorption of Mg and increases urinary loss. The higher vitamin D content in goat milk also accounted for this effect. 1,25 (OH)₂D₃ promotes Mg reabsorption at distal tubule, because calbindin 9K induction stimulates transcellular transport in the distal tubule (Ritchie *et al.*, 2001).

-Mg deposits in organs:

In general, Mg content in the femur was lower in anaemic rats than in their respective controls for the three normal-Ca diets (S, C and G). Moreover, a higher Mg deposit was found in animals fed with V⁺ diet. Regarding Mg content in the sternum and *Longissimus dorsi* muscle, no differences were found between anaemic and control rats with the six diets assayed (table 11, figures 15a-c).

The comparison of the six assayed diets indicated that the Mg content in organs did not show significant differences for controls and anaemic animals, both normal and double-Ca.

Ca-supplementation caused a descent in Mg content in the sternum of control rats fed with S⁺ diet (P<0.001) and anaemic rats fed C⁺ diet (P<0.01) and, finally, a slight decrease in the Mg content in the sternum of control rats fed with G⁺ diet (P<0.05) (table 11, figure 15b). Bones (femur and sternum) are the preferential organ for Mg deposit among the control and anaemic animals given all the diets assayed. Under our experimental conditions, anaemia caused a drop in femur deposits of Mg, as was to be expected considering our previous results (Campos *et al.*, 1998) and those of other authors (Medeiros *et al.*, 2002), who found that rats fed a Fe-deficient diet develop decreased bone mass and increased fragility.

In anaemic rats, Ca-enrichment of a goat's milk diet led to recovery of the Mg content in the femur, which was not observed in the animals fed a cow's milk-based diet. Once again, the lower mineral interaction found in animal fed the G diet compared with those given the C diet would explain this.

In general, after feeding the animals during 14 days with all the diets assayed, no significant changes were observed for Mg deposits in organs. This could be because it was a short period and not long enough for digestive and metabolic use to be reflected in the organs (Lerma *et al.*, 1993).

Regarding Mg in total blood, we could see higher levels in animals fed G or G⁺ diets, accurately reflecting the events taking place in digestive and metabolic utilization (table 9, figure 16).

6.6. CONCLUSIONS

FIRST CONCLUSION

Recovery from anaemia is better when the goat milk diet is supplied, both normal and enriched with calcium, as is shown by the high HRE and the descent in the platelets level.

SECOND CONCLUSION

Bone demineralization caused by nutritional ferropenic anaemia is better recovered with the milk-based diets, especially with the goat milk, due to the higher bioavailability of calcium and phosphorus, together with the low levels of PTH found in the animals that had been fed with this kind of milk.

THIRD CONCLUSION

In control and anaemic rats, the inclusion of dietary caprine milk, with a normal or double calcium content, favours the digestive (ADC) and metabolic (R/I) utilization of iron, as well as its deposit in liver, sternum and femur.

FOURTH CONCLUSION

In general, habitual goat milk consumption, with a normal content or enriched in calcium, increases the nutritive utilization of calcium, phosphorus and magnesium (ADC and R/I), in control and anaemic animals. This fact is reflected at the metabolic level, especially for calcium and phosphorus in *longissimus dorsi* muscle and femur. Moreover, the larger deposits of phosphorus in the brain and muscle are needed to satisfy the organ's high consumption of ATP in these tissues, during the anaemia recovery.

FIFTH CONCLUSION

Goat milk, even when supplemented with calcium, minimizes Ca-Fe interactions, because favours the nutritive and metabolic utilization of iron and does not affect its deposit in the different organs studied, in control animals and specially in ferropenic status.

GENERAL CONCLUSION

Usual goat milk consumption, a natural food with highly beneficial nutritional characteristics, has positive effects on the mineral metabolism, recovery of the nutritional ferropenic anaemia and bone mineralization. Moreover, Ca-enrichment of goat milk does not interfere in the bioavailability of the minerals studied, a fact that it is not observed with cow milk. Therefore, it would be recommendable to consider the inclusion of caprine milk in the diet of the general population and people suffering from nutritional ferropenic anaemia.



Bibliografía

A

ABBOUD, S. and HAILE, D.J. "A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism". *J. Biol. Chem.*, 265:19906-19912, (2000).

ADA. "Pediatric Manual of Clinical Dietetics", WILLIAMS, C.P., editor. The American Dietetic Association, 385-387, (1998).

AGUSTINE, G.J. "How does calcium trigger neurotransmitter release?". *Curr. Opin. Neurobiol.*, 11:320-326, (2001).

ALFÉREZ, M.J.M.; LÓPEZ-ALIAGA, I.; BARRIONUEVO, M.; LISBONA, F.; HARTITI, S.; PALLARÉS, I. and CAMPOS, M.S. "Calcium absorption in rats with distal intestinal resection: influence of dietary fat, cholecalciferol and nature of the adaptive response". *Int. J. Vit. Nutr. Res.*, 66:59-65, (1996).

ALFÉREZ, M.J.M.; BARRIONUEVO, M.; LÓPEZ-ALIAGA, I.; SANZ-SAMPELAYO, M.R.; LISBONA, F. and CAMPOS, M.S. "The digestive utilization of goat and cow milk fat in malabsorption syndrome". *J. Dairy Res.*, 68:451-461, (2001).

ALFÉREZ, M.J.M.; LÓPEZ-ALIAGA, I.; NESTARES, T; DÍAZ-CASTRO, J.; BARRIONUEVO, M; ROS, P.B. and CAMPOS, M.S. "Dietary goat milk improves iron bioavailability in rats with induced nutritional ferropenic anaemia in comparison with cow milk". *Int. Dairy J.*, 16:813-821, (2006).

ANDERSON, G.L and POWELL, L.W. "Of metals, mice and men: What animal models can teach us about body iron loading". *J. Clin. Invest.*, 105:1185-1186, (2000).

ANDREWS, S.C.; AROSIO, P. and BOTTKE, W. "Structure, function and evolution of functions of ferritins". *J. Inorg. Biochem.*, 47:161-174, (1992).

ANIA, B.J.; SUMAN, V.J. and FAIRBANKS, V.F. "Incidence of anemia in older people: an epidemiologic study in a well defined population". *J. Am. Geriatr. Soc.*, 45:825-831, (1997).

ARBIZA, S.F. "Producción de caprinos". AGT Editores México. pp:105-128, (1986).

ARUNABH, S.; FEUERMAN, M.; MA, R. and ALOIA, J.F. "Total body phosphorus in healthy women and ethnic variations". *Metab. Clin. Exp.*, 51:180-183, (2002).

ATALLAH, A.N.; HOFMEYR, G.J. and DULEY, L. "Calcium supplementation during pregnancy for preventing hypertensive disorders and related problems". *Cochrane Database of Systematics Reviews*, CD001059, (2000).

B

BARGER-LUX, M.J.; HEANEY, R.P. and STEGMAN, M.R. "Effects of moderate caffeine intake on the calcium economy of premenopausal women". *Am. J. Clin. Nutr.*, 52:722-725, (1990).

BARRIONUEVO, M.; ALFÉREZ, M.J.M.; LÓPEZ-ALIAGA, I.; SANZ SAMPELAYO, M.R. and CAMPOS, M.S. "Beneficial effect of goat milk on nutritive utilization of iron and copper in malabsorption syndrome". *J. Dairy Sci.*, 85:657-664, (2002).

BEARD, J.L. "Iron biology in immune function, muscle, metabolism, and neuronal functioning". *J. Nutr.*, 131:568S-579S, (2001).

BENNET, H.P. and SOLOMON, S. "Use of Pico-Tag methodology in the chemical analysis of peptides with carboxyl-terminal amides". *J. Chromatogr.* 359:221-230, (1986).

BERNDT, T.J. and KNOX, F.G. "Renal regulation of phosphate excretion". In: "The kidney, physiology and pathophysiology". SELDIN D.W. and GIEBISCH, G. New York: Raven, pp. 2511-2532, (1992).

BERTOLO, R.F.P.; BETTGER, W.J. and ATKINSON, S.A. "Divalent metals inhibit and lactosa stimulates zinc transport across brush border membrane vesicles from piglets". *J. Nutr. Biochem.*, 12:73-80, (2001).

BIANCA-MARÍA, E.; RAVILACQUA, C.; MARTIN, P. and CHANDAL, C. "Goat's milk of defective α s₁-casein genotype decreases intestinal and systemic sensibilization to β -lactoglobulin in guinea pigs". *J. Dairy Res.*, 68:217-227, (2001).

BIKLE, D.D.; NG, D.; TU, C.L.; ODA, Y. and ZIE, X. "Calcium- and vitamin D-regulated keratinocyte differentiation". *Mol. Cell Endocrinol.*, 177:161-171, (2001).

