



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Medicina

Unidad de Posgrado

**Efecto de una mezcla de minerales y vitaminas sobre la  
capacidad antioxidante y la anemia inducida en ratas**

**TESIS**

Para optar el Grado Académico de Magíster en Nutrición con  
mención en Nutrición Clínica

**AUTOR**

Lorena Lois LOZANO VILLAFUERTE

**ASESOR**

Luzmila Victoria TRONCOSO CORZO

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Lozano, L. Efecto de una mezcla de minerales y vitaminas sobre la capacidad antioxidante y la anemia inducida en ratas [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina, Unidad de Posgrado; 2019.

---

## HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

**1) CODIGO ORCID DEL AUTOR:** 0000-0001-6549-4775

**2) CODIGO ORCID DEL ASESOR:** 0000-0003-1075-874X

**3) DNI DEL AUTOR:** 44369364

**4) GRUPO DE INVESTIGACIÓN:**

- ANTIOXIDANTES, METABOLISMO NUTRICIONAL Y SALUD (METABNUT)

**5) INSTITUCIÓN QUE FINANCIA PARCIALMENTE LA INVESTIGACIÓN:**

- FONDECIT, Proyecto N°145 – CIENCIACTIVA, 2015 – CONCYTEC.

- Laboratorio de Bioquímica Clínica y Nutricional del Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición de la Facultad de Medicina de la UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS.

**6) UBICACIÓN GEOGRÁFICA DONDE SE DESARROLLO LA INVESTIGACIÓN:**

- Bioterio y Laboratorio de Bioquímica Clínica y Nutricional del Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición de la Facultad de Medicina de la UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS. 12°03'28"S 77°01'23"O

**7) RANGO DE AÑOS QUE LA INVESTIGACIÓN ABARCÓ:** 2016 – 2018 (3 AÑOS)



Universidad Nacional Mayor de San Marcos  
Universidad del Perú. Decana de América



Facultad de Medicina

Unidad de Posgrado  
Sección Maestría

### ACTA DE GRADO DE MAGISTER

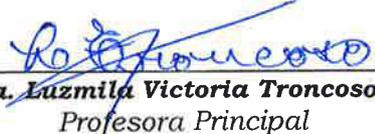
En la ciudad de Lima, a los 18 días del mes de diciembre del año dos mil diecinueve siendo las 11:00 am, bajo la presidencia del Dr. Felio Palomino Paz con la asistencia de los Profesores: Mg. Henry Guija Guerra (Miembro), Mg. Jovita Silva Robledo De Ricalde (Miembro), Mg. Oscar Gustavo Huamán Gutiérrez (Miembro) y la Dra. Luzmila Victoria Troncoso Corzo (Asesora); la postulante al Grado de Magister en Nutrición con mención en Nutrición Clínica, Bachiller en Nutrición, procedió a hacer la exposición y defensa pública de su tesis Titulada: **"EFECTO DE UNA MEZCLA DE MINERALES Y VITAMINAS SOBRE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y LA ANEMIA INDUCIDA EN RATAS"** con el fin de optar el Grado Académico de Magister en Nutrición con mención en Nutrición Clínica. Concluida la exposición, se procedió a la evaluación correspondiente, habiendo obtenido la siguiente calificación **B MUY BUENO 18**. A continuación el Presidente del Jurado recomienda a la Facultad de Medicina se le otorgue el Grado Académico de **MAGÍSTER EN NUTRICIÓN CON MENCIÓN EN NUTRICIÓN CLÍNICA** a la postulante **LORENA LOIS LOZANO VILLAFUERTE**.

Se extiende la presente Acta en tres originales y siendo las 12:10 pm, se da por concluido el acto académico de sustentación.

  
Mg. Henry Guija Guerra  
Profesor Auxiliar  
Miembro

  
Mg. Jovita Silva Robledo De Ricalde  
Profesora Asociada  
Miembro

  
Mg. Oscar Gustavo Huamán Gutiérrez  
Profesor Asociado  
Miembro

  
Dra. Luzmila Victoria Troncoso Corzo  
Profesora Principal  
Asesora

  
Dr. Felio Palomino Paz  
Profesor Invitado  
Presidente

Av. Grau 755 – Lima Teléfonos 619 7000 anexo: 4646

Web: [www.unmsm.edu.pe/medicina](http://www.unmsm.edu.pe/medicina)

## **Dedicatoria**

A mis padres, mi esposo, mi hijo Álvaro  
y a toda mi familia, ustedes son mi mayor  
estímulo a seguir adelante con mis proyectos.

## **Agradecimientos:**

A la Dra. Luzmila Troncoso Corzo, Doctora en Medicina y Docente investigador de la Facultad de Medicina San Fernando de la UNMSM, Asesora de mi tesis, por su incondicional apoyo en el diseño, ejecución y revisión crítica de la presente tesis.

Al Dr. Emilio Guija Poma, Doctor en Medicina y Docente emérito de la Facultad de Medicina San Fernando de la UNMSM, por su asesoría técnica y estímulo al desarrollo de la presente investigación.

Al Dr. Felio Palomino Paz, Médico Patólogo y Docente principal de la Facultad de Medicina San Fernando de la UNMSM, por su gran labor en la revisión histopatológica.

A mis maestros y todo el equipo de trabajo del Laboratorio de Bioquímica Clínica y Nutricional del Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos quienes contribuyeron al logro de mis objetivos.

Al financiamiento de FONDECIT: Proyecto N°145 – CIENCIACTIVA, 2015 – CONCYTEC.

## ÍNDICE GENERAL

Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Índice general	v
Lista de Tablas	vi
Lista de Figuras	vii
Resumen	ix
Abstract	x
<b>Capítulo 1</b>	
Introducción	01
<b>Capítulo 2</b>	
Marco teórico	12
<b>Capítulo 3</b>	
Metodología	23
<b>Capítulo 4</b>	
Resultados	29
Discusión	32
Conclusiones	65
Recomendaciones	66
Referencias bibliográficas	67
Anexos	80

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Peso corporal de ratas según tratamientos	41
Tabla 2. Concentración de Hemoglobina en ratas según tratamientos	41
Tabla 3. Capacidad antioxidante según FRAP en ratas post tratamientos	42
Tabla 4. Peso corporal y de órganos de ratas al final del experimento	42

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Concentración de Hemoglobina en ratas post tratamientos	43
Figura 2. Capacidad antioxidante según FRAP en ratas post tratamientos	43
Foto 1. Hígado de rata Control Negativo	44
Foto 2. Hígado de rata Control Positivo	44
Foto 3. Hígado de rata con Tratamiento Mezcla MV	45
Foto 4. Hígado de rata con Tratamiento sulfato ferroso	45
Foto 5. Hígado de rata hemínico	46
Foto 6. Estómago de rata Control Negativo	47
Foto 7. Estómago de rata Control Positivo	47
Foto 8. Estómago de rata con tratamiento Mezcla MV	48
Foto 9. Estómago de rata con tratamiento Sulfato ferroso	48
Foto 10. Estómago de rata con tratamiento Hemínico	49
Foto 11. Duodeno de rata Control Negativo	50
Foto 12. Duodeno de rata Control Positivo	50
Foto 13. Duodeno de rata con tratamiento Mezcla MV	51
Foto 14. Duodeno de rata con tratamiento Sulfato ferroso	51
Foto 15. Duodeno de rata con tratamiento Hemínico	52
Foto 16. Riñón de rata Control Negativo	53
Foto 17. Riñón de rata Control Positivo	53
Foto 18. Riñón de rata con tratamiento Mezcla MV	54
Foto 19. Riñón de rata con tratamiento Sulfato ferroso	54
Foto 20. Riñón de rata con tratamiento Hemínico	55
Foto 21. Bazo de rata Control Negativo	56
Foto 22. Bazo de rata Control Positivo	56
Foto 23. Bazo de rata con tratamiento Mezcla MV	57
Foto 24. Bazo de rata con tratamiento Sulfato ferroso	57
Foto 25. Bazo de rata con tratamiento Hemínico	58

Foto 26. Corazón de rata Control Negativo	59
Foto 27. Corazón de rata Control Positivo	59
Foto 28. Corazón de rata con tratamiento Mezcla MV	60
Foto 29. Corazón de rata con tratamiento: Sulfato ferroso	60
Foto 30. Corazón de rata con tratamiento: Hemínico	61
Foto 31. Cerebro de rata Control Negativo	62
Foto 32. Cerebro de rata Control Positivo	62
Foto 33. Cerebro de rata con tratamiento Mezcla MV	63
Foto 34. Cerebro de rata con tratamiento Sulfato ferroso	63
Foto 35. Cerebro de rata con tratamiento Hemínico	64

## RESUMEN

La anemia constituye un problema grave de salud pública en el Perú, afecta principalmente a los niños menores de tres años y gestantes, el tratamiento de elección se da mediante el uso de sales ferrosas. Sin embargo, existe baja adherencia al tratamiento. **Objetivos:** Determinar el efecto de una mezcla de minerales y vitaminas sobre la capacidad antioxidante y anemia inducida en ratas (concentración de hemoglobina) y (cambios bioquímicos e histológicos). **Metodología:** Estudio analítico, experimental clásico, longitudinal y prospectivo. Se utilizaron 30 ratas albinas Holtzman, distribuidos aleatoriamente en 5 grupos; Se indujo la anemia mediante extracción sanguínea y dieta deficiente de hierro. Se brindó tratamiento durante 21 días. Grupos: 1) Control negativo, 2) Control positivo, 3) Mezcla MV (fumarato ferroso: 3 mg Fe/Kg p.c. + zinc, ácido fólico, vit. A y vit. C), 4) Sulfato ferroso (3 mg Fe/Kg p.c.) y 5) Hierro hemínico (3 mg Fe/Kg p.c.). Se determinó la hemoglobina basal, post inducción y post tratamiento; se midió la capacidad antioxidante a través de la técnica FRAP y se analizaron los cortes histológicos de diversos órganos (hígado, estomago, duodeno, riñón, bazo, corazón y cerebro). **Resultados:** Los tres tipos de hierro lograron la recuperación de hemoglobina similar a valores basales, se halló diferencia significativa entre el Control Positivo y Mezcla MV (p-valor = 0,001). En la capacidad antioxidante post tratamiento se obtuvo diferencia significativa entre los grupos tratados con sulfato ferroso y hierro hemínico (p-valor = 0,033) a favor de éste último. Se hallaron cambios histopatológicos principalmente en hígado, duodeno y riñón en los grupos inducidos a anemia, sobre todo en el grupo tratado con sulfato ferroso. **Conclusión:** Los tres tratamientos de hierro produjeron un efecto antianémico. Los tratamientos con hierro iónico afectaron la capacidad antioxidante en suero a diferencia del tratado con hierro hemínico. El sulfato ferroso generó mayores alteraciones en la morfología celular, especialmente en hígado.

**Palabras clave:** Anemia, Capacidad antioxidante, Hierro, Sulfato Ferroso, Ratas (*fuentes: DeSC BIREME*).

## ABSTRACT

Anemia is a serious public health problem in Peru. It affects children under three years of age and pregnant women mainly. Usually, the treatment of choice is ferrous salts. However, there is low adherence to treatment. **Objectives:** To determine the effect of a mixture of minerals and vitamins on the antioxidant capacity and induced anemia in rats (hemoglobin concentration) and (Biochemical and histological changes). **Methodology:** Analytical, experimental classic, longitudinal and prospective study. 30 Holtzman albino rats were used, randomly distributed in 5 groups; Anemia was induced by blood extraction and iron deficient diet. Treatment was provided for 21 days. Groups: 1) Negative control, 2) Positive control, 3) MV mixture (ferrous fumarate: 3 mg Fe/Kg b.w. + zinc, folic acid, vit A and vit C), 4) Ferrous sulphate (3 mg Fe/Kg b.w.) and 5) Heme iron (3 mg Fe/Kg b.w.). The hemoglobin was determined at basal, post induction and post treatment; Antioxidant capacity was measured through the FRAP technique and the histological sections of various organs were analyzed (liver, stomach, duodenum, kidney, spleen, heart and brain). **Results:** The three types of iron achieved similar hemoglobin recovery at baseline values. A significant difference was found between the Positive Control and MV Mix (p-value = 0,001). In the post-treatment antioxidant capacity, significant difference was obtained between the groups treated with ferrous sulfate and heme iron (p-value = 0,033) in favor of the latter. Histopathological changes were found mainly in the liver, duodenum and kidney in the groups induced to anemia, especially in the group treated with ferrous sulfate. **Conclusion:** The three iron treatments produced an anti-anemic effect. The treatments with ionic iron affected the antioxidant capacity in serum unlike of treated with heme iron. Ferrous sulfate generated greater alterations in cell morphology, especially in the liver.

