

Laboratorio de Reconstituyentes. Centro Nacional de Biopreparados. Bejucal. Mayabeque.

EFECTO ANTIANÉMICO Y DAÑO GASTROINTESTINAL EN RATAS SUPLEMENTADAS CON DIFERENTES FORMAS DE HIERRO

Yenela García Hernández^{1*}, Raúl González Hernández^{2*}, Guillermo Espinosa Villanueva^{3†}, Agustín Carmona Castro^{1§}, René Cárdenas Vázquez^{4§}.

RESUMEN

El BIOcen Centro Nacional de Biopreparados de Cuba ha desarrollado una línea de antianémicos obtenidos a partir de la sangre bovina que comprende la solución oral Trofin® y las tabletas NeoTrofin® y NeoTrofinC®. La eficacia de tales antianémicos supera el 90%, y no se han reportado reacciones adversas después de su uso. El tratamiento de la anemia se ha enfocado tradicionalmente en el uso de suplementos que integran hierro de origen iónico y ácido fólico. La absorción intestinal del hierro es mediada por dos receptores diferentes: el DMT1 para la forma iónica y el HCP1 para la hemínica. El efecto anti-anémico de las preparaciones de sales ferrosas y las formulaciones de Trofin® se pudiera favorecer mediante la estimulación simultánea de las vías descritas de absorción, utilizando para ello dosis inferiores del mineral, lo que resultaría en una tasa menor de efectos gastrointestinales no deseados. Se utilizaron 3 grupos de ratas Wistar anémicas que se suplementaron indistintamente con Trofin® (Dieta A), Sulfato ferroso (Dieta B), y Trofin® + Sulfato ferroso (Dieta C) durante 10 días. Las tres dietas mostraron un efecto antianémico similar, confirmando la biodisponibilidad del hierro tras la administración conjunta de las formas iónica y hemínica, y con ello, la efectividad superior de la Dieta C. Las dietas empleadas fueron también similares en la ocurrencia de efectos gastrointestinales no deseados, lo que sugeriría que el examen del estómago y el duodeno pudiera servir para medir la seguridad y tolerancia de futuras preparaciones anti-anémicas.

Descriptor DeCS: TROFIN / Sulfato ferroso / Hierro / Anemia / Ratas / Duodeno / Estómago.

¹ Máster en Ciencias. ² Doctor en Ciencias Veterinarias. ³ Técnico de Laboratorio. ⁴ Doctor en Ciencias Biológicas.

^{*} Laboratorio de Reconstituyentes. BIOcen Centro Nacional de Biopreparados. [†] Departamento de Anatomía. Facultad de Medicina. UNAM Universidad Nacional Autónoma de México. [§] Laboratorio de Biología Animal Experimental. Facultad de Ciencias. UNAM Universidad Nacional Autónoma de México.

Recibido: 10 de Agosto del 2011. Aceptado: 11 de Diciembre del 2011.

Yenela García Hernández. Laboratorio de Reconstituyentes. BIOcen Centro Nacional de Biopreparados. Carretera a Beltrán. Kilómetro 1½. Bejucal. Mayabeque.

Correo electrónico: yenela@biocen.cu

INTRODUCCIÓN

La anemia es el trastorno nutricional más extendido en el mundo, razón por la que se ha convertido en un problema global de salud pública. La anemia está asociada al incremento de la morbilidad y mortalidad de grupos poblacionales vulnerables, en particular, las embarazadas y los niños pequeños. La deficiencia de hierro es considerada como el factor de mayor influencia en la extensión de la prevalencia de la anemia.¹ Si bien la anemia en Cuba se califica entre leve y moderada, la elevada frecuencia de la misma en el país la ha hecho merecer la atención de las autoridades sanitarias.²