BLOEM M.W. "Interdependence of vitamin A and iron: an important association for programmes of anaemia control". *Proc. Nutr. Soc.*, 54:501-508, (1995).

BORRÁS, A. "Cómo comer y beber leche". Comité Nacional Lechero nº 8:7-130, (1968).

BOTHWELL, T.H. "Overview and mechanism of iron regulation". *Nutr. Rev.*, 53:237-245, (1995).

BOTHWELL, T.H. and FINCH, C.A. "Iron metabolism". London, England: J & A Churchill Ltd., pp. 69-71, (1962).

BOZA, J. "Obtención de hidrolizados enzimáticos de proteínas lácteas. Estudio del valor nutritivo y de la capacidad antigénica". Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada, (1992).

BOZA, J. and SANZ-SAMPELAYO, M.R. "Nutritional aspects of goat milk". *An. Acad. Cienc. Vet. Andalucía Oriental*, 10:109-139, (1997).

BRINGHURST F.R.; DEMAY, M.B. and KRONENBERG, H.M. "Hormones and disorders of mineral metabolism". In: WILSON, J.D.; FOSTER, D.W.; KRONENBERG, H.M. and LARSEN, P.R. Eds. "William Textbook of Endocrinology", 9th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 1155-1210, (1998).

BRINK, E.J.; DEKKER, P.R., VAN BERESTEIJN, E.C. and BEYNEN, A.C. "Bioavailability of magnesium and calcium from cow's milk and soya-bean beverage in rats". *Br. J. Nutr.* 68:271-282, (1992).

BROADUS, A.E. "Physiological functions of calcium, magnesium and phosphorus and mineral ion balance". In: FAVUS, M.J. "Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism". 2nd ed. New York. Raven Press. pp 41-46, (1993).

BRODY, T. "Nutritional Biochemistry", 2nd ed. San Diego: Academic Press, (1999).

BROWN, J.R.; LAW, A.J.K. and KNIGHT, C.H. "Changes in casein composition of goat's milk during the course of lactation: physiological inferences and technological implications". *J. Dairy Res.*, 62:431-439, (1995).

BROWN, E.M.; MACLEOD, R.J. and O'MALLEY, B.W. "Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signalling". *Physiol. Rev.*, 81:239-297, (2001).

BUCHOWSKI, M.S. and MILLER, D.D. "calcium bioavailability from ripening cheddar cheese". *J. Food Sci.*, 55:1293-1295, (1990).

BURDO, J.R.; MENZIES, S.L.; SIMPSON, I.A.; GARRICK, L.M.; GARRICK, M.D.; DOLAN, K.G.; HAILE, D.J.; BEARD, J.L. and CONNOR, J.R. "Distribution of divalent metal transporter 1 and metal transport protein 1 in the normal and Belgrade rat". *J. Neurosci. Res.*, 66:1198-1207, (2001).

C

CADOGAN, J.; EASTELL, R.; JONES, N. and BARKER, M. "Milk intake and bone mineral acquisition in adolescent girls: randomised, controlled intervention trial". *Br. Med. J.*, 315:1255-1260, (1997).

CALVO, M. S. "The effects of high phosphorus intake on calcium homeostasis". *Adv. Nutr. Res.* 9:183–207, (1994).

CALVO, M.S and PARK, Y.K. "Changing phosphorus content of the U.S. diet: potential for adverse effects on bone". *J. Nutr.*, 126:1168S-1180S, (1996).

CALVO, M.S. "Dietary considerations to prevent loss of bone and renal function". *Nutrition.* 16(7-8):564-566, (2000).

CAMPOS, M.S.; BARRIONUEVO, M.; ALFÉREZ, M.J.M.; GÓMEZ-AYALA, A.E.; RODRÍGUEZ-MATAS, M.C.; LÓPEZ-ALIAGA, I. and LISBONA, F. (1998). "Interactions among iron, calcium, phosphorus and magnesium in nutritionally iron – deficient rats". *Exp. Physiol.*, 83:771-781, (1998).

CAMPOS, M.S.; LÓPEZ-ALIAGA, I.; ALFÉREZ, M.J.M.; NESTARES, T and BARRIONUEVO, M. "Effects of goats' or cows' milks on nutritive utilization of calcium and phosphorus in rats with intestinal resection". *Br. J. Nutr.*, 90:61-67, (2003).

CAMPOS, M.S.; PALLARÉS, I.; MORATALLA, A.; LÓPEZ-ALIAGA, I.; GÓMEZ-AYALA, A.E.; HARTITI, S.; ALFÉREZ, M.J.M.; BARRIONUEVO, M. and LISBONA, F. “Bioavailability of Fe, Ca, P and Mg in Fe-deficient rats treated with different sources of dietary iron”. *Nutr. Res.*, 16:683-696, (1996).

CARRUTH, B.R. and SKINNER, J.D. “The role of dietary calcium and other nutrients in moderating body fat in preschool children”. *Int. J. Obesity Related Metabol. Dis.*, 25:559-566, (2001).

CASSANELLI, S. and MOULLIS, J. “Sulfide is an efficient iron releasing agent from mammalian ferritins”. *Biochim. Biophys. Acta*, 1547:174-182, (2001).

CASEY, J.L.; HENTZE, M.W.; KOEELER, D.M.; CAUGHMAN, S.W.; ROUAULT, T.A.; KLAUSNER, R.D. and HARFORD J.B.; Iron-responsive elements: regulatory RNA sequences that control mRNA levels and translation”. *Science*, 240:924-928, (1988).

CHAN, S.; MC COWEN, K.C. and BISTRAN, B. “Medium-chain triglyceride and n-3 polyunsaturated fatty acid-containing emulsions in intravenous nutrition”. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 1(2):163-169, (1998).

CHANDAN, R.C.; ATTAIE, R. and SAHANI, K.M. “Nutritional aspects of goat milk and its products”. In: “Recent advances in goat production”. Pre-Conference Proceedings, Vol. I, part II, 399:420, (1992).

CHILLIARD, Y. “Caractéristiques biochimies des lipids du lait de chèvre. Comparaison avec les laits de vache et humain”. En: “Intérêts nutritionnel et diététique du lait de chèvre”. INRA editions, pp: 51-65, (1996).

CLARKE, S.D. and JUMP, D.B. “Dietary polyunsaturated fatty acid regulation and gene transcription”. *Am. Res. Nutr.*, 14:83-98, (1994).

COLE D.E.C. and QUAMME, G.A. "Inherited disorders of renal magnesium handling". *J. Am. Soc. Nephrol.* 11:1937-1947, (2000).

CONRAD, M. E. and UMBREIT, J. N. "A concise review: Iron absorption. The mucin-mobilferrin-integrin pathway. A competitive pathway for metal absorption". *Am. J. Hematol.*, 42:67-73, (1993).

CONRAD, M.E. and UMBREIT, J.N. "Iron absorption and transport". *Am. J. Hematol.*, 64:287-298, (2000).

CONRAD, M.E.; UMBREIT, J.N.; MOORE, E.G. and HEIDMAN, D. "Mobilferrin is an intermediate port between transferrin and hemoglobin K562 cells". *J. Clin. Invest.*, 98:1449-1454, (1996).

COOK, J.D. and REDDY, M.B. "Effect of ascorbic acid intake on nonheme iron absorption from a complete diet". *Am. J. Clin. Nutr.*, 79:93-98, (2001).

CZAJKA-NARINS, D.M. "Minerals". In: "Krause's Food, Nutrition and Diet Therapy". 9th Ed. Ed. Mc-Graw-Hill Interamericana, México D.F., pp: 123-167, (1998).

D

DALLMAN, P.R.; YIP, R. and OSKI, F.A. "Iron deficiency and related nutritional anemias". En: Natham and Oski's Hematology of infancy and childhood, 4th ed. Philadelphia: W.B. Saunders. 413-450, (1993).

DANDRIFOSSE, G.; PEULEN, O.; EL KHEFIF, N.; DELOYER, P.; DANDRIFOSSE, A.C. and GRANDFILS, C. "Are milk polyamines preventive agents against food allergy?". *Proc. Nutr. Soc.*, 59:81-86, (2000).

DANZEISEN, R.; PONNAMBALAM, S.; LEA, R.G.; PAGE, K.; GAMBLING, L. and MCARDLE, H.J. "The effect of ceruloplasmin on iron release from placental (BeWo) cells; evience for an endogenous Cu oxidase". *Placenta*, 21:805-812, (2000).

DAVIES, K.M, HEANEY, R.P.; RECKER, R.R.; LAPPE, J.M.; BARGERLUX, M.J.; RAFFERTY, K. and HINDER, S. "Calcium intake and body weight". *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 85:4635-4638, (2000).

DEVENDRA, C. and MCLEROY, G. B. "Producción de cabras y ovejas en los trópicos". Ed. *Manual Moderno*, México, pp: 108-110, (1986).

