

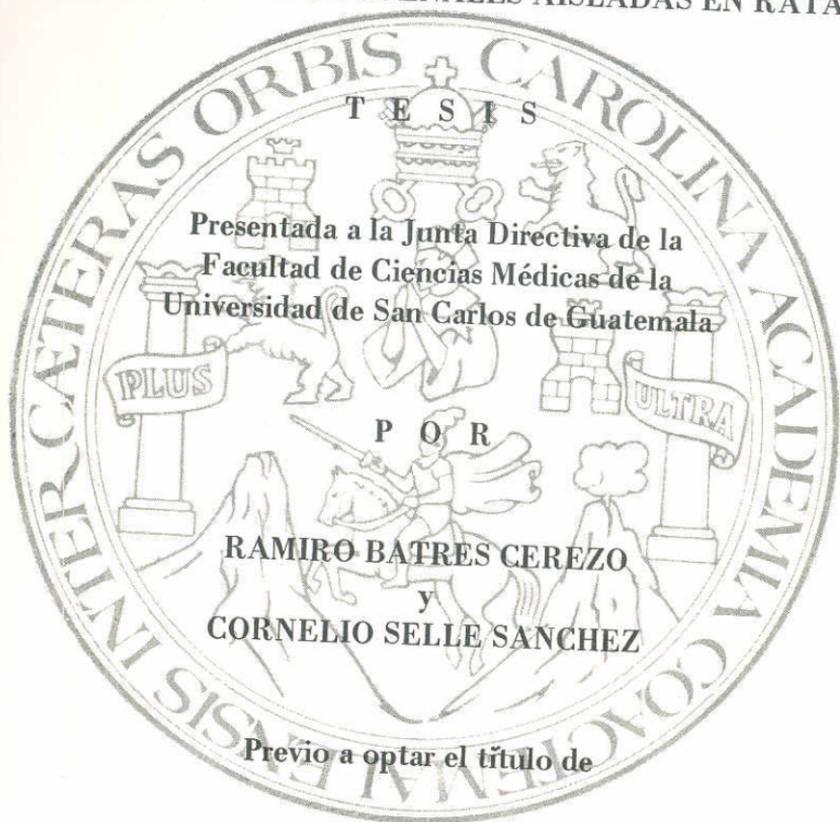
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS



ESTUDIO DE LA ABSORCION DE TRES COMPUESTOS DE
HIERRO EN ASAS DUODENALES AISLADAS EN RATAS

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS

ESTUDIO DE LA ABSORCION DE TRES COMPUESTOS DE
HIERRO EN ASAS DUODENALES AISLADAS EN RATAS



MEDICO Y CIRUJANO

Guatemala, noviembre de 1977.

CONTENIDO

- I. INTRODUCCION
 - II. ANTECEDENTES
 - III. JUSTIFICACION
 - IV. OBJETIVOS
 - V. MATERIAL Y METODOS
 - VI. RESULTADOS
 - VII. DISCUSION
 - VIII. CONCLUSIONES
 - IX. RECOMENDACIONES
 - X. BIBLIOGRAFIA
- AGRADECIMIENTO

INTRODUCCION:

Es obligación del médico dedicar parte de su esfuerzo a la búsqueda de soluciones prácticas a los problemas de salud de la población a que atiende, de su país y de la humanidad en general.

Uno de los más serios problemas de salud es el nutricional, por su amplia distribución, su repercusión, y el relativo fracaso de la mayor parte de intentos que han buscado su solución. Es obvio que la solución a la seria situación nutricional de nuestro país, de Centro América y el resto del mundo no industrializado radica en la estrecha cooperación multidisciplinaria en la implementación de medidas científicamente avaladas, en la decisión firme y desinteresada por parte de los organismos ejecutores de dichas medidas y en la valoración de los resultados obtenidos con miras a mejorarlos. Es claro también que la solución será gradual y que los verdaderos resultados se verán a largo plazo.

Dentro del problema general, las anemias nutricionales son muy prevalentes y urge una acción preventiva además de los esfuerzos curativos ya conocidos. Así, hasta la fecha, tanto en Guatemala como en varios países del mundo, la anemia por deficiencia de hierro ha sido tratada de múltiples maneras, individualmente por parte de los médicos y a nivel de poblaciones por las políticas de gobierno. Sin embargo, el problema persiste pues los ataques emprendidos tropiezan con problemas económicos, culturales, técnicos, fisiológicos, bioquímicos, etc.

Se vislumbra en el futuro cercano la posibilidad de una medida preventiva efectiva, como es la fortificación de alimentos con hierro. Carece este método de los inconvenientes del tratamiento por medicamentos y es una forma de medicina preventiva y curativa a la vez, de amplia cobertura poblacional y de implementación factible en nuestro medio. Los resultados de una intervención de este tipo, cuando ha sido bien llevada, prometen ser muy satisfactorios.

El presente trabajo fue emprendido con el propósito de proveer información científica encaminada a comprender mejor el comportamiento de un compuesto quelado de hierro, el cual llena una serie de condiciones que lo singularizan como un posible compuesto de elección en la fortificación de alimentos con hierro en Centro América.

ANTECEDENTES

Las anemias nutricionales afectan a una gran parte de la población mundial y se ha reconocido que su principal causa es la deficiencia de hierro (1-3). Se sabe también que la anemia es una manifestación tardía de un estado carencial, y que se produce sólo cuando las reservas del organismo han sido depletadas (4).

En la población de Guatemala, y de toda Centro América, la alta prevalencia de deficiencia de hierro se debe a varios factores, tales como ingesta inadecuada de hierro tanto en cantidad como en calidad, infección por uncinarias, embarazos repetidos y pérdidas crónicas de sangre por diversas causas. Entre ellos, los principales son la baja disponibilidad de hierro en la dieta, ya que casi la totalidad de éste proviene de alimentos de origen vegetal, y la baja ingesta total de hierro en un amplio segmento de la población (5, 6).

Se ha encontrado que en la dieta, el hierro de origen vegetal es poco absorbible (1.7 a 7.9o/o), mientras que el hierro hemínico se absorbe mejor (12.6 a 20.3o/o) (7). Se sabe también que las proteínas de la carne tiene un efecto facilitador sobre la absorción del hierro de origen vegetal, probablemente por su alto contenido en amino-ácidos azufrados y la acción de éstos como quelantes (8-10). Pero este efecto facilitador no es importante en nuestro medio porque la mayoría de la población consume carne en muy poca cantidad y en forma irregular.

A pesar de que los mecanismos precisos que participan en la absorción del hierro y los factores últimos que regulan estos mecanismos no se conocen por completo, está bien establecido que ciertos compuestos del metal se absorben en mayor proporción que otros y que existen factores 'externos' presentes en la dieta que condicionan la mayor o menor absorción del hierro; aún más, estos factores de la dieta afectan en grados diferentes la absorción de las diversas formas de hierro (11).

Las sustancias que inhiben la absorción están presentes en los cereales, verduras y legumbres (12). Incluyen sales minerales y compuestos orgánicos tales como las sales de calcio y fosfatos (13); el ácido tánico, presente en forma natural en varias bebidas como el café y el té (14); la albúmina del huevo (15); los fitatos; ciertos preservativos que se agregan a los alimentos y bebidas preparados, como el etilén-diamino-tetra-acetato (EDTA) libre, etc. (16). El ácido ascórbico y ciertos carbohidratos, en contraste, facilitan la absorción del hierro (11).

Ciertos hechos conocidos destacan por su importancia y trascendencia práctica: 1) Las sales de hierro comúnmente usadas en regímenes terapéuticos de reposición se absorben en un porcentaje bastante bajo de la dosis total administrada (4). 2) El hierro hemínico se absorbe más que el no hemínico cuando ambos se ingieren como componentes de la dieta (17). 3) Los factores de la dieta que afectan la absorción del hierro no hemínico, aumentándola o disminuyéndola, no tienen mayor efecto sobre la absorción del hierro hemínico (17).

En vista de todo lo anterior, una de las soluciones que se propone al problema de las anemias nutricionales por deficiencia de hierro en Centro América es la fortificación de alimentos con este metal. Lógicamente el ideal sería que el hierro estuviese en una forma cuya absorción no fuese afectada por los inhibidores antes mencionados, predominantes en la dieta usual de la población de menores recursos.

Por sus características, el hierro hemínico sería la forma ideal para la fortificación. Sin embargo, existen otros muchos problemas de índole organoléptico, físico, químico, económico, socio-cultural, etc., que le son un gran contrapeso a sus ventajas.

Utilizando el concepto que el hem contiene una molécula de hierro en forma quelada, una alternativa a considerar en la búsqueda

de un compuesto de comportamiento cercano al ideal sería el estudio de quelatos de hierro. Entre éstos se encuentra la sal sódica férrica de EDTA (18), compuesto férrico quelado, el cual se absorbe mejor que el sulfato ferroso o cloruro férrico en presencia de alimentos (19 a 22) y aún parece favorecer la absorción del hierro alimenticio que se encuentra en forma no hemínica (23 y 24). Esto ocurre aún cuando el EDTA 'libre' en la dieta disminuye considerablemente la absorción del hierro presente en los alimentos, como citamos antes (16).

Esta forma de hierro parece ser menos afectada por los factores que influyen negativamente la absorción de diversas formas de hierro inorgánico (11 y 24); además, sus características organolépticas se adecúan bien a las necesidades de un programa de fortificación de alimentos de consumo regular y popular (21, 22 y 24).

JUSTIFICACION

Dado que el NaFeEDTA, por sus propiedades antes mencionadas, se ha considerado como una sal útil para la fortificación de alimentos con hierro en Centro América, es necesario investigar detalladamente la absorción del hierro de esta sal, buscando la razón de sus características observadas en estudios con humanos (19-22).

Ya que no se conoce con exactitud el comportamiento intestinal del NaFeEDTA, este trabajo en asas duodenales de ratas normales tiene el propósito de establecer, en parte, su comportamiento en el intestino a nivel de compartimientos (contenido intestinal, mucosa y resto del intestino), comparándolo con el de otras sales de hierro de uso común, una ferrosa y otra férrica.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar el comportamiento del hierro proveniente de NaFeEDTA y de dos compuestos inorgánicos, uno férrico (FeCl_3) y otro ferroso (FeSO_4), en el proceso de absorción intestinal bajo condiciones que simulen las normalmente esperadas en el medio intestinal del humano.

Objetivos Específicos

1) Investigar, en asas duodenales aisladas de ratas normales, la cantidad de hierro absorbida del FeSO_4 , FeCl_3 y NaFeEDTA bajo diferentes condiciones que puedan afectarlo:

- a) Variaciones del pH del contenido intestinal: 8, 7 y 5.8 (25).
- b) Presencia de una substancia inhibidora de la absorción del hierro y que se sabe es común en la dieta: fosfatos.
- c) Presencia de un facilitador de la absorción del hierro: ácido ascórbico.

2) Determinar la distribución del hierro de FeSO_4 , FeCl_3 y NaFeEDTA en el asa intestinal: contenido, mucosa y resto del intestino.

3) Tratar de encontrar algún hecho en relación al comportamiento del NaFeEDTA en humanos (19 a 24), que pueda servir como punto de partida a próximos estudios tendientes a esclarecer sus mecanismos de absorción y distribución, y que ayuden así a establecer su verdadero valor para programas de fortificación de alimentos con hierro.

MATERIAL Y METODOS

Para el presente estudio se usaron ratas blancas, de la cepa Wistar, de la colonia del INCAP. Todas fueron machos sanos, con peso mayor de 300 g. El hematocrito de los animales era normal: promedio de 48.10/o con E.E. de 1.25. Se alimentaron con una dieta comercial completa (Purina Laboratory Rat Chow), hasta 24 horas antes del experimento cuando se les retiró el alimento. Como anestesia se usó Pentobarbital Sódico, intraperitoneal, a una dosis de 50 mg. por Kg. de peso (26).

Los estudios de absorción se hicieron por el método de asa duodenal aislada (27 a 33), el cual se desarrolló empleando $^{60}\text{CoCl}_2$ como sustituto del hierro por razones prácticas y técnicas, y por ser bastante similar al hierro en su comportamiento intestinal (34 y 35). Se trabajó con cobalto hasta obtener estandarización del método y resultados consistentes. Estos experimentos permitieron definir el comportamiento de asas intestinales a distintas distancias del píloro y a diferentes tiempos de incubación, así como depurar el manejo del asa y, una vez concluido el período de incubación, las condiciones de conteo de los compartimientos del intestino (Cuadro 1 y figuras 1 y 2).

a) Preparación del Asa aislada

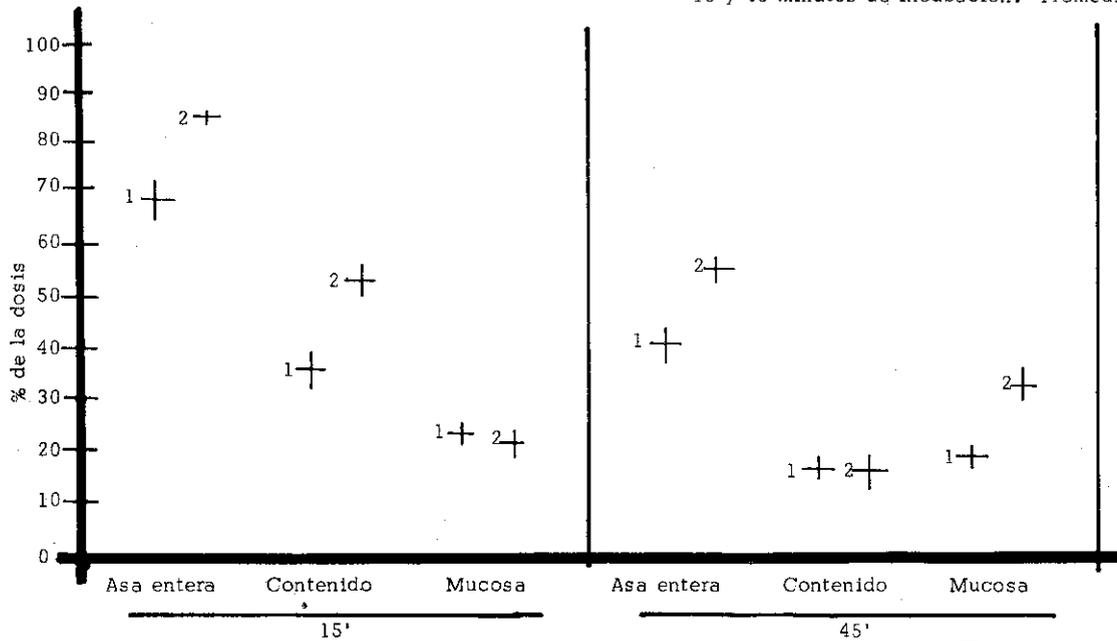
Una vez anestesiada la rata se le mojó el pelo del abdomen para evitar la interferencia de éste en los procedimientos; se hizo una incisión medial desde el apéndice xifoides hasta la región del púbis y se localizó el duodeno tomando como referencia el estómago y haciendo lo posible, a lo largo del experimento, por no tocar el duodeno con los dedos más que cuando fuese estrictamente necesario. Los dedos se mantuvieron siempre húmedos en solución salina tibia, isotónica a la rata, 0.154 M (36).

Ya localizado el duodeno se procedió a ligar el colédoco y el conducto pancreático a su paso por el mesenterio y tan cerca del duodeno como era posible, evitando dañar la vasculación del

^{60}Co encontrado en dos Asas Yeyunales de rata, aisladas y contiguas, después de 15 y 45 minutos de incubación. Promedio \pm EE. (n=16) (1-Asa de 6 cm. a partir del ángulo de Treitz; 2-Asa de 6 cm. de largo a partir del límite distal del asa 1.) Porcentajes de la dosis.

		ASA 1			ASA 2		
		Asa Entera	Contenido	Mucosa	Asa Entera	Contenido	Mucosa
15'	\bar{X}	69.3	36.2	23.9	35.3	53.3	21.9
	EE.	3.7	3.8	1.5	1.6	2.8	2.2
45'	\bar{X}	41.2	17.2	19.9	55.9	16.6	33.6
	EE.	3	2.3	2	2.4	3.2	2.8

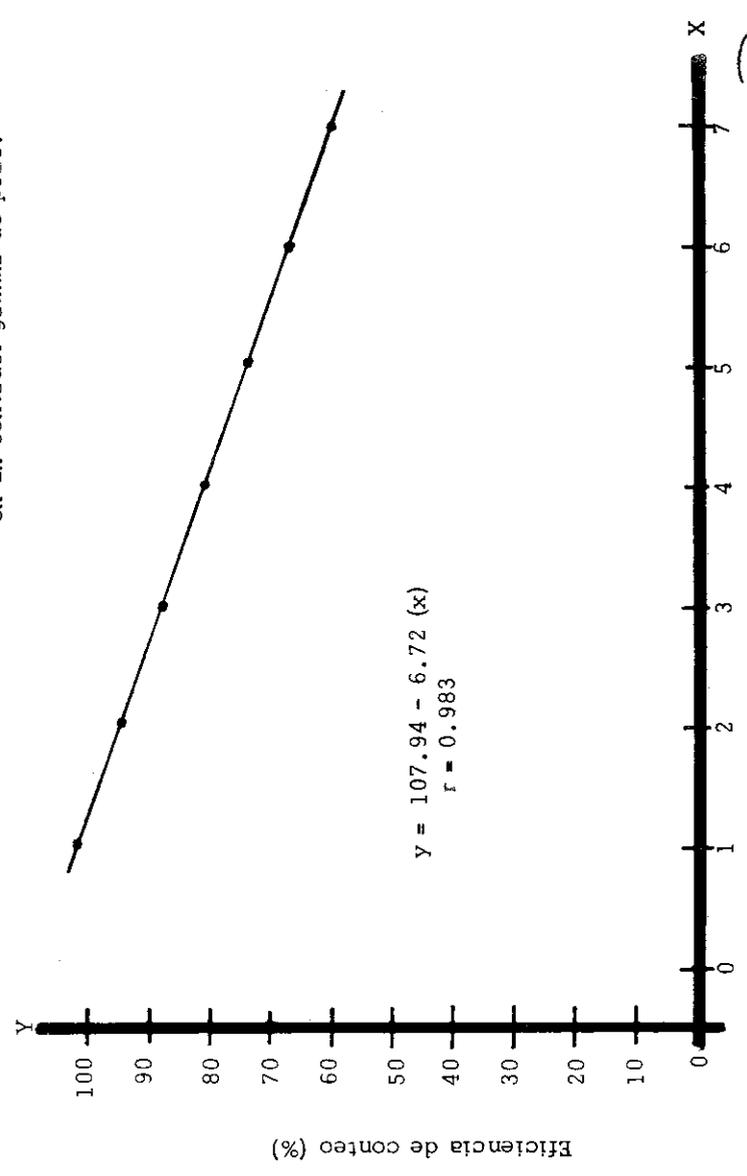
FIGURA 1: ^{60}Co encontrado en dos asas yeyunales de rata, aisladas y contiguas, después de 15 y 45 minutos de incubación. Promedio \pm EE. (n=16)



- 1 - Asa de 6 cm. a partir del ángulo de Treitz.
2 - Asa de 6 cm. a partir del límite distal del asa 1.