Como parte de los esfuerzos nacionales para enfrentar esta situación, el BIOCEN Centro Nacional de Biopreparados (Bejucal, provincia de Mayabeque, Cuba) ha venido desarrollando desde hace más de 15 años una línea de antianémicos de origen natural obtenidos a partir de la sangre bovina, la miel de abejas, propóleos y un extracto acuoso abomasal (ABM).³ La actuación del BIOCEN ha permitido la obtención del producto Trofin® en la forma farmacéutica de suspensión oral, así como NeoTrofin® y NeoTrofinC® en tabletas. La eficacia antianémica de tales productos ha demostrado ser superior al 90%, y no se han reportado reacciones adversas gastrointestinales en los diferentes grupos poblacionales evaluados.⁴⁻⁶ Estos resultados se han atribuido al aporte del hierro contenido en la hemoglobina de la sangre bovina, cuya biodisponibilidad es mayor que la de la forma no hemínica (léase iónica) que se suministra con la sales del mineral.⁷ Sin embargo, las intervenciones nutricionales para combatir la anemia se han enfocado tradicionalmente en el uso de suplementos que reúnen hierro de origen iónico y ácido fólico principalmente en las embarazadas, y, en menor extensión, los niños menores de

dos años. Tal intervención ha fallado en reducir significativamente la prevalencia de la anemia,⁸ lo que pudiera explicarse tanto por el insuficiente suministro del suplemento como la baja adherencia al tratamiento, quizás por los efectos adversos que ocasionan las reacciones gastrointestinales después del uso de estos anti-anémicos, que pueden ocurrir en el 6 – 31% de los pacientes, y que se ha atribuido a una elevada generación de radicales libres.⁹⁻¹¹

Es conocido que la absorción del hierro ocurre en el intestino delgado,¹² y está mediada por dos receptores diferentes: el DMT1 para la absorción de la forma no hemínica, y el HCP1 para la hemínica.¹³⁻¹⁴ Los estudios nutricionales completados hasta la fecha evidencian que la proporción en que ambas formas químicas del mineral se combinan en los alimentos de la dieta regular del sujeto determina las diferencias en la prevalencia de la anemia ferropénica. En las poblaciones donde predomina la ingestión del Fe no hemo (como China) la prevalencia de anemia es mayor que la observada en los EEUU, donde predomina la ingestión de Fe hemo.¹⁵⁻¹⁶ Adicionalmente, se ha demostrado en humanos que las formulaciones de hemoglobina bovina y sulfato ferroso tienen una biodisponibilidad superior a la del sulfato ferroso o la hemoglobina bovina por separado.¹⁷

El efecto antianémico de las formulaciones de Trofin® y otras sales ferrosas se pudiera mejorar si se pudieran estimular simultáneamente ambas vías de absorción del hierro. Por otra parte, estas formulaciones podrían eliminar los estados de deficiencia del mineral mediante el uso de dosis inferiores a las utilizadas actualmente, lo que conllevaría una menor tasa de efectos adversos gastrointestinales, y de esta manera, terapias más efectivas. Por todo lo anterior, se condujo el presente trabajo para evaluar en ratas el efecto antianémico y el daño gastrointestinal de la

suplementación con Fe aportado en formas hemínica y no hemínica por el Trofin® deshidratado y el sulfato ferroso; respectivamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos: Sulfato ferroso heptahidratado, 1,10 fenantrolina, óxido de selenio, molibdato de amonio, sulfato de manganeso, sulfato de magnesio heptahidratado, fosfato de potasio monobásico, fosfato de calcio di-hidratado, sacarosa, glucosa anhidra, cloruro de zinc, carbonato de sodio, reactivo de Folin 2N, hidroquinona, acetato de amonio, citrato de sodio, ácido tiobarbitúrico, y sulfato de cobre II (Merck, Alemania). Cloruro de sodio, ácido clorhídrico al 37%, cloruro de potasio, tartrato de sodio y potasio, sodio-dodecil-sulfato, hidróxido de sodio, ácido acético glacial, sulfato de magnesio heptahidratado, fosfato de potasio monobásico, yoduro de potasio, acetato de etilo, guanidina-HCl, butil-hidroxi-tolueno, ácido sulfúrico (APPLICHEM, Alemania). HEMOTEST y juegos de reactivos para la determinación de hierro (HELFA Diagnostics®, Cuba). Solución patrón de Cianometahemoglobina (57.2 mg por cada 100 mL), carboximetilcelulosa, ácido tricloroacético (BDH Diagnostics, Inglaterra). Mezclas de vitaminas, caseína de alto contenido de nitrógeno, almidón de maíz, celulosa ALPHACEL (MP Biomedicals, Estados Unidos). Isofluorano FORANE® (Laboratorios PISA, México). Sulfato de estreptomycin y 2,4 dinitro-fenilhidracina (Sigma-Aldrich, EEUU).