DEVINE, A.; CRIDDLE, R.A.; DICK, I.M.; KERR, D.A. and PRINCE, R.L. "A longitudinal study of the effect of sodium and calcium intakes on regional bone density in postmenopausal women". *Am. J. Clin. Nutr.*, 62:740-745, (1995).

DEVON, S.J.J. and TESTER, R.F. "In vitro binding of calcium, iron and zinc by non-starch polysaccharides". *Food Chem.* 73:401-410, (2001).

DONOVAN, A.; BROWNLIE, A.; ZHOU, Y.; SHEPARD, J.; PRATT, S.J.; MOYNIHAN, J.; PAW, B.H.; DREJER, A.; BARUT, B.; ZAPATA, A.; LAW, T.C.; BRUGNARA, C.; LUX, S.E.; PINKUS, G.S.; PINKUS, J.L.; KINGSLEY, P.D.; PALIS, J.; FLEMING, M.D.; ANDREWS, N.C. and ZON, L.I. "Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter". *Nature*, 403:777-781, (2000).

DOSTALOVA, J. "Goat milk". *Vyziva*, 49:43-44, (1994).

DREWES, P. A. "Direct colorimetric determination of phosphorus in serum and urine". *Clin. Chim. Acta*, 39: 81-88, (1972).

E

ERBA, D.; CIAPELLAUO, S. and TESTOLIN, G. "Effect of caseinphosphopeptides on inhibition of calcium intestinal absorption due to phosphate". *Nutr. Res.*, 28:649-656, (2001).

ERIKSON, K.M.; PINERO, D.J.; CONNOR, J.R. and BEARD, J.L. "Regional brain iron, ferritin and transferrin concentrations during iron deficiency and iron repletion in the developing rat". *J. Nutr.*, 127:2030-2038, (1997).

ESPIE, W.H. and MULLAN, W.M.A. "Compositional aspects of goat milk in northern Ireland". *Milchwissenschaft*, 145:361-362, (1990).

F

FAIRBANKS, V.F. "Iron in medicine and Nutrition", In: SHILS, M.; OLSON, J.A.; SHIKE, M.; ROSS, A.C. eds. "Nutrition in health and disease", 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, pp: 223-239, (1999).

FANDERSON, P. "A New method of analysis of feeding stuffs for the determination of crude oils and fat". In: HARESING, W.; COLE, D.J.A. Eds. "Recent advances in animal nutrition". London: Butter Worths, pp: 77-86, (1986).

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization). "Necesidades en proteínas". Reuniones sobre la nutrición, n° 37. Roma, 1966.

FARIA, R.J.F; GARCÍA, A.; ALLARA, M.; GARCÍA, A.; OLIVARES, Y. and RÍOS, G. "Some physico-chemical and microbiological characteristics of goat milk produced in Quisiro". *Rev. Fac. Agron.* 16: 99-106, (1999).

FEDER, J.N.; GNIRKE, A.; THOMAS, W.; TSUCHIHASHI, Z.; RUDDY, D.A.; BASAVA, A.; DORMISHIAN, F.; DOMINGO, R. JR.; ELLIS, M.C.; FULLAN, A.; HINTON, L.M.; JONES, N.L.; KIMMEL, B.E.; KRONMAL, G.S.; LAUER, P.; LEE, V.K.; LOEB, D.B.; MAPA, F.A.; MCCLELLAND, E.; MEYER, N.C.; MINTIER, G.A.; MOELLER, N.; MOORE, T.; MORIKANG, E.; PRASS, C.E.; QUINTANA, L.; STARNES, S.M.; SCHATZMAN, R.C.; BRUNKE, K.J.; DRAYNA, D.T.; RISCH, N.J.; BACON, B.R. and WOLFF, R.K. "A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis". *Nat. Genet.*, 13:399-408, (1996).

FEDER, J.N.; TSUCHIHASHI, Z.; IRRINKI, A.; LEE, V.K.; MAPA, F.A.; MORIKANG, E.; PRASS, C.E.; STRANES, S.M.; WOLFF, R.K.; PARKKILA, S.; SLY, W.S. and SCHATZMAN, R.C.; "The hemochromatosis founder mutation in HLA-H disrupts β_2 -microglobulin interaction and cell surface expression". *J. Biol. Chem.*, 272:10425-10428, (1997).

FEDER, J.N.; PENNY, D.M.; IRRINKI, A.; LEE, V.K.; LEBRON, J.A.; WATSON, N.; TSUCHIHASHI, Z.; SIGAL, E.; BJORKMAN, P.J. and SCHATZMAN, R.C. "The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:1472-1477, (1998).

FEHR, P.; CHILLIARD, Y.; SAUVANT, D. "Goat milk and its components". *Proc. Int. Conf. Goat Production and Disease*, pp:113-121, (1982).

FERGUSON, C.J.; WAREING, M.; WARD, D.T.; GREEN, R.; SMITH, C.P. and RICCARDI, D. "Cellular localization of divalent metal transporter DMT-1 in rat kidney". *Am. J. Physiol.-Renal Fluid Electrolyte Physiol.*, 280:F803-F814, (2001).

FISKE, C.H. and SUBBAROW, Y. "The colorimetric determination of phosphorus". *J. Biol. Chem.*, 66: 375-400, (1925).

FLEMING, M.D.; TRENOR, C.C.; SU, M.A.; FOERNZLER, D.; BEIER, D.R.; DIETRICH, W.F. and ANDREWS, N.C.; “Myocytic anemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. *Nat. Genet.*, 16:383-386, (1997).

FLEMING, M.D.; ROMANO, M.A.; SU, M.A.; GARRICK, L.M.; GARRICK, M.D.; and ANDREWS, N.C. “Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:1148-1153, (1998).

FOOD AND NUTRITION BOARD, INSTITUTE OF MEDICINE. “Dietary reference intakes for Arsenic, Boron, Calcium, Chromium, Copper, Fluoride, Iodine, Iron, Magnesium, Manganese, Molybdenum, Nickel, Phosphorus, Selenium, Silicon, Vanadium and Zinc”. Washington, D.C.: National Academy Press, pp:290-393, (2004).

FORELLAT, M.; GAUTIER H. and FERNÁNDEZ, N. “Metabolismo del hierro”. *Rev. Cub. Hematol. Immunol. Hemoter.*, 16:149-160, (2000).

FRIEDLANDER, M.M.; WALD, H.; DRANITZKI-ELHALEL, H.; ZAJICEK, H.K.; LEVI, M. and POPOVTZER, M.M.. “Vitamin D reduces renal NaPi-2 in PTH infused rats: complexity of vitamin D action on renal Pi handling”. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 281:F428-F433, (2001).

G

GABRILOVE, J. “Overview: erythropoiesis, anemia and the impact of erythropoietin. *Semin. Hematol.*, 37(supl. 6):1-13, (2000).

GANONG, W.F. “Fisiología médica”. 19ª Ed. Editorial Manual Moderno, pp: 513-514, (2004).

GAMBLING, L.; DANZEISEN, R.; GAIR, S.; LEA, R.G.; CHARANIA, Z.; SOLANKY, N.; JOORY, K.D.; SRAI, S.K. and MCARDLE; H.J. “Effect of iron deficiency on placental transfer

of iron and expression of iron transport proteins in vivo and in vitro". *Biochem. J.*, 356:883-889, (2001).

GARCIA-CASAL, M.N.; LEETS, I. and LAYRISSE, M. "Beta-carotene and inhibitors of iron absorption modify iron uptake by Caco-2 cells". *J. Nutr.*, 130:5-9, (2000).

GARCÍA-UNCITI, M.S. "Therapeutic utility of medium chain triglycerides (MCT).Cetogenic diets in infant epilepsy". *Nutr. Clin.*, 16:7-35, (1996).

GARGARI, B.P.; RAZAVIEH, S.V.; MAHBOOB, S.; NIKNAFS, B. and KOOSHAVAR, H. "Effect of retinol on iron bioavailability from Iranian bread in a Caco-2 cell culture model". *Nutrition*, 22:638-644, (2006).

GEE, J.B. 2nd ; CORBETT, R.J.; PERLMAN, J.M. and LAPTOOK, A.R. "Hypermagnesemia does not increase brain intracellular magnesium in newborn swine". *Ped. Neurol.*, 25:304-308, (2001).

GEISSER, P.; BAER, M. and SCHAUB, E. "Structure/histotoxicity relationship of parenteral iron preparations". *Drug. Res.*, 42:1439-1452, (1992).

GEORGIEFF, M.K.; WOBKEN, J.K.; WELLE, J.; BURDO, J.R. and CONNOR, J.R. "Identification and localization of divalent metal transporter 1 (DMT1) in term human placenta. *Placenta*, 21:799-804, (2000).