**Key words:** Anemia, Antioxidant capacity, Iron, Ferrous Sulfate, Rats  
(source: MESH NLM).

# CAPÍTULO 1

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Situación Problemática

Según la Organización Mundial de la Salud, la anemia “es un trastorno en el cual el número de eritrocitos (y, por consiguiente, la capacidad de transporte de oxígeno de la sangre) es insuficiente para satisfacer las necesidades del organismo” (OMS, 2011).

En el año 2011, se estimó que la anemia afectaba a alrededor de 800 millones de niños y mujeres en el mundo, de los cuales, 528.7 millones eran mujeres en edad reproductiva o gestantes; y 273.2 millones eran niños menores de 5 años, aproximadamente el 50% de los casos son atribuidos a la deficiencia de hierro (WHO, 2015).

De acuerdo al Instituto Nacional de Estadística e Informática INEI, (2018) en el Perú, “La anemia por déficit de hierro es estimada a partir del nivel de hemoglobina en la sangre. Es una carencia que a nivel nacional afecta a cuatro de cada diez niñas y niños menores de 6 a 35 meses de edad (43,5%), es mayor en el área rural (50,9%) que en el área urbana (40,9%)”.

Dada la alta prevalencia, en nuestro país la anemia constituye un problema grave de salud pública, se estima que hay 620 mil niños con anemia (MINSa, 2017b). El promedio nacional del porcentaje de anemia es elevado desde antes del año 2000 (60,9%) y se viene manteniendo desde el 2012 (44,5%), siendo mayor en las regiones de la Selva y Sierra según los resultados de la Encuesta Demográfica y de Salud Familiar – ENDES (INEI, 2013).

El tratamiento de elección de la anemia ferropénica se da mediante el uso de sales ferrosas, siendo el referente el sulfato ferroso, debido a su eficacia, ya que permite la normalización de valores de ferremia, saturación de transferrina y ferritina con incrementos más precoces y de mayor intensidad, además el costo es relativamente bajo. Sin embargo, las manifestaciones de

intolerancia digestiva pueden limitar su eficacia (Donato, Rapetti, Morán y Cavo, 2007).

Dado el comportamiento epidemiológico de la anemia en nuestro país, se han implementado estrategias de intervención para disminuir su prevalencia y reducir el impacto negativo sobre el desarrollo de los niños peruanos. En 1997, se estableció la suplementación con sulfato ferroso como estrategia para la prevención de anemia en niños de 6 a 36 meses, sin embargo, en el 2009 según ENDES solo el 12,6% recibían el suplemento de hierro, además se identificó baja adherencia y ausencia de estrategias de monitoreo y evaluación de la suplementación con sulfato ferroso (Román et al., 2014).

Luego de una revisión sistemática de 8 estudios en varios países, en la cual se evaluó la administración de micronutrientes y su efecto sobre la prevalencia de anemia, los resultados que el grupo asesor consideró prioritarios para la Propuesta fueron, la concentración de hemoglobina, dotación de hierro, la pauta de administración, y la duración de la intervención entre otros, los cuales apoyaron la directriz de ámbito mundial que recomienda “la fortificación domiciliaria de los alimentos con micronutrientes en polvo (hierro, vitamina A y Zinc) para mejorar la dotación de hierro y reducir la anemia en lactantes y niños menores de 5 años de edad” con frecuencia de un sobre diario en poblaciones con una prevalencia de anemia de 20% a más (OMS, 2012).

Sobre este tema, el Ministerio de Salud (2014) aprobó la Directiva Sanitaria N°056 que estableció la Suplementación con Multimicronutrientes y Hierro para la prevención de anemia en niñas y niños de 6 a 36 meses de edad, con la administración diaria de un sobre de 1.0g de polvo cuyo contenido consiste en, hierro (fumarato ferroso), vitamina A, ácido fólico, vitamina C y zinc, a partir de los 6 meses de edad durante 12 meses continuos.

En adelante se denominará al Multimicronutriente como Micronutriente, según la Directiva Sanitaria N°068, la cual brinda una indicación adicional

para la prevención de anemia: “La suplementación se iniciará a los 4 meses de vida con sulfato ferroso o complejo Polimaltosado férrico en gotas hasta los 5 meses con 29 días de edad”, considerándose una dosis a administrar de 2 mg de hierro elemental por kilogramo de peso diario, (MINSa, 2016a). Esquema de suplementación vigente de aplicación obligatoria, a nivel nacional, en todos los establecimientos del Sector Salud, según lo establece la Norma Técnica de Salud (NTS N°134) en el manejo terapéutico y preventivo de la anemia en niños, adolescentes, mujeres gestantes y puérperas (MINSa, 2017a).

Existe una baja adherencia a los suplementos de hierro, los cuales tienen como finalidad prevenir la deficiencia de hierro en población vulnerable, el consumo de estos es limitado, según ENDES 2016 sólo el 29.2% de niños de 6 a 36 meses consumió suplementos de hierro en los últimos 7 días (21.9% de micronutrientes, 5.8% en jarabe de sulfato ferroso y 3.4% en gotas de sulfato ferroso) (MINSa, 2017b).

Según el Ministerio de Salud (2017a) bajo la NTS N°134, toda gestante a partir de la semana 14 de gestación y las puérperas, hasta los 30 días después del parto, deben recibir suplemento de hierro en dosis diaria de 60 mg de hierro elemental más 400 µg de ácido fólico (1 tableta diaria) de forma preventiva, y como tratamiento de la anemia deberá administrarse 120 mg de hierro elemental más 800 µg de ácido fólico (2 tabletas diarias) durante 6 meses continuos. La suplementación de hierro se da bajo la forma de sulfato ferroso, en caso de adherencia inadecuada (<75%) o intolerancia digestiva se puede emplear hierro Polimaltosado.

Un estudio realizado en 18 establecimientos de salud del MINSa para conocer la adherencia al suplemento de hierro de las gestantes que acuden al control prenatal determinó que menos del 50% de las gestantes estudiadas mostraron una adherencia promedio a la suplementación, y esto disminuye conforme transcurren los meses de gestación, llegando a ser sólo del 30% al sexto mes de seguimiento, la adherencia baja se relacionó con mayor número

de efectos adversos producto de la suplementación como, náuseas y mal sabor de boca (Munayco, Gambirazio, Suárez, y Arias, 2009).

Al respecto, las intervenciones nutricionales para combatir la anemia se han enfocado en el uso de suplementos de hierro de origen iónico y ácido fólico en gestantes, lo cual no ha contribuido significativamente en reducir la prevalencia de anemia, debido a la baja adherencia al tratamiento asociado a reacciones gastrointestinales, motivo por el cual en otros países se viene empleando antianémicos en base a hierro hemínico de origen natural obtenidos a partir de la sangre bovina, obteniéndose eficacia antianémica superior al 90%, y no se han reportado reacciones adversas gastrointestinales, resultados que se han atribuido a su mayor biodisponibilidad debido a su naturaleza (González, García, Espinosa, Carmona y Cárdenas, 2011).

En la dieta humana el hierro (Fe) se encuentra como hierro hemínico (en tejido animal como carnes y en la sangre) y hierro no hemínico (en alimentos de origen vegetal, sales minerales y algunos alimentos de origen animal como la leche, y los huevos.), en los países en vías de desarrollo el consumo alimentario habitual de la población posee un bajo contenido de hierro hemínico, siendo una de las principales causas de la anemia por deficiencia de hierro (Gaitán, Olivares, Arredondo y Pizarro, 2006).

La condición de anemia (por deficiencia de Fe en la dieta) y el uso de preparados de Fe para prevenir y tratar la anemia pueden generar daño oxidativo, el cual se halló a nivel del hígado de animales anémicos por el movimiento del mineral desde éste órgano hasta los tejidos eritroides, debido a la reactividad del Fe; a nivel de la mucosa del duodeno, daño oxidativo a los lípidos y a las proteínas, siendo mayor en el grupo de animales que recibieron dieta de contenido normal en hierro (fumarato ferroso). Sin embargo, los organismos vivos se protegen del daño oxidativo mediante mecanismos enzimáticos endógenos (García, Morejón y Bourg, 2015).

En una sobrecarga de hierro, el hierro libre puede generar radicales libres que dañan componentes biológicos esenciales (lípidos, proteínas y DNA), por

lo cual el organismo debe ser capaz de controlarlo a través de la absorción de hierro, más que a través de su excreción (Palomo, Pereira y Palma, 2005).

Se denominan especies reactivas del oxígeno a las moléculas radicales y no radicales que son agentes oxidantes y/o son fácilmente convertidos a radicales. Los radicales libres son átomos o grupo de átomos que poseen un electrón desapareado, tienen capacidad de reaccionar con moléculas estables que están a su alrededor, captando un electrón de éstas con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica, generando que la molécula que cedió el electrón se convierta a su vez en un radical libre iniciándose así una reacción en cadena que destruye moléculas, membranas celulares y tejidos.

En cantidades moderadas los radicales libres cumplen una función fisiológica, al participar en el metabolismo normal, en la fagocitosis e inflamación y constituyendo un mecanismo de defensa ante virus, bacterias, parásitos y células anormales. En nuestro organismo dichos procesos se dan constantemente y deben ser controlados con una adecuada protección antioxidante. Los antioxidantes son sustancias capaces de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres mediante la liberación de electrones en nuestra sangre (Avello y Suwalsky, 2006).

Cuando el incremento del contenido intracelular de los niveles de especies reactivas de oxígeno, sobrepasa la capacidad antioxidante de la célula se produce estrés oxidativo, el cual induce daño a moléculas biológicas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, alterando la funcionalidad celular (Toxqui et al., 2010).

La utilización de modelos animales experimentales permite estudiar el desarrollo de enfermedades y el efecto terapéutico de los medicamentos antes de su aplicación clínica, la rata recién destetada ha sido el modelo animal más empleado en estudios relacionados con el hierro debido a que existen suficientes similitudes entre el ratón o rata y organismo del ser humano (García, García-Pérez, Ángeles-Campos, Carmona-Castro y Cárdenas-Vázquez 2013).

Sobre este tema, la inducción de anemia ferropénica en ratas se ha obtenido bajo algunos modelos. Llanllaya y Meléndez (2013) lograron la inducción mediante sangría, extrayéndoles 3 mL de sangre una vez por semana durante 4 semanas, y modificación de la dieta, antes y durante el periodo de experimentación, dieta baja en hierro de acuerdo a los requerimientos integrada por, maicena, claras de huevo y aceite vegetal.

Considerándose anemia en ratas, concentraciones de hemoglobina en sangre menores de 9 g/dL, resultados similares obtenidos por Tillán, Rodríguez, Gómez, Pardo y Agüero (2004) quienes utilizaron ratas machos con una masa corporal comprendida entre 250 y 300 g, los cuales fueron sometidos durante 15 días a una dieta semisintética deficiente en hierro y extracciones de 2,5 mL de sangre del plexo ocular 3 veces por semana, hasta provocar estados anémicos además de una dieta de depleción.