J.A.C.

relativa a la altura de la muestra dentro del tubo,
en un contador gamma de pozo.



7.9.C.

intestino. La ligadura de estos conductos se hizo con el objeto de evitar la interferencia de la bilis y del jugo pancreático en el pH de la solución que se introducía dentro del duodeno; se ha observado que su ligadura no influye sobre la absorción del hierro (27 y 37).

Inmediatamente después se procedió a pasar una ligadura alrededor del píloro, teniendo cuidado de no comprometer la circulación; esta ligadura no se apretó. A partir del píloro se midieron 8 cm. de duodeno, usando para ésto un hilo de esa longitud, midiendo el segmento intestinal por su borde libre, sin estirarlo. Al final de los 8 cm. se pasó otra ligadura alrededor del intestino, introduciéndola por medio de una aguja a través de un pequeño espacio avascular que se encuentra entre la serosa del borde fijo y el vaso mesentérico arqueado grande que corre paralelo al duodeno; esta ligadura tampoco se apretó.

Luego se hizo una incisión en el estómago, en su cara anterior, cerca de la curvatura mayor y tratando de encontrar un área poco irrigada. Se hizo otra incisión en el intestino a más o menos 1 cm. por debajo de la ligadura distal. Por la incisión intestinal se introdujo una sonda pequeña y se lavó el asa con 10 ml. de solución salina tibia 0.154 M, teniendo cuidado que la solución, al salir por la incisión del estómago después de haber lavado el asa, no bañara la cavidad abdominal.

Inmediatamente, y después de estar seguros que no quedaba ya solución salina dentro del asa, se apretó y cuadró la ligadura sobre el píloro. Por la incisión distal se introdujo una sonda calibre Fr5 conectada a una jeringa que contenía la solución en estudio; la sonda debía estar llena de solución. Se apretó la ligadura sobre la sonda, se inyectó la solución (ver después) y se acabó de apretar el hilo, al mismo tiempo que se sacó la sonda. Se cerró la pared abdominal. (Ver figura 3).

b) Mantenimiento de un Ambiente a Temperatura y Humedad Controladas:

Debido a que la temperatura de los animales disminuye bajo el efecto de anestesia y a que existe una pérdida de calor y humedad por tener la cavidad abdominal abierta durante el procedimiento; y a

que estas alteraciones tienen efectos negativos sobre el estado general de los animales y de las asas intestinales en sí y, por ende, sobre su funcionamiento, todas las incubaciones se hicieron dentro de una cámara de "plexiglass", en un ambiente saturado de humedad y a temperatura controlada (Figura 4).

Las condiciones estables e ideales de humedad y temperatura se lograron por medio de un recipiente metálico con agua y con una resistencia eléctrica conectada a un termostato. Dicho recipiente constituye el piso de la cámara (Figura 5); tiene una cubierta, también de metal, con hoyos por donde sale vapor de agua. La temperatura rectal y abdominal de la rata se registraron a lo largo del procedimiento y de las incubaciones, por medio de un teletermómetro; la temperatura del ambiente se registró también en la misma forma y se modificaba según se requería para mantener la temperatura de la rata dentro de límites normales (38). La humedad relativa del ambiente se midió con un higrómetro del tipo de termómetro de bulbo húmedo y bulbo seco; siempre se mantuvo a más de 85o/o. Los resultados logrados con el uso de la cámara, en comparación a cuando ésta no se usa, se muestran en la figura 6.

No se observó ningún efecto nocivo sobre los animales que pudiera ser atribuido a las condiciones existentes dentro de la cámara.

c) Soluciones de Prueba y Llenado del Asa:

Se estudio la absorción de tres diferentes compuestos de hierro radioactivo: $^{59}\text{FeSO}_4$, $^{59}\text{FeCl}_3$ y $^{59}\text{FeNaEDTA}$; las variables de prueba fueron las siguientes:

a) Influencia del pH, por medio de la introducción de las soluciones de los compuestos de hierro con:

1. Tampón de Tris, pH 7 (39, 40).

2. Tampón de Acetato, pH 7 (41).
3. Tampón de Tris, pH 8 (39, 40).
4. Tampón de Acetato, pH 5.8 (41).

b) Influencia de fosfatos como inhibidores de la absorción, administrando las sales de hierro con:

1. Tampón de Fosfatos, pH 7 (38 y 42 a 44).
2. Tampón de Fosfatos, pH 5.8 (38 y 42 a 44).

c) Influencia del ácido ascórbico como facilitador de la absorción:

Adición de una solución de ácido ascórbico a la solución de hierro a incubar, en una relación molar de 2 a 1 (ácido ascórbico a hierro). Este ascorbato se preparó a partir de ácido ascórbico en polvo (L-Ascorbic Acid, Reagent grade. Fisher Scientific Company); se preparó cada vez, poco antes de ser usado. Se usó con Tampón de Tris a pH 7.

Cada una de estas variables se estudio en un grupo de 18 ratas, 6 con cada una de las tres diferentes sales de hierro.

En todos los casos la solución introducida al asa tenía un volumen total de 0.5 ml. De éstos 0.2 ml. eran de la sal de hierro, diluida en solución salina 0.154 M pH 3. Esta solución salina se acidificó con H_2SO_4 para usarla con FeSO_4 , y con HCl para el FeCl_3 y el NaFeEDTA . En el caso del ascorbato se usó solución salina 0.154 M y no se modificó su pH. El pH de 3 fue necesario para mantener al hierro del FeSO_4 en forma ferrosa en la solución; y en el caso del FeCl_3 y el NaFeEDTA , para mantener las sales en solución y evitar su precipitación. Estos 0.2ml. eran introducidos al asa duodenal por la sonda y eran inmediatamente seguidos por la inyección de 0.3 ml. del Tampón correspondiente.

En todos los casos se usó la cantidad total de 50 microgramos de hierro elemental (45), marcados extrínsecamente (46) con ^{59}Fe , bajo la misma forma de la sal o compuesto no radiactivo en estudio, y a razón de aproximadamente 0.05 a 0.07 microcuris por cada 0.2 ml. de solución de hierro.

d) Determinación de la Absorción del Hierro Radioactivo:

El tiempo de incubación fue de una hora, a partir del momento de la inyección (28, 29). Al concluir la hora se sacó el asa duodenal y se colocó en un tubo mantenido en hielo, a por lo menos 4°C, para parar el proceso de absorción. Se sacrificó la rata por asfixia, estando aún bajo anestesia. El cadáver y el asa entera fueron contados juntos en un contador de cuerpo total (Conteo 1) (47, 48); después se contó el cadáver solo, es decir sin el asa, en el mismo contador (Conteo 2). Las condiciones de conteo fueron: Alto voltaje: 1200; amplificación gruesa: 4; amplificación fina: 6.5; amplitud de la ventana: 3.5; límite inferior: 2. Con esta calibración se logra detectar bien el foto-pico principal del ⁵⁹Fe (Figura 7).

La absorción fue calculada así:

$$\text{Absorción: } \frac{\text{Conteo 2 - Fondo}}{\text{Conteo 1 - Fondo}} \times 100$$

e) Determinación de la Distribución del Hierro Radioactivo en El Asa:

Abriendo el asa por sus dos extremos, se lavó el contenido con 5 ml. de agua seguidos por 30 cc. de aire colocando todo lo expulsado del asa, incluyendo el lavado, dentro de un tubo de vidrio; esto fue llamado 'contenido'. Se abrió luego el asa longitudinalmente y se removió la mucosa raspándola con una lámina porta-objetos (49) y colocándola dentro de un tubo rotulado "mucosa". Los restos del intestino se dejaron dentro del papel parafinado sobre el cual se realizó la separación; todo esto se introdujo dentro de otro tubo y se rotuló 'restos'.

Cada una de estas partes, dentro de su tubo, se contó en un contador gamma de pozo (47, 48), bajo las siguientes condiciones de

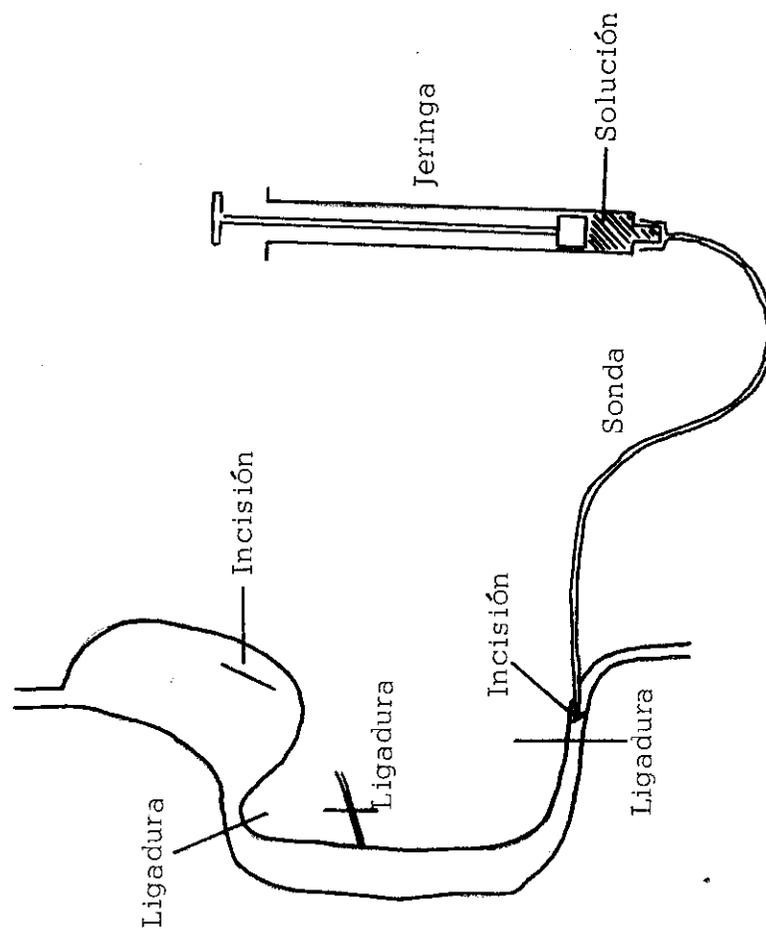
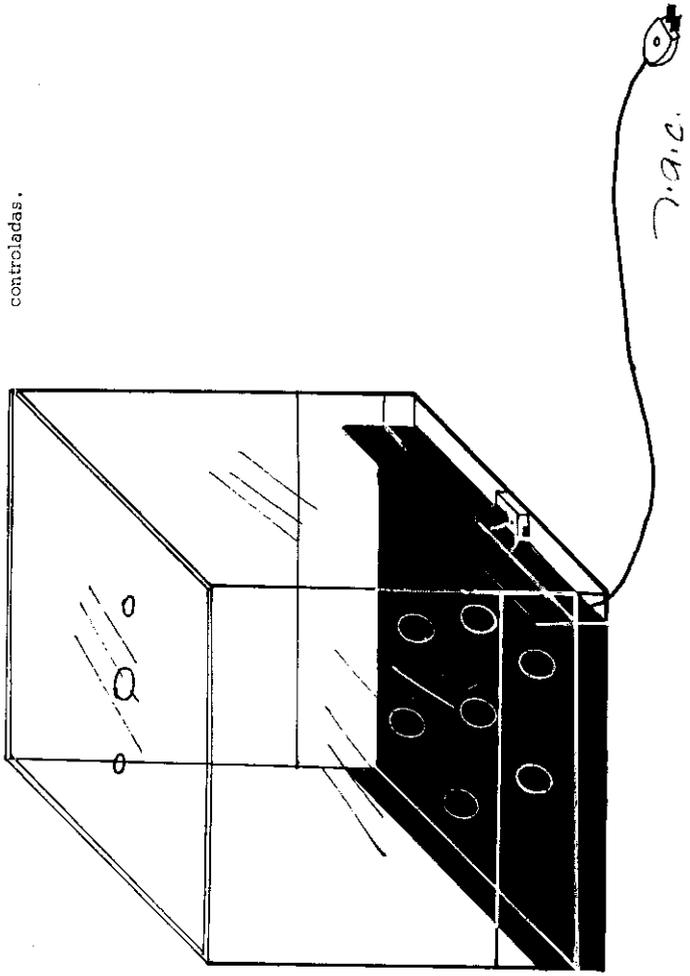


FIGURA 3: Diagrama del asa duodenal aislada.

FIGURA 4: Cámara para mentenimiento de un ambiente a temperatura y humedad controladas.



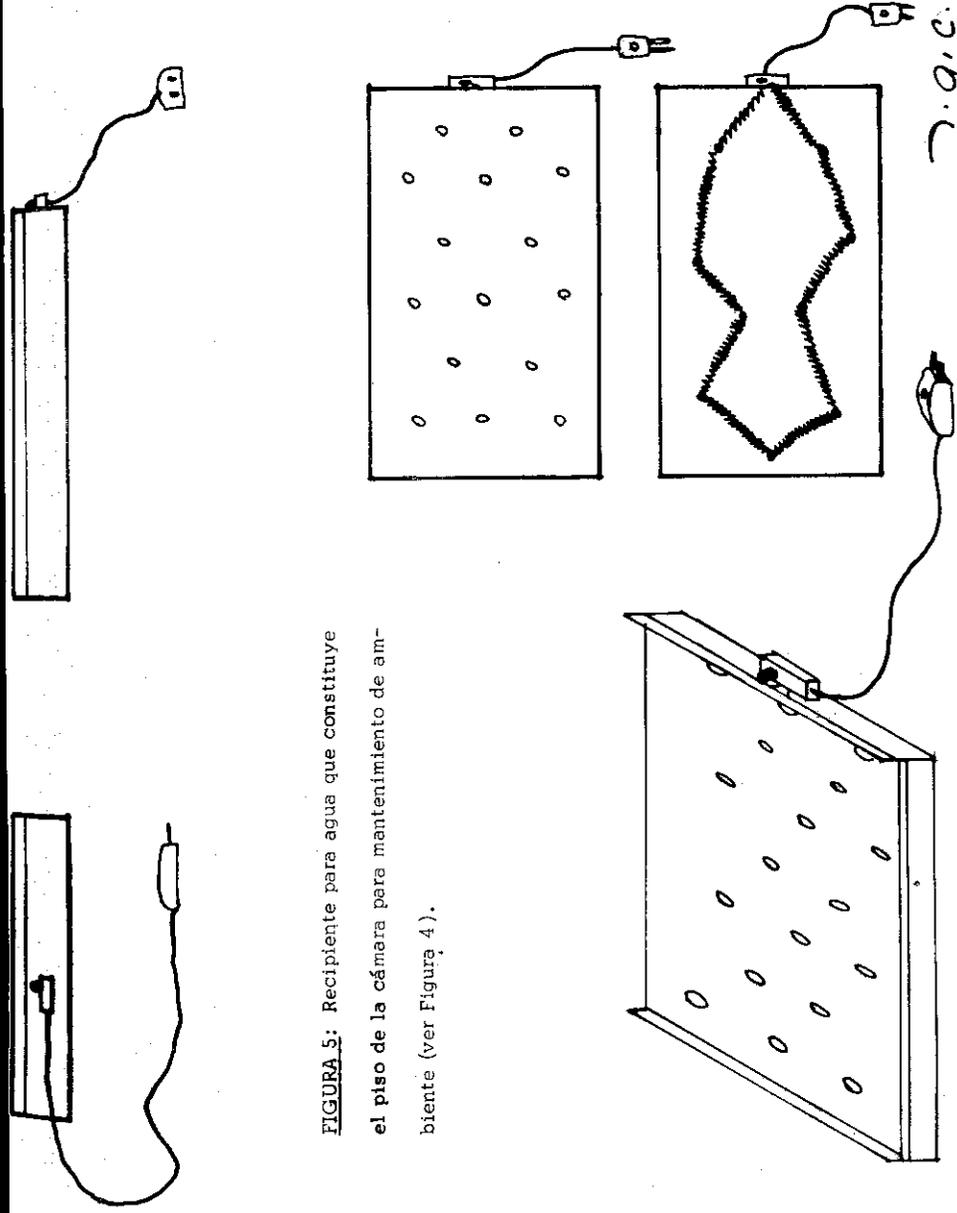
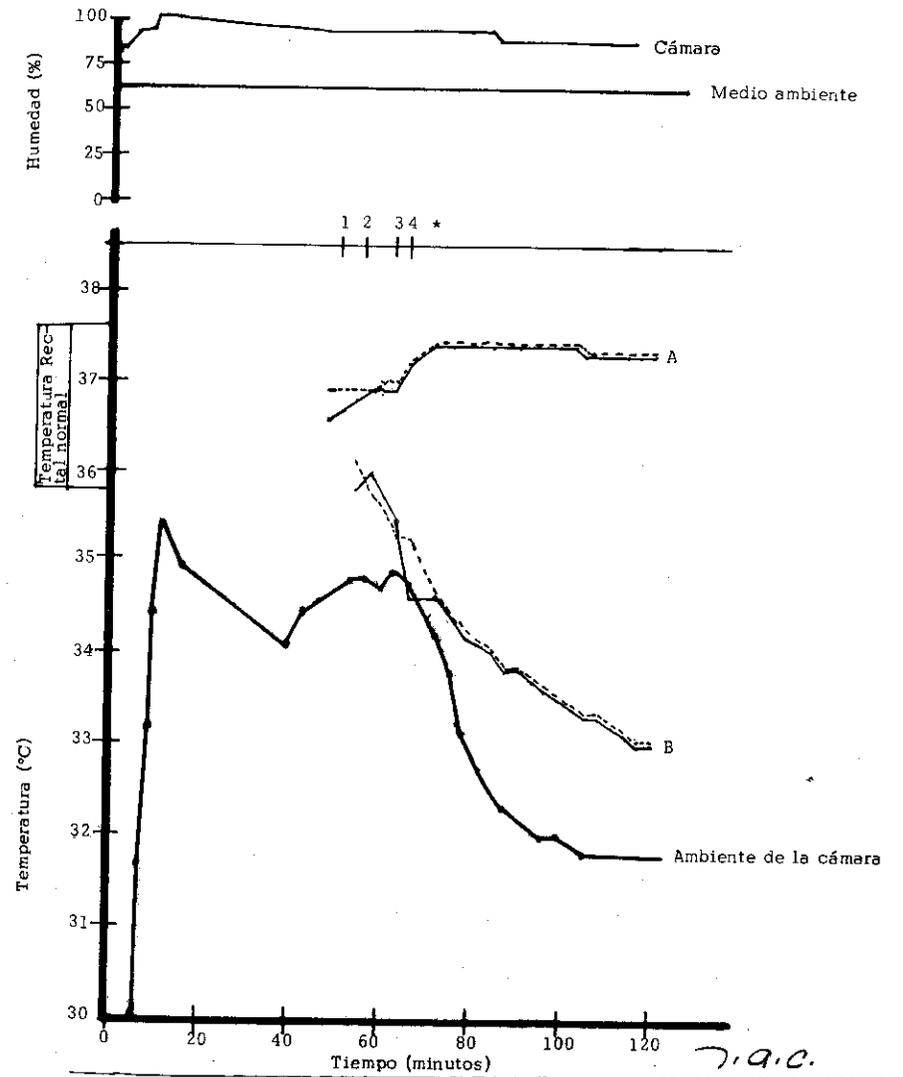