El Trofin® deshidratado fue producido por BIOECN (Bejucal, Cuba), y contenía 1.2 ± 0.1 mg de Fe total por cada gramo del producto, determinado por espectroscopia de absorción atómica (Perkin-Elmer Analyst 300, Norwalk, Connecticut, Estados Unidos).

Diseño experimental: Se utilizó el método de depleción-repleción de hemoglobina (Hb) en ratas Wistar machos y hembras recién destetadas (21 – 23 días de nacidas), provenientes de la colonia del Bioterio de la Facultad de Ciencias de la UNAM Universidad Nacional Autónoma de México (México DF, México). Las ratas se alojaron en grupos de 3 en cajas de acero inoxidable con piso de malla metálica, y se alimentaron durante dos semanas con una dieta de caseína que contenía 5% de la proteína, y 0.94 miligramos de Fe por cada 100 gramos del producto.

La anemia se indujo en el animal mediante la combinación de flebotomía con la dieta de caseína durante dos semanas.¹⁸ La concentración de Hb obtenida al término del período experimental se midió por el método de la cianometahemoglobina. El valor de Hb observado se tuvo como el valor basal.¹⁹

Las ratas anémicas ($Hb \text{ basal} < 90 \text{ g.L}^{-1}$) se distribuyeron en 3 grupos de 6 animales cada uno (a razón de 3 machos y 3 hembras en cada grupo), de manera que no existieran diferencias significativas en los valores basales de Hb de-grupo-a-grupo, ni entre animales de diferentes sexos en cada grupo. Cada grupo fue tratado durante otros 10 días con la dieta de caseína,¹⁸ que fue suplementada con Fe obtenido de diferentes fuentes de la siguiente forma (por cada 100 g del alimento): *Dieta A*: 2 mg de Fe en forma de Trofin® deshidratado; *Dieta B*: 160 mg de Fe en forma de sulfato ferroso; y *Dieta C*: 80 mg de Fe como sulfato ferroso + 1 mg de Fe en forma de Trofin®. Las dietas suplementadas con Fe se administraron durante 10 días, y se midió el consumo diario del alimento. Se suministró agua desionizada *ad libitum*.

La proporción de Fe con la que se suplementaron las dietas se determinó del consumo diario promedio del alimento por el animal (~ 5 g). Obtenido este resultado, se

procedió a incorporar la dosis diaria del mineral según la fuente del mismo por cada 5 g del alimento. La proporción de Fe aportado por el Trofin[®] (Dieta A) fue 20 veces menor que la aportada por el Sulfato ferroso, ya que se consideró la mayor biodisponibilidad del Fe hemínico aportado por la sangre bovina,⁷ así como los resultados clínicos obtenidos por las diferentes formas farmacéuticas de la línea de antianémicos derivados del Trofin[®].⁴⁻⁶ La cantidad de Sulfato ferroso con que se suplementó la dieta de caseína (Dieta B) fue de 8 mg de Fe por cada 5 g, que es la dosis recomendada para las ratas, y que se determinó por extrapolación de la utilizada en mujeres anémicas, a fin de estudiar los efectos adversos producidos en los animales de experimentación por las formulaciones de Fe que se desarrollan para uso en humanos.¹⁹⁻²⁰ La "Dieta C", que contenía Trofin[®] + Sulfato ferroso, fue suplementada con la mitad de la dosis de Trofin[®] de la "Dieta A" y la mitad de la dosis de Sulfato ferroso de la "Dieta B", para una relación Fe hemínico:Fe no hemínico, por cada 5 g del alimento, de 1:80. El contenido de Fe en cada una de las dietas se determinó mediante espectroscopia de absorción atómica.

Finalizado el período de suplementación, se extrajeron muestras de sangre del animal por punción del plexo retro-orbital para la determinación de la concentración final de Hb. Completado este paso, los animales fueron anestesiados en atmósfera de isofluorano, desangrados por sección de la aorta abdominal, y retirados el estómago, el hígado y el duodeno. De la sangre colectada de la cavidad abdominal del animal tras la sección de la aorta abdominal se obtuvieron muestras de suero para la determinación de la concentración sérica de Fe.

Los órganos se enjuagaron con solución de NaCl al 0.9% previamente enfriada. El estómago se fijó en formalina tamponada al 10%, y acto seguido, incluido en parafina,

cortado en tiras, y teñido con hematoxilina-eosina según técnicas convencionales. El aspecto microscópico de los cortes de estómago fue analizado y fotografiado con un fotomicroscopio Provis AX70 (OLYMPUS, Japón). El hígado se procesó convenientemente para la determinación del contenido total de Fe como indicador de las reservas del mineral.²¹ La mucosa del duodeno se raspó siempre manipulando el tejido en baño de hielo.