GERHARD, G.S.; LEVIN, K.A.; PRICE GOLDSTEIN, J.; WOJNAR, M.M.; CHORNEY, M.J. and BELCHIS, D.A. "Vibrio vulnificus septicemia in a patient with the hemochromatosis HFE C282Y mutation". *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 125:1107-1109, (2001).

GIACHELLI, C.M.; JONO, S.; SHIOI, A.; NISHIZAWA, Y.; MORI, K. and MORII, H. "Vascular calcification and inorganic phosphate". *Am. J. Kidney. Dis.*, 38:S34-S37, (2001).

GLAHN, R.P.; LEE, O.A.; YEUNG, A.; GOLDMAN, M.I and MILLER, D.D. "Caco-2 cells ferritin formation predicts nonradiolabeled food iron availability in vitro digestion / Caco-2 cells culture model". *J. Nutr.*, 128:1555-1561, (1998).

GLAHN, R.P. and VAN CAMPEN D.R: "Iron uptake is enhanced in Caco-2 cells monolayers by cysteine and reduced cysteinyl glycine. *J. Nutr.*, 127:642-647, (1997).

GLAHN, R.P.; WIEN, E.M.; VAN CAMPEN, D.R. and MILLER, D.D. "Caco-2 cells iron uptake from meat and casein digest parallels in vivo studies use of a novel in vitro method for rapid estimation of iron bioavailability". *J. Nutr.*, 2126:332-339, (1996).

GNAN, S.O.; ERABTI, H.A and RANA, M.S. "The composition of libyan goat milk". *Aust. J. Dairy Technol.*, 40:165-166, (1985).

GÓMEZ-AYALA, A.E.; LISBONA, F.; LÓPEZ-ALIAGA, I.; PALLARÉS, I.; BARRIONUEVO, M.; HARTITI, S.; RODRÍGUEZ-MATAS, M.C. and CAMPOS, M.S. "The absorption of iron, calcium, phosphorus, magnesium, copper and zinc in the yeyuno-ileon of control and iron-deficient rats". *Lab. Anim.*, 32:72-79, (1998).

GRASBECK, R.; KOUVONEN, I.; LUNDBERG, M. and TENHUNEN, R. "An intestinal receptor for heme". *Scand. J. Haematol.*, 23:5-9, (1979).

GRASBECK, R.; MAJURI, R.; KOUVONEN, I. and TENHUNEN, R. "Spectral and other studies on the intestinal haem receptor of the pig". *Biochim. Biophys. Acta*, 700:137-142, (1982).

GRIBKOFF, V.K.; STARRET, J.E. and DWORETZKY, S.I. "Maxi-K potassium channels: form, function and modulation of a class of endogenous regulators of intracellular calcium". *Neurosci.*, 7:166-177, (2001).

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

GROFF, J.L. and GROPPER, S.S. "Advanced nutrition and human metabolism", 3rd ed. Belmont, CA:Wadsworth Thomson Learning, (2000).

GROSS, P.M. and WEINDL, A. "Peering through the windows of the brain". *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 7:663-672, (1987).

GUEGUEN, L. "Interactions lipides-calcium et biodisponibilité du calcium du fromage". *Cah. Nutr. Diét.*, 27:311-315, (1992).

GUEGUEN, L. "Le valeur nutritionnelle minérale du lait du chèvre". En: "Intérêts nutritionnel et diététique du lait de chèvre". INRA editions, pp:67-80, (1996).

GUEGUEN, L. and POINTILLART, A. "The bioavailability of dietary calcium". *J. Am. Coll. Nutr.*, 19:119S-136S, (2000).

GUNSHIN, H.; MCENZIE, B.; BERGER, U.V.; GUNSHIN, Y.; ROMERO, M.F.; BORON, W.F.; NUSSBERGER, S.; GOLLAN, J.L. and HEDIGER, M.A. "Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metalion transporter". *Nature*, 388:482-487, (1997).

H

HALL, W.D.; PETTINGER, M.; OBERMAN, A.; WATTS, N.B.; JOHNSON, K.C.; PASKETT, E.D.; LIMACHER, M.C. and HAYS, J. "Risk factors for kidney stones in older women in the southern united States". *Am. J. Med. Sci.*, 322:12-18, (2001).

HALLBERG, L.; BENGTSSON, C.; GARBY, L.; LENNARTSSON, J.; ROSSANDER, L. and TIBBLIN, E. "An analysis of factors leading to a reduction in iron deficiency in Swedish women". *Bulletin of the World Health Organization*, 57:947-954, (1979).

HALLBERG, L.; BRUNE, M.; ERLANDSSON, M.; SANDBERG, A.S. and ROSSANDER-HULTEN, L. "Calcium: Effect of different amounts on nonheme-iron and heme-iron absorption in humans". *Am. J. Clin. Nutr.*, 53:112-119, (1991).

HALLBERG, L.; ROSSANDER-HULTEN, L.; BRUNE, M. and GLEERUP, A.. "Calcium and iron absorption: mechanism of action and nutritional importance". *Eur. J. Clin Nutr.*, 46:317-327, (1992).

HALLTERMAN, J.S.; KACZOROWSKI, J.M.; ALIGNÉ, C.A; AUINGER, P. and SZILAGYI, P.G. "Iron deficiency and cognitive achievement among schooled children and adolescents in the United States." *Pediatrics*, 107:1381-1386, (2001).

HAN, O.; FAILLA, M.L.; HILL, A.D.; MORRIS, E.R. and SMITH, J.C. "Reduction of Fe (III) is required for uptake of nonheme iron by Caco-2 cells". *J. Nutr.*, 125:1291-1299, (1995).

HARDWICK, L.L.; JONES, M.R.; BUDDINGTON, R.K.; CLEMENS, R. A. and LEE, D.B.N. "Comparison of calcium and magnesium absorption: in vivo and in vitro studies". *Am. J. Physiol.*, 259:G720-G726, (1990).

HARRIS, S.S. and DAWSON HUGHES, B. "Caffeine and bone loss in healthy postmenopausal women". *Am. J. Clin. Nutr.*, 60:573-578, (1994).

HAAS, J.D. and BROWNLIE, T. "Iron deficiency and reduced work capacity: a critical review of the research to determine a causal relationship". *J. Nutr.*, 131:676S-690S, (2001).

HEANEY, R.P. "Calcium". En BILEZIKIAN, J.P.; RAISZ, G.A.; RODAN, G.A.; "Principles of bone Biology". New York: Academic Press, pp:1007-1018, (1996).

HEANEY, R.P. "Absorbing calcium" [Editorial]. *Clin. Chem.*, 45:161-162, (1999).

HEANEY, R.P. "Calcium, dairy products and osteoporosis". *J. Am. Coll. Nutr.*, 19:83S-99S, (2000).

HEANEY, R.P., DOWELL, S.; BIERMAN, J.; HALE, C.A. and BENDICH, A. "Absorbability and cost effectiveness in calcium supplementation". *J. Am. Coll. Nutr.*, 20:239-246, (2001).

HENTZE, M.W. and KÜHN, L.C. "Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress". *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.* 93:8175-8182, (1996).

HERCBERG, S.; GALAN, P. "Nutritional anemias". *Bailleres Clin. Haematol.*, 5:143-168, (1992).

HERNANDO, N.; FORSTER, I.C.; BIBER, J. and MURER, H. "Molecular characteristics of phosphate transporters and their regulation". *Exp. Nephrol.*, 8:366-375, (2000).

HERNANDO, N.; KARIM-JIMÉNEZ, Z.; BIBER, J. and MURER, H. "Molecular determinants for apical expression and regulatory membrane retrieval of the type II Na/Pi cotransporter. *Kidney Int.*, 260:431-435, (2001).

HEUDI, O.; TRISCONI, M.J. and BLAKE C. J. "Simultaneous quantification of vitamins A, D3 and E in fortified infant formulae by liquid chromatography-mass Spectrometry". *J. Chromatogr.* 1022:115-123, (2004).

HIGDON, J. "Magnesium". In: HIGDON, J. Ed. "An evidence-based approach to vitamins and minerals". Theme Medical Publishers, Inc., pp: 148-156, (2003).

I

IVAN, M.; KONDO, K.; YANG, H.; KIM, W.; VALIANDO, J.; OHH, M.; SALIC, A.; ASARA, J.M.; LANE, W.S. and KAELIN W.G. JR. "HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hidroxilation: implications for oxigen sensing". *Science*, 292:464-468, (2001).

J

JAAKKOLA, P.; MOLE, D.R.; TIAN, Y.M., WILSON, M.I.; GIELBERT, J., GASKELL, S.J.; KRIEGSHEIM, A.V.; HEBESTREIT, H.F.; MUKHERJI, M.; SCHOFIELD, C.J.; MAXWELL, P.H.; PUGH, C.W. and RATCLIFFE, P.J. "Targeting of HIF-alpha to the Von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by oxygen regulated prolil hidroxilation". *Science*, 292:468-472, (2001).