FIGURA 5: Recipiente para agua que constituye el piso de la cámara para mantenimiento de ambiente (ver Figura 4).

FIGURA 6: Temperatura rectal (---) y abdominal (—) de una rata dentro de la cámara (A) y otra al medio ambiente bajo una lámpara (B). Humedad relativa del ambiente durante el procedimiento y la incubación.



* 1 - Rata A metida a la cámara e incisión abdominal. 2 - Incisión abdominal de rata B.
3 - Cierre de incisión de rata A. 4 - Cierre de incisión de rata B.

7.9.0.

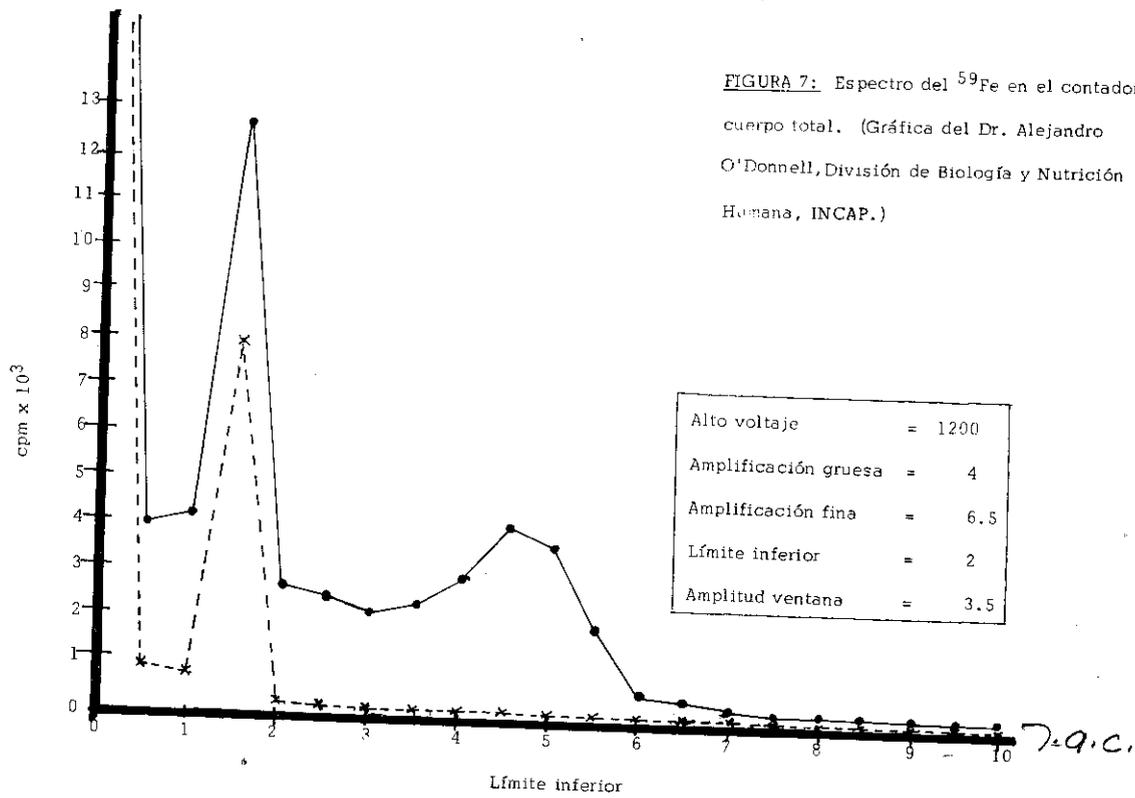
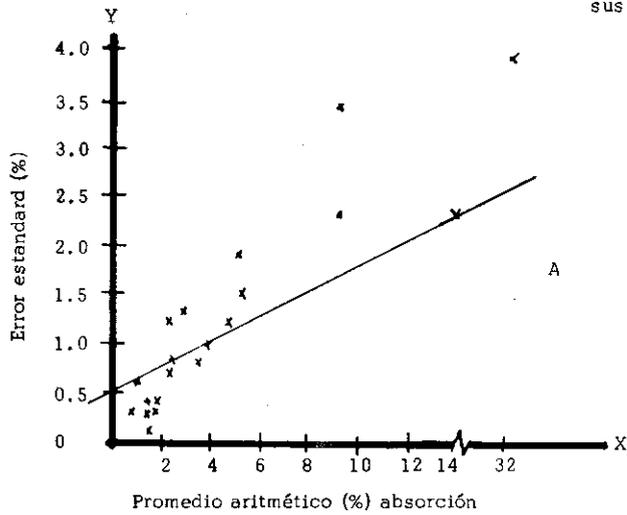
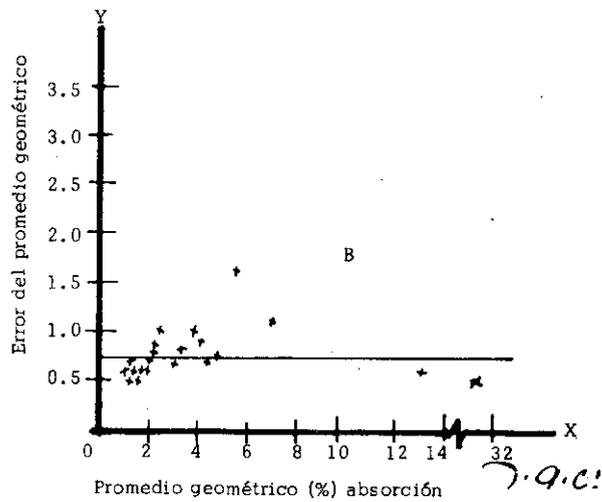


FIGURA 7: Espectro del ⁵⁹Fe en el contador de cuerpo total. (Gráfica del Dr. Alejandro O'Donnell, División de Biología y Nutrición Humana, INCAP.)

FIGURA 8: Correlación entre el promedio aritmético (A) y el promedio geométrico (B) de la absorción de tres diferentes sales de hierro con distintas soluciones tampon (Tris, acetato y fosfatos) y sus respectivos errores estandar.



Intercepto : 0.54
 Pendiente : 0.125
 r : 0.85
 Promedio X : 5.2
 Promedio Y : 1.2
 r² : 5.8



Intercepto : 0.77
 Pendiente : -3.4×10^{-3}
 r : 8.9×10^{-2}
 Promedio X : 4.6
 Promedio Y : 0.75
 r² : 1.32

7.9.C!

conteo: Alto voltaje: 1175; amplificación gruesa: 1/32; amplificación fina: 0.5; amplitud de la ventana: 292; límite inferior: 475.

Se hicieron las debidas correcciones por las diferentes alturas de las muestras dentro de los tubos (geometría de la muestra), llevando todas las muestras al valor equivalente para una altura estandard según la ecuación $y = 107.94 - 6.72 (x)$, en donde: 'y' representa el porcentaje del contador de pozo usado en el caso de la altura de la muestra que se cuenta: 'x' (figura 2). Así, conociendo la eficiencia del aparato para una altura estandard y la altura de cada una de las muestras, es posible corregir los conteos por el efecto de altura (geometría de la muestra).

Los resultados de la radioactividad encontrada en cada uno de los compartimientos del asa se expresan en porcentajes, siendo el 100o/o la suma de la radioactividad de los tres compartimientos.

f) Análisis de los Resultados:

Los resultados se estudiaron utilizando el análisis de varianza (50) aplicado a los logaritmos de las cifras de absorción encontradas; ésto se convirtió de nuevo a la escala aritmética empleando el antilogaritmo de los resultados. En otras palabras, se trabajó con promedios y varianza geométricos; ésto se hizo con el objeto de igualar la varianza dentro de los diversos límites de absorción encontrados, ya que la utilización de cálculos aritméticos reveló que la varianza aumentaba conforme aumentaba el porcentaje de absorción. (Figura 8).

* Porcentaje de eficiencia.

RESULTADOS

1) Absorción

El cuadro 2 y las figuras 9, 10 y 11 resumen los resultados de las absorciones obtenidas en las incubaciones realizadas con tampón Tris a pH 7, a pH 7 más ácido ascórbico y a pH 8. Se puede apreciar que el promedio de absorción de $^{59}\text{FeSO}_4$, además de ser siempre más alto que el de los otros compuestos, aumentó significativamente con la presencia de ácido ascórbico. La adición de este ácido no modificó la absorción de $^{59}\text{FeCl}_3$ ni de $^{59}\text{FeNaEDTA}$. La absorción de $^{59}\text{FeSO}_4$ disminuyó con el tampón Tris a pH 8, en relación al tampón Tris pH 7, aún cuando la diferencia no alcanzó significancia estadística. Para los otros compuestos la variación en pH no tiene mayor efecto con este tampón, sobre todo en el caso de $^{59}\text{FeNaEDTA}$; el $^{59}\text{FeCl}_3$ se absorbe menos a pH 8, aunque la diferencia no llega a ser estadísticamente significativa.

Las absorciones obtenidas en las incubaciones con el tampón de fosfatos a pH 7 y a pH 5.8 (Cuadro 3 y figuras 12 y 13) fueron menores para el $^{59}\text{FeSO}_4$ que cuando este compuesto se incubó con tampón Tris a pH 7, o aún a pH 8 (p menor de 0.01). Las absorciones de $^{59}\text{FeCl}_3$ con el tampón de fosfatos fueron las más bajas, independiente del pH, y a la vez eran menores que con tampón Tris a pH 7 o pH 8, aunque estas disminuciones no alcanzaron significancia estadística.

La absorción de hierro de $^{59}\text{FeNaEDTA}$ también disminuyó, aunque no significativamente, con fosfatos a pH 7 al compararla con los resultados de tampón Tris. Sin embargo, a pH 5.8 en tampón de fosfatos, su absorción fue significativamente mayor que a pH 7 con el mismo tampón (p menor de 0.01) y que a pH 8, con tampón Tris (p menor de 0.05). El aumento en absorción alcanza una p menor 0.1 al compararla con los valores con tampón Tris a pH 7.

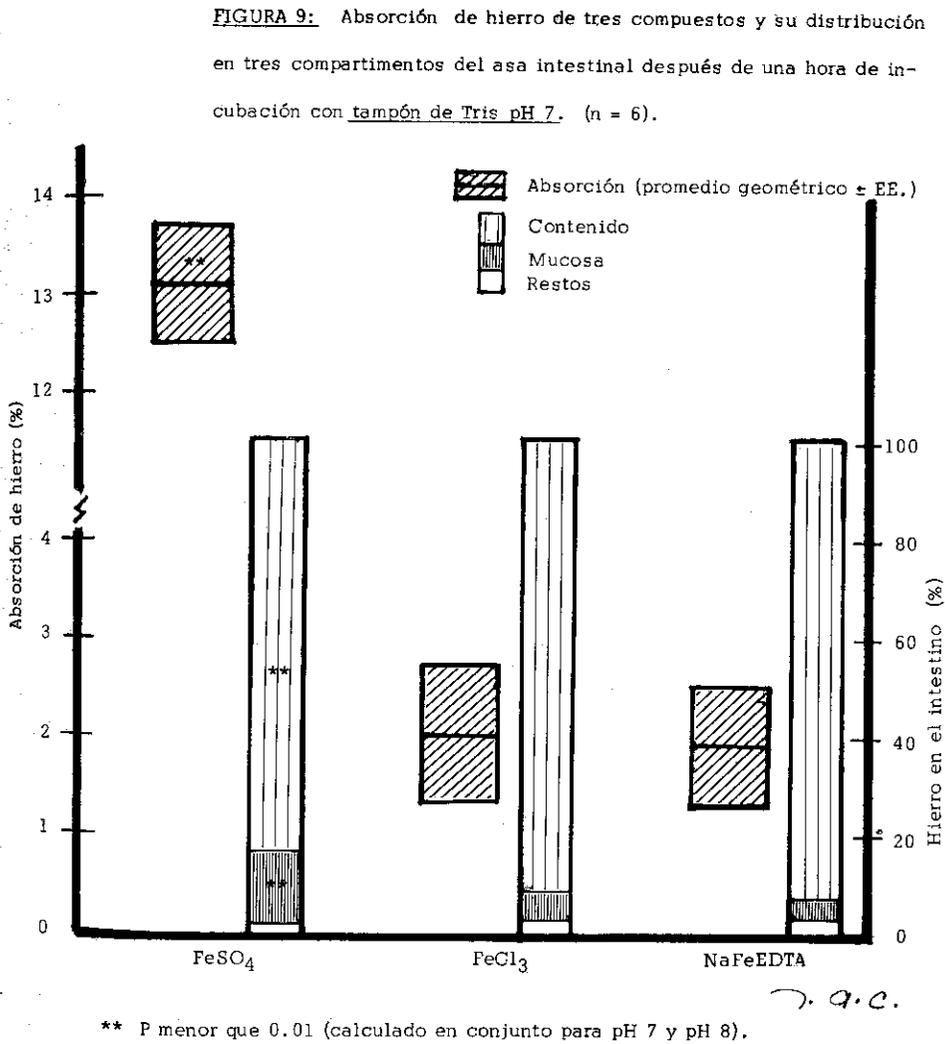
La absorción de hierro a partir de $^{59}\text{FeSO}_4$ se mantuvo baja en

CUADRO No. 2

Porcentajes de absorción de hierro de $^{59}\text{FeSO}_4$, $^{59}\text{FeCl}_3$ y $^{59}\text{FeNaEDTA}$ en asas duodenales aisladas, en 1 hora de incubación con tampón Tris a pH 7, sin y con ácido ascórbico, y a pH 8.