El procesamiento, homogenización y fraccionamiento de las muestras de tejidos y órganos para la determinación de marcadores de estrés oxidativo se realizaron mediante una modificación del método propuesto en 1998 por Srigiridhar y Nair.²² Brevemente, el tejido se homogenizó en KCl 0.15 M para una concentración final de masa tisular del 5%, y se le adicionó BHT 0.5 mM. Acto seguido, el homogenato obtenido en el paso anterior se centrifugó a 800 x g durante 30 minutos. El sobrenadante colectado se centrifugó nuevamente a 12,000 x g por otros 30 minutos. El nuevo sobrenadante se conservó para la determinación de las concentraciones de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (ERATB)²³ y la concentración de grupos carbonilos.²⁴

El protocolo experimental aplicado en este estudio fue aprobado por el Comité de Ética para la Experimentación Animal de la Facultad de Ciencias de la UNAM Universidad Nacional Autónoma de México (México DF, México).

Análisis estadístico de los resultados:

Para cada grupo experimental se obtuvieron los valores promedio (junto con la desviación estándar) de las variables contempladas en el protocolo experimental. La asociación entre el contenido de Fe presente en la dieta ofertada al animal y el consumo promedio de Fe se calculó mediante el coeficiente "r" de correlación.

Las diferencias entre los valores promedio de las variables de interés se evaluaron mediante un análisis ANOVA de varianza de una sola vía. Las diferencias que alcanzaron significación estadística fueron estudiadas *post hoc* mediante un test de Fisher para la mínima diferencia significativa. Se analizó el comportamiento de la Hb y el peso corporal al final del período de observación respecto del observado después de completada la inducción de la anemia mediante el “t” de Student. Se utilizó un nivel “p” de confianza igual o menor de 0.05. El análisis estadístico de los resultados se hizo con el programa estadístico STATGRAFICS CENTURIUM versión 15.0 (Statgrafics, Pennsylvania, Estados Unidos).

Trofin® deshidratado y/o el Sulfato ferroso según corresponda, a partir de los resultados del contenido de Fe determinado mediante espectroscopia de absorción atómica. No se observaron diferencias en el consumo diario promedio del alimento por animal entre los grupos. La cantidad de Fe ingerida con el alimento en cada grupo fue la esperada según el protocolo de suplementación: *Dieta A*: 147.5%; *Dieta B*: 100.5%; y *Dieta C*: 102.4%; respectivamente. La cantidad de Fe ingerido con el alimento se asoció fuertemente con el contenido dietético de Fe ($r = 0.99$; $r^2 = 0.98$; $p < 0.05$).

La Tabla 2 muestra los cambios en el peso corporal y la hemoglobina después de 10 días de tratamiento. El peso corporal no mostró cambios significativos tras el

Tabla 1. Comportamiento de la cantidad de Fe ingerida diariamente por las ratas Wistar anémicas suplementadas con Trofin® (Dieta A), Sulfato ferroso (Dieta B) ó Trofin+Sulfato ferroso (Dieta C) durante 10 días. Se muestran la cantidad ingerida día/animal del alimento, el contenido total de Fe en la dieta de suplementación, y la cantidad ingerida día/animal de Fe total, respectivamente.

Régimen de suplementación	Cantidad ingerida de alimento día/animal (g)	Contenido total de Fe en la dieta de suplementación (mg/100 g)	Cantidad ingerida de Fe total día/animal (mg)
A Trofin®	5.75 ± 1.68	2.95	0.18 ± 0.03
B FeSO ₄	6.60 ± 2.01	160.95	9.49 ± 1.90
C Trofin® + FeSO ₄	5.86 ± 1.63	81.95	5.00 ± 1.35

RESULTADOS

La Tabla 1 muestra las cantidades individuales de Fe ingeridas diariamente por las ratas suplementadas con diferentes regímenes de suplementación. La cantidad total de Fe contenido en las dietas experimentales fue calculada a partir de la sumatoria del contenido de Fe aportado por la dieta de caseína y el aportado por el

régimen de suplementación seguido. Por su parte, la concentración de Hb aumentó en todos los grupos experimentales en más de 70 g.L⁻¹: *Dieta A*: 74.6%; *Dieta B*: 72.9%; y *Dieta C*: 85.8% del valor basal, respectivamente; pero el cambio observado fue similar para los 3 grupos. El incremento de la Hb observado en los 3 grupos corroboró el logro del objetivo propuesto en

el estudio con la suplementación del animal con diferentes fuentes de Fe.