JAN DE BEUR, S.M. and LEVINE, M.A. "Molecular Pathogenesis of hypophosphatemic rickets". *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 87:2467-2473, (2002).

JAUBER, O. and KALANTZOPOULOS, O. "Quality of goat milk for cheese and other products". *VI Int. Conf. Goats Int.*, 1:274-284, (1996).

JAUBERT, A. "Les vitamines et les nucléotides du lait de chèvre". In: "Intérêts nutritionnel et diététique du lait de chèvre". INRA editions, pp: 81-92, (1996).

JÜTTNER, R. and EBEL, H. "Characterization of Mg²⁺ transport in brush border membrane vesicles of rabbit ileum studied with mag-fura 2". *Biochim. Biophys. Acta*, 1370:51-63, (1998).

K

KAUP, S.M. "Aspects of mineral bioavailability in infant nutrition". *Int. Dairy J.*, 8:435-441, (1998).

KERSTAN, D. and QUAMME, G. "Physiology and pathophysiology of intestinal absorption of magnesium. In: MASSRY, S.G.; MORII, H. and NISHIZAWA, Y. Eds. "Calcium in Internal Medicine", London:Springer-Verlag, pp: 171-183, (2002).

KIM HA, J. and LINDSAY, R. "Contributions of cow, sheep and goat milk to characterizing branched-chain fatty acid and phenolic flavors in varietal cheeses". *J. Dairy Sci.*, 74:3267-3274, (1991).

KIMURA, M. "Overview of magnesium nutrition". In: "*New Perspectives in Magnesium Research*", ed by NISHIZAWA, Y.; MORII, H. and DURLACH, J. Springer-Verlag, London, pp. 69-93, (2007).

KJELDAHL, J. Z. "Neue Methode zur Bestimmung des stickstoffs in organischen Körpern". *Z. Anal. Chem.* 22:366-382, (1883).

KNOCHEL, J.P. "Phosphorus". In: SHILS, M.; OLSON, J.A.; SHIKE, M.; ROSS, A.C. Eds. "Nutrition in health and disease", 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, pp:157-167, (1999).

KOHLMEIER, M. "Phosphorus". In: KOHLMEIER, M. Ed. "Nutrient Metabolism", New York Academic Press, pp:700-708, (2003).

KONRAD, M.; SCHLINGMANN, K.P. and GUDERMANN, T. "Insights into the molecular nature of magnesium homeostasis". *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 286:F599-F605, (2004).

KOZYRAKI, R.; FYFE, J.; VERROUST, P.J.; JACOBSEN, C.; DAUTRY-VARSAT, A.; GBUREK, J. WILLNOW, T.E.; CHRISTENSEN, E.I. and MOESTRUP, S.K. "Megalin-dependent cubilin-mediated endocytosis is a major pathway for the apical uptake of transferrin in polarized epithelia. Proc. Nat. Ac. Sci., USA. 98:12491-12496, (2001).

KUMAR, R. "1,25- dihydroxivitamin D₃- not just a calciotropic hormone." Nephron., 91:576-581, (2002).

L

LAFOND, J.; GOYER- O'REILLY, I.; LARAMEE, M., and SIMONEAU, L. "Hormonal regulation and implication of cell signaling in calcium transfer by placenta". Endocrin. J., 14:85-94, (2001).

LAJEUNESSE, D. and BRUNETTE, M.G. "Sodium gradient-dependent phosphate transport in placental brush border membrane vesicles". Placenta, 9:117-128, (1988).

LAYRISSE, M.; GARCIA-CASAL, M.N.; SOLANO, L.; BARON, M.A.; AGUELLO, F.; LLOVERA, D.; RAMIREZ, J.; LEETS, I. and TROPPER, E. "The role of vitamin A on the inhibitors of nonheme iron absorption". J. Nutr. Biochem., 8:61-67, (1997).

LEE, P.L.; GELBART, T.; WEST, C.; HALLORAN, C.; and BEUTLER, E.; "The human Nramp2 gene: characterization of the gene structure, alternative splicing promoter region and polimorfisms". Blood Cells and Molecular Diseases, 24:199-215, (1998).

LEMANN, J. JR. "Urinary excretion of calcium, magnesium and phosphorus". In: FAVUS, M.J. "Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism". New York, Raven Press 2nd ed., pp: 50-54, (1993).

LEPAGE, G. and ROY, C.C. "Direct transesterification of all classes of lipids in a one step reaction". *J. Lipid Res.* 27:114-120, (1986).

LERMA, A.; PLANELLS, E.; ARANDA, P. and LLOPIS, J. "Evolution of magnesium deficiency in rats". *An. Nutr. Metab.*, 37:210-217, (1993).

LEVI, M.; KEMPSON, S.A.; LOTSCHER, M.; BIBER, J. and MURER, H. "Molecular regulation of renal phosphate transport". *J. Membr. Biol.*, 154:1-9, (1996).

LEVY, J.E.; JIN, O.; FUJIWARA, Y.; KUO, F. and ANDREWS, N.C.; "Transferrin receptor is necessary for development of erythrocytes and the nervous system". *Nature Genet.*, 21:361-369, (1999).

LEVI, S.; YEWDAL, S.J. and HARRISON, P.M. "Evidence of H and L chains have to cooperative roles in the iron uptake mechanisms of human ferritin". *Biochem. J.*, 288:591-596, (1992).

LEYHAUSEN, G.; LORENZ, B.; ZHU, H.; GEURTSSEN, W.; BOHNENSACK, R.; MULLER, W.E. and SCHRODER, H.C. "Inorganic polyphosphate in human osteoblast-like cells". *J. Bone Min. Res.*, 13:803-812, (1998).

LISBONA, F.; ALFÉREZ, M.J.M.; BARRIONUEVO, M.; LÓPEZ-ALIAGA, I.; PALLARÉS, I.; HARTITI, S. and CAMPOS, M.S. "Effects of type of dietary fat and vitamin D₃ on magnesium absorption in rats with intestinal resection". *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, 64:294-302, (1994).

LOMBARDI-BOCCIA, G.; MARTINEZ-DOMINGUEZ, B. and AGUZZI, A. "Total heme and non-heme iron in raw and cooked meats". *J. Food Sci.*, 67,1738-1741, (2002).

LÖNNERDAL, B. and DEWEY, K.G. "Epidemiología de la deficiencia de hierro en lactantes y niños". *An. Nestlé.* 53:12-19, (1995).

LÓPEZ, H.W.; COUDRAY, C.; LEVRAT-VERNY, M.A.; FEILLET-COUDRAY, C.; DEMIGNÉ, C. and RÉMESY, C. "Fructooligosaccharides enhance mineral apparent absorption and counteract the deleterious effects on phytic acid on mineral homeostasis in rats". *J. Nutr. Biochem.*, 11:500-508, (2000).

LÓPEZ-ALIAGA, I.; ALFÉREZ, M.J.M.; BARRIONUEVO, M.; LISBONA, F. and CAMPOS, M.S. "Influence of goat and cow milk on the digestive and metabolic utilization of calcium and iron". *J. Physiol. Biochem.*, 56:201-208, (2000).

LÓPEZ-ALIAGA, I.; ALFÉREZ, M.J.M.; BARRIONUEVO, NESTARES, T.; SANZ-SAMPELAYO, M.R. and CAMPOS M.S. "Study of nutritive utilization of protein and magnesium in rats with resection of the distal small intestine. Beneficial effect of goat milk". *J. Dairy Sci.*, 86:2958-2966, (2003).

LÓPEZ-ALIAGA, I.; ALFÉREZ, M. J. M.; LISBONA, F.; BARRIONUEVO, M.; HARTITI, S., GÓMEZ-AYALA; A. E. and CAMPOS, M.S. "Influence of vitamin D3 and type of dietary fat on phosphorus absorption in rats with intestinal resection". *Nutr. Res.*, 14: 47-57, (1994).

LÓPEZ-ALIAGA, I.; ALFÉREZ, M.J.M.; NESTARES, T.; ROS, P.B.; BARRIONUEVO, M.; and CAMPOS, M.S. "Goat milk feeding causes an increase in biliary secretion of cholesterol and a decrease in plasma cholesterol levels in rats". *J. Dairy Sci.*, 88:1024-1030, (2005).

LÓPEZ-ALIAGA, I.; CAMPOS, M.S.; BARRIONUEVO, M.; COVES, F.; LISBONA, F. and ALFÉREZ, M.J.M. "Efecto de la resección intestinal, de los triglicéridos de cadena media y del ácido ursodeoxicólico sobre la utilización nutritiva de calcio, fósforo y magnesio en ratas". *Ars Pharmaceutica*, Tomo XXX, Núms. 1-2, 83-97, (1989).