Valores individuales de Absorción (o/o)	pH 7			pH 7 + Ac. Ascórbico			pH 8		
	Fe SO ₄	Fe Cl ₃	Fe Na EDTA	Fe SO ₄	Fe Cl ₃	Fe Na EDTA	Fe SO ₄	Fe Cl ₃	Fe Na EDTA
		23.8	3.2	0.1	26.8	1.5	3.3	0.0	2.2
	16.2	2.2	1.5	34.3	0.2	1.7	7.7	1.5	1.3
	12.6	0.4	2.6	20.9	2.6	1.6	13.0	1.6	1.2
	9.0	1.1	1.9	32.8	7.8	1.7	6.4	2.0	2.5
	14.0	2.1	2.2	49.5	1.7	1.0	14.9	0.0	2.4
	8.4	4.2	2.5	30.3	2.4	0.8	13.6	1.1	0.5
\bar{x} geométrico	13.1	2.0	1.9	31.3	2.2	1.6	7.1	1.5	1.7
E.E.	0.6	0.7	0.6	0.5	0.8	0.6	1.1	0.6	0.6

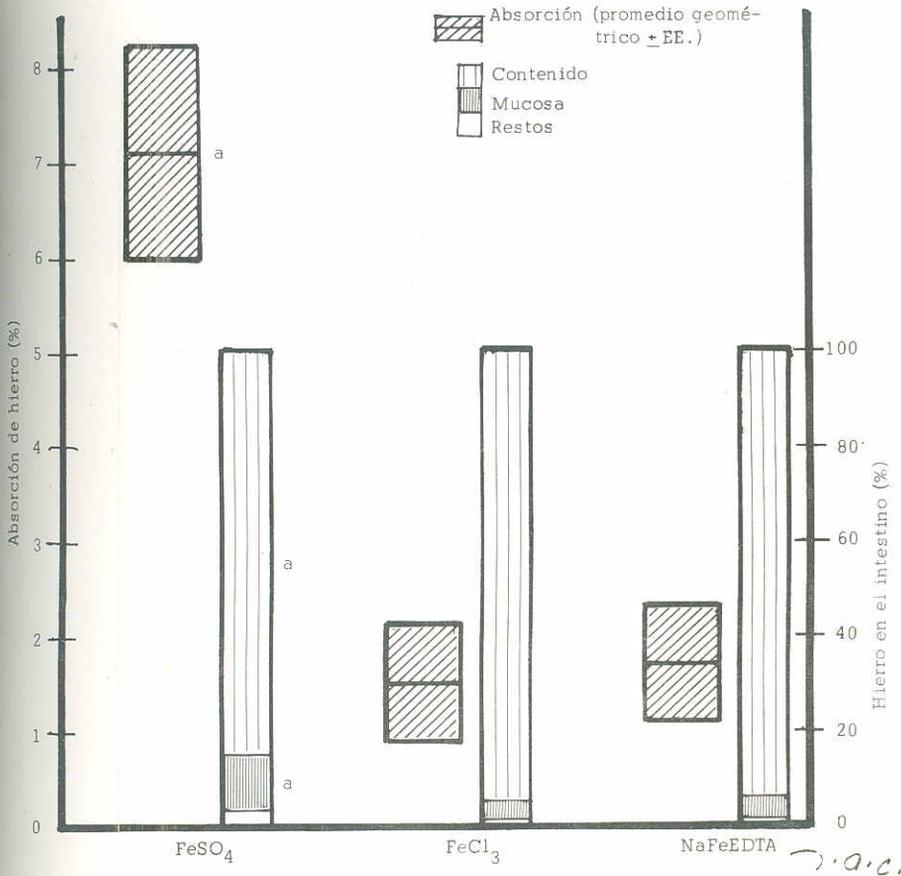
(a) p menor de 0.01 contra FeSO_4 con Tris a pH 8
 (b) p menor de 0.05 contra FeSO_4 con Tris a pH 7



** P menor que 0.01 (calculado en conjunto para pH 7 y pH 8).

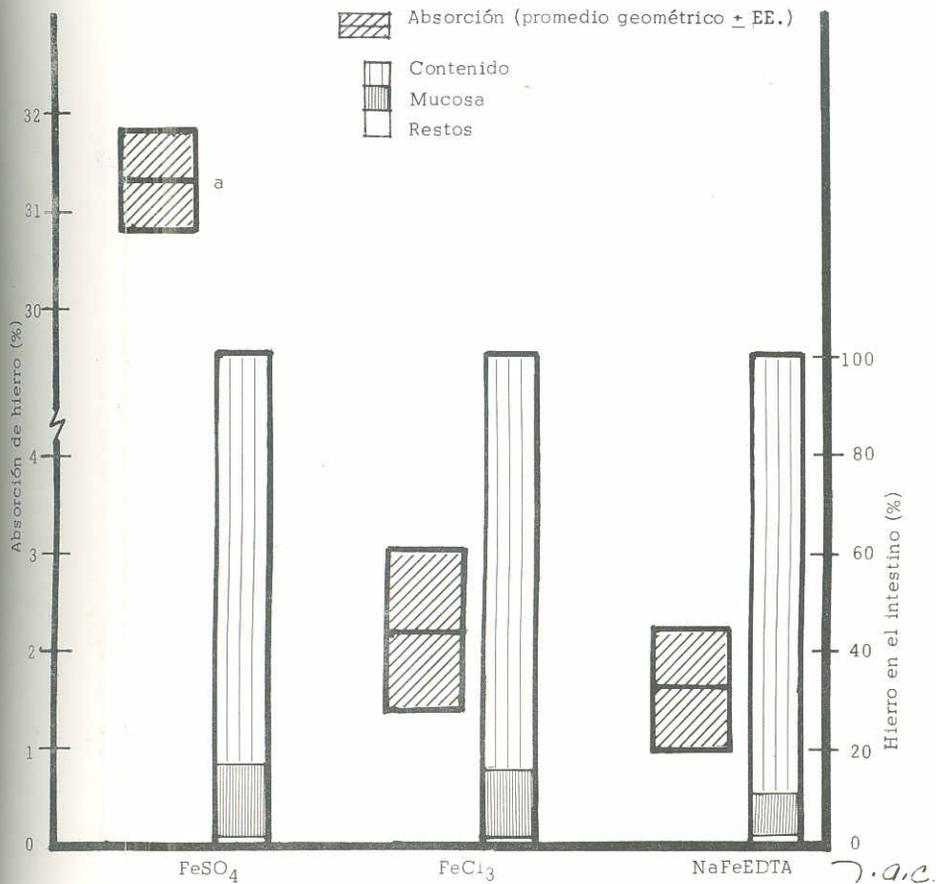
J. G. C.

FIGURA 10: Absorción de hierro de tres compuestos y su distribución en tres compartimentos del asa intestinal después de una hora de incubación con tampón de Tris pH 8 (n = 6).



a: p menor que 0.01 contra FeCl₃ y NaFeEDTA (p calculado para pH 7 y 8 en conjunto).

FIGURA 11: Absorción de hierro de tres compuestos y su distribución en tres compartimentos del asa intestinal después de una hora de incubación con tampón de Tris pH 7 más ácido ascórbico. (n = 6)



a: p menor que 0.01 contra FeCl₃ y NaFeEDTA.

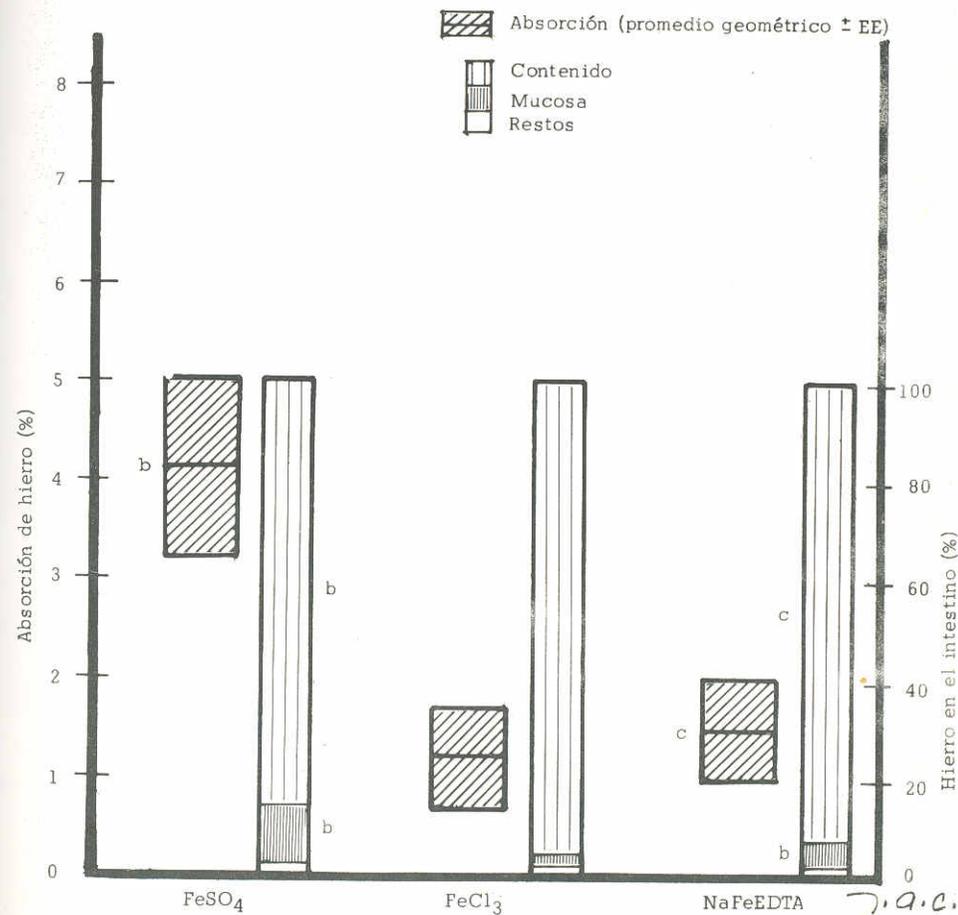
Porcentajes de absorción de hierro de $^{59}\text{FeSO}_4$, $^{59}\text{FeCl}_3$ y $^{59}\text{FeNaEDTA}$ en asas duodenales aisladas, en 1 hora de incubación con tampón de fosfatos a pH 7 y pH 5.8

	pH 7			pH 5.8		
	Fe SO ₄	Fe Cl ₃	NaFe EDTA	Fe SO ₄	Fe Cl ₃	NaFe EDTA
Valores individuales	0.0	1.0	0.9	0.0	0.0	2.6
	7.0	2.0	1.6	5.6	1.4	1.5
de	8.0	0.5	1.5	0.0	3.5	6.5
absorción	3.2	1.4	1.8	0.0	1.2	2.8
(o/o)	5.5	0.0	1.8	6.5	0.0	5.0
	5.0	0.0	1.3	5.5	0.1	2.4
\bar{x} geom	4.1	1.2	1.5	2.4	1.3	3.1 ^(b)
E.E.	0.9	0.5	0.5	1.0	0.7	0.7

(b) p menor de 0.01 contra NaFeEDTA con fosfatos a pH 7.

Porcentajes de absorción de hierro de $^{59}\text{FeSO}_4$, $^{59}\text{FeCl}_3$ y $^{59}\text{FeNaEDTA}$ en asas duodenales aisladas, en 1 hora de incubación con tampón de acetato a pH 7 y pH 5.8.

	pH 7			pH 5.8		
	Fe SO ₄	Fe Cl ₃	NaFe EDTA	Fe SO ₄	Fe Cl ₃	NaFe EDTA
Valores individuales de absorción (o/o)	21.2 0.0 8.1 0.0 12.1 15.2	5.6 2.8 3.6 0.0 0.6 2.0	2.6 4.4 1.3 8.0 2.5 4.8	5.9 2.9 6.7 13.6 2.2 0.0	2.0 1.1 3.0 1.0 0.0 1.1	12.5 2.9 3.0 5.3 5.5 2.4
\bar{X} geom E.E.	5.6 1.6	2.2 0.8	3.3 0.8	3.9 1.0	1.4 0.6	4.4 0.7

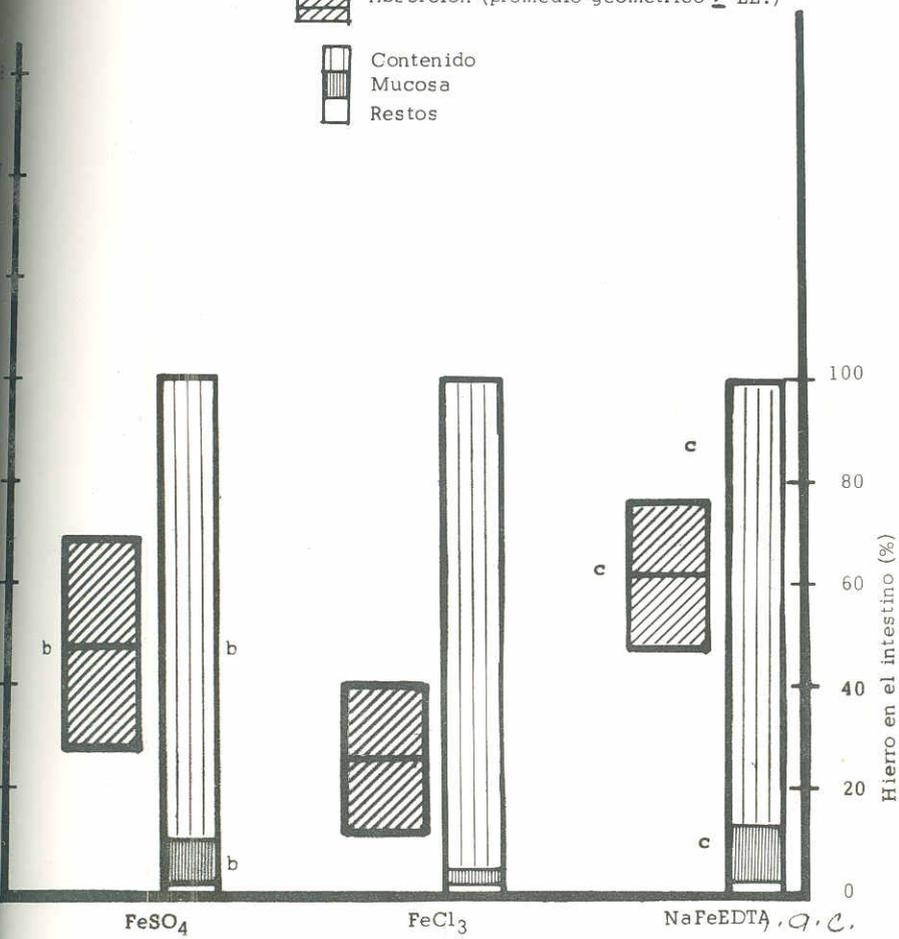


b: p menor que 0.01 contra FeCl₃
 c: p menor que 0.05 contra FeCl₃

p calculado en conjunto para pH 7 y 5.8.

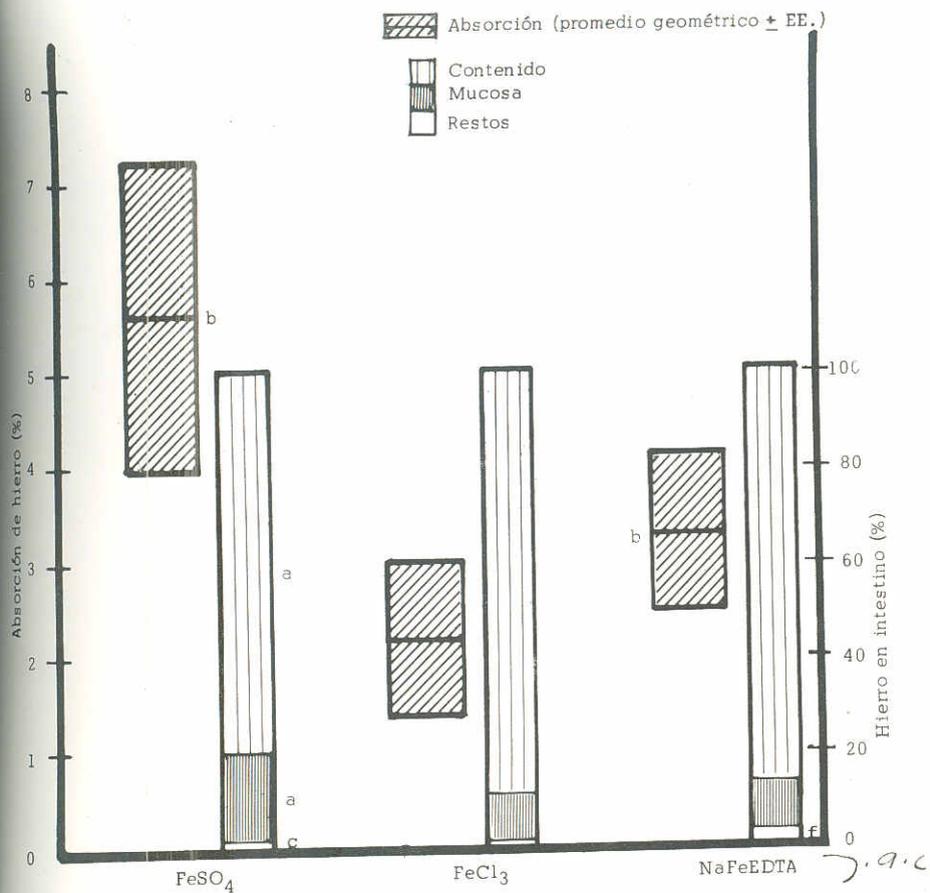
FIGURA 13: Absorción de hierro de tres compuestos y su distribución en tres compartimentos del asa intestinal después de una hora de incubación con tampón de fosfatos pH 5.8 (n = 6).