Estos aspectos nos motivan a estudiar en forma comparativa los efectos de la mezcla de algunos tipos de hierro y vitaminas sobre la capacidad antioxidante y la anemia inducida, conduciéndonos a conocer qué tratamiento de hierro además de influir sobre la concentración de hemoglobina logra una mejor capacidad antioxidante y menores manifestaciones a nivel tisular.

## **1.2 Formulación del Problema**

¿Cuál es el efecto de una mezcla de minerales y vitaminas sobre la capacidad antioxidante y la anemia inducida en ratas?

### 1.3 Justificación teórica

La anemia es un problema de salud global, superando el 43% a nivel nacional, 620 mil niños menores de tres años padecen de anemia en una población de 1,6 millones, el gobierno se ha propuesto como objetivo reducirla al 19% para el año 2021, a través de diversas estrategias (Arroyo-Laguna, 2017).

La anemia por deficiencia de hierro (Fe) o anemia ferropénica nutricional se caracteriza por la reducción o ausencia de depósitos de Fe, bajo porcentaje de saturación de transferrina, bajos niveles de Fe sérico, disminución de ferritina sérica y finalmente bajos niveles de Hemoglobina. La ferropenia ocasiona lesiones irreversibles a nivel neurológico, principalmente en la población infantil, alterando el desarrollo cognitivo, motor y de la conducta, incluso alteraciones sobre la fisiología auditiva y visual (MINSA, 2015).

En un estudio descriptivo en gestantes anémicas de un hospital MINSA de Lima, se analizaron factores asociados a la suplementación, y se determinó una asociación entre la mayor frecuencia de síntomas gastrointestinales con la administración de hierro (sulfato ferroso) en mujeres con baja adherencia al tratamiento, además 7 de cada 10 gestantes no conocían los beneficios de la suplementación (Guillen, 2014).

En la investigación de Troncoso et al. (2011) el tratamiento antianémico con sulfato ferroso y vitamina C ocasionó daño pulmonar, hemorragia septal e intraalveolar moderada a severa, enfisema focal moderado en ratas preñadas, fetos y crías; los animales de experimento sin tratamiento mostraron pulmones sin alteraciones.

En un estudio experimental se conoció que la administración de sulfato ferroso y vitamina C generó mayor producción de radicales libres y acción nociva sobre el tejido hepático (Guija et al. 2011). Los radicales libres son compuestos químicos caracterizados por poseer uno o más electrones desapareados, entre otros, pueden formarse intracelularmente en los

peroxisomas, en la cadena transportadora de electrones, durante la fagocitosis, la autooxidación o como consecuencia de la interacción de metales de transición como el hierro o cobre con ascorbato o peróxido de hidrógeno (Troncoso y Guija, 2007).

La eficiencia del hierro  $\text{Fe}^{2+}$  para ceder electrones y la del hierro  $\text{Fe}^{3+}$  para aceptarlos, es una característica que, bajo condiciones aerobias fácilmente se puede catalizar la formación de radicales libres nocivos, como el hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ) a partir de superóxido ( $\text{O}_2\cdot^-$ ) y peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), conocidos como intermediarios reactivos de oxígeno (ROS), los cuales se forman a través de la reducción incompleta de oxígeno molecular en la mitocondria. Los radicales libres promueven la oxidación de proteínas, peroxidación de lípidos de membrana y modificación de ácidos nucleicos. Un exceso de hierro con actividad redox agrava el estrés oxidativo y acelera la degeneración tisular (Toxqui et al., 2010).

Se ha reportado que la ferrodeficiencia genera deterioro al ADN, daño oxidativo al material genético y su estabilidad, revelado por el porcentaje de ADN en cabeza y cola (Díaz et al., 2014).

A consecuencia de la deficiencia de hierro, además de las manifestaciones propias de la anemia, se han descrito otras manifestaciones no hematológicas generadas por la disfunción de las enzimas hierro dependiente, entre ellas, alteraciones de la inmunidad celular, disminución de la termogénesis, alteraciones funcionales e histológicas del tubo digestivo, falla en la movilización de la vitamina A hepática, entre otros (Olivares y Walter, 2004).

De acuerdo a lo encontrado en la literatura, el plantear un estudio que revele cuales son los efectos de distintos tratamientos de hierro no solamente sobre la concentración de hemoglobina sino sobre su repercusión en la capacidad antioxidante del organismo y los probables efectos sobre algunos órganos justifican el desarrollo de la presente investigación.

#### 1.4 Justificación práctica

De acuerdo Alcázar (2012), se estimó el costo de la anemia tomando en cuenta la carga que representa principalmente en dos componentes, su influencia en el costo para la economía (por pérdida cognitiva, por pérdida por escolaridad y por pérdida de productividad) y en el costo para el estado (por atención de partos prematuros de mujeres con anemia, por años de repitencia, por tratamiento de los niños y gestantes con anemia) a nivel nacional y calculó que debido a esto se pierde el 0,62% del PBI, es decir aproximadamente S/. 2 777 millones, ésta cifra es cinco veces mayor al presupuesto del SIS del año 2009 y casi el 38% del presupuesto del sector salud a nivel nacional del mismo año.

Respecto a la prevención de anemia mediante la administración de micronutrientes, un ensayo comunitario concluyó que se han encontrado barreras de tipo subjetivas y objetivas para una adecuada adherencia a la suplementación, encontrándose la modalidad de atención, interrelación entre la madre y el personal de salud, la falta de monitoreo de la suplementación (visitas domiciliarias como parte del seguimiento para fortalecer los mensajes respecto a la preparación y consumo del suplemento), además la madre considera la anemia como un proceso normal además se menciona efectos gastrointestinales no deseados y ello debido a una mala preparación del suplemento (CENAN, 2016).

Se han identificado barreras referidas al producto que se emplea como suplemento para la prevención de anemia, los micronutrientes en polvo se mezclan con el alimento del niño, la madre lo percibe como un medicamento desconociendo su importancia, además el sabor y forma de presentación han generado rechazo en algunos niños, con efectos no esperados como estreñimiento, por otra parte, las barreras referidas a la familia y comunidad, ejercen una gran influencia para la adopción o no de las recomendaciones brindadas por el personal de salud durante la consejería (Aparco y Huamán-Espino, 2017).

En relación a la prevención y tratamiento de la anemia, el sulfato ferroso es la sal ferrosa más utilizada. En el año 2016, la Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas elaboró un Informe Técnico para el proceso de elaboración de la Lista Complementaria de medicamentos para el control de la anemia infantil y parasitosis, para el cual realizaron una revisión de la información científica respecto al medicamento a base de hierro, como polimaltosa (Hierro oral trivalente acoplado con un complejo de azúcar) y sulfato ferroso.

Se halló según la base de datos VigiAccess de la OMS se registraron 46,306 sospechas de Reacciones Adversas a Medicamentos (RAMs) con preparaciones de hierro en general además, el Centro Nacional de Farmacovigilancia y Tecnovigilancia informó que desde el año 2006 al 2016 se registraron 286 Reacciones Adversas reportadas con Sulfato ferroso, clasificados según la gravedad como no serio, siendo el estreñimiento uno de los efectos secundarios más comunes, significando ello un factor limitante para la adherencia a la terapia con hierro oral, la mayor incidencia asociada al uso de altas dosis de hierro.

El Equipo Técnico concluyó que existe evidencia científica con resultados controversiales que el hierro polimaltosado tenga una mejor respuesta clínica y menores eventos adversos que el sulfato ferroso para la prevención y tratamiento de la anemia por deficiencia de hierro, incluyéndolo en la Lista Complementaria de medicamentos para el control de la anemia infantil y parasitosis, al Petitorio Nacional Único de Medicamentos Esenciales como una alternativa en pacientes que presentan intolerancia con el uso de sulfato ferroso (MINSA, 2016b).

En los últimos años, el Ministerio de Salud viene proponiendo esquemas de suplementación preventiva con hierro (sulfato y fumarato ferroso) que no han presentado una adecuada adherencia en su mayoría, por lo cual en la presente investigación comparamos el hierro iónico versus el hierro hemínico y sus efectos sobre la anemia inducida en ratas.

## **1.5 Objetivos**

### **1.5.1 *Objetivo general***

Determinar el efecto de una mezcla de minerales y vitaminas sobre la capacidad antioxidante y la anemia inducida en ratas.

### **1.5.2 *Objetivos específicos***

- a. Determinar el efecto de una mezcla de minerales y vitaminas sobre la capacidad antioxidante en ratas con anemia inducida.
- b. Determinar el efecto de una mezcla de minerales y vitaminas sobre la concentración de hemoglobina en ratas con anemia inducida.
- c. Determinar el efecto de una mezcla de minerales y vitaminas sobre cambios histológicos en órganos de ratas con anemia inducida.

## **CAPÍTULO 2**

### **2. MARCO TEÓRICO**

#### **2.1 Marco epistemológico de la investigación**

La presencia de anemia maternoinfantil motiva mucha preocupación en todos los ámbitos, ya que sus consecuencias repercuten negativamente en la salud y el desarrollo temprano de niñas y niños, a nivel cognitivo, motor, emocional y social afectándolos a corto y largo plazo (MINSA, 2017b).

En el presente trabajo de investigación se ha impulsado analizar el efecto de una mezcla de minerales y vitaminas sobre la capacidad antioxidante y la anemia inducida en ratas, ya que se conoce del uso de sales ferrosas y su efecto sobre la regeneración de hemoglobina, pero es incierto aún los probables efectos adversos sobre los órganos que puedan generar dichos tratamientos.

Además de buscar mejorar la condición clínica, se requiere generar el menor daño posible. La investigación con animales experimentales es tan antigua como la ciencia misma, gracias al uso de los animales, se han hecho múltiples hallazgos e invenciones para un gran número de afecciones humanas y animales, los cuales han sido constantemente reportados y celebrados (Cardozo de Martínez y Mrad de Osorio, 2008).

Por lo cual, se ha propuesto una metodología de acuerdo a estudios de referencia, teniendo en consideración el cumplimiento de los requisitos de una investigación científica y las disposiciones para el manejo adecuado de los animales de experimentación.

Se ha establecido la correlación entre las variables del estudio, de acuerdo a los objetivos planteados. Para su ejecución se cumplieron con rigurosidad las exigentes normas y estándares nacionales e internacionales para el trabajo preclínico.

## 2.2 Antecedentes de investigación

Se viene investigando la persistencia de la anemia ferropénica y la baja adhesión a la terapia con sulfato ferroso, teniendo como principal barrera el disconfort abdominal, el desagradable sabor metálico y tinción dental, motivando un estudio para evaluar la aceptación y tolerancia a los microgránulos de fumarato ferroso microencapsulado en relación a las gotas de sulfato ferroso, y se determinó que el porcentaje estimado de niños que incrementaron sus niveles de hemoglobina hasta alcanzar un estado “no anémico” en el grupo con fumarato ferroso (54%) fue significativamente mayor que en el grupo sulfato ferroso (21%), así mismo respecto al promedio de cumplimiento del tratamiento hallándose 78 y 55%, respectivamente (Urquidi, Mejía y Vera, 2007).

García, González, Menéndez, González y Bourg (2008) ejecutaron un diseño experimental utilizando formulaciones de hierro iónico y no iónico (para estimular simultáneamente ambas vías de absorción del hierro usando dosis inferiores lo que conllevaría una menor tasa de efectos adversos gastrointestinales), protocolo que distribuyó las unidades biológicas en 4 grupos, grupo control (I), hierro hemínico (II), fumarato ferroso (III) y la mezcla de hierro hemínico-fumarato ferroso (IV); Se observó un incremento significativo de la concentración de hemoglobina en los grupos respecto al basal. En el Grupo IV se registraron los mayores incrementos de hemoglobina, los niveles séricos de hierro fueron significativamente mayores en los grupos II – IV.