LÓPEZ DE NOVALES; E. “Metabolismo mineral del magnesio”. *Rev. Clin. Esp.*, 135:307-312, (1974).

LUCAS, M.L.; COPPER, B.T.; LEI, F.H.; JOHNSON, I.T.; HOLMNES; G.K.T.; BLAIR, J.A. and COOKE, W.T.; “Acid microclimate en celiac and Crohn’s disease: a model for folate malabsorption”. *Gut.*, 19:735-742, (1978).

LYNCH, S.R: “Interaction of iron with other nutrients”. *Nutr. Rev.*, 55:102-110, (1997).

M

MAHONEY, A.W. and HENDRICKS, D.G. “Efficiency of haemoglobin regeneration as a method of assessing iron bioavailability in food products”. In: KRIES, C. “Nutritional bioavailability of iron”. Washington D.C.: American Chemical Society, pp:1-11, (1982).

MANOONKITIWONGSA, P.S.; WHITTER, E.F.; WAREESANGTIP, W.; MCMILLAN, P.J.; NAVA, P.B. and SCHULTZ, R.L. “Calcium-dependent ATPase unlike ecto-ATPase is located primarily on the luminal surface of brain endothelial cells”. *Histochem. J.*, 32:313-324, (2000).

MARTIN, P. “La composition protéique du lait de chèvre: ses particularités”. In: “Interêts nutritionnel et diététique du latí de chèvre”. INRA Editions, pp:27-49, (1996).

MARTÍNEZ-FÉREZ, A. “Obtención de oligosacáridos de la leche de diferentes especies por tecnología de membranas”. Tesis Doctoral, (2004).

MASSEY, L.K. “Does excess dietary protein adversely affect bone?” Symposium overview. *J. Nutr.*, 128:1048-1050, (1998).

MASUYAMA, R.; UEHARA, M. and SUZUKI, K. “High P diet induces acute secretion parathyroidhormone without alteration of serum calcium levels in rats”. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 64: 2316–2319, (2000).

MATAIX, F.J.; MAÑAS, M.; LLOPIS, J. and MARTINEZ DE VICTORIA, E. "Tabla de composición de alimentos españoles". 2ª Ed. "Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Granada", (1988).

MATSUMOTO, J.; MORI, N.; DOI, M.; KISHIDA, T. and EBIHARA, K. "Evaluation of iron bioavailability from bonito dark muscle using anaemic rats". *J. Agric. Food Chem.*, 51: 4478-4482, (2003).

McCANCE K.L. and HUETER S.E. "Pathophysiology: The biologic basis for disease in adults and children" (3rd Ed.). St. Louis, MO: Mosby, (1998).

McEWAN, G.T.A.; LUCAS, M.L.; DENVER, M.; RAJ, M.; MCCOLL, K.E.; RUSSELL, R.I. and MATHAN, V.I.; "A combined TDDA-PVC pH and reference electrode for use in the upper small intestine". *J. Med. Eng. Technol.*, 14:16-20, (1990).

McPHAIL, A.P. and BOTHWELL, T.H. "The prevalence and causes of nutritional iron deficiency anemia". In: FOMON, S.J. and ZLOTKIN, S. "Nutritional anemias". Nestlé Nutrition Workshop Series, vol.30, Nestec Ltd., Vevey/Raven Press, Ltd., New York, 1-12, (1992).

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

McKIE, A.T.; MARCIANI, P.; ROLFS, A.; BRENAN, K.; WHER, K.; BARROW, D.; MIRET, S.; BOMFORD, A.; PETERS, T.J.; FARNAZEH, F.; HEDIGER, M.A.; HENTZE, M.W. and SIMPSON, R.J. "A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation". *Molecular Cell*, 5:299-309, (2000).

MEDEIROS, D.M.; PLATTNER, A.; JENNINGS, D. and STOECKER, B. "Bone morphology, strength and density are compromised in iron-deficient rats and exacerbated by calcium restriction". *J. Nutr.*, 132:3135-3141, (2002).

MILNE, D.B. and NIELSEN, F.H. "The interaction between dietary fructose and magnesium adversely affects macromineral homeostasis in men". *J. Am. Coll. Nutr.*, 19:31-37, (2000).

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

MIYAMOTO, K.I. and ITHO, M.. "Transcriptional regulation of the Npt2 gene by dietary phosphate". *Kidney Int.*, 60:412-425, (2001).

MOOS, T. and MORGAN, E.H. "Transferrin and transferrin receptor function in brain barrier systems. *Cell Mol. Neurobiol.*, 20:77-95, (2000).

MORGAN E.H. and OATES P.S. "Mechanisms and regulation of intestinal iron absorption". *Blood Cells Mol. Dis.*, 29:384-399, (2002).

MOYA, M.; CORTÉS, E.; BALLESTER, M.I.; VENTO, M.Y. and JUSTE, M. "Short term polyose substitution for lactose reduces calcium absorption in healthy term babies". *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 14:57-61, (1992).

MÜLLNER, E.W.; and KÜHN, L.C. "A stem-loop in the 3' untranslated region mediates iron-dependent regulation of transferrin receptor mRNA stability in the cytoplasm". *Cell*, 53:815-825, (1988).

MURER, H.; HERNANDO, N.; FORSTER, L. and BIBER, J. "Molecular mechanisms in proximal tubular and small intestinal phosphate reabsorption". *Mol. Membr. Biol.*, 18:3-11, (2001).

N

NEED, A.G.; KEMP, A.; GILES, N.; MORRIS, H.A.; HOROWITZ, M. and NORDIN, B.E. "Relationships between intestinal calcium absorption, serum vitamin D metabolites and smoking in postmenopausal women". *Osteopor. Internat.*, 13:83-88, (2002).

NISSENSON, A.R.; BERNS, J.S.; SAKIEWICZ, P.; GHADDAR, S.; MOORE, G.M.; SCHLEICHER, R.B. and SELIGMAN, P.A. "Clinical evaluation of heme iron polypeptide: sustaining a response to rHuEPO in hemodialysis patients". *Am. J. Kidney Dis.*, 42:325-330, (2003).

O

OATES, P.S.; and MORGAN, E.H. "Ferritin gene expression and transferrin receptor activity in intestine of rats with varying iron stores". *Am. J. Physiol.*, 273:G636-G646, (1997).

O'CONNOR, D.L. "Folate in goat milk products with reference to other vitamins and minerals: a review". *Small Rumin. Res.*, 14:143-149, (1994).

ODLE, J. "New insights into the utilization of medium-chain triglycerides by the neonate: observations from a piglet model". *J. Nutr.*, 127:1061-1067, (1997).

P

PALMER, G.; ZAO, J.; BONJOUR, J.; HOFSTETTER, W and CAVERZASIO, J. “in vivo expression of transcripts encoding the Glvr-1 phosphate transporter/retrovirus receptor during bone development”. *Bone*, 24:1-7, (1999).

PAPANIKOLAOU, G. and PANTOPOULOS, K. “Iron metabolism and toxicity”. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 202:199-211, (2004).

PARK, Y.W. “Relative buffering capacity of goat and cow milk, soybased infant formulas and commercial non prescription antacid drug”. *J. Dairy Sci.*, 74:3326-3333, (1991).

PARKASH, S. and JENNESS, R. “The composition and characteristics of goat milk: review”. *J. Dairy Sci. Abstr.*, 20:67-87, (1968).

PARKKILA, S.; WAHEED, A.; BRITTON, R.S.; BACON, B.R.; ZHOU, X.Y.; TOMATSU, S.; FLEMING, R.E. and SLY, W.S. “Immunohistochemistry of HLA-H, the protein defective in patients with hereditary hemochromatosis, reveals unique pattern of expression in gastrointestinal tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 94:2534-2539, (1997a).

PARKKILA, S.; WAHEED, A.; BRITTON, R.S.; BACON, B.R.; ZHOU, X.Y.; TOMATSU, S.; FLEMING, R.E. and SLY, W.S. “Association of the transferrin receptor in human placenta with HFE, the protein defective in patients with hereditary hemochromatosis”. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 94:13198-13202, (1997b).

PATTANAUNGKUL, S.; RIGGS, B.L.; YERGEY, A.L.; VIERA, N.E.; O’FALLON, W.M.; and KHOSLA, S. “Relationship of intestinal calcium absorption to 1,25-dihydroxyvitamin D in young versus elderly women: evidence for age related intestinal resistance to 1,25(OH)₂D action”. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 85:4023-4027, (2000).

PATTERSON, A.J. “Dietary treatment of iron deficiency in women of child-bearing age”. *Am. J. Clin. Nutr.*, 74:650-656, (2001).

PATWARDHAN, D.N.; PAHUJA, D.N. and SAMUEL, A.M. “Calcium bioavailability: an *in vivo* assessment”. *Nutr. Res.*, 21:667-675, (2001).