 Absorción (promedio geométrico \pm EE.)
 Contenido Mucosa
 Restos



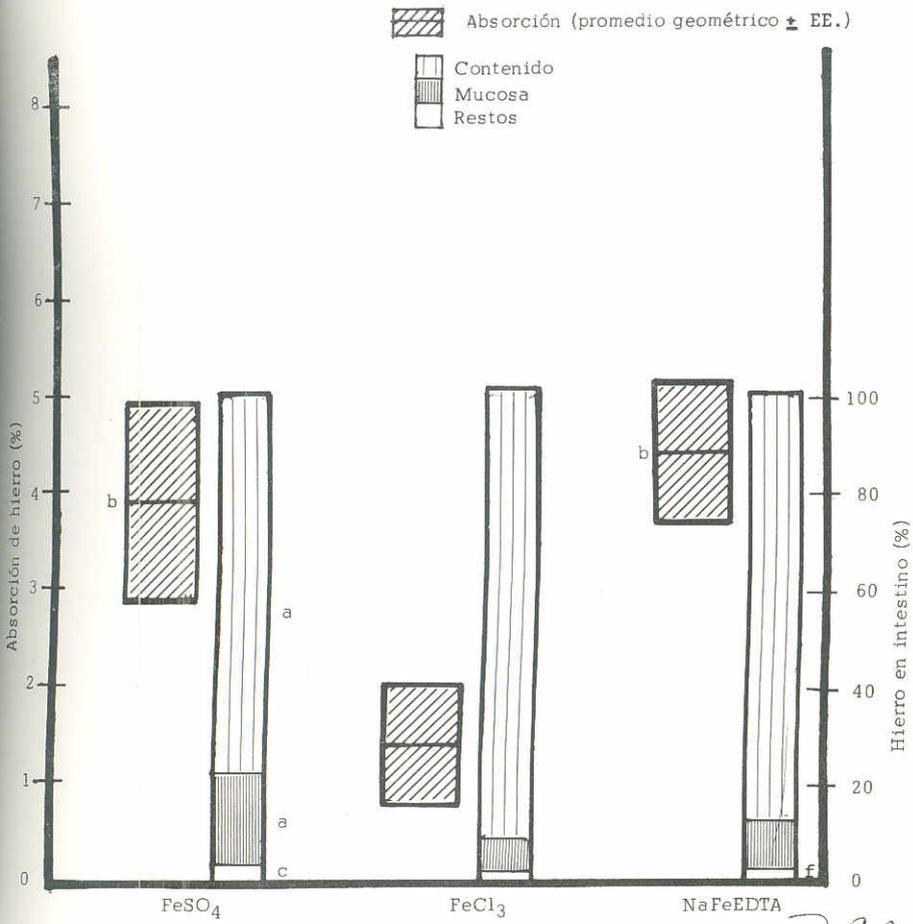
b: p menor que 0.01 contra FeCl₃; p menor que 0.05 contra (p calculado en conjunto para pH 7 y 5.8.)

FIGURA 14: Absorción de hierro de tres compuestos y su distribución en tres compartimentos del asa intestinal después de una hora de incubación con tampón acetato pH 7 (n = 6).



a: p menor que 0.01 contra FeCl₃ y NaFeEDTA; b: p menor que 0.01 contra FeCl₃; c: p menor que 0.05 contra FeCl₃; f: p menor que 0.01 contra FeSO₄ y FeCl₃. (p calculado en conjunto para pH 7 y 5.8)

FIGURA 15: Absorción de hierro de tres compuestos y su distribución en tres compartimentos del asa intestinal después de una hora de incubación con tampón acetato pH 5.8 (n = 6)



a: p menor que 0.01 contra FeCl₃ y NaFeEDTA; b: p menor que 0.01 contra FeCl₃; c: p menor que 0.05 contra FeCl₃; f: p menor que 0.01 contra FeSO₄ y FeCl₃. (p calculado en conjunto para pH 7 y 5.8.)

Q.C.

presencia de tampón de acetato (Cuadro 4 y figuras 14 y 15), aún cuando los valores son ligeramente mayores a los obtenidos con tampón de fosfatos. Al igual que con este último tampón, la absorción del hierro de $^{59}\text{FeSO}_4$ tiende a ser menor a pH 5.8 que a pH 7. La absorción de $^{59}\text{FeCl}_3$ persiste muy baja y sufre pocas modificaciones por la presencia del tampón de acetato, independiente del pH, aún cuando es menor a pH 5.8 que a pH 7. En contraste, la absorción de hierro a partir de $^{59}\text{FeNaEDTA}$ aumenta en tampón de acetato, sobre todo a pH 5.8.

La comparación de la absorción de los tres compuestos en los tres sistemas tampón, al mismo pH de 7, puede verse en la figura 16. Es evidente el descenso en absorción del $^{59}\text{FeSO}_4$ en los sistemas tampón de fosfatos y acetatos. Por el contrario, resalta el poco efecto negativo de los sistemas tampón de fosfatos sobre la absorción de $^{59}\text{FeNaEDTA}$. La absorción de $^{59}\text{FeNaEDTA}$ es superior a la del $^{59}\text{FeCl}_3$, en presencia de tampón de fosfatos, debido a la estabilidad de la absorción del $^{59}\text{FeNaEDTA}$ y al descenso observado con $^{59}\text{FeCl}_3$. Finalmente, en el sistema tampón de acetato, la absorción de ^{59}Fe a partir de $^{59}\text{FeNaEDTA}$ aumenta y se hace significativamente mayor al valor obtenido para el $^{59}\text{FeCl}_3$ e igual al valor para el $^{59}\text{FeSO}_4$.

La misma comparación descrita para los sistemas tampón a pH 7 ha sido hecha para los estudios con pH 5.8 (Figura 17). En este caso, la absorción de los tres compuestos de hierro no se modifica significativamente por el sistema tampón. Tanto con tampón de fosfatos como con tampón de acetato, la absorción de $^{59}\text{FeCl}_3$ es significativamente menor que la de $^{59}\text{FeNaEDTA}$, y es también menor que la del $^{59}\text{FeSO}_4$ con tampón de acetato (p menor de 0.05).

La comparación de los resultados agrupados por sistema tampón, independiente del pH, se muestra en la figura 18. Con el sistema Tris, el $^{59}\text{FeSO}_4$ se absorbe significativamente más que los

otros dos compuestos. La diferencia de absorción del $^{59}\text{FeSO}_4$ con la del $^{59}\text{FeNaEDTA}$ desaparece en los sistemas de fosfatos y acetatos, pero persiste para el $^{59}\text{FeCl}_3$; en estos sistemas el $^{59}\text{FeNaEDTA}$ se absorbe más que el $^{59}\text{FeCl}_3$. Esto se explica porque la absorción de $^{59}\text{FeSO}_4$ disminuye significativamente en los sistemas de fosfato y acetato en relación al de Tris, mientras que la absorción de $^{59}\text{FeCl}_3$ no varía con el sistema tampón, y el sistema de acetato favorece la absorción del $^{59}\text{FeNaEDTA}$.

2) Distribución del ^{59}Fe en los Compartimientos de las Asas Intestinales al Final de la Incubación:

Dado que la gran mayoría de la radioactividad de la pared intestinal se encuentra en la mucosa, y que es muy probable que la radioactividad residual en el resto de la pared se deba a cierto grado de contaminación por restos indetectables de mucosa, sobre todo en los extremos del asa, estos dos compartimientos se tratarán en forma conjunta, llamándoles 'pared'.

El cuadro 5 muestra los resultados obtenidos en las incubaciones con tampón de Tris a pH 7 y a pH 8 y con ácido ascórbico a pH 7. Estos resultados también se expresan en forma gráfica en las figuras 9 a 11. Es evidente que la radioactividad del contenido es menor y la presente en la pared es mayor para el $^{59}\text{FeSO}_4$ que para los otros compuestos, excepto cuando se agregó ácido ascórbico. En este caso la radioactividad del contenido disminuye y la cantidad en la pared aumenta en la incubación con $^{59}\text{FeCl}_3$ y con $^{59}\text{FeNaEDTA}$. La adición de ácido ascórbico, en contraste, no modifica las proporciones encontradas en las incubaciones con $^{59}\text{FeSO}_4$.

Las incubaciones con tampón de fosfatos arrojan los resultados condensados en el cuadro 6 y en las figuras 12 y 13. El descenso en la radioactividad en la pared es evidente y significativo (p menor de 0.01) en el caso del $^{59}\text{FeCl}_3$. Igualmente notorio es el caso de

FIGURA 16: Efecto de tres tampones pH 7 sobre

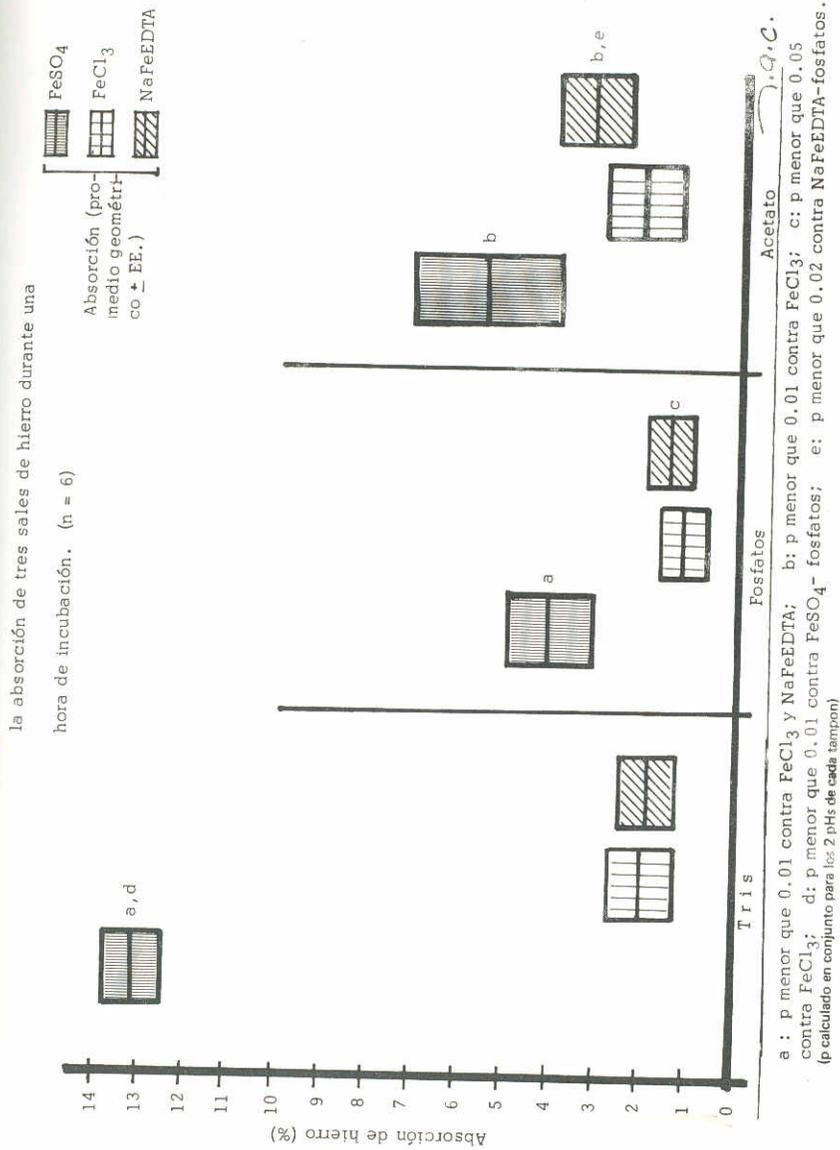


FIGURA 17: Efecto de dos tampones pH 5.8 sobre la absorción de hierro durante una hora de incubación.

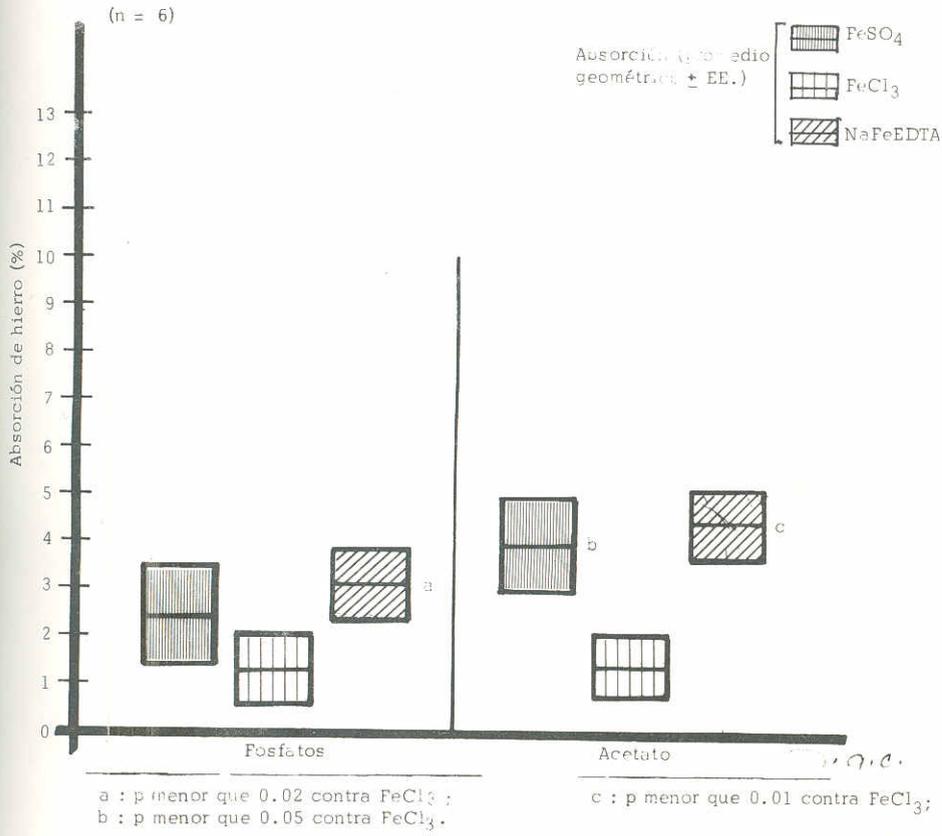
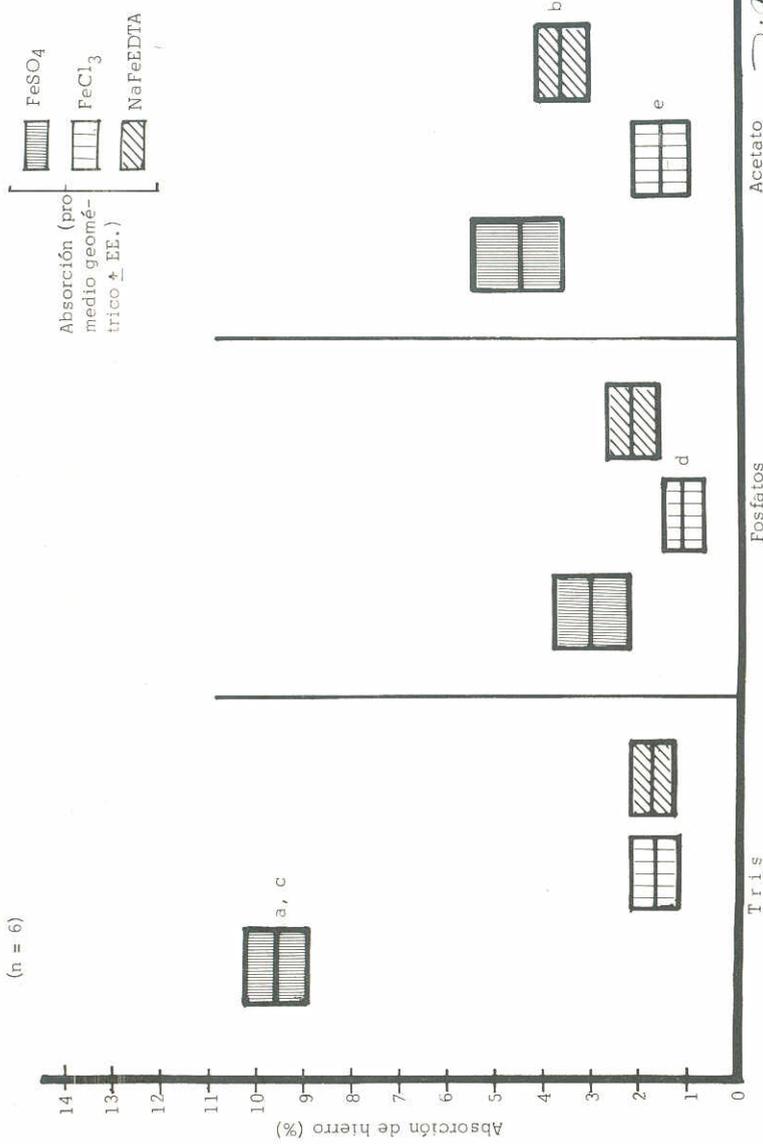


FIGURA 18: Efecto de tres tampones, independiente del pH, sobre la absorción de tres sales de hierro durante una hora de incubación.



a: p menor que 0.01 contra fosfatos y acetato; b: p menor que 0.01 contra Tris y p menor que 0.05 contra fosfatos; c: p menor que 0.01 contra FeCl₃ y NaFeEDTA; d: p menor que 0.01 contra FeSO₄ y p menor que 0.05 contra NaFeEDTA; e: p menor que 0.01 contra FeSO₄ y NaFeEDTA.

Cuadro No. 5

Distribución porcentual, en las partes de asas duodenales aisladas, del hierro de $^{59}\text{FeSO}_4$, $^{59}\text{FeCl}_3$, $^{59}\text{FeNaEDTA}$, después de 1 hora de incubación con tampón Tris a pH 7 sin y con ácido ascórbico, y a pH 8 *

Contenido	pH 7			pH 7 + Ac. Ascórbico			pH 8		
	Fe SO ₄	Fe Cl ₃	FeNa EDTA	Fe SO ₄	Fe Cl ₃	FeNa EDTA	Fe SO ₄	Fe Cl ₃	FeNa EDTA
\bar{X} Geom.	82.7	92.0	92.0	82.8	84.0	88.2	84.1	94.6	93.7
E.E.	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Mucosa									
\bar{X} Geom	14.5	6.3	5.2	15.0	13.6	8.8	11.6	3.5	4.8
E.E.	0.6	0.6	0.6	0.5	0.5	0.5	0.6	0.8	0.5
Restos									
\bar{X} Geom	1.8	1.9	2.1	1.8	1.7	2.5	3.1	1.4	1.5
E.E.	0.7	0.8	0.7	0.5	0.6	0.7	0.7	0.7	0.5

* Cada \bar{X} es resultado de 6 muestras

Cuadro 6

Distribución porcentual en las partes de asas duodenales aisladas, del hierro de $^{59}\text{FeSO}_4$, $^{59}\text{FeCl}_3$ y $^{59}\text{FeNaEDTA}$, después de una hora de incubación con tampón de fosfatos a pH 7 y pH 5.8. *

	pH 7			pH 5.8		
	Fe SO ₄	Fe Cl ₃	NaFe EDTA	Fe SO ₄	Fe Cl ₃	NaFe EDTA
Contenido						
\bar{X} geom:	86.0	94.8	92.1	86.7	95.7	86.4
E.E.	0.4	0.4	0.4	0.5	0.4	0.4
Mucosa						
\bar{X} geom	11.2	3.6	5.6	8.7	2.9	10.7
E.E.	0.5	0.8	0.6	0.9	0.8	0.5
Resto						
\bar{X} Geom:	2.3	1.1	2.0	1.2	1.3	2.5
E.E.	0.8	0.5	0.6	0.6	0.6	0.6

* Cada \bar{X} es resultado de 6 muestras.