González et al. (2011) compararon tres tipos de tratamientos en ratas con anemia inducida, empleando sulfato ferroso, hierro hemínico, solos y combinados, los cuales mostraron un efecto antianémico similar, respecto al Fe hepático, el grupo que recibió sulfato ferroso mostró el contenido hepático máximo de Fe lo cual pudiera desencadenar efectos adversos, entre ellos, daño oxidativo de células y órganos.

En un estudio experimental Alférez et al. (2014) reportaron que la suplementación con hierro no hemo o la combinación de hierro hemo/no hemo es eficiente para restablecer los parámetros hematológicos en las ratas anémicas. Sin embargo, los tratamientos basados en sobrecarga de hierro generan mayor estrés oxidativo, pudo comprobar que una menor cantidad de hierro y si es de tipo hemo, generó un menor daño a proteínas a nivel intestinal y eritrocitos.

Díaz et al. (2014) investigaron a cerca de la estabilidad del material genético durante la recuperación de la anemia ferropénica nutricional, tras la administración de hierro hemínico y no hemínico a diferentes dosis y descubrió que “el suplemento de hierro hemínico en la dieta, en pequeña cantidad, minimiza la producción de radicales libres y evita daños en el ADN causado por tratamientos prolongados con este mineral”.

Por lo ya expuesto, desde las últimas décadas vienen promoviendo la búsqueda de nuevas formas de suplementación. Apolinario, Herrada y Nole (1998) estudiaron la influencia de galletas fortificadas sobre el nivel de hematocrito en niños de 7 meses a 3 años en el Establecimiento Penitenciario Mujeres- Chorrillos, se determinó que el 51.6% de los niños presentaba anemia, los cuales fueron intervenidos con galletas fortificadas con hierro hemínico (obtenido de sangre desecada de bovino), administrándose 28.25 mg de hierro en 50 g de galleta por un período de 45 días. La fortificación elevó los niveles de Hematocrito en un 61.3% de la población, con una tasa de recuperación en el grado anémico del 50% y un incremento promedio de hematocrito de 1.7%.

A su vez, Baltazar y Tarmeño (1998) analizaron la influencia de galletas fortificadas con hierro hemínico sobre los niveles basales de hemoglobina en adolescentes en Lima, hallando buena aceptación y tolerancia, además del incremento en los niveles basales de hemoglobina en un 76.5% de la población sujeto de estudio. La mayor proporción de la muestra (35.3%) presentó un incremento de 0.33 gr/dL de hemoglobina.

La deficiencia de hierro no sólo causa anemia, también afecta tejidos, pues este mineral es parte fundamental de la hemoglobina, componente clave de enzimas que participan en la producción de energía celular. Un estudio comprobó que la deficiencia de proteína y hierro, generó cambios histomorfológicos de la mandíbula, disminuyendo la capa dentinaria, los odontoblastos y fibroblastos pulpaes, entre otros (Cáceres, 2016).

Abdel-Reheim, Shehata y Abo-Saif (2017) desarrollaron un experimento en ratas en el cual concluyeron que el uso de sulfato ferroso (6 mg Fe/Kg p.c./día) produjo hepatotoxicidad, observándose elevación de marcadores de daño de la membrana del hepatocito, tales como transaminasas, marcadores oxidativos e inflamatorios, incremento significativo de malondialdehído generado por el estrés oxidativo.

### **2.3 Bases Teóricas.**

Desde hace más de un siglo se reconoce al hierro como un mineral esencial, el hierro está muy conservado dentro del cuerpo, aproximadamente el 90% se recupera y reutiliza cada día. El resto se excreta, principalmente por la bilis. Se debe disponer de hierro en la dieta para mantener el equilibrio del hierro y compensar esta diferencia del 10%, o se produce una deficiencia de hierro (Mahan y Escott-Stump, 2009).

La deficiencia de hierro es uno de los principales problemas de salud pública asociados a la nutrición, afectando a la población materno-infantil. La ingesta recomendada de hierro en menores de 3 años es 11 mg por día, el CENAN mediante un estudio alimentario comprobó un consumo reducido de hierro en todos los quintiles socioeconómicos, el 90% de los niños no alcanza a consumir los niveles recomendados de hierro de origen animal (MINSa, 2017b).

Desde el punto de vista biológico, las dos formas relevantes de hierro son el oxidado o férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) y el reducido o ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ). En los países en

vías de desarrollo las dietas tienen bajo contenido de Hierro Hem y alto aporte de Hierro No Hem. Este último tiene una biodisponibilidad que usualmente es baja, además está afectada por los inhibidores presentes en las dietas ricas en productos de origen vegetal y pobres en carnes. No obstante, el estado fisiológico y las reservas de hierro del individuo modulan la biodisponibilidad de este metal (Gaitán et al., 2006).

Respecto a los tipos de suplemento de hierro oral, en el país se encuentran disponible como sales ferrosas, entre las más usadas tenemos: bivalentes ( $\text{Fe}^{2+}$ ): sulfato ferroso, fumarato ferroso, gluconato ferroso, y trivalentes ( $\text{Fe}^{3+}$ ): hierro polimaltosa, proteínsuccinilato; las cuales varían en su forma galénica (de liberación prolongada y rápida) encontrándose más efectos adversos si no está en una formulación de liberación prolongada (MINSA, 2016b).

Según Tostado-Madrid, Benítez-Ruiz, Pinzón-Navarro, Bautista-Silva y Ramírez-Mayans (2015) en el organismo el hierro participa como:

1. Hierro funcional: conformando diversos compuestos, entre ellos 65% hemoglobina, 15% enzimas que lo utilizan como cofactor o grupo prostético (catalasas, peroxidasas, oxigenasas y transportador de los citocromos) y mioglobina.
2. Hierro de depósito formando la ferritina y la hemosiderina (20%).
3. Hierro de transporte en la transferrina (entre 0.1 y 0.2%).

El hierro constituye uno de los micronutrientes a incorporar diariamente en la dieta. Es absorbido en el duodeno y yeyuno superior; en el estómago la secreción de ácido clorhídrico y enzimas ayudan no sólo a liberar al hierro de la matriz alimentaria sino también a su solubilidad, favoreciendo la reducción de este catión a la forma ferrosa.

Su absorción a nivel intestinal está influenciada además por la cantidad y la forma química del mineral en la dieta, por el consumo simultáneo de factores estimulantes e inhibidores, por el nivel nutricional de hierro en el individuo y según su estado de salud. Desde el punto de vista nutricional el

hierro se clasifica en hierro hemínico y hierro no hemínico (Cabrera y García, 2014).

El proceso de absorción del hierro puede ser dividido en tres etapas: 1) Captación de hierro, 2) Transporte intraenterocítico, y 3) Almacenamiento y transporte extraenterocítico. Durante la fase intestinal de la asimilación de nutrientes, el hierro se enlaza a sitios específicos de la membrana de la mucosa, es internalizado, para después ser captado en la célula de la mucosa o transportado a la membrana basolateral, donde se acopla a la transferrina plasmática. Este proceso está mediado por factores intraluminales, mucosales y somáticos (Iannacone, 2014).

La dieta normal contiene 10-20 mg de hierro aproximadamente, de lo cual, sólo se absorbe entre 1-2 mg al día, puede estar disponible como hierro hemínico u orgánico (10-20% del hierro presente en la dieta), o como hierro no hemínico o inorgánico (80-90% del total del hierro) el cual presenta menor biodisponibilidad, puesto que su absorción puede ser interferida por otros factores dietarios tales como los fitatos, el calcio, o la mucina (Sermini, Acevedo y Arredondo, 2017).

Del hierro no hemínico de los vegetales se absorbe entre el 2 y 10%, y se suele absorber entre el 10 y 30% del hierro de origen animal (hemínico y no hemínico). La eficiencia de la absorción en las personas con anemia por deficiencia de hierro puede ser de hasta 50%, este nivel de absorción no es común. El ácido ascórbico es el estimulante más potente de la absorción del hierro, lo reduce y forma un quelato con el hierro que permanece soluble al pH alcalino del intestino delgado distal (Mahan y Escott-Stump, 2009).

El hierro hemínico se genera por medio de la degradación de la hemoglobina y de la mioglobina, ambas hemoproteínas constituidas por cadenas polipeptídicas; cada una va unida a un grupo prostético llamado hemo. Por lo tanto, cuando el átomo de hierro proviene de estas proteínas se obtiene en forma de grupo hemo compuesto por el átomo en estado ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) y un anillo tetrapirrólico (Protoporfirina). Cuando se ingieren

alimentos con hierro hemínico en su digestión la hemoglobina y la mioglobina son degradadas en el estómago por acción del ácido clorhídrico y la pepsina, especialmente por enzimas pancreáticas en el lumen intestinal, liberando el grupo hemo.

El grupo hemo ingresa al enterocito atravesando la membrana apical mediante captación por una proteína transportadora de hemo HCP-1. En el citosol la hemooxigenasa HO libera el hierro de la estructura tetrapirrólica (grupo hemo). Una parte del  $\text{Fe}^{2+}$  es almacenada como ferritina o como hemosiderina en menores cantidades, mientras que la otra cantidad de hierro es utilizada pasando a la circulación sanguínea por medio de la ferroportina, donde es oxidada de  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  por la proteína hefaestina o la ceruloplasmina plasmática, el cual se une a la apotransferrina circulante convirtiéndose en transferrina sérica (Tostado-Madrid et al., 2015).

La absorción del hierro no hemínico requiere de su solubilización y reducción del estado férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) a ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) que inicia en el medio ácido gástrico, debido a que el hierro en estado férrico es muy poco absorbible. Existen factores dietarios que también tienen la capacidad de reducir al hierro como el ácido ascórbico, la cisteína y la histidina.

En el duodeno, la actividad de la enzima citocromo B reductasa duodenal (DCytB) en el borde del cepillo, cumple con la función de reducir el hierro, luego éste es ingresado al citoplasma mediante el transportador de metales divalentes DMT1, el cual es capaz de transportar hierro y otros metales en su estado reducido.

En el citoplasma, según las necesidades del nutriente, el hierro puede: 1) ser almacenado en la ferritina (proteína reservorio de hierro y que puede contener hasta 4500 átomos de hierro); 2) ser utilizado en los procesos metabólicos celulares, o 3) puede ser transportado a la sangre a través de la membrana basolateral, mediante el transportador ferroportina. Junto a este transportador se encuentra la proteína hefestina (una óxido-reductasa) que reoxida el hierro a  $\text{Fe}^{3+}$ . En este estado, es captado por la transferrina,

principal proteína transportadora de Fe plasmático, la cual transporta el hierro a los tejidos periféricos (Ver Anexo 1) (Sermini et al., 2017).

Tras la absorción del hierro, éste es transportado por la transferrina plasmática ( $\beta$ 1-globulina que fija el hierro procedente del tubo gastrointestinal, los depósitos o de la degradación de la hemoglobina) hasta la médula ósea (para la síntesis de hemoglobina), las células endoteliales (depósito) o la placenta (necesidades fetales). En la superficie de los eritrocitos se generan receptores de transferrina en respuesta a la necesidad de hierro. Cuando existe deficiencia de hierro, hay tantos receptores de transferrina sobre la superficie eritrocítica pendientes del hierro, que algunos de ellos se desprenden y permanecen en el suero. Su presencia es un indicador precoz de deficiencia de hierro; una cantidad alta de receptores solubles de transferrina séricos (RSTF) expresa mayor déficit de hierro (Mahan y Raymond, 2017).

En el cuerpo están almacenados entre 200 a 1500 mg de hierro en forma de ferritina y hemosiderina, el 30% del depósito de hierro está en el hígado, el 30% en la médula ósea y el resto en el bazo y en el musculo. Se pueden movilizar del hierro de los depósitos hasta 50 mg/día, 20 mg de los cuales se utilizan para la síntesis de hemoglobina. La excreción de hierro se da mediante pérdidas sanguíneas y en cantidades muy pequeñas por las heces (proveniente del hierro que no se pudo absorber, la bilis y células exfoliadas del tubo digestivo), el sudor y la exfoliación normal del cabello y la piel. Casi no se excreta hierro por la orina.