PIETRANGELO, A. “Physiology of iron transport and the hemochromatosis gene”. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 282:403-414, (2002).

PLOSZAJ, T.; RYNIEWCZ, Z. and MOTYL, T. “Polyamines in goat’s colostrum and milk”. *Comp. Biochem. Physiol.*, 118B:45-52, (1997).

POTTER B.J.; MCHUGH, T.A. and BELOQUI, O. “Iron uptake from transferrin and asialotransferrin by hepatocytes from chronically alcohol-fed rats. *Alcoholism: Clin. Exp. Res.*, 16:810-815, (1992).

Q

QUARLES, L.D. “Evidence for a bone-kidney axis regulating phosphate homeostasis”. *J Clin. Invest.*, 112:642-646, (2003).

QUILES, A.; GONZALO, C.; BARCINA, Y.; FUENTES, F. and HEVIA, M. “Protein quality of spanish murciano-granadina goat milk during lactation”. *Small Rumin. Res.*, 14:67-72, (1994).

R

RAFFIN, S.B.; WOO, C.H.; ROOST, K.T.; PRICE, D.C. and SCHMID, R. “Intestinal absorption of haemoglobin iron-heme cleavage by mucosal heme oxygenase”. *J. Clin. Invest.*, 54:1344-1352, (1974).

REDDY, M.B. and COOK, J.D. "Effect of calcium intake on nonheme iron absorption from a complete diet". *Am. J. Clin. Nutr.*, 65:1820-1825, (1997).

REEVES, P.; NIELSEN, F. and FAHEY, G. "AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet". *J. Nutr.*, 123:1939-1951, (1993).

RITCHIE, G; KERSTAN, D.; DAI, L.J.; KANG, H.S.; CANAFF, L.; HENDY, G.N.; and QUAMME, G.A. "1,25 (OH)2D3 stimulates Mg²⁺ uptake into MDCT cells: modulation by extracellular Ca²⁺ and Mg²⁺". *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 280:F868-F878, (2001).

ROMANI, A.; MARFELLA, C. and SCARPA, A. "Cell magnesium transport and homeostasis: role of intracellular compartments". *Min. Electrolyte Metab.*, 19:282-289, (1993).

ROTHENBERG, B.E. and VOLAND, J.R. "β₂ knockout mice develop parenchymal iron overload: a putative role for class I genes of the major histocompatibility complex in iron metabolism". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:1529-1534, (1996).

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

RUDE, R.K. "Magnesium". In: STIPANUK, M.H.; Ed. "Biochemical and Physiological Aspects of Human Nutrition". W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp: 671-685, (2000).

S

SABATIER, M.; ARNAUD, M.J.; KASTENMAYER, P.; RYTZ, A. and BARCLAY, D.W. "Meal effect on magnesium bioavailability from mineral water in healthy women". *Am. J. Clin. Nutr.*, 75:65-71, (2002).

SÁNCHEZ, M. “Especies menores para pequeños productores: cabras lecheras”, en: Memoria de la XIX Reunión Nacional sobre Caprinocultura. Acapulco Gro., pp: 219- 223, (2004).

SANTOS, M.; SCHILHAM, M.W.; RADEMAKERS, L.H.; MARX, J.J.; DE SOUSA, M. and CLEVERS, H. “Defective iron homeostasis in beta2-microglobulin knockout mice recapitulates hereditary hemochromatosis in man”. *J. Exper. Med.*, 184:1975-1985, (1996).

SANZ SAMPELAYO, M.R.; MARTÍN, A.J.; PÉREZ, L.; GIL EXTREMERA, F. and BOZA, J. “Dietary supplements for lactating goats by polyunsaturated fatty acid-rich protected fat. Effects after supplement withdrawal”. *J. Dairy Sci.*, 87:1796-1802, (2004).

SARABIA, M.I.; ZUBILLAGA, M.; SALGUEIRO, J.; LYSIONEK, A.; DE PAOLI, T.; HAGER, A.; ETTLIN, E.; CARO, R.; WEILL, R. and BOCCIO, J. “Bioavailability, biodistribution and toxicity of biocal, a new calcium source. Comparative studies in rats”. *Nutr. Res.*, 19:1223-1231, (1999).

SARKAR, B.C. and CHAUHAN, U. P. “A new method for determining microquantities of calcium in biological materials”. *Anal. Biochem.*, 20:155-166, (1967).

SCANLON, K.S and YIP, R. “Nutritional anemias”. In: WOLINSKY, I.; KLIMIS-TRAVANTZIS, D., eds. *Nutritional Concerns of Women*. Boca Ratón, F.L: CRC Press. 5:61-88, (1996).

SCHANLER, R.J. and ABRAMS, S.A. “Postnatal attainment of intrauterine macromineral accretion rates in low birth weight infants fed fortified human milk”. *J. Pediatr.*, 113:441-447, (1995).

SCHIAVI, S.C. and KUMAR, R. “The phosphatonin pathway: new insights in phosphate homeostasis”. *Kidney Internat.*, 65:1-14, (2004).

SCHWEIGEL, M.; LANG, I. and MARTENS, H. “Mg²⁺ transport in sheep rumen epithelium: evidence for an electrodiffusive transport. *Am. J. Physiol., (Gastrointest. Liver Physiol.)* 277:G976-G982, (1999).

SCHWEIGEL, M. and MARTENS, H. “Magnesium transport in the gastrointestinal tract”. *Front. Biosci.*, 5: 666-677, (2000).

SHARP, P.A.; TANDY, S.R. and SRAI, S.K.S. “Mechanisms involved in the regulation of intestinal iron absorption”. *Nutr. Abst. Rev.*, 73:1-9, (2003).

SHARP, P.; TANDY, S.; YAMAJI, S.; TENNANT, J.; WILLIAMS, M. and SINGH SRAI, S.K. “Rapid regulation of divalent metal transporter (DMT1) protein, but not mRNA expression by non-haem iron in human intestinal Caco-2 cells”. *FEBS Lett.*, 510:71-76, (2002).

SHEN, X.; WEAVER, C.M.; MARTIN, B.R. and HEANY, R.P. “Lignin effect on calcium absorption in rats”. *J. Food Sci.*, 63:165-167, (1998).

SHILS, M.E. “Magnesium”. In: SHILS, M.; OLSON, J.A.; SHIKE, M.; ROSS, A.C. Eds. “Nutrition in Health and Disease”, 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, pp:169-192, (1999).

SHIMIZU, T.; MORISHIMA, S. and OKADA, Y. “Ca²⁺ sensing receptor-mediated regulation of volume-sensitive Cl-channels in human epithelial cells”. *J. Physiol.*, 528:457-472, (2000).

SOUZA, S. and TORRES, M.A. “Iron deficiency anemia in children”. *J. Ped.*, 76:298-304, (2000).

SPENCER, H.; NORRIS, C. and WILLIAMS, D. “Inhibitory effects of zinc on magnesium balance and magnesium absorption in man”. *J. Am. Coll. Nutr.*, 13:479-484, (1994).

STEPHENSON, L.S.; LATHAN, M.C. and OTTESEN, E.A. "Global malnutrition". *Parasitology*, 121:S5-S22, (2000).

STIPANUK, M.H. "Biochemical and Physiological aspects of human nutrition". PA: W.B. SAUNDERS Company, Philadelphia , pp: 656, (2000).

ST-ONGE, M.P. and JONES, P. "Physiological effects of medium chain triglycerides: potential agents in the prevention of obesity". *J. Nutr.*, 132:329-332, (2002).

STOPLER, T. and HERBERT, V. "Nutrition E.T.C. for the millennium". Plainview, NY, Nutrition ETC., (1999).

SULLIVAN, L.W.; LUHBY, L.A. and STREIFF, L.W. "Studies on the daily requirement for folic acid in infants and the etiology of folate deficiency in goat's milk megaloblastic anemia". *Am. J. Clin. Nutr.*, 18:311-317, (1966).

SWAIN, J.H.; TABATABAI, L.B and REDDY, M.B. "Histidine content of low molecular weight beef proteins influences nonheme iron bioavailability in Caco-2 cells". *J. Nutr.*, 135:245-251, (2002).

SWAISGOOD, H.E. "Características de los fluidos líquidos de origen animal: leche". En: ACRIBIA, O.R., "Química de los Alimentos". Ed. Fonema, pp:889-930, (1992).

T

TANDY, S.; WILLIAMS, M.; LEGGET, A.; LOPEZ-JIMENEZ, M.; DEDES, M.; RAMESH, B.; SRAI, S.K. and SAHRP, P. "Nramp2 expression is associated with pH-dependent iron uptake across the apical membrane of human intestinal Caco-2 cells. *J. Biol. Chem.*, 275:1023-1029, (2000).