Cuadro 7

Distribución porcentual en las partes de asas duodenales aisladas, del hierro de $^{59}\text{FeSO}_4$, $^{59}\text{FeCl}_3$ y $^{59}\text{FeNaEDTA}$ después de 1 hora de incubación con tampón de acetato a pH 7 y pH 5.8*

	pH 7			pH 5.8		
	Fe SO ₄	Fe Cl ₃	NaFe EDTA	Fe SO ₄	Fe Cl ₃	NaFe EDTA
Contenido						
\bar{X} geom	75.9	87.8	82.5	75.3	91.0	86.7
E.E.	0.5	0.4	0.5	0.5	0.4	0.4
Mucosa						
\bar{X} geom	19.0	10.1	10.5	20.1	7.1	10.7
E.E.	0.6	0.7	0.8	0.6	0.7	0.6
Restos						
\bar{X} geom	1.4	1.0	3.0	2.0	1.2	2.2
E.E.	0.8	0.4	0.8	0.7	0.5	0.5

* Cada \bar{X} es resultado de 6 muestras

incubación de $^{59}\text{FeNaEDTA}$ con tampón de fosfatos a pH 5.8. Esto contrasta con los resultados de la pared en las incubaciones de $^{59}\text{FeSO}_4$ y $^{59}\text{FeCl}_3$ bajo las mismas condiciones, los cuales muestran un descenso al comparar sus resultados con los de incubaciones con tampón de fosfatos a pH 7 y con tampón de Tris a pHs 7 y 8.

Las incubaciones con tampón de acetato (Cuadro 7 y Figuras 14 y 15) produjeron, en general, un aumento en la radioactividad encontrada en la pared; ésto es más evidente en el caso del $^{59}\text{FeSO}_4$ (p menor de 0.01).

3) Interrelación entre absorción y radioactividad en mucosa y restos:

Existe una clara relación, dentro de cada sistema tampón, entre la cantidad absorbida y la cantidad presente en la pared del intestino, siendo el componente mayor la radioactividad en la mucosa. La única excepción parece ser el $^{59}\text{FeSO}_4$ con tampón acetato donde, sobre todo a pH 5.8, existe mayor cantidad de ^{59}Fe en la mucosa que lo esperado en base a lo absorbido. Esta interrelación es tratada más detalladamente en la sección de discusión de resultados.

DISCUSION

El método utilizado para llevar a cabo las investigaciones de esta tesis presenta ventajas y limitaciones al emplearse como un sistema de estudio de absorción de hierro con miras a explicar ciertos fenómenos observados en humanos. Por un lado, la estandarización del procedimiento y el uso de animales muy similares permite observar diferencias relativamente pequeñas en los procesos de absorción; además, el poder separar los compartimientos del asa aislada permite avanzar en el conocimiento del proceso de absorción del hierro bajo diversas condiciones. Por otro lado, la extrapolación de resultados al fenómeno de absorción de hierro en el humano debe hacerse con cautela ya que en el presente estudio el animal experimental fue la rata, el asa se aisló del estómago, hígado y páncreas, y las condiciones de incubación utilizando diversos tampones son diferentes a las condiciones usuales de absorción de hierro en el humano.

La consideración de cada uno de estos puntos es importante para colocar esta investigación en una perspectiva adecuada dentro del complejo problema de la absorción de hierro por el humano. No cabe la menor duda que la rata absorbe el hierro en forma diferente al humano; así por ejemplo, para el último el hierro de hem es la mejor fuente de ese mineral, mientras que la rata no lo absorbe (51); igualmente, la rata absorbe en forma eficiente el hierro de compuestos que son muy poco absorbidos por el ser humano (52 y 53). Lo más probable es que la poca absorción del hem se deba a las características de las secreciones gastro-intestinales, ya que la rata sí posee el sistema de hem-oxidasas y su actividad aumenta en la deficiencia de hierro (54 y 55); pero esto no afecta la investigación realizada en esta tesis. La mejor absorción de otros compuestos de hierro probablemente se deba, sobre todo, a las características de las secreciones gástrica, biliar y pancreática de la rata, más que a las características de la mucosa y del sistema de transporte intestinal

de hierro de la mucosa a la sangre. En efecto, estudios de otros investigadores y del INCAP (en progreso) han demostrado claramente que el sitio principal de absorción (33 y 27) y la dinámica de absorción del hierro y su regulación por el estado de nutrición del animal (45 y 56) son muy similares y, por lo tanto, aplicables a lo conocido de estos fenómenos en el humano (57). Con base en estos hechos fue que se decidió estudiar la absorción de hierro en asas separadas tanto del estómago como de las otras secreciones exógenas al intestino mismo, lo cual permite aislar la función de la mucosa de otros factores; es decir que, por este método, se logra además estudiar la influencia de diversos factores sobre la mucosa intestinal en una forma más pura, sin interferencias adicionales.

El sistema de trabajo empleado llenó los requerimientos de la investigación y los resultados obtenidos son similares, en diversos aspectos, a lo que se conoce de la absorción de FeSO_4 , FeCl_3 y NaFeEDTA en el humano (23 y 24). Esta circunstancia permite utilizar los resultados de estos estudios para explicar, dentro de las limitaciones ya mencionadas, el comportamiento del intestino humano en el proceso de absorción de hierro de los compuestos estudiados.

Para este propósito es fundamental el resultado obtenido en el presente estudio, que indica claramente que la absorción de un compuesto ferroso (FeSO_4) solo, en ausencia de sales minerales en el medio inyectado dentro del intestino excepto por Na y Cl y a un pH de 7 (con tampón de Tris), es cerca de 6 veces mayor que la de los otros compuestos conteniendo hierro férrico (FeCl_3 y NaFeEDTA); esto es muy similar a lo observado en el humano al dar estas sales por boca en soluciones acuosas (58). Esta circunstancia ha sido utilizada en este trabajo para tomar como base de comparación (100o/o) la absorción de hierro de FeSO_4 a pH 7 con tampón Tris, en la expresión del efecto de diversos tratamientos (pHs, sales diversas y otros tampones) sobre la absorción de hierro.

En el cuadro 8 se aprecian las absorciones de hierro relativas al 100o/o del FeSO_4 en las condiciones ya indicadas. Con el uso de Tampón de Tris a pH 7 la absorción del hierro de FeCl_3 fue el 15o/o y la del NaFeEDTA fue del 14o/o. Además, bajo las condiciones del estudio el comportamiento del hierro férrico del NaFeEDTA es similar al del hierro férrico no quelado (8). La absorción de FeSO_4 encontrada en presencia de tampón de Tris a pH 7 es consistente con la encontrada en otros estudios realizados bajo similares condiciones (9). El incremento en la absorción del hierro del FeSO_4 al agregar ácido ascórbico fue notorio. También es evidente que el agregado de este ácido no modificó la absorción del

FeCl_3 ni del NaFeEDTA . Estos resultados parecen sorprendentes ya que en el humano la absorción de FeSO_4 administrado en solución acuosa no se mejora con la adición de ácido ascórbico a dosis similares a las empleadas en este trabajo. Las diferencias pueden explicarse fácilmente, sin embargo, al recordarse que en los estudios en humanos el FeSO_4 se ha administrado en solución ácida (con H_2SO_4 a pHs menores de 3) precisamente para mantener el hierro en forma ferrosa ya que a pH 7, en breves momentos, el hierro del FeSO_4 se convierte en hierro férrico. El efecto positivo del ácido ascórbico en la absorción del FeSO_4 en las incubaciones a pH 7 puede deberse a la formación casi instantánea de ascorbato de hierro. Este quelato (ascorbato de hierro), así como otros quelatos solubles es bien absorbido y transfiere rápidamente su hierro a la transferrina (10). En el humano, la absorción de hierro a partir de sales férricas en solución acuosa sí se mejora con el agregado de ácido ascórbico. La ausencia de un efecto del ácido ascórbico en el caso de incubaciones con FeCl_3 y NaFeEDTA a pH 7, encontrados en este trabajo, es más difícil de explicar ya que este ácido aumentó la incorporación de hierro de estos compuestos a la mucosa. Parece ser que con estos compuestos la falta de mejor absorción con ácido ascórbico está relacionada a una ineffectividad en aumentar la transferencia de hierro de la mucosa a la transferrina circulante. La razón de esto último no puede sugerirse con los datos de estos estudios.

Cuadro No. 8

Absorción promedio relativa (o/o) de $^{59}\text{FeSO}_4$, $^{59}\text{FeCl}_3$ y $^{59}\text{FeNaEDTA}$ en diversas condiciones de incubación.

	$^{59}\text{FeSO}_4$	$^{59}\text{FeCl}_3$	$^{59}\text{FeNaEDTA}$
Tris pH 7	100 o/o	15	14
Tris pH 8	54	11	13
Fosfatos pH 7	31	9	11
Fosfatos pH 5.8	18	10	24
Acetatos pH 7	43	17	25
Acetatos pH 5.8	30	11	34
Ascorbato pH 7	239	17	12

Cuadro No. 9

Incorporación de ^{59}Fe a la mucosa del asa sialda después de 60 minutos de incubación. Los resultados son expresados como o/o de los obtenidos con el $^{59}\text{FeSO}_4$ a pH 7 con tampón Tris.

	$^{59}\text{FeSO}_4$	$^{59}\text{FeCl}_3$	$^{59}\text{FeNaEDTA}$
Tris pH 7	100 o/o	43	36
Tris pH 8	80	24	33
Fosfatos pH 7	77	25	39
Fosfatos pH 5.8	60	20	74
Acetatos pH 7	131	70	73
Acetatos pH 5.8	139	49	74
Ascorbato pH 7	103	94	61

Los cambios introducidos por el sistema Tampón a un pH constante (pH 7) también se presentan en el cuadro 8. Con el FeSO_4 , la presencia de fosfatos o acetato se tradujo en una clara disminución en la absorción de hierro en relación a la obtenida con Tris. Estos dos sistemas, sin embargo, tuvieron un efecto distinto sobre la incorporación de hierro en la mucosa (Cuadro 9): el primero produjo una disminución mientras que el segundo ocasionó un aumento. Los resultados obtenidos con el tampón de fosfatos son una clara indicación del efecto adverso del ion fosfato en presencia de hierro soluble, al producirse polímeros de fosfato de hierro los cuales son insolubles e inabsorbibles (60). En el caso del tampón de acetato el efecto inhibitorio de la absorción parece radicar en la transferencia mucosa-transferrina. El tampón de fosfatos también produjo una disminución de la absorción de hierro en el caso del FeCl_3 y del NaFeEDTA , aunque el efecto fue mucho menor con este último compuesto. Parecería entonces, que con el FeCl_3 el poco hierro soluble a pH 7 reaccionó con los fosfatos disminuyendo aún más al hierro capaz de penetrar la mucosa. Por el contrario, el hierro quelado con EDTA parece no intercambiarse con los fosfatos lo cual se traduce en una absorción esencialmente constante y en una incorporación a la mucosa igual a la observada con Tris a pH 7.

Con los compuestos férricos (FeCl_3 y NaFeEDTA) el tampón de acetato a pH 7 tuvo efectos diferentes: no alteró la absorción de FeCl_3 y aumentó la del NaFeEDTA (Cuadro 1). Con ambos compuestos la incorporación del hierro a la mucosa aumentó sugiriendo que existía más hierro soluble el cual no era capaz de transferirse a la transferrina, en el caso del FeCl_3 , mientras que éste sí se transfería en el caso del NaFeEDTA .

El efecto del pH sobre la absorción fue evidente (25): El uso de soluciones tampón a pH 5.8 y 8 tuvo un efecto negativo sobre la absorción del hierro de FeSO_4 en comparación a la observada en presencia de las mismas soluciones con tampón a pH 7 (Cuadros

8 y 10). El mayor efecto negativo se observa al aumentar el pH a 8 con el tampón de Tris, donde la absorción de hierro del FeSO_4 es el 54% de la encontrada con pH 7. Como es conocido, el hierro ferroso se oxida rápidamente a férrico en un medio oxidante (pH alto, con exceso de OH) y en presencia de oxígeno disuelto en el medio de incubación. Como era de esperar, la elevación del pH tuvo muy ligero efecto o no tuvo efecto del todo sobre la absorción de los compuestos férricos, los cuales ya estaban totalmente oxidados.

Las modificaciones en la absorción del hierro producidas en medios de incubación a pH 5.8 con tampones de fosfatos y acetato son opuestas según el compuesto de hierro estudiado. En estos casos, dos cambios simultáneos fueron provocados: cambio de pH y tampón diferente al Tris. La acción inhibitoria del tampón de fosfatos se acentúa en el caso del FeSO_4 a pH 5.8 en relación a los resultados con pH 7 (Cuadro 10).

Esto sugiere fuertemente que a menor pH hay más hierro soluble capaz de reaccionar con los fosfatos y parece confirmarse por la menor incorporación de hierro en la mucosa a pH 5.8 que a pH 7 (Cuadro 9); la misma explicación (reacción de hierro libre con fosfatos) se aplica a los datos de absorción de FeCl_3 , los cuales permanecen bajos con el pH 5.8. A este pH la incorporación de hierro a la mucosa es menor que a pH 7. La absorción de hierro del NaFeEDTA , en contraste, aumenta con el pH 5.8 a pesar de la presencia de fosfatos, indicando que a menor pH hay más NaFeEDTA soluble pero que permanece quelado, evitando la formación de fosfatos insolubles, permaneciendo así más disponible para penetrar a la mucosa.

El descenso del pH con tampón de acetato inhibe la absorción de hierro a partir de FeSO_4 y de FeCl_3 y la aumenta en el caso del NaFeEDTA (Cuadros 8 y 10). El efecto inhibitorio sobre el FeSO_4 es menor al observado con el tampón de fosfatos al mismo pH. La razón de este menor efecto inhibitorio parece radicar en que la

Efecto de pH sobre la absorción de hierro de diversos compuestos. La absorción con los distintos Tampones a pH 7 se toma como 100o/o.

	$^{59}\text{FeSO}_4$	$^{59}\text{FeCl}_3$	$^{59}\text{FeNaEDTA}$
Tris pH 7	100 o/o	15	14
Tris pH 8	54	11	13
Fosfatos pH 7	100 o/o	29	37
Fosfatos pH 5.8	58	32	76
Acetatos pH 7	100 o/o	39	59
Acetatos pH 5.8	70	25	78

captación por la mucosa no estuvo disminuída, como ocurrió con el tampón de fosfatos, sino que se encontró elevada. El problema de absorción parece, entonces, radicar en la transferencia de mucosa a torrente sanguíneo. Con el FeCl_3 la inhibición ocurre también en este paso ya que la captación mucosa está elevada en relación a la encontrada con el tampón de fosfatos al mismo pH de 5.8. Como se observó en ocasiones anteriores, el NaFeEDTA se comportó en forma distinta al FeSO_4 y, sobre todo, al FeCl_3 . En efecto, tanto la captación de la mucosa como la absorción total aumentaron con el tampón de acetato a pH 5.8. Esto puede explicarse esencialmente por el efecto de pH que mantiene el NaFeEDTA más soluble, pero en forma quelada. Aún más, el hierro del NaFeEDTA parece mantenerse en forma disponible para entrar al plasma.

Los resultados de estos estudios permiten, además, adentrarse en algunos aspectos dinámicos de la absorción intestinal de los compuestos de hierro investigados, dividiendo su absorción en dos etapas: 1) Captación por la mucosa y 2) Transferencia del hierro de la mucosa al plasma circulante (61). (Fig. 19).

Varios autores (32, 62 y 63) han encontrado que el proceso de absorción sigue una curva similar a las de cinética enzimática cuando se colocan diferentes dosis de hierro dentro del lumen intestinal; por otra parte, algunos autores refieren que a bajas dosis de hierro la captación de hierro por la mucosa ocurre por difusión; mientras que, al aumentar la dosis, la misma sigue también una curva similar a la de cinética enzimática. En estos estudios se colocó siempre la misma cantidad de hierro elemental, pero en diferentes estados de reducción y en presencia de diferentes compuestos que lo harían más o menos disponible a ser captado por la mucosa intestinal. Se sabe, por ejemplo, que diversos medios de incubación cambian el estado físico-químico y que existe una relación directa entre la biodisponibilidad del hierro y la solubilidad del mismo, así como una relación inversa entre el tamaño de la partícula de hierro y su biodisponibilidad

(64 y 65); además se ha encontrado que compuestos de hierro que forman polímeros con peso molecular mayor de 100,000 son pobremente captados por la mucosa (32). En lo que respecta a los quelantes de hierro se sabe que hay una relación directa entre el hierro que es captado por la mucosa y la mayor o menor facilidad con que el quelante cede su hierro a la transferrina (Figura 20) (66, 67 y 68).