La Tabla 3 muestra el comportamiento de los contenidos sérico y hepático del Fe. No se observaron diferencias en la concentración de Fe sérico entre los grupos experimentales. Por el contrario, el contenido hepático de Fe fue mayor en los grupos B y C, cuando se le comparó con el observado en el A. El contenido hepático de Fe fue máximo en el grupo B.

DISCUSIÓN

El presente trabajo ha evaluado el efecto sobre el peso corporal del animal, y los contenidos hepático y sérico de Fe, de 3 regímenes diferentes de suplementación con Fe. La ausencia de cambios en el peso corporal de las ratas durante la suplementación con diferentes dietas difiere del resultado obtenido por Hernández *et al.* (2003),²⁶ cuando se observó un incremento

Tabla 2. Evolución de la Hb y el peso corporal de ratas Wistar anémicas de 5 semanas suplementadas con Trofin® (Dieta A), Sulfato ferroso (Dieta B), ó Trofin® + Sulfato ferroso (Dieta C) durante 10 días. Se muestran los valores basales (Día 0) y los observados al final del período de suplementación (Día 10).

Indicador	Día	Régimen de suplementación		
		A	B	C
Tamaño		6	6	6
Peso, g	0	36.67 ± 9.00	32.67 ± 6.15	38.28 ± 11.10
	10	39.75 ± 6.96	32.33 ± 8.24	36.39 ± 5.10
		Δ 3.08	Δ -0.33	Δ -2.29
Hb, g.L ⁻¹	0	79.0 ± 8.80	81.0 ± 6.7	77.1 ± 10.0
	10	153.6 ± 29.0	153.9 ± 12.5	163.9 ± 14.4
		Δ 74.6 *	Δ 72.9 *	Δ 85.8 *

* Diferencias significativas entre los momentos de observación, para cada uno de los muestreos hechos ($p < 0.05$).

La Tabla 4 muestra el comportamiento de los indicadores de daño oxidativo registrados a nivel de la mucosa del duodeno. No se obtuvieron diferencias significativas entre los animales anémicos tratados con diferentes fuentes de Fe.

Finalmente, la Figura 1 muestra el aspecto de la mucosa gástrica una vez concluido el régimen de suplementación. No se observaron daños histológicos sobre la mucosa gástrica con ninguno de los tratamientos utilizados.

de 9 – 16 g de peso después de 14 días de utilización de una dieta de caseína con una formulación similar a la empleada en este estudio. Pudiera ser que la participación de la proteína en la dieta ofertada al animal haya hecho la diferencia: la caseína incluida en la dieta en el estudio citado representó el 8% de la proteína, en lugar del 5%, como fue en este caso.

Las formulaciones de las dietas B y C superaban los requerimientos diarios de Fe de la rata, que se han estimado en 3.0 – 3.5 mg de Fe por cada 100 gramos de peso del animal.²⁷ Si bien en el caso de la “Dieta A” no se satisficieron los requerimientos del mineral de la especie, como se trataba de

una fuente de Fe con una mayor biodisponibilidad, se suponía que se obtuvieran valores fisiológicamente normales de la Hb en los 3 grupos experimentales, y que no se observaran diferencias entre los grupos. El hecho de que no se obtuvieran diferencias en los 3 grupos en cuanto a la Hb final, aun cuando se suplementaron con cantidades diferentes de Fe total, sugieren diferencias en cuanto a la biodisponibilidad de las diferentes fuentes de Fe utilizadas. Esto es: la biodisponibilidad de la “Dieta C” puede ser mayor que la propia de la “Dieta B”.

La ausencia de efectos adversos gastrointestinales con uno u otro régimen de suplementación pudiera deberse a la metodología empleada para la administración de los principios activos, puesto que la mezcla de éstos con el alimento pudo haber disminuido los efectos adversos que, desde el punto de vista oxidativo, pudieran ocasionar las diferentes fuentes de Fe utilizadas para la suplementación en este estudio.