TAPPENDEN, K.A.; THOMSON, A.B.; WILD, G.E. and Mc BURNEY, M.I. "Short-chain fatty acid-supplemented total parenteral nutrition enhances functional adaptation to intestinal resection in rats". *Gastroenterology*, 112: 792-802, (1997).

TENENHOUSE, H.S.; ROY, S.; MARTEL, J. and GAUTHIER, C. "Differential expression, abundance and regulation of Na⁺-Phosphate cotransporter genes in murine kidney". *Am. J. Physiol.*, 275:F527-F534, (1998).

TENENHOUSE, H.S. "Regulation of phosphorus homeostasis by the Type IIa Na/phosphate cotransporter". *Ann. Rev. Nutr.*, 25:197-214, (2005).

THOMAS, K. and MITCHELL, H.H. "A method of determining the biological value of protein". *J. Biol. Chem.*, 58: 873-903, (1923).

THYS-JACOBS, S.; STARKEY, P.; BERNSTEIN, D. and TIAN, J. "Calcium carbonate and the premenstrual syndrome: Effects on premenstrual and menstrual symptoms. Premenstrual Syndrome Study Group. *Am. J. Obstetrics Gyn.*, 179:444-452, (1998).

TRINDER, D; FOX, C.; VAUTIER, G. and OLYNIK, J.K. "Molecular pathogenesis of iron overload". *Gut.*, 51:290-295, (2002).

U

UTERMOHLEN, V. "Diet, nutrition and drug interactions". In: SHILS, M.E.; OLSON, J.A.; SHIKE, M.; ROSS, A.C., eds. "Modern nutrition in health and disease" 9th ed., Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, pp: 1619-1641, (2000).

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

V

VAN BERESTEIJN, E. C. H.; HILL, L. F. and STANBURY, S.W. "Advances in nutritional research", Vol. 9. New York: Plenum Press, (1993).

VAN CAMPEN D. R. "Enhancement of iron absorption from ligated segments of rat intestine by histidine, cysteine and lysine. Effects of removing ionizing groups and of stereoisomerism". *J. Nutr.*, 103:139-142, (1973).

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

VEGA LEÓN, S. "Innovaciones alimentarias del siglo XXI. El caso de los llamados alimentos y sustancias funcionales". En: CORONADO, M. Ed. "Las innovaciones tecnológicas en el futuro de los profesionales de las áreas de Biológicas". Universidad Autónoma Metropolitana y Universidad Autónoma del Estado de Morelos. México, pp :285, (2003).

W

WAHEED, A.; PARKKILA, S.; X.Y.; TOMATSU, S.; TSUCHIHASHI, Z.; FEDER, J.N.; SCHATZMAN, R.C.; BRITTON, R.S.; BACON, B.R. and SLY, W.S. "Hereditary hemochromatosis: effects on C282Y and H63D mutations on association with β_2 -microglobulin intracellular processing, and cell surface expression of the HFE protein in COS-7 cells". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:12384-12389, (1997).

WAHEED, A.; PARKKILA, S.; SAARNIO, J.; FLEMING, R.E.; ZHOU, X.Y.; TOMATSU, S.; BRITTON, R.S.; BACON, B.R. and SLY, W.S. "Association of HFE protein with transferrin receptor in crypt enterocytes of human duodenum". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:3117-3122, (2002).

WAHEED, A.; GRUBB, J.H.; ZHOU, X.Y.; TOMATSU, S.; FLEMING, R.E.; COSTALDI, M.E.; BRITTON, R.S.; BACON, B.R. and SLY, W.S. "Regulation of transferrin-mediated iron uptake by HFE, the protein defective in hereditary hemochromatosis". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:1579-1584, (1999).

WALTER, A.R. and SEGAL, I. "Iron overload in sub-Saharan Africa: to what extent is it a public health problem?". *Br. J. Nutr.*, 81:427-434, (1999).

WALTER, H.; HERTLING, I.; BENDA, N.; KONIG, B.; RAMSKOGLER, RIEGLER, A.; SEMLER, B.; ZOGHLAMI, A. and LESCH, O.M. "Sensitivity and specificity of carbohydrate-deficient transferrin in drinking experiments and different patients". *Alcohol*, 25:189-194, (2001).

WALTERS G.O.; MILLER, F.M. and WOEWOOD, M. "Serum ferritin concentration and iron stores in normal subjects". *J. Clin. Exp. Pathol.*, 26:770-772, (1973).

WEAVER, C.M. "Calcium". In: BOWMAN, B. A. and RUSSELL, R.M., eds. "Present Knowledge in nutrition" (8th ed.) Washington D.C. International Life Sciences Institute, (2001).

WEAVER, C.M. and HEANEY, R.P. "Calcium". In: SHILS, M.; OLSON, J.A.; SHIKE, M.; ROSS, A.C., eds. *Nutrition in Health and Disease*, 9th ed. Baltimore, pp:141-155, (1999).

WEAVER, C.M. and HANEY, R.P. "Dairy consumption and bone health". *Am. J. Clin. Nutr.*, 73:660-661, (2001).

WEAVER, C.M.; PROLUX, W.R. and HEANEY, R. "Choices for achieving adequate dietary calcium with a vegetarian diet". *Am. J. Clin. Nutr.*, 70:543S-548S, (1999).

WEBER, S.; SCHNEIDER, L.; PETERS, M.; MISSELWITZ, J.; RONNERFARTH, G.; BOSWALD, M.; BONZEI, K.E.; SEEMAN, T.; SULAKOVA, T.; KUWERTZ-BROKING, E.; GREGORIC, A.; PALCOUX, J.B.; TASIC, V.; MANZ, F.; SCHARER, K.; SEYBERTH, H.W. and KONRAD, M. "Novel paracellin-1 mutations in 25 families with familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis". *J. Am. Soc. Nephrol.*, 12: 1872-1881, (2001).

WHITTAKER, P.; HINES, F.A.; ROBL, M.G. and DUNKEL V.C. "Histopathological evaluation on liver, pancreas, spleen and heart from iron-overloaded Spraged-Dawley rats". *Toxicol. Pathol.*, 24:558-563, (1996).

WHITTAKER, P.; TUFARO, P.R. and RADER, J.I. "Iron and folate in fortified cereals". *J. Am. Coll. Nutr.*, 20:247-254, (2001).

WHITING, S.J.; ANDERSON, D.J. and WEEK, S.J. "Calciuric effects of protein, and potassium bicarbonate but not of sodium chloride or phosphate can be detected acutely in adult women and men". *Am. J. Clin. Nutr.*, 65:1465-1472, (1997).

WIENK, K.J., MARX, J.J. and BEYNEN, A.C. "The concept of iron bioavailability and its assessment". *Eur. J. Nutr.*, 38:51-75, (1999).

WOLF, R.L.; CAULEY, J.A.; BAKER, C.E.; FERRELL, R.E.; CHARRON, M.; CAGGIULA, A.W.; SALAMONE, L.M.; HEANEY, R.P. and KULLER, L.H. "Factors associated with calcium absorption efficiency in pre and perimenopausal women". *Am. J. Clin. Nutr.*, 72:466-471, (2000).

WORTINGTON, M.T.; COHN, S.M.; MILLER, S.K.; LUO, R.K. and BERG, C.L. "Characterization of human plasma membrane heme transporter in intestinal and hepatocyte cell lines". *Am. J. Physiol.*, 280:G1172-G1177, (2001).

WORWOOD, M. "Regulación del metabolismo del hierro". *An. Nestlé.* 53:1-11, (1995).

Y

YANG, F.; WANG, X.; HAILE, D.J.; PIANTADOSI, C.A. and GHIO, A.J. "Iron increases expression of iron-export protein MTP1 in lung cells". *Am. J. Clin. Physiol.*, 283:L932-L939, (2002).

YATES, A.A. "Dietary reference intakes: the new basis for recommendations for calcium and related nutrients, B vitamins and choline". *J. Am. Diet. Assoc.*, 98:699-706, (1998).

YEH, K.Y.; YEH M.; WATKINS A.; RODRÍGUEZ-PARIS J. and GLASS, J. "Dietary iron induces rapid changes in rat intestinal divalent metal transporter expression". *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 279:G1070-1079, (2000).

YIP, R. "Significance of an abnormality low or high haemoglobin concentration during pregnancy. Special consideration of iron nutrition". *Am. J. Clin. Nutr.*, 72: 272S-279S, (2000).

Z

ZLOTKIN, S. "Treatment of anemia with microencapsulated ferrous fumarate plus ascorbic acid supplied as sprinkles to complementary (weaning) foods". *Am. J. Clin. Nutr.*, 74:791-795, (2001).

ZOPPI, S.T.; BERRA, B. and ENNE, O. "Goat milk products in the diet therapy of arteriopathic patients and/or in geriatric age". *Rev. Ita. Sostanze Grasse*, 72:67-71, (1995).