El análisis de los resultados de esta tesis, en busca de la dinámica del proceso de absorción de los diversos compuestos en las diferentes condiciones de incubación, se hizo relacionando el promedio de absorción de hierro con el promedio del hierro captado por la mucosa de cada grupo de resultados. Esta relación se presenta en la figura 21, la cual muestra una curva parecida a las de cinética enzimática y similar a la reportada por varios autores en asas intestinales de ratas incubadas con diferentes dosis de hierro elemental (32, 62 y 63). La captación del hierro por la mucosa aumenta en forma lineal en los estudios que provocaron una absorción de hierro menor de 2.50/o, con la ecuación siguiente:

$$\text{captación por la mucosa} = -3.3 + 5.7 (\text{absorción de hierro})$$

$$(r = 0.70)$$

Omitiendo los puntos de captación mucosa alta correspondientes al FeSO_4 incubado con tampón de acetato se obtiene otra relación lineal para las absorciones mayores de 2.50/o, la cual es caracterizada por la ecuación:

$$\text{captación por la mucosa} = 10.5 + 0.16 (\text{absorción de hierro})$$

$$(r = 0.89)$$

Estas dos líneas se cruzan precisamente en el nivel de absorción de 2.50/o y sugieren que para el FeCl_3 la absorción es limitada por la captación por la mucosa (absorción siempre menor a 2.50/o). Lo mismo puede expresarse para la absorción de FeSO_4 , con tampón de fosfatos a pH 5.8 y para la absorción de NaFeEDTA , excepto cuando este compuesto se incubaba con tampón de fosfatos a pH 5.8

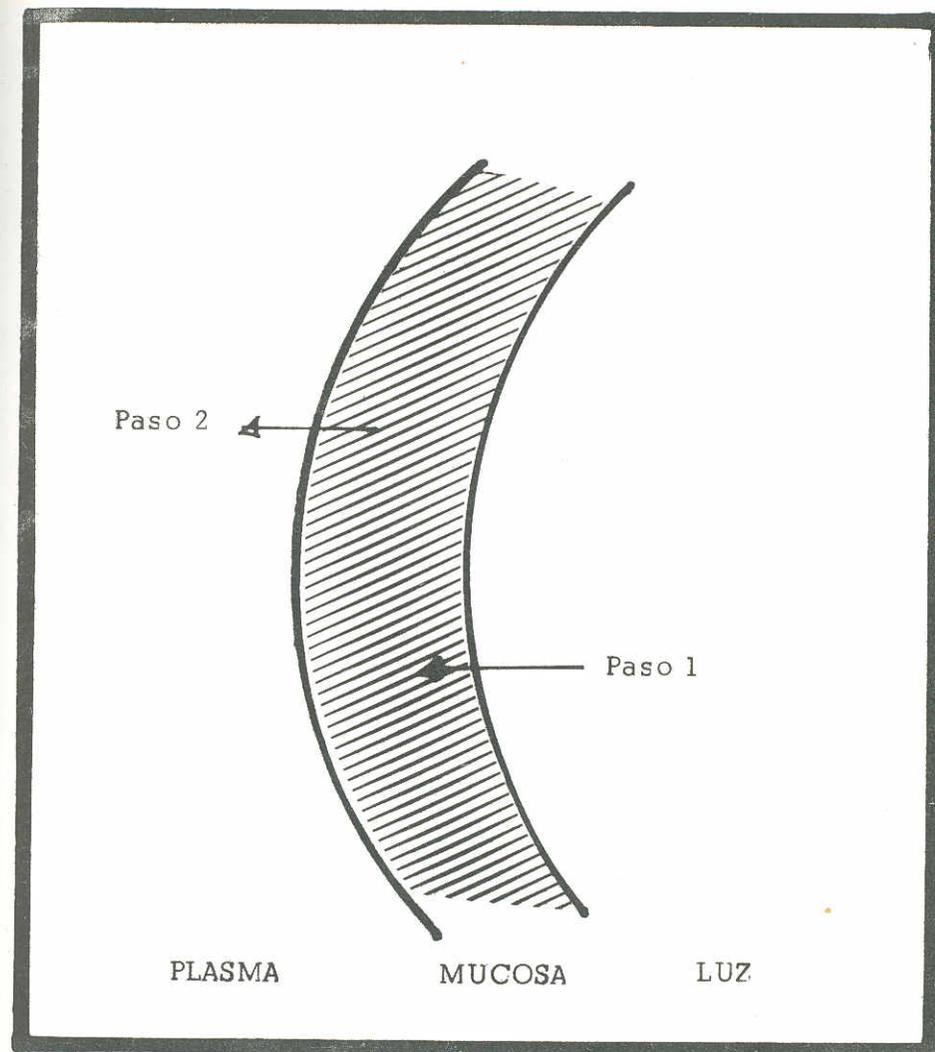


FIGURA 19: Esquema que representa la teoría de la absorción de hierro en dos pasos.

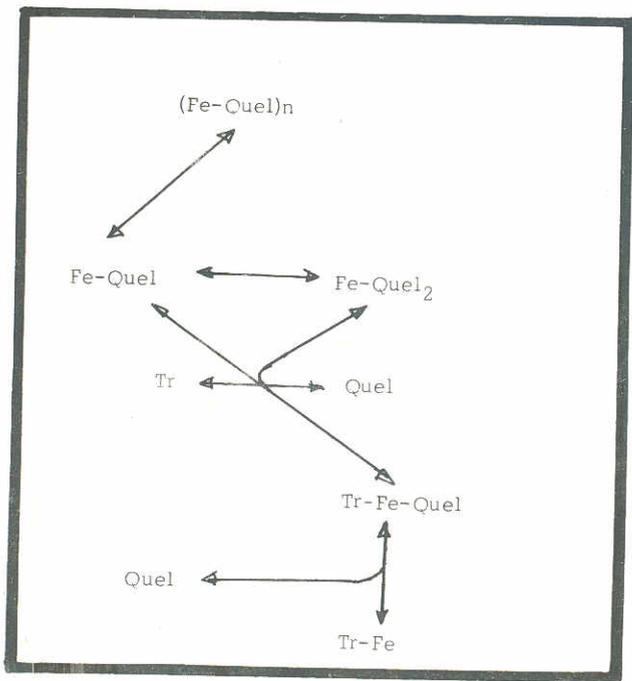
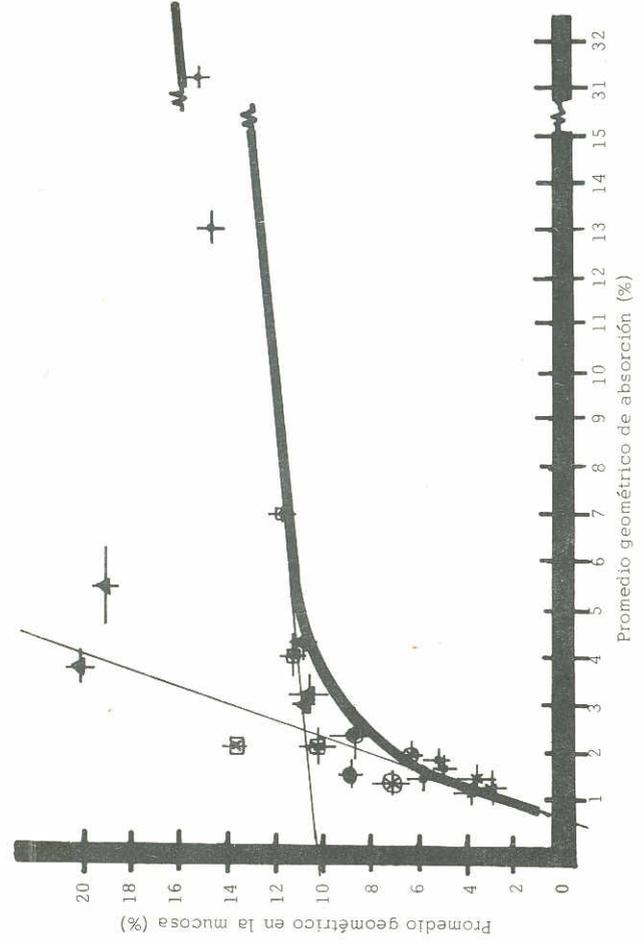


FIGURA 20: Mecanismo propuesto para la transferencia del hierro de quelatos de bajo peso molecular a la apo-transferrina involucrando al complejo ternario inmediato proteína-hierro-quelato. El hierro polinuclear debe ser depolimerizado antes de su unión a la proteína. La presencia de agentes quelantes en exceso, particularmente citrato, lleva a la formación del complejo bis, que reacciona rápidamente. Tomado de: Spiro, Th. G. y P. Saltman, Polynuclear Complexes of Iron and their Biological Implications, en Structure and Bonding, editado por P. Hemmerich et al. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York 1969, Volumen 6, página 149.)

FIGURA 21: Relación entre el promedio geométrico de absorción de cada una de las sales de hierro con diferentes soluciones tampón y el promedio geométrico del hierro proveniente de dichas sales que fue captado por la mucosa. (La curva fue trazada con base en las dos líneas de regresión lineal (—)), excepto por la línea curva.)

- ▲ NaFeEDTA-PO₄ 5.8
- ◆ NaFeEDTA-Acet. 5.8
- NaFeEDTA-Acet. 7
- FeSO₄-Tris 7
- FeSO₄-Acid. Ascor.
- FeSO₄-Tris 8
- ◇ FeSO₄-PO₄ 7
- FeSO₄-PO₄ 5.8
- ▲ FeSO₄-Acetato 7
- FeSO₄-Acetato 5.8
- ✱ FeCl₃-PO₄ 5.8
- FeCl₃-PO₄ 7
- ✱ FeCl₃-Tris 8
- FeCl₃-Acetato 5.8
- FeCl₃-Tris 7
- FeCl₃-Acid. Ascor.
- FeCl₃-Acetato 7
- NaFeEDTA-Tris 7
- NaFeEDTA-Tris 3
- NaFeEDTA-PO₄ 7
- NaFeEDTA-A. Ascor.



EE. Mucosa
 PROMEDIO — EE. Absorción

y con tampón de acetato tanto a pH 7 como a pH 5.8.

En el proceso de absorción de FeSO_4 la mucosa parece saturarse excepto en el caso previamente indicado (tampón de fosfatos a pH 5.8). La regulación de la absorción del hierro, en estos casos, se debe probablemente a la velocidad de transferencia del hierro al plasma. Lo mismo parece ocurrir, aunque en menor grado, con el hierro del NaFeEDTA incubado con tampones a pH 5.8 y con tampón de acetato a pH 7. El tampón de acetato parece tener un efecto adverso sobre el proceso de absorción del hierro de FeSO_4 , sobresaturando la mucosa y evitando el paso al plasma. Podría especularse que el hierro reacciona con el acetato originando un compuesto de acetato férrico o ferroso, según el caso, que dentro de la mucosa se precipite, impidiendo el paso al torrente sanguíneo. Para aclarar este punto se necesitan estudios adicionales.

Los resultados obtenidos con el NaFeEDTA y con la adición de ácido ascórbico también sugieren que ambos compuestos entran a la mucosa intestinal como quelatos de hierro y que la transferencia del hierro quelado a los sistemas de transporte plasmático es facilitada por dicho estado del mineral (69).

Finalmente, con el objeto de buscar alguna explicación adicional a las observaciones hechas, se realizaron pruebas in-vitro mezclando cada una de las soluciones de los tres distintos compuestos de hierro estudiados con cada uno de los seis tampones usados y con ácido ascórbico en presencia de tampón Tris a pH 7. Los componentes se mezclaron en las mismas proporciones usadas en los experimentos de absorción. Los resultados que se presentan en el Cuadro 11 confirman el efecto de los fosfatos que forman polímeros de hierro^{*} los cuales se manifiestan como precipitados francos o como enturbiamiento de las soluciones. El mismo efecto se observó con el tampón de acetato a pH 7, pero no a pH 5.8.

Los pHs resultantes después de combinar la solución de hierro

* (60, 70 y 71)

Prueba in-vitro hecha mezclando cada una de las soluciones de las tres sales de hierro estudiadas (FeSO_4 , FeCl_3 y NaFeEDTA) con cada una de las soluciones tampón usadas, a la proporción de 0.2 de solución de hierro por 0.3 de solución tampón.; resultados leídos dentro de la siguiente media hora a la mezcla. (n = 1)

	FeSO_4			FeCl_3			FeNaEDTA		
	pH	Turbi- dez	Precipi- tado	pH	Turbi- dez	Preci- pitado	pH	Turbi- dez	Preci- pitado
Tris pH 7	6.5	++	+++	4.4	no	no	6.8		
Tris pH 8	8.0	no	no	8.1	+	no	8.0		Todas
Fosfatos pH 7	6.8	++	no	6.8	++	++	6.9		
Fosfatos pH 5.8	6.0	+++	no	5.6	++	++	5.8		claras
Acetatos pH 7	6.5	++	no	6.2	+	+++	6.3		
Acetatos pH 5.8	5.7	no	no	5.6	no	no	5.7		y
Ascorbato pH 7	6.6	no	no	4.2	no	no	6.7		sin precipitados

con el tampón, en el caso del Tris y del tampón de acetato, a pH 7, reflejan la reducida capacidad amortiguadora de estas soluciones al pH indicado. Sin embargo, estos resultados in-vitro no deben ser tomados como totalmente extrapolables al medio interior del asa duodenal, donde existen otros muchos factores amortiguadores tales como proteínas y secreciones con capacidad tampón.

Los hechos observados sobre el comportamiento intestinal de la sal sódica férrica de EDTA sugieren que este compuesto podría ser adecuado para la fortificación de alimentos con hierro, dada la poca o casi nula inhibición de la absorción de su hierro por factores presentes en la dieta, como fosfatos o acetato. Esta condición asegura una buena absorción del hierro cuando se mezcla con la dieta usual centroamericana.

Lo anterior ya ha sido observado en los estudios realizados por el INCAP en poblaciones guatemaltecas y por Layrisse y Martínez-Torres en Venezuela (20-24), por lo que el presente trabajo da un apoyo sólido a la hipótesis que la absorción tan estable del hierro de NaFeEDTA se debe a su protección en el intestino de las reacciones con inhibidores presentes en alimentos vegetales.

Lo anterior, sumado al hecho que el NaFeEDTA en la dieta aumenta la absorción del hierro presente en los alimentos (23 y 24), hace que esta forma de hierro sea ventajosa y superior al FeSO_4 para propósitos de fortificación de alimentos. Dicha aseveración es válida a pesar que el FeSO_4 sólo, sin comida, se absorbe más que el NaFeEDTA , ya que en presencia de inhibidores la absorción del primero se hace igual o menor a la del segundo compuesto. Además, el FeSO_4 no tiene un efecto facilitador sobre la absorción del hierro de la dieta. El NaFeEDTA presenta la ventaja adicional que no produce alteraciones de sabor, cambio de color y otras que causa el FeSO_4 al usarlo para fortificación de alimentos.

CONCLUSIONES

- 1) El método experimental de asa duodenal ligada es adecuado para estudios de absorción de hierro en ratas. El procedimiento quirúrgico en sí es funcional y las soluciones de prueba pueden modificarse según los objetivos de cada estudio.
- 2) Una cámara para mantenimiento del ambiente a temperatura y humedad controladas es indispensable para lograr una estabilidad del animal anestesiado dentro de sus límites fisiológicos y para asegurar resultados confiables.
- 3) Los patrones de absorción del hierro no hemínico en ratas son, en líneas generales, similares a los patrones en humanos y parecen reflejar el comportamiento de la mucosa intestinal independiente de la especie.
- 4) De las tres formas de hierro estudiadas en asas aisladas:
 - a) El sulfato ferroso, solo, fue la forma mejor absorbida en ausencia de sustancias y condiciones interferentes. Este compuesto de hierro también fue el más afectado por los facilitadores e inhibidores de la absorción del hierro.
 - b) El cloruro férrico, solo, fue la forma de hierro menos absorbida por la rata.
 - c) La sal sódica férrica de EDTA, sola, fue menos absorbida que el sulfato ferroso, pero su absorción fue superior a la del cloruro férrico en condiciones adversas.

- 5) El efecto facilitador o inhibidor de diversas sustancias sobre la absorción de los distintos compuestos de hierro ocurre por mecanismos distintos según las características de estas sustancias y del compuesto.
- 6) El ácido ascórbico favoreció marcadamente la absorción del hierro de FeSO_4 ; sobre el FeCl_3 y el NaFeEDTA su efecto es facilitador de la captación por la mucosa, pero no de la absorción en sí.
- 7) Los fosfatos inhiben la absorción de hierro cuando éste se encuentra en forma libre, pero no cuando está quelado.
- 8) El acetato inhibe la absorción del hierro de FeSO_4 ; no afecta la del FeCl_3 y aumenta la del NaFeEDTA .
- 9) La absorción de hierro de FeSO_4 disminuye a pH 8 y 5.8, en comparación a pH 7, con los mismos tampones.
- 10) El efecto inhibidor del acetato sobre la absorción del hierro ocurre sobre la transferencia de la mucosa al plasma, la cual parece bloqueada.
- 11) La absorción de FeCl_3 , en general, está limitada por la captación de éste por la mucosa intestinal. Lo mismo sucede con la forma quelada de hierro férrico (NaFeEDTA), excepto en los casos en que éste se incubó con fosfatos a pH 5.8 o con acetato a los pHs de 7 y 5.8.
- 12) En el presente estudio, la mucosa se saturó durante el proceso de absorción de FeSO_4 , excepto en presencia de tampón de fosfatos a pH 5.8.
- 13) El comportamiento del NaFeEDTA en asas aisladas es diferente al del FeSO_4 y FeCl_3 , siendo similar al del hierro hemínico en

humanos. Esta característica podría considerarse favorable para el uso de NaFeEDTA en programas de fortificación de alimentos con hierro.