Las funciones del hierro se relacionan con su capacidad de participar en reacciones de oxidación y reducción, es un elemento muy reactivo que puede interactuar con el oxígeno para formar productos intermediarios con capacidad de dañar las membranas celulares y degradar el ADN. El hierro debe estar unido a proteínas para evitar estos efectos oxidativos (Mahan y Escott-Stump, 2009).

Durante la administración de preparados de hierro, se estimula el movimiento de Fe en varios tejidos y órganos, este proceso incrementa el riesgo de generar daño oxidativo por la elevada reactividad del mineral. Sin embargo, los organismos vivos se protegen del daño oxidativo generado por el hierro mediante, la participación de proteínas secuestradoras de hierro, aumentando la absorción intestinal o por la acción combinada de los mecanismos enzimáticos endógenos. Cuando se produce un desbalance entre la formación y la neutralización de prooxidantes, como resultado de un incremento en la generación de especies reactivas del O<sub>2</sub> (EROs), una disminución de los sistemas de protección antioxidante o un fallo en la reparación del daño oxidativo, se presenta el estrés oxidativo (García et al, 2015).

En condiciones fisiológicas, el hierro extracelular se encuentra ligado a la transferrina, la cual lo mantiene soluble y “prácticamente” no-tóxico. En situaciones de sobrecarga de hierro, se satura la capacidad de unión con la transferrina. Así, el hierro no ligado, se internaliza en tejidos, a través de mecanismos poco definidos que originan daño celular. Diversos estudios han investigado el efecto del hierro en la peroxidación lipídica, influyendo en la modificación oxidativa de LDL, aumentando así su potencial aterogénico (Toxqui et al., 2010).

Se conoce que el organismo posee sistemas de defensa antioxidante que impiden la formación de radicales libres, bloqueando su propagación o interaccionando con ellos. Conforman este sistema la superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, ácido úrico, proteínas, glucosa, glutatión, grupos sulfidrilos, entre otros. Asimismo, es posible ingerir en la dieta sustancias naturales o de origen sintético con capacidad antioxidante, como flavonoides, polifenoles, β-caroteno, vitamina E, vitamina C, dimetilsulfóxido entre otros (Troncoso y Guija, 2007).

Los sistemas de defensa antioxidante celular son mecanismos con los cuales la célula anula la reactividad y/o reduce la producción de radicales libres, mecanismos generados en la vida media de los radicales libres y

comprenden moléculas pequeñas, endógenas y exógenas con capacidad antioxidante, éstas últimas provenientes de la dieta. La contribución de dichos compuestos depende no sólo de su concentración y de su calidad antioxidante, sino que también de su interacción con otros componentes.

El plasma puede estabilizar especies reactivas del oxígeno previniendo reacciones que puedan generar especies aún más nocivas. La capacidad antioxidante celular está principalmente determinada por sistemas enzimáticos, mientras que las plasmáticas están asociadas a la concentración de antioxidantes suplementados por la dieta (Avello y Suwalsky, 2006).

Para conocer el estado del hierro existen biomarcadores del metabolismo de hierro tales como, concentración de hierro sérico, concentración de ferritina sérica, volumen corpuscular medio, porcentaje de saturación de transferrina, hematocrito, hemoglobina, hepcidina, ésta última viene siendo muy investigada.

La hepcidina es una hormona peptídica sintetizada en el hígado que regula la absorción, y la movilización del hierro correspondiendo el reciclaje del mismo a los macrófagos, cuya expresión es afectada por los requerimientos de hierro del organismo. Se ha comprobado la relación directa de esta hormona con casos de anemia crónica, así como con la deficiencia de hierro asociada con la obesidad (Tostado-Madrid et al., 2015).

Respecto a la regulación del metabolismo del hierro a través de la hepcidina, su síntesis es estimulada por las reservas y los niveles plasmáticos de hierro, así como por la inflamación a través de citoquinas (TNF $\alpha$ , IL-6); cuando los niveles de hierro sanguíneo aumentan, se activa la síntesis de hepcidina para prevenir la absorción y mantener la homeostasis. Por el contrario, la expresión de la hepcidina es inhibida por la actividad eritropoyética, para asegurar que las concentraciones de hierro plasmático extracelular y las reservas se mantienen estables (Toxqui et al., 2010).

La Hemoglobina (Hb) es el principal componente de los eritrocitos, la síntesis de eritrocitos tiene lugar en la médula ósea y está bajo el control de la eritropoyetina. El hierro es un componente esencial del grupo heme que forma parte de la hemoglobina. Una disminución de hierro, induce una disminución en la síntesis del grupo heme y, por lo tanto, una disminución en la síntesis de hemoglobina (Sermini et al, 2017).

Según Palomo et al. (2005) “La estructura de la Hb es resultado de un largo proceso evolutivo, con perfecta adaptación a la función que desarrollan las células animales, esto es: transportar  $O_2$  desde los pulmones a los tejidos del cuerpo y facilitar el regreso de  $CO_2$  desde los tejidos a los pulmones”. La hemoglobina principalmente es una proteína transportadora de  $O_2$ . En cada hematíe hay alrededor de 280 millones de moléculas de hemoglobina. La consecuencia de la anemia es la hipoxia tisular; lo cual altera el proceso de generación de energía en las células debido a la disminución de la disponibilidad de oxígeno, afectando la capacidad funcional de los órganos.

## CAPÍTULO 3

### 3. METODOLOGÍA

#### **Tipo y Diseño de Investigación**

- Estudio experimental: Analítico, experimental clásico, longitudinal y prospectivo.
- Diseño de investigación: Ensayo preclínico “*in vivo*”
- Selección de muestra: Distribución aleatoria simple.

#### **Animales de experimentación:**

Se utilizaron 30 ratas albinas Holtzman adultos machos, mayor de 2 meses de edad, procedentes del Instituto Nacional de Salud, y permanecieron en el Bioterio N°03 de la Facultad de Medicina San Fernando de la UNMSM, con micro y macroambiente controlado.

Los animales de experimentación fueron distribuidos aleatoriamente en 5 grupos de 6 animales cada uno, alojados en jaulas metabólicas individuales de acero inoxidable, a temperatura ambiente de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  y humedad relativa de  $75\% \pm 5\%$  controladas. Además, con ciclo luz/oscuridad de 12 horas también controlados. Se les brindó alimentación balanceada (La Molina-Alimentos balanceados) y agua *Ad libitum* durante la primera semana de aclimatación.

#### **Diseño Experimental:**

Para la inducción de anemia se empleó el método de depleción-repleción de la Hemoglobina (Hb) según Ortiz-Alva y Román-Vargas (2013) mediante sangrado periódico, complementado con una dieta deficiente en hierro elaborada manualmente.

## INDUCCIÓN DE ANEMIA:

### Período de depleción:

#### - *Elaboración de la dieta:*

Según el Subcomité del Consejo Nacional de Investigación EE. UU., a cerca de la nutrición del animal de laboratorio (1995), durante la etapa de crecimiento cada kg de dieta balanceada contiene 35 mgFe/día, y considerando un consumo promedio de 30 g de ración de alimento diario por unidad biológica, ésta aporta 1,05 mg hierro al día.

Para complementar el proceso de inducción de anemia, además de la extracción sanguínea, se planificó una dieta deficiente de hierro que aporte menos del 50% de lo requerido. Para tal fin se seleccionaron alimentos de muy bajo aporte y biodisponibilidad de hierro.

La dieta estuvo integrada por maíz amarillo y arroz blanco corriente, los cuales según análisis teórico de la ración promedio aportó 0,48 mg de hierro (menos del 46% del requerimiento diario) de acuerdo a las Tablas Peruanas de Composición de Alimentos del Centro Nacional de Alimentación y Nutrición (2017).

### Valor nutricional de la dieta deficiente de hierro en base a 30 g de parte comestible:

Composición	Alimento (peso)		Total
	Arroz blanco (10 g)	Maíz amarillo (20 g)	
Agua (g)	1.3	2.7	4
Proteína (g)	0.78	1.34	2.12
Grasa (g)	0.1	1.0	1.1
Carbohidrato (g)	7.8	14.7	22.5
Fibra cruda (g)	0.0	0.8	0.8
Calcio (mg)	1	1	2
Fósforo (mg)	13	53	67
Zinc (mg)	0.15	0.30	0.45
Hierro (mg)	0.10	0.38	0.48
Vitamina A (mg)	0.0	0.0	0
Vitamina C (mg)	0.09	0.14	0.23

Fuente: Tablas Peruanas de Composición de Alimentos. CENAN (2017).

- *Extracción sanguínea:*

Se realizó 3 veces por semana, durante 2 semanas. Procedimiento:

1. Los animales fueron anestesiados con 0,075 mL de ketaxyl (Ketamina 100 mg, Xilacina 20 mg y Atropina sulfato 1 mg) + 0,15 mL cloruro de sodio vía intramuscular.
2. La dilatación de la cola se logró mediante su sumersión en agua, a una temperatura de 40 °C por 3 minutos.
3. Se ubicó la vena lateral de la cola para extracción sanguínea por goteo (3 mL). Luego se repuso de 3 mL de cloruro de sodio 0,9% vía subcutánea.

**Período de repleción:**

Luego de haber logrado la depleción de los valores de hemoglobina basal, las unidades biológicas recibieron tratamiento cada 24 horas mediante una cánula orogástrica de acero durante 3 semanas, y continuaron con la dieta deficiente de hierro empleada desde el período de depleción (Ortiz-Alva & Román-Vargas, 2013).

- *Tratamientos:*

Se conformaron 5 grupos, 2 controles y 3 experimentales: **Grupo 1:** control negativo, **Grupo 2:** control positivo, con dieta deficiente de hierro, **Grupo 3:** dieta deficiente de hierro y Mezcla de Minerales y Vitaminas (fumarato ferroso: 3 mg Fe/Kg p.c. + zinc, ácido fólico, vitamina A y vitamina C), **Grupo 4:** dieta deficiente de hierro y sulfato ferroso (3 mg Fe/Kg p.c.), **Grupo 5:** dieta deficiente de hierro y hierro hemínico (3 mg Fe/Kg p.c.) (Anexo 2).

- *Productos utilizados:*

Mezcla de minerales y vitaminas: Suplemento de micronutrientes en polvo fabricado por Piramal Enterprises Limited, cada sobre de 1 g contiene: Fumarato ferroso (12,5 mg Fe elemental), zinc (5 mg), ácido fólico (160 µg), vitamina A (300 µg Retinol equivalente) y vitamina C (30 mg).

Sulfato ferroso: Solución oral en gotas, fabricado por Instituto Quimioterápico S.A., contiene: Sulfato Ferroso Heptahidratado (125 mg/mL Equivalente a 25 mg de hierro elemental).

Hierro Hemínico: Hemin Powder fabricado por Xi'an Wison Biological Technology Co., Ltd, producto en polvo cristalino proveniente de sangre bovina (8,55% de hierro).

**Recolección de datos:**

- Peso: Se midió el peso corporal al inicio de experimento, post inducción de anemia y post tratamiento, utilizando una balanza electrónica de laboratorio.
- Determinación de la hemoglobina: Se consideró 3 mediciones, dosaje basal, post inducción de anemia y post tratamiento. Se realizó la punción capilar en el extremo de la cola, para la toma de muestra de sangre se utilizó una microcubeta Hb201 y se empleó el procedimiento de referencia para la Determinación de la Hemoglobina mediante Hemoglobinómetro portátil modelo Hemocue (MINSa, 2013).
- Sacrificio: Previo ayuno de 12 horas, los animales de experimento fueron anestesiados mediante inhalación de éter, se extrajo 3 mL de sangre por punción intracardiaca en tubos Vacutainer para posteriormente obtener el suero, luego se realizó la dislocación cervical, se extrajeron y pesaron los órganos.