En vista de todo lo anteriormente expuesto, y teniendo en cuenta que los principios activos ensayados en este estudio

Tabla 3. Comportamiento de los contenidos sérico y hepático de Fe en ratas Wistar anémicas suplementadas con Trofin® (Dieta A), Sulfato ferroso (Dieta B) ó Trofin® + Sulfato ferroso (Dieta C) durante 10 días.

Régimen de suplementación	Fe sérico $\mu\text{mol.L}^{-1}$	Fe hepático $\mu\text{mol.g}^{-1}$
A Trofin®	42.41 ± 22.64	254.04 ± 84.34 ^a
B FeSO ₄	51.94 ± 14.97	498.23 ± 107.69 ^b
C Trofin® + FeSO ₄	45.17 ± 17.52	373.21 ± 74.23 ^c

* Las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

En cuanto al comportamiento del Fe hepático como indicador de las reservas del mineral, el hecho de que el grupo suplementado con la “Dieta B” mostrara el contenido hepático máximo de Fe permite suponer un efecto positivo de la “Dieta C”: una mayor cantidad de Fe hepático pudiera desencadenar efectos adversos, entre ellos, daño oxidativo de células y órganos, aun cuando los indicadores medidos de daño oxidativo no mostraron cambios significativos, y no se pudieron observar daños en la mucosa gástrica finalizado el período de observación.

se utilizarán en la forma farmacéutica de tableta, se recomienda que, para la evaluación futura del daño gastrointestinal de la suplementación con Trofin® y Sulfato ferroso, se utilice la administración intragástrica de la formulación a las ratas anémicas, con el objetivo de determinar si la vía de administración de los principios activos influye en el daño gastrointestinal que pudieran ocasionar las formulaciones desarrolladas.

Tabla 4. Comportamiento de los indicadores de daño oxidativo en la mucosa del duodeno de ratas Wistar anémicas suplementadas durante 10 días con Trofin® (Dieta A), Sulfato ferroso (Dieta B), ó Trofin® + Sulfato ferroso (Dieta C).

Régimen de suplementación	ERATB nmol.mg ⁻¹ de proteína	Concentración de carbonilos nmol.mg ⁻¹ de proteína
A Trofin®	0.41 ± 0.24	2.93 ± 0.54
B FeSO ₄	0.59 ± 0.20	2.32 ± 0.65
C Trofin® + FeSO ₄	0.67 ± 0.16	2.57 ± 0.81

CONCLUSIONES

La suplementación con Fe ha sido la vía más utilizada para combatir la deficiencia de este micronutriente. Sin embargo, los resultados de estas intervenciones son aún insuficientes. Ante esta situación, es de gran importancia el desarrollo de nuevas fuentes de suplementación. Los resultados favorables obtenidos en los grupos poblacionales donde se ha evaluado el Trofin®, y los conocimientos acumulados acerca del transporte intestinal de Fe mediado por receptores específicos, según la forma química en que éste se presenta, han conducido al desarrollo de nuevas formulaciones antianémicas que contienen ambas formas químicas del Fe: la hemínica, aportada por el Trofin®; y la iónica, aportada por el Sulfato ferroso. Debido a que la suplementación con la “Dieta C”, que contenía solo la mitad de la dosis de Fe recomendada para la rata, a fin de evaluar los efectos adversos de la suplementación respecto de la “Dieta B” (que representó la dieta-control del estudio), no mostrara diferencias en cuanto al efecto antianémico, sugiere una eficacia superior de la Dieta C. La ausencia de daños oxidativos o gastrointestinales pudiera explicado de la inclusión de los principios activos en el alimento consumido por el animal.

AGRADECIMIENTOS

Mario Javier Soriano Bautista, Máster en Veterinaria y Zoología, y técnicas Isabel Antúnez de la Rosa y Dora María Salazar Castelo, miembros del personal del Bioterio de la Facultad de Ciencias de la UNAM Universidad Nacional Autónoma de México, por el apoyo en el suministro de los animales de experimentación, y las facilidades otorgadas para el uso de las instalaciones y el desarrollo del proyecto.

La AUIP Asociación Universitaria Iberoamericana de Postgrado, por el financiamiento brindado en apoyo a la movilidad internacional para la ejecución del proyecto.

Ana Isabel Bieler Antolín, Máster en Ciencias, miembro del Laboratorio de Microcine de la Facultad de Ciencias de la UNAM, por el suministro de las microfotografías.