- 14) Es necesario hacer más estudios para encontrar explicaciones a ciertos hechos aún no claros en el comportamiento intestinal del hierro de los diferentes compuestos.
- 15) El objetivo primordial de este trabajo se cumplió por cuanto la sal sódica férrica de EDTA mostró mejor comportamiento que las otras dos formas de hierro en presencia de inhibidores de la absorción del metal. Este hecho es de suma importancia al considerar al NaFeEDTA para su uso en fortificación de alimentos con hierro.

RECOMENDACIONES

- 1) Realizar estudios adicionales en esta misma línea con otros inhibidores de la absorción del hierro, como fitatos, ácido tánico, desferrioxamida, etc.
- 2) Hacer experimentos similares con ratas anémicas para comparar los efectos de las sustancias inhibidoras y facilitadoras de la absorción del hierro en esta situación y determinar las características de absorción y captación por la mucosa en estados de deficiencia de hierro.
- 3) Usar, en los experimentos de absorción en ratas, técnicas que esclarezcan el estado del hierro en el medio intestinal, y de fraccionamiento a nivel sub-celular, para lograr determinar más exactamente el comportamiento intestinal del hierro de los diferentes compuestos.
- 4) Usar una cámara para mantenimiento de un ambiente a temperatura y humedad controladas cuando se trabaje con el método de asa duodenal aislada o por cualquier otro que requiera anestesia general por largos períodos de tiempo o incisiones abdominales amplias.
- 5) Realizar investigaciones químicas y bioquímicas del medio intestinal y de la mucosa, y experimentos de absorción, para esclarecer el verdadero efecto del acetato sobre la absorción del hierro.
- 6) Hacer estudios usando $^{59}\text{FeNa}^{14}(\text{C})\text{EDTA}$ para especificar mejor el papel del quelato de EDTA en los procesos de absorción de hierro.

BIBLIOGRAFIA

1. World Health Organization. "Nutritional Anemias". WHO Group of Experts. WHO Tech. Rep. Ser., número 503: 1-29. 1972.
2. Cook, J. D.; J. Alvarado, A. Gutnisky, M. Jamra, J. Labardini, M. Layrisse, J. Linares, A. Lorfa, V. Maspes, A. Restrepo, G. Reynafarje, L. Sánchez-Medal, H. Vélez y F. Viteri. "Las carencias nutricionales y la anemia en Latinoamérica. Estudio en colaboración." Bol. Of. San. PanAm., 72(3):215-228. 1972.
3. Finch, C. A.; J. D. Cook, Elaine Monsen y S. K. Sood. "The problem of nutritional iron deficiency". Ind. J. Nut. Diet., 11(5):296-300. 1974.
4. Finch, C. A. "Iron Metabolism". En: Present Knowledge in Nutrition, Nutrition Reviews. 4ta. ed. Nueva York, Washington, USA., The Nutrition Foundation, Inc., 1976. Capítulo 27, pp. 280-289.
5. Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá. Nutritional evaluation of the population of Central America and Panama. Regional Summary. (Editado por el) INCAP, Nutritional Program Center for Disease Control, U. S. D. H. E. W. y Ministerios de Salud de los países centroamericanos. 1965-1967.
6. Viteri, F. E. "Hematological status of the Central American population. Iron and folate deficiencies". Informe en: Pan American Health Organization ACMR meeting. Junio de 1973.
7. Layrisse, M.; J. D. Cook, C. Martínez, M. Roche, I. N. Kuhn, R. B. Walker y C. A. Finch. "Food iron absorption: A comparison of vegetable and animal foods". Blood., 33(3):430-443. 1969.
8. Layrisse, M.; C. Martínez-Torres, J. D. Cook, R. Walker y C. A. Finch. "Iron fortification of food: Its measurement by the extrinsic tag method". Blood, 41(3):333-352. 1973.
9. Martínez-Torres, C.; Irene Leets, Martha Renzi y M. Layrisse. "Iron absorption by humans from veal liver". J. of Nut., 104(8):983-993. 1974.
10. Cook, J. D. y Elaine R. Monsen. "Food iron absorption in human subjects III. Comparison of the effect of animal proteins on non-heme iron absorption". Am. J. Clin. Nut., 29:859-867. 1976.

11. García I., Roberto. Estudio de compuestos de hierro con miras a su empleo en fortificación de alimentos. Tesis (Médico y Cirujano) Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Médicas. Guatemala, Mayo de 1975. 62 p.
12. Layrisse, M.; C. Martínez-Torres y M. Roche. "Effect of interaction of various foods on iron absorption". Am. J. Clin. Nut., 21(10):1175-1183. 1968.
13. Cook, J. D. y Elaine Monsen. "Food iron absorption in human subjects IV. The effect of calcium and phosphate salts on the absorption of non-heme iron". Am. J. Clin. Nut., 29:1142-1148. 1976.
14. Disler, P. B.; S. R. Lynch, R. W. Charlton, J. D. Torrance, T. H. Bothwell, R. B. Walker y Fatima Mayet. "The effect of tea on iron absorption". Gut, 16(3):193-200. 1975.
15. Cook, J. D. y Elaine Monsen. "Food iron absorption in human subjects V. Effects of the major dietary constituents of a semi-synthetic meal". Am. J. Clin. Nut., in press.
16. _____ "Food iron absorption in man II. The effect of EDTA on absorption of dietary non-heme iron". Am. J. Clin. Nut., 29(6):614-620. 1976.
17. Turnbull, A.; F. Cleton y C. A. Finch. "Iron absorption. IV. The absorption of hemoglobin iron". J. Clin. Inv., 41(10):1897-1907. 1962.
18. Furia, Thomas E. "Sequestrants in Food". En: Furia, Thomas E., ed. Handbook of Food Additives. Cleveland, Ohio, USA., The Chemical Rubber Co., 1968. Capítulo 7, pp. 289-312.
19. Viteri, F. E. "Lucha contra la anemia nutricional, especialmente contra la carencia de hierro." Publicaciones Científicas de la Organización Mundial de La Salud. Ginebra, 1975. pág. 60. (OMS, Serie de Informes Técnicos No. 580.)
20. Viteri, F. E.; B. Torún y R. García I. "Iron fortification of sugar. Advantages of NaFeEDTA over FeSO₄". Presentado en: X International Congress of Nutrition. Kyoto, Japón, 1975. Abstracto número 8211.
21. Viteri, F. E. y R. García I. "Prevención de la deficiencia de hierro en Centro América por medio de la fortificación de la dieta con NaFeEDTA." Presentado en: IV Congreso Latinoamericano de Nutrición. Caracas, Venezuela, 1976.
22. Viteri, F. E. y R. García I. "Prevention of iron deficiency in Central America by means of sugar fortification with NaFeEDTA". Presentado en: Western Hemisphere Nutrition Congress V. Quebec, Canadá, 1977. Pág. 75 del informe.
23. Layrisse, M. y C. Martínez-Torres. "Iron (III) EDTA complex in iron fortification". Am. J. Clin. Nut., 30(7):1166-1174. 1977.
24. Viteri, F. E.; B. Torún y R. García I. "Iron fortification of food with NaFeEDTA. Iron absorption studies". Am. J. Clin. Nut., in press.
25. Kroe, D. J.; N. Kaufman, J. V. Klavins y T. D. Kinney. "Interrelation of amino acids and pH on intestinal iron absorption". Am. J. Physiol., 211(2):414-418. 1966.
26. Barnes, C. D. y L. G. Eltherington. Drug Dosage in Laboratory Animals. A Handbook. Berkeley y Los Angeles, California, USA., University of California Press, 1966. Pág. 168.
27. Wheby, M. S.; L. G. Jones y W. H. Crosby. "Studies on iron absorption. Intestinal regulatory mechanisms". J. Clin. Inv., 43(7):1433-1442. 1964.
28. Sheehan, R. G. y E. P. Frenkel. "The control of iron absorption by the gastro-intestinal mucosal cell". J. Clin. Inv., 51(2):224-231. 1972.
29. Wheby, M. S. y L. G. Jones. "Role of transferrin in iron absorption". J. Clin. Inv., 42(7):1007-1016. 1963.
30. Thomson, A. B. R. y L. S. Valdberg. "Kinetics of the sub-cellular distribution of iron and cobalt in the intestinal mucosa of the rat". Am. J. Dig. Dis., 21(4):305-312. 1976.
31. Wilson, Thomas Hastings. Intestinal Absorption. Filadelfia, USA., W. Saunders Co., 1962.
32. Terato, K.; T. Fujita e Y. Yoshino. "Studies on iron absorption. I. The role of low molecular polymers in iron absorption". Am. J. Dig. Dis., 18(2):121-128. 1973.
33. Terato, K.; Y. Hiramatsu e Y. Yoshino. "Studies on iron absorption. II. Transport mechanism of low molecular iron chelates in rat intestine". Am. J. Dig. Dis., 18(2):129-134. 1973.

34. Wahner-Roedler, D. L.; V. F. Fairbanks y J. W. Linman. "Cobalt excretion test as an index of iron absorption and diagnostic test for iron deficiency". J. Lab. Clin. Med., 85(2):253-259. 1975.
35. Valberg, L. S.; Janet Sorbie, W. Corbett y J. Luwig. "Cobalt test for the detection of iron deficiency anemia". Ann. Int. Med., 77(2):181-187. 1972.
36. Farris, E. J. y J. Q. Griffith, Jr., eds. The Rat in Laboratory Investigation. 2da. ed. Philadelphia, USA., J. B. Lippincott Co. 1949.
37. Manis, J. G. y D. Schachter. "Active transport of iron by intestine: Features of the two step mechanism". Am. J. Physiol., 203(1):73-80. 1962.
38. Spector, William, ed. Handbook of Biological Data. Londres y Philadelphia, USA., W. Saunders Co., 1956. Pág. 437.
39. Altman, P. L. y Dorothy S. Dittmer, eds. Biological Data Book. 2da. ed. Bethesda, Maryland, USA., Federation of American Societies for Experimental Biology, 1972. Volumen I.
40. Horwitz, William, ed. Official Methods of Analysis of The Association of Official Analytical Chemists. 12a. ed. Washington, USA., Association of Official Analytical Chemists.
41. Nerenberg, S. T. Electroforesis. Barcelona, España, Ediciones JIMS, 1963.
42. Colowick, S. P. y N. Kaplan, eds. Methods in Enzymology. Nueva York, USA., Academic Press Inc., 1955. Volumen 1, pág. 143.
43. Rosin, Joseph. Reagent Chemicals and Standards. 3ra. ed. Nueva York, USA., D. Van Nostrand Co., Inc., 1955.
44. Scott, Wilfred. Standard Methods of Chemical Analysis. Furman, N. H., ed. 5a. ed. Nueva York, Toronto, Londres, D. Van Nostrand Co., Inc., 1939. Volumen 2.
45. Bannerman, R. M.; J. R. P. O'Brien y L. J. Witts. "Studies in iron metabolism. IV. Iron Absorption in experimental iron deficiency". Blood, 20(5):532-546. 1962.
46. Cook, J. D.; M. Layrisse, C. Martínez-Torres, R. Walker, Elaine Monsen y C. A. Finch. "Food iron absorption measured by an extrinsic tag". J. Clin. Inv., 51(4): 805-815. 1972.
47. Overman, R. T. y H. M. Clark. Radioisotope Techniques. Nueva York, USA., McGraw Hill, 1960.
48. Hine, Gerald J., ed. Instrumentation in Nuclear Medicine. Nueva York, USA., Academic Press, Inc., 1967. Volumen 5.
49. Brown, E. y Mary Rother. "Studies of the mechanism of iron absorption I. Iron uptake by the normal rat". J. Lab. Clin. Med., 62(3):357-373. 1963.
50. Snedecor, G. W. y W. G. Cochran. Statistical Methods. 6a. ed. Ames, Iowa, USA., The Iowa State University Press, 1967.
51. Weintraub, L. R.; M. E. Conrad y W. H. Crosby. "Absorption of hemoglobin iron by the rat". Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 120(3):840-843. 1965
52. Fritz, J. C.; Gwendolyn W. Plea, Bertha N. Harrison y Geneva A. Clark. "Estimation of the bioavailability of iron". J. Assoc. Off. An. Chem., 58(5): 902-905. 1975.
53. Fritz, J.C.; Gwendolyn W. Plea, T. Roberts, W. Boehne y E. L. Hove. "Biological availability in animals of iron from common dietary sources". J. Agr. Food Chem., 18(4):647-651. 1970.
54. Crosby, William H. "Iron Absorption". En: Code, Charles F., section ed. y Werner Heidel, executive ed. Handbook of Physiology. Washington, USA., American Physiology Society, 1968. Volumen 3, Sección 6, Capítulo 6, pág. 1553.
55. Raffin, S. B.; C. H. Woo, K. T. Roost, D. C. Price y R. Schmid. "Intestinal absorption of hemoglobin iron. Heme cleavage by mucosal heme oxygenase". J. Clin. Inv., 54(6):1344-1352. 1974.
56. Bannerman, R. M. "Quantitative aspects of hemoglobin iron absorption". J. Lab. Clin. Med., 65(6):944-950. 1965.
57. Bothwell, T. H. y C. A. Finch. Iron Metabolism. Boston, USA., Little, Brown and Company, 1962. pp. 94-95.
58. Moore, Carl V. "Section C Iron". En: Goodhart, R. S. y M. E. Shills, eds. Modern Nutrition in Health and Disease; Dietotherapy. 5a. ed. Filadelfia, USA., Lea & Febiger, 1973.
59. Sheehan, R. "Unidirectional uptake of iron across intestinal brush border". Am. J. Physiol., 231(5): 1438 -1444. 1976.

60. Peters T. Jr., L. Apt y J. F. Ross. "Effect of phosphates upon iron absorption studied in normal human subjects in an experimental model using dialysis". Gastroenterol., 61(3):315-322. 1971.
61. Linder, M. C. y H. N. Munro. "The mechanism of iron absorption and its regulation". Fed. Proc., 36(7): 2017-2023. 1977.
62. Gitlin D. y A. Ceuchand. "On the kinetics of iron absorption in mice". J. Clin. Inv., 41(2):344-349. 1962.
63. Eastman, E. J.; J. I. Bell y A. P. Douglas. "Iron transport characteristics of vesicles of brush border and baso-lateral plasma membrane from the rat enterocyte". Biochem. J., 164(2):289-294. 1977.
64. Plea, Gwendolyn W.; J. C. Fritz y L. Rollinson. "Relationship between the biological availability and solubility rate of reduced iron". J. Assoc. Off. An. Chem., 59(3):582-583. 1976.
65. Bjorn-Rasmussen; L. Hallberg y L. Rossander. "Absorption of 'fortification' iron. Bioavailability in man of different samples of reduced iron, and prediction of the effects of iron fortification". Br. J. Nut., 37(3):375-388. 1977.
66. Bates, G. W.; C. Billops y P. Saltman. "The kinetics and mechanism of iron (III) exchange between chelates and transferrin. I. The complexes of citrate and nitrilotriacetic acid". J. Biol. Chem., 242(12): 2810-2815. 1967.
67. Ibid. "The kinetics of iron (III) exchange between chelates and transferrin. II. The presentation and removal with ethylenediaminetetracetate". J. Biol. Chem., 242(12):2816-2821. 1967.
68. Spiro, Th. G. y P. Saltman. "Polinuclear complexes of iron and their biological implications". En: Hemmerich, P.; C. K. Jørgensen, J. B. Neilands, Sir Ronald S. Nyholm, D. Reinen y R. J. P. Williams, eds. Structure and Bonding. Springer-Verlag Berlin Heidelberg Nueva York, 1969. Vol. 6, pp. 117-156
69. Saltman, Paul. "The role of chelation on iron metabolism". J. Chem. Ed., 42(12):682-687. 1965.
70. Hegsted, D. M.; C. A. Finch y T. D. Kinney. "The influence of diet on iron absorption. II. The interrelation of iron and phosphorous". J. Exp. Med., 90:147. 1949.
71. Chapman, B. G. y J. A. Campbell. "Effect of calcium and phosphorous salts on the utilization of iron by anaemic rats". Br. J. Nut., 11(2):127-139. 1957.

BR.

Ramiro Batrés
Ramiro Batrés

Viteri
Asesor.
Dr. Fernando Viteri

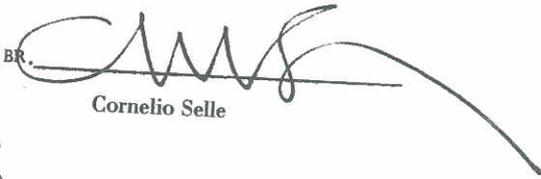
Federico Sánchez
Revisor.
Dr. Federico Sánchez

Julio de León Méndez
Director de Fase III.
Dr. Julio de León Méndez

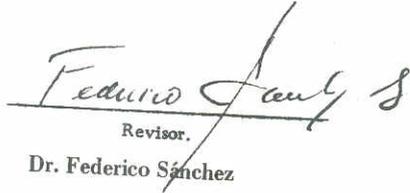
Mariano Guerrero Rojas
Secretario General
Dr. Mariano Guerrero Rojas

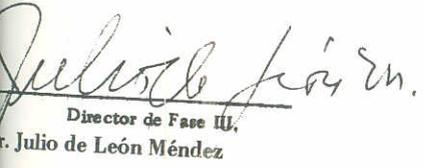
Vo. Bo.

Carlos Armando Soto Gómez
Decano
Dr. Carlos Armando Soto Gómez

BR. 
Cornelio Selle


Asesor.
Dr. Fernando Viteri


Revisor.
Dr. Federico Sánchez


Director de Fase III.
Dr. Julio de León Méndez


Secretario General
Dr. Mariano Guerrero Rojas

Vo. Bo.


Decano
Dr. Carlos Armando Soto Gómez