- Determinación de la Capacidad antioxidante (Método FRAP): se empleó el método “Ferric Reducing Ability of Plasma” capacidad de reducción férrica del plasma, prueba sensible en la medición del poder reductor. Este método mide la reducción del complejo férrico 2,4,6-tri-piridil-s-triazina (TPTZ), en la cual el hierro férrico ( $\text{Fe}^{3+}$  -TPTZ) se reduce a ion ferroso a bajo pH, generando el complejo ( $\text{Fe}^{2+}$  - TPTZ) el cual posee una coloración azul intenso y se puede monitorear a 593 nm (Szollosi y Vargas, 2002).

Para su determinación se utilizó una muestra de sangre extraída previo al sacrificio, se centrifugó a 1500 rpm en una centrífuga clínica durante 20 minutos, obteniéndose el suero, para reservarlo en envases de eppendorf. En un tubo de ensayo se colocó 50  $\mu\text{L}$  de suero, 950  $\mu\text{L}$  de agua destilada y 1 mL de solución FRAP (mezcla de 0,1 mol/L de buffer acetato de sodio (pH 3,6), 10 mmol/L 2,4,6-TPTZ y 20 mmol/L de cloruro férrico) se agitó y sometió a baño maría a 37°C durante 15 minutos para luego dar lectura a 593 nm en un equipo Espectrofotómetro NV 203, ubicado en el laboratorio de Bioquímica y Nutrición de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, y finalmente se expresó los resultados como concentración de  $\mu\text{moles}$  de  $\text{Fe}^{2+}/\text{L}$  de suero sanguíneo.

- Disección de órganos: Se procedió a cortar entre 0,5x1,0cm de algunos órganos: hígado, estómago, duodeno, bazo, riñones, corazón y cerebro, los mismos que fueron colocados en envases individuales con formol al 10% en tampón fosfato 0,1 M (pH 7), debidamente rotulados.
- Estudio histopatológico de órganos: Los cortes practicados en los órganos fueron seccionados con un micrótopo con un espesor de 3 a 4 micras, para luego ser coloreados con HE (hematoxilina-eosina) y examinados con un microscopio óptico a 20 y 40 aumentos para identificar los cambios en la morfología tisular.

**Diseño Estadístico:**

Para el análisis estadístico de los resultados se procedió a utilizar estadística descriptiva de promedios y desviación estándar. Para conocer si había diferencia estadísticamente significativa, primero se comprobó si los datos post tratamiento, concentración de hemoglobina y capacidad antioxidante tenían una distribución normal a través de la prueba Shapiro-Wilk, encontrándose en ambos casos que los resultados presentaban normalidad ( $p > 0,05$ ).

Luego, se realizó el análisis de varianza; para la variable concentración de hemoglobina se aplicó la prueba HSD Tukey para comparaciones múltiples, y para evaluar la capacidad antioxidante se empleó el Test Kruskal-Wallis. Se utilizó el valor  $p < 0,05$  para establecer significancia estadística. Se empleó el programa estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Science) versión 22.

**Consideraciones éticas:**

Se respetaron las disposiciones dadas por la Ley N° 30407, de Protección y Bienestar Animal, aplicándose buenas prácticas de manejo y bioseguridad, teniendo en cuenta que la primera condición del investigador que trabaja con animales de laboratorio es el respeto por la vida, y cuidado de las condiciones ambientales y de trabajo adecuadas según la especie.

De acuerdo a Cardozo de Martínez y Mrad de Osorio (2008) la aplicación del Principio de las Tres R's en investigación con animales busca garantizar el uso racional y respetuoso del animal, considerando 2 de sus principios:

- Alternativas de Reducción: Se redujo al mínimo indispensable el número de animales para garantizar la validez del estudio.
- Alternativas de Refinamiento: Los animales fueron anestesiados en ciertos procedimientos del experimento para evitar dolor. Se evitó el sufrimiento, estrés o lesiones prolongadas. Se promovió el bienestar de los animales durante el experimento hasta el sacrificio de los mismos.

## CAPÍTULO 4

### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 Análisis, interpretación y discusión de resultados

##### 4.1.1 Resultados

El estudio del efecto de los diferentes tratamientos con hierro (Mezcla MV, sulfato ferroso y hierro hemínico) sobre la anemia inducida en ratas, concentración de hemoglobina, capacidad antioxidante y cambios histológicos brindó los siguientes resultados. Al inicio del experimento el peso promedio de las ratas fue  $265,4 \pm 6,9\text{g}$ , luego de 4 semanas el peso promedio en los grupos post inducción de anemia fue  $275,2 \pm 8,9\text{g}$ , respecto a  $344,2 \pm 36,9\text{g}$  que se obtuvo en el grupo control negativo (Tabla 1).

##### - *Determinación de la Hemoglobina:*

En relación a la concentración de hemoglobina basal, la media fue  $14,5 \pm 0,5\text{g/dL}$ , posterior a la inducción de anemia se alcanzó una media de  $6,7 \pm 0,5\text{g/dL}$ , aquellos grupos que durante 3 semanas recibieron algún tratamiento con hierro (Mezcla de Minerales y Vitaminas, sulfato ferroso y hierro hemínico) lograron recuperar su hemoglobina con un valor promedio de  $14,6 \pm 0,7\text{g/dL}$  frente a  $11,8 \pm 1,85\text{g/dL}$  obtenido por el grupo control positivo sin tratamiento (Tabla 2).

Sin embargo, existen diferencias de medias respecto a la concentración de hemoglobina entre los tratamientos. Donde la diferencia de medias entre el Control Positivo y Mezcla MV es más significativa que el resto ( $p\text{-valor} = 0,001 < \alpha = 0,05$ , prueba Tukey HSD) obteniéndose mayores niveles de hemoglobina ( $15,4 \pm 1,2 \text{g/dL}$ ) en el grupo que recibió la Mezcla MV (Tabla 3).

- ***Determinación de la Capacidad Antioxidante:***

Posterior a los tratamientos, se midió la capacidad antioxidante en suero, utilizando la técnica FRAP, el grupo control obtuvo una media de  $821,3 \pm 82,4$   $\mu$ moles de Fe-II/L, mientras que en los tratamientos se observó un rango de 740,2 a 902,9  $\mu$ moles de Fe-II/L. La comparación entre tratamientos mostró diferencias estadísticamente significativas de la capacidad reductora en el plasma entre los grupos sulfato ferroso y control positivo (p-valor = 0,009) con valores FRAP de  $740,2 \pm 20,7$  y  $902,9 \pm 72,9$   $\mu$ moles de Fe-II/L respectivamente. También se halló diferencias significativas entre los grupos tratados con sulfato ferroso y hierro hemínico, con un nivel de significación de 0,033 obteniendo valores FRAP de  $740,2 \pm 20,7$   $\mu$ moles de Fe-II/L en el grupo tratado con sulfato ferroso versus  $880,7 \pm 82,81$   $\mu$ moles de Fe-II/L en el grupo hierro hemínico (Tabla 4-5).

Se midió el peso corporal final y el peso absoluto de algunos órganos (hígado, bazo, riñón, corazón y cerebro). El grupo control negativo tuvo un promedio de  $378,2 \pm 34,57$ g de peso corporal al final del experimento, y entre los grupos de tratamiento el que obtuvo los valores más cercanos fue el Hierro hemínico  $322,67 \pm 32,67$ g (Tabla 6).

- ***Identificación de los cambios histológicos:***

Para el estudio de los cambios histológicos se analizaron microscópicamente las muestras de los siguientes órganos: hígado, estómago, duodeno, riñón, bazo, corazón y cerebro.

Al observar tejido hepático, se hallaron cambios en la morfología celular en todas las ratas inducidas a anemia con o sin tratamiento, sin embargo, se encontraron mayores alteraciones en hígado de rata tratada con sulfato ferroso y en forma similar en ratas tratadas con la Mezcla MV, donde se apreció pérdida de la distribución polar de los hepatocitos y alteración de la estructura celular; menor proporción de daño se mostró en el hígado de rata tratada con Hierro hemínico. La muestra de hígado de rata control negativo conservó caracteres normales (Foto 1-5).

Al examinar la estructura del estómago, se apreció principalmente presencia de células eosinofílicas en el epitelio de la mucosa del estómago de ratas con anemia y que recibieron tratamiento con algún tipo de hierro (Foto 6-10).

Al analizar las muestras de duodeno, se observaron cambios, especialmente en el de rata Control Positivo en el cual el epitelio de la mucosa duodenal mostró pérdida de su morfología con desordenamiento del epitelio, en las demás muestras de ratas de los distintos tratamientos de hierro se hallaron algunas alteraciones en la estructura y presencia de vacuolas (Foto 11-15).

Al observar los cortes del riñón, en rata tratada con Sulfato ferroso se evidenció pérdida de la distribución adecuada del pelotón glomerular, alteración de la estructura del glomérulo y desprendimiento del epitelio en el túbulo contorneado proximal. También se observó cambios en el riñón de rata tratada con Hierro Hemínico, en el cual se mostró el espacio de Bowman disminuido, alteración de la estructura del glomérulo y desprendimiento del epitelio tubular. (Foto 16-20).

Al evaluar los cortes histológicos del tejido del bazo, se observaron folículos linfoides y material hemático a nivel del estroma linfoides y parénquima esplénico en todas las muestras de ratas inducidas a anemia con o sin tratamiento, similar a lo hallado en el bazo de rata Control Negativo (Foto 21-25).

Respecto a las muestras de corazón y cerebro, entre las unidades de análisis no se encontraron cambios significativos en la musculatura cardíaca ni en el parénquima cerebral (Foto 26-35).

#### **4.1.2 *Discusión***

En la presente investigación se estudió el efecto de tres tratamientos que contenían, Mezcla de MV (fumarato ferroso, zinc, ácido fólico, vitamina A, y vitamina C), Sulfato ferroso y Hierro hemínico; sobre la anemia inducida en ratas.

Los tratamientos antianémicos buscan restablecer los mecanismos normales de producción de hemoglobina y formación de hematíes. La síntesis de hemoglobina tiene lugar en los precursores hematopoyéticos del hematíe, este proceso es dependiente de hierro, entre otros. La molécula de protoporfirina se une a un átomo de hierro originando un grupo hemo, el cual se adhiere a una cadena polipeptídica constituyendo un monómero de hemoglobina, dos monómeros forman un dímero y dos dímeros conforman el tetrámero final de la molécula hemoglobina (Peñuela, 2005).

Se evaluó el efecto de los tratamientos sobre los niveles de hemoglobina post inducción de anemia, y se comprobó que los tres tipos de tratamiento de hierro lograron la recuperación de la concentración de hemoglobina cercano a los valores basales, similar a lo reportado por García et al. (2008) quien evaluó el efecto de la suplementación utilizando hierro hemínico, hierro iónico, solos y combinados logrando un incremento significativo de la concentración de hemoglobina en todos sus grupos.

El tratamiento que alcanzó valores significativamente mayores de hemoglobina ( $p$ -valor = 0,001) fue el de la Mezcla de MV, probablemente por la participación de la vitamina C ya que en el medio ácido del estómago forma un complejo ascorbato férrico muy estable, e incrementa la eficiencia de la absorción del hierro al reducirlo a su estado ferroso mejorando su solubilidad y absorción a nivel intestinal (Palomo et al., 2005). Considerando además que la Mezcla de MV contenía ácido

fólico, nutriente esencial en la síntesis de DNA, metabolismo de aminoácidos y maduración de eritrocitos (Trompetero, 2014).