SUMMARY

The Cuban National Center for Biopreparations has developed a line of anti-anemics obtained from bovine blood which comprises Trofin® oral solution and NeoTrofin® and NeoTrofinC® tablets. The efficacy of such anti-anemics is higher than 90%, and no adverse reactions have been reported after their use. Treatment of anemia has traditionally relied upon use of supplements incorporating ionic iron and folic

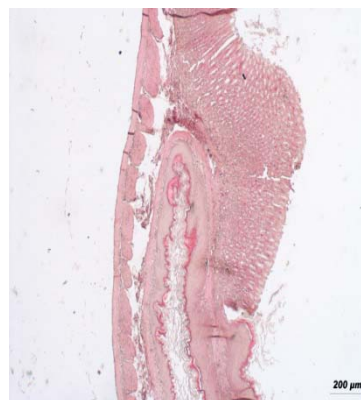
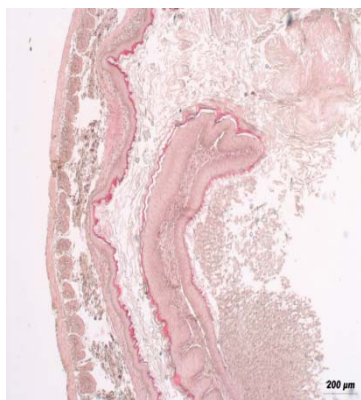
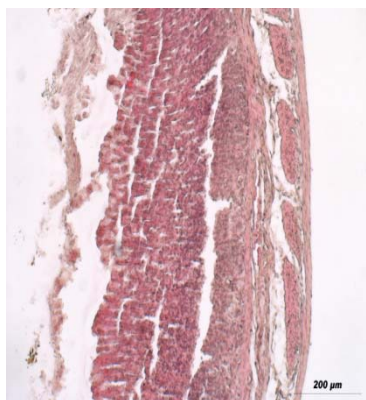
acid. Intestinal absorption of iron is mediated by two different receptors: DMT1 for the ionic form and HCP1 for the heme one. Anti-anemic effect of preparations of iron salts and Trofin® formulations could be promoted by means of simultaneous stimulation of the described routes of absorption, thus using lower dose of the mineral, resulting in a diminished rate of non-desirable gastrointestinal effects. Anemic Wistar rats were distributed in three groups, and each group where supplemented with Trofin® (Diet A), Iron Sulphate (Diet B), and Trofin® + Iron Sulphate (Diet C), respectively, during 10 days. The three diets showed a similar anti-anemic effect, confirming the bioavailability of iron after joint administration of ionic and heme forms, and hence, the superior effectiveness of Diet C. Used diets were also similar in the occurrence of non-desirable gastrointestinal effects, suggesting that examination of stomach and duodenum could serve to assess safety and tolerance of future anti-anemic preparations.

Subject headings: Trofin® / Iron sulphate / Iron / Anemia / Rats / Duodenum / Stomach.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. McLean E, Egli I, Benoist B, Wojdyla D, Cogswell M. Worldwide prevalence of anemia in preschool aged children, pregnant women and non-pregnant women of reproductive age. En: Nutritional anemia (Editores: Kraemer K, Zimmermann MB). Sight and Life Press. Switzerland: 2007. pp 3.
2. Vitaminas y minerales: Hierro. Aparecido en: <http://www.nutrinet.org>. Disponible en: <http://cuba.nutrinet.org/areas-tematicas/vitaminas-y-minerales/introduccion/117?task=view> Fecha de última visita: 23 de julio del 2010.
3. González R, Aznar E, González M. Composición físico-química del reconstituyente y antianémico Trofin®. Rev Mex Cien Farm 2004;36:2-5.

Figura 1. Cortes del estómago de ratas anémicas que fueron suplementadas con regímenes diferentes. Izquierda: Trofin® (Dieta A). Centro: Sulfato ferroso (Dieta B). Derecha: Trofin® + Sulfato ferroso (Dieta C) durante 10 días. 10X. Tinción Hematoxilina-Eosina. Se aprecia constancia de las estructuras propias de la mucosa gástrica.



4. Aznar E, González R, Moroño M, González M. Tratamiento anti-anémico Fe-proteína (Trofin) para uso pediátrico. *Rev Mex Cienc Farm* 1998;29:18-21.
5. Aznar, E, González R, González M. Ensayo clínico (Fase II) en embarazadas de nueva forma farmacéutica de Trofin en tabletas (NeoTrofin® y NeoTrofinC®). *Av Biotec Mod* 2003;5.
6. González R, Aznar E, González M, Hernández JC, Varela A, Silva P, García Y. Nueva línea de productos para prevenir y tratar la anemia partiendo del hierro hemínico. *Informacéutico* 2008; 15:43-8.
7. Hurrell R. Preventing iron deficiency through food fortification. *Nutr Rev* 1999;55:210-22.
8. Venkatesh M. The case for urgent action to address nutritional anemia. En: *Nutritional anemia* (Editores: Kraemer K, Zimmermann MB). Sight and Life Press. Switzerland: 2007. pp 13.
9. Lund, EK, Fairweather S, Wharf G, Johnson IT. Chronic exposure to high levels of dietary iron fortification increases lipid peroxidation in the mucosa of the rat large intestine. *J Nutr* 2001;131:2928-31.
10. Olivares GM. Suplementación con Fe. *Rev Chil Nutr* 2004;31(3). Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182004000300001&tlng=en&lng=en&nrm=iso. Fecha de última visita: 25 de Marzo del 2011.
11. Alderman H, Horton S. The economics addressing nutritional anemia. *Nutritional anemia* (Editores: Kraemer K, Zimmermann MB). Sight and Life Press. Switzerland: 2007. pp 3.
12. Conrad ME, Umbriet JN. Pathways of iron absorption. *Blood Cel Mol Dis* 2002;29:336-55.
13. Fleming MD, Romano MA, Su MA, Garrick LM, Garrick MD, Andrews NC. Nramp 2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: Evidence of a role for Nramp 2 in endosomal iron transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:1148-53.
14. Shayeghi M, Latunde-Dada GO, Cahill JS, Laftah AH, Takeuchi K, Halliday N *et al*. Identification of an intestinal heme transporter. *Cell* 2005;122:789-801.
15. Carpenter CE y Mahoney AW. Contributions of heme and nonheme iron to human nutrition. *Food Sci Nutr* 1992; 31:333-67.
16. Shufa D, Flegging Z, Youfa W, Barry MP. Current methods for estimating dietary iron bioavailability do not work in China. *J Nutr* 2000;130:193-8.
17. Pizarro F, Olivares M, Hertrampf E, Mazariegos DI, Arredondo M, Letelier A *et al*. Iron bis-glycine chelate competes for the nonheme-iron absorption pathway. *Am J Clin Nutr* 2002;76:577-81.
18. García Hernández Y, González Hernández R, Cárdenas Vázquez R, Carmona Castro A. Desarrollo de un biomodelo de ratas anémicas mediante dos tipos de dietas de caseína. *RCAN Rev Cubana Aliment Nutr* 2010;20:26-34.
19. Benito P, House W y Millar D. Influence of iron supplementation frequency on Absorption efficiency and mucosal ferritin in anaemic rats. *Brit J Nutr* 1997; 78:469-77.
20. Knutson MD, Walter PB, Ames BN, Viteri FE. Both iron deficiency and daily iron supplements increased lipid peroxidation in rats. *J Nutr* 2000; 130:261-8.
21. Drabkin DL, Austin JH. Spectrophotometric studies: V. A technique for the analysis of undiluted

- blood and concentrated hemoglobin solutions. *J Biol Chem* 1935;112:105-15.
22. Barry M, Sherlock S. Measurement of liver iron concentration in needle biopsy specimens. *Lancet* 1971; i:100-3.
23. Srigiridhar K, Nair KM Iron deficient intestine is more susceptible to peroxidation damage during iron supplementation in rats. *Free Radic Biol Med* 1998;25:660-5.
24. Okhawa O, Yagi K. Assay of lipid peroxides in animal tissues by the thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351-8.
25. Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods of Enzymology* 1994;233:357-63.
26. Hernández M, Sousa V, Moreno A, Villalpando S, López Alarcón M. Iron bioavailability and utilization in rats are lower from lime-treated corn flour than from wheat flour when they are fortified with different source of iron. *J Nutr* 2003;133:154-9.
27. Anónimo. Nutrient Requirements of laboratory rat. Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition. En: Nutrient Requirements of laboratory animals. Academy Press. Washington: 1995. pp 11-79.