Asimismo se observó que en el grupo Control Positivo hubo cierta recuperación de los niveles de hemoglobina sin lograr su normalización, grupo que fue inducido a anemia sin tratamiento con hierro, pudiéndose explicar este resultado experimental como una respuesta del organismo ante el estado de ferredoficiencia el cual promueve la regulación del metabolismo del hierro estimulando su absorción y una mayor movilización de hierro a través de la inhibición de la expresión de la Hefcidina (Toxqui et al., 2010).

Se analizó la capacidad antioxidante con el Método FRAP, el cual midió la capacidad de reducción férrica del plasma por acción de los compuestos antioxidantes. Se ha descrito la eficiencia del Hierro para ceder y aceptar electrones, característica que lo convierte en un elemento potencialmente tóxico, ya que, bajo condiciones aerobias, puede catalizar la formación de radicales libres. Pequeñas cantidades de este mineral son suficientes para formar radical hidroxilo a partir de superóxido y peróxido de hidrógeno. Un incremento en los niveles de especies reactivas de oxígeno, que va más allá de la capacidad antioxidante del organismo, genera estrés oxidativo (Toxqui et al., 2010).

Para valorar la capacidad antioxidante post tratamiento en ratas con anemia inducida se comparó la significancia estadística por parejas de tratamiento antianémico:

Se halló mayor diferencia significativa entre los grupos que se administró sulfato ferroso y control positivo ( $p$ -valor = 0,009) evidenciando que el hierro iónico afectó en mayor proporción la capacidad reductora de la muestra, obteniéndose los valores FRAP más bajos. García et al, 2015, comprobó un menor efecto oxidativo en el grupo de ratas con anemia sin tratamiento de hierro iónico, a su vez la condición de anemia no afectó la actividad de los sistemas antioxidantes

de protección endógena, los cuales son estimulados ante la noxa siendo fundamental la actividad correspondiente a las enzimas antioxidantes, como superóxido dismutasa, la cual permite la dismutación del anión superóxido en peróxido de hidrógeno y cuya acumulación se evita por el sistema glutatión peroxidasa/catalasa, transformándolo en oxígeno no molecular, agua y glutatión oxidado (Corrales y Muñoz, 2012).

Asimismo, existió diferencia significativa entre los grupos que se administró sulfato ferroso y hierro hemínico ( $p$ -valor = 0.033) nuestro resultado experimental mostró que en el grupo tratado con hierro hemo se obtuvo mayor poder reductor según su valor FRAP, la capacidad de reducir metales es importante ya que éstos están implicados en procesos de propagación de la cadena radicalaria interactuando con biomoléculas tales como lípidos membranales, proteínas, carbohidratos, e incluso con el ADN, generando alteraciones de tipo estructural y funcional, extendiendo el proceso de daño celular en el organismo (González-Torres, Betancourt-Rule y Ortiz-Muñiz, 2000).

Sobre este tema, se ha descrito que para neutralizar la actividad nociva de los radicales libres el organismo posee sistemas de defensa antioxidante, conformado por agentes enzimáticos y no enzimáticos. Entre los antioxidantes de tipo no enzimáticos encontramos un conjunto de moléculas hidrófobas e hidrofílicas que tienen como función generar moléculas menos dañinas para la célula, entre ellas se encuentran:  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E),  $\beta$ -caroteno, ascorbato (vitamina C), glutatión, flavonoides, entre otros. La vitamina C es soluble en agua y se ubica en el citoplasma celular, mientras que la vitamina E y el  $\beta$ -caroteno son solubles en lípidos (Corrales y Muñoz, 2012).

Al respecto, entre los antioxidantes destacan algunos oligoelementos como el cobre, zinc, selenio, magnesio y hierro, cuya incorporación al organismo es necesaria por constituir parte del núcleo activo de enzimas antioxidantes, tal como la superóxido dismutasa que cataliza el cambio

del radical superóxido a peróxido de hidrógeno, la cual contiene cobre y zinc (Mayor-Oxilia, 2010).

Al evaluar los resultados de la capacidad antioxidante post tratamiento antianémico, el grupo tratado con la Mezcla de MV que además del fumarato ferroso contenía al zinc, ácido fólico, vitamina A, y vitamina C obtuvo un valor promedio de 752,0  $\mu$ moles de Fe-II/L, relativamente bajo respecto a los otros grupos, aparentemente las vitaminas antioxidantes no produjeron una acción antioxidante eficiente ante la presencia del hierro iónico.

El hierro libre participa en la producción de diferentes especies reactivas de oxígeno, lo cual es controlado por la presencia de proteínas que se unen a metales (en particular hierro y cobre), estas proteínas son: ferritina, transferrina, ceruloplasmina, albúmina y metalotioneínas. En el plasma sanguíneo la mayor acción protectora es efectuada por la transferrina y la ceruloplasmina. La ferritina es una proteína intracelular que evita la acumulación de fierro libre (González-Torres et al., 2000). En situaciones de sobrecarga de hierro, se satura la capacidad de unión con la transferrina. Así, el hierro no ligado, se internaliza en tejidos, originando daño celular (Toxqui et al., 2010).

En nuestra investigación, también se evaluó si los tratamientos antianémicos generaron algún efecto sobre los tejidos de órganos tales como: hígado, estómago, duodeno, bazo, riñones, corazón y cerebro en búsqueda de probables manifestaciones no sólo del tratamiento antianémico sino también de la condición de anemia, y se hallaron cambios histopatológicos principalmente en hígado, duodeno y riñón.

En hígado de rata tratada con sulfato ferroso se observó la pérdida de la distribución polar de los hepatocitos y su membrana citoplasmática, además de la presencia de vacuolas, indicador de degeneración del tejido, lo cual se puede asociar a un mayor efecto oxidativo del tratamiento y correlacionado a la menor capacidad antioxidante demostrada. Hallazgos

similares se encontraron en hígado de ratas tratadas con la Mezcla MV, donde se apreció, compromiso del parénquima hepático y alteración de la estructura del hepatocito.

Teniendo en cuenta que los tratamientos con hierro iónico obtuvieron las mayores concentraciones de hemoglobina post tratamiento y considerando al hígado como principal órgano de almacén de hierro, se podría relacionar estos efectos histopatológicos al daño oxidativo generado por los tratamientos de la anemia, basados en sobrecarga de hierro, alta reactividad del mineral, exceso de éste en el organismo en determinado periodo, derivado de la repleción, produciendo mayor daño celular. Alférez et al. (2014) halló un menor estrés oxidativo en el grupo experimental que recibió una baja cantidad de hierro y el hierro era de tipo hemo, a menor cantidad de hierro circulante se minimizaron los efectos negativos del mismo.

Respecto al análisis de los cortes histológicos en duodeno, se observaron cambios principalmente en la mucosa duodenal de rata Control Positivo en la cual se halló desordenamiento del epitelio y algunos núcleos sueltos, resultado que demostraría que, en la sola condición de anemia, la hipoxia tisular inducida por la ferropdeficiencia limitaría la producción de ATP y aumentaría la formación de radicales libres, lo cual afecta las múltiples funciones celulares. En otro trabajo experimental, luego de brindar dieta deficiente en proteína y hierro, se halló daño en la histomorfología de la mandíbula en ratas, (Cáceres, 2016).

En relación al estudio del riñón, en el parénquima renal se observó el glomérulo con alteraciones en su estructura, principalmente comprometido en riñón de rata tratada con Sulfato ferroso, signos similares se hallaron en el grupo tratado con Hierro Hemínico y un menor compromiso se localizó en el grupo Control positivo, observando afectación en ambos tratamientos de hierro iónico y hemo. Probablemente, habiéndose éste generado por la sobrecarga de hierro con

actividad redox que agrava el estrés oxidativo dañando biomoléculas y a su vez por la hipoxia tisular que acelera la degeneración, lo que se observó en el tejido renal.

## **4.2 Pruebas de hipótesis**

### **4.2.1 Concentración de hemoglobina post tratamiento:**

#### **4.2.1.1 Prueba de normalidad**

Según el contraste de hipótesis de Shapiro-Wilk se acepta la hipótesis nula cuando el p-valor es  $\geq \alpha$ .

H<sub>0</sub>: Los datos en cada grupo tienen una distribución normal

H<sub>1</sub>: Los datos no tienen una distribución normal

De los resultados obtenidos de la prueba de Shapiro-Wilk, todos los grupos tienen un p-valor mayor que 0,05, lo que evidencia que los datos de cada grupo tienen una distribución normal (Ver Anexo 3).

#### **4.2.1.2 Prueba de igualdad de varianzas**

El test de Levene se utiliza para contrastar la hipótesis nula de igualdad de varianzas, cuando el p-valor  $\geq \alpha$  se acepta la hipótesis nula, caso contrario se rechaza.

H<sub>0</sub>: Las varianzas del nivel de hemoglobina de los cinco grupos son similares

H<sub>1</sub>: Al menos una varianza es diferente de los demás

Se obtuvo un p-valor de 0,351 mayor que  $\alpha = 0,05$ , por lo tanto, se cumple el supuesto de homogeneidad de las varianzas (Ver Anexo 3).

De este modo, se cumplen los supuestos de normalidad (Test de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilks) y la Prueba de homogeneidad de varianzas (Test de Levene), que requiere el análisis de varianza (ANOVA).

#### 4.2.1.3 Análisis de varianza (ANOVA)

Hipótesis de contraste:

$H_0$ : Los niveles de hemoglobina promedio de cada grupo son similares

$H_1$ : Al menos una media es diferente de las demás.

Al emplear el ANOVA de un factor, se calcula la prueba de F y su significación. El estadístico F se obtiene al estimar la variación de las medias entre los grupos de la variable independiente y dividirla por la estimación de la variación de las medias dentro de los grupos.

Se halló el valor del estadístico de prueba,  $F=6,309$  y su nivel de significancia  $\alpha = 0,001$ , por lo cual se rechaza la hipótesis nula ya que existen diferencias de medias de hemoglobina entre los tratamientos (Ver Anexo 3).

Sin embargo, es necesario precisar que el estadístico F del ANOVA únicamente nos indica que hay diferencias significativas entre las medias, pero no muestra si todas son diferentes entre sí, o sólo una media difiere de las demás. Para determinarlo se utilizó otro tipo de contraste como las comparaciones múltiples POST HOC o a Posteriori.

#### 4.2.1.4 Comparaciones post hoc o a posteriori

Se aplicó la prueba de hipótesis HSD Tukey donde se asume la igualdad de varianzas de los grupos (Homogeneidad de varianzas).

La tabla de comparaciones múltiples (prueba Post Hoc) identificó que diferencias de medias son o no significativas, categoría a categoría según los diferentes contrastes.

Se observó que existen diferencias de medias, donde la diferencia entre el Control Positivo y Mezcla MV es más significativa que el resto de tratamientos con un p-valor  $= 0,001 < \alpha = 0,05$ , lo que hace rechazar la hipótesis de igualdad de medias. (Ver Anexo 4).

## **4.2.2 Capacidad antioxidante**

### **4.2.2.1 Prueba de normalidad**

H<sub>0</sub>: Los datos en cada grupo tienen una distribución normal

H<sub>1</sub>: Los datos no tienen una distribución normal

Según el contraste de hipótesis de Shapiro-Wilk se cumplió con la prueba de normalidad ya que todos los grupos tienen p-valores mayores que  $\alpha = 0,05$  (Ver Anexo 5).

### **4.2.2.2 Prueba de igualdad de varianzas**

Las hipótesis del contraste son las siguientes:

H<sub>0</sub>: Las varianzas de la capacidad antioxidante de los cinco grupos son similares.

H<sub>1</sub>: Al menos una varianza es diferente de los demás

Existieron suficientes evidencias estadísticas para rechazar la H<sub>0</sub> (p-valor es 0,000), por lo que se puede afirmar que las varianzas de la capacidad antioxidante de los cinco grupos no son similares (Ver Anexo 5).

De acuerdo a los resultados obtenidos, no se puede aplicar el análisis de varianza (ANOVA) al no cumplir con uno de los supuestos. Por lo cual se aplicó la prueba estadística Kruskal-Wallis y Chi-Cuadrado para determinar si hay diferencias significativas entre los tratamientos.

### **4.2.2.3 Prueba no paramétrica**

Se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis, método más adecuado para comparar poblaciones cuyas distribuciones no son normales.

Las hipótesis del contraste son las siguientes:

H<sub>0</sub>: Las medianas de los cinco grupos son similares

H<sub>1</sub>: Al menos una mediana es diferente de las demás.

Se obtuvo el p-valor = 0,002, menor que  $\alpha = 0,05$  por lo cual se concluye que las medianas son diferentes en cada grupo de datos. (Ver Anexo 5).

Se utilizó la prueba de contraste Chi-cuadrado, en este caso correspondió a 17,216 con 4 grados de libertad y el p-valor asociado a este contraste es 0,002 entonces se confirma el rechazo de la hipótesis nula, existiendo diferencias entre los tratamientos (Ver Anexo 6).

Luego se aplicaron las pruebas a posteriori y comparaciones por pareja de tratamientos para saber entre que grupos hay diferencia en los tratamientos. Y se halló un nivel de significación de 0,033 entre los grupos de tratamiento sulfato ferroso y hierro hemínico, lo cual evidencia que dichos tratamientos producen diferentes efectos (Ver Anexo 7).

### 4.3 Presentación de resultados

**Tabla 1. Peso corporal de ratas según tratamientos (n=30)**

Tratamientos	Peso corporal (g)		
	$\bar{X} \pm D.E.$		
	Inicial	Post inducción de anemia	Post tratamiento
Control negativo <sup>a</sup>	272,7 ± 52,0	344,2 ± 37,0	378,2 ± 34,6
Control Positivo <sup>b</sup>	266,7 ± 35,0	274,3 ± 29,4	298,8 ± 28,5
Mezcla MV <sup>c</sup>	261,3 ± 47,1	270,7 ± 46,0	296,7 ± 43,3
Sulfato ferroso <sup>d</sup>	255,8 ± 44,2	267,8 ± 35,5	296,7 ± 37,0
Hierro hemínico <sup>e</sup>	270,7 ± 44,9	288,0 ± 38,1	322,7 ± 32,7

<sup>a</sup> Sin inducción a anemia, ni tratamiento.

<sup>b</sup> Tratamiento: dieta deficiente de hierro.

<sup>c</sup> Tratamiento: dieta deficiente de hierro y tratamiento con Mezcla MV.

<sup>d</sup> Tratamiento: dieta deficiente de hierro y tratamiento con Sulfato ferroso.

<sup>e</sup> Tratamiento: dieta deficiente de hierro y tratamiento con Hierro hemínico.

**Tabla 2. Concentración de Hemoglobina en ratas según tratamientos (n=30)**

Tratamientos	Hb (g/dL)				
	$\bar{X} \pm D.E.$				
	Basal	Post inducción de anemia	Post tratamiento (DS)	g/dL de recuperación	% de recuperación
Control negativo	13,7 ± 0,26	14,6 ± 1,0	14,7 ± 0,8 <sup>b</sup>	-	-
Control Positivo	14,9 ± 1,36	6,3 ± 1,8	11,8 ± 1,8	5,4 ± 1,3	45.7
Mezcla MV	14,6 ± 1,19	6,3 ± 1,4	15,4 ± 1,2 <sup>a</sup>	9,1 ± 1,7	59.0
Sulfato ferroso	14,9 ± 0,68	7,3 ± 1,0	14,7 ± 1,2 <sup>c</sup>	7,4 ± 0,8	50.3
Hierro hemínico	14,6 ± 0,74	7,0 ± 1,7	13,9 ± 1,3	7,0 ± 1,4	50.3

DS: Dato significativo con p valor < 0,05 según Hipótesis Tukey HSD

<sup>(a)</sup> p valor = 0,001 respecto al grupo Control Positivo.

<sup>(b)</sup> p valor = 0,007 respecto al grupo Control Positivo.

<sup>(c)</sup> p valor = 0,009 respecto al grupo Control Positivo.

**Tabla 3. Capacidad antioxidante según FRAP en ratas post tratamientos (n=30)**

Tratamientos	Capacidad Antioxidante ( $\mu$ moles de Fe-II/L) <sup>(DS)</sup>
	$\bar{X} \pm D.E.$
Control negativo	821,3 $\pm$ 82,4
Control Positivo	902,9 $\pm$ 72,9
Mezcla MV	752,0 $\pm$ 29,2 <sup>c</sup>
Sulfato ferroso	740,2 $\pm$ 20,7 <sup>a, b</sup>
Hierro hemínico	880,7 $\pm$ 82,8

DS: Dato significativo con p valor < 0,05 según Comparaciones por pareja de tratamientos

<sup>(a)</sup> p valor = 0,009 respecto al grupo Control positivo.

<sup>(b)</sup> p valor = 0,033 respecto al grupo de Hierro hemínico.

<sup>(c)</sup> p valor = 0,041 respecto al grupo Control positivo.

**Tabla 4. Peso corporal y de órganos de ratas al final del experimento (n=30)**

Tratamientos	Peso (g) $\bar{X}$					
	Corporal final	Hígado	Bazo	Riñón	Corazón	Cerebro
Control negativo <sup>a</sup>	378,2	13,46	1,36	2,34	1,28	1,34
Control positivo <sup>b</sup>	298,83	10,95	1,07	1,9	1,23	1,3
Mezcla MV <sup>c</sup>	296,6	10,97	0,9	1,83	1,17	1,25
Sulfato ferroso <sup>d</sup>	296,67	10,58	0,97	1,87	1,1	1,3
Hierro hemínico <sup>e</sup>	322,67	10,35	1,15	1,9	1,2	1,3

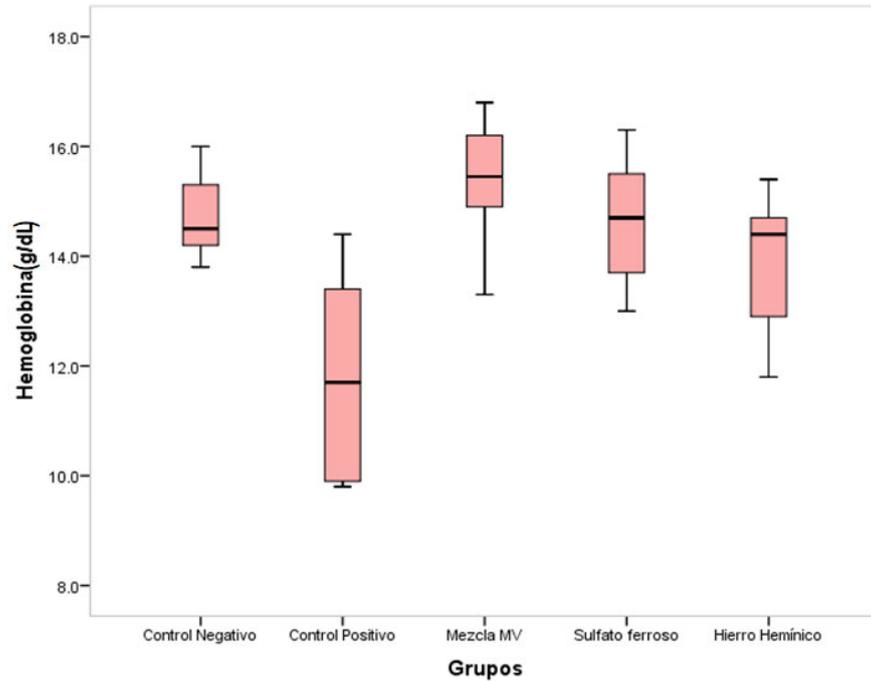
<sup>a</sup> Sin inducción a anemia, ni tratamiento.

<sup>b</sup> Tratamiento: dieta deficiente de hierro.

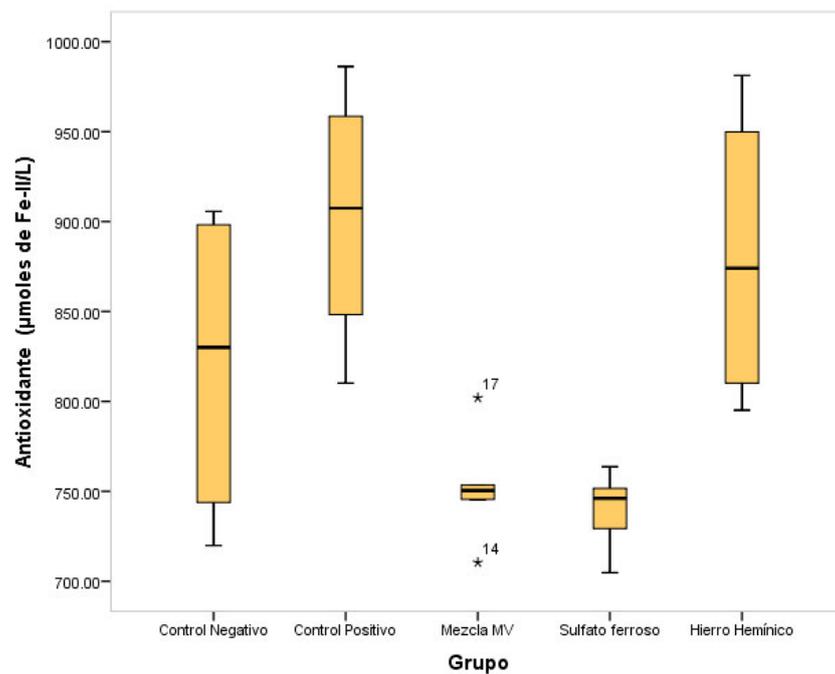
<sup>c</sup> Tratamiento: dieta deficiente de hierro y tratamiento con Mezcla MV.

<sup>d</sup> Tratamiento: dieta deficiente de hierro y tratamiento con Sulfato ferroso.

<sup>e</sup> Tratamiento: dieta deficiente de hierro y tratamiento con Hierro hemínico.

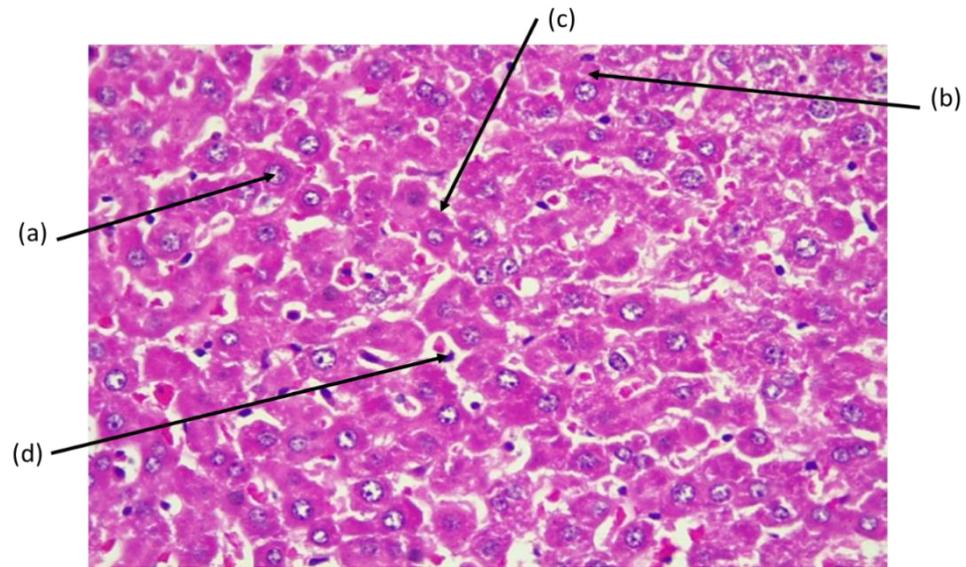


**Figura 1. Concentración de Hemoglobina en ratas post tratamientos (n=30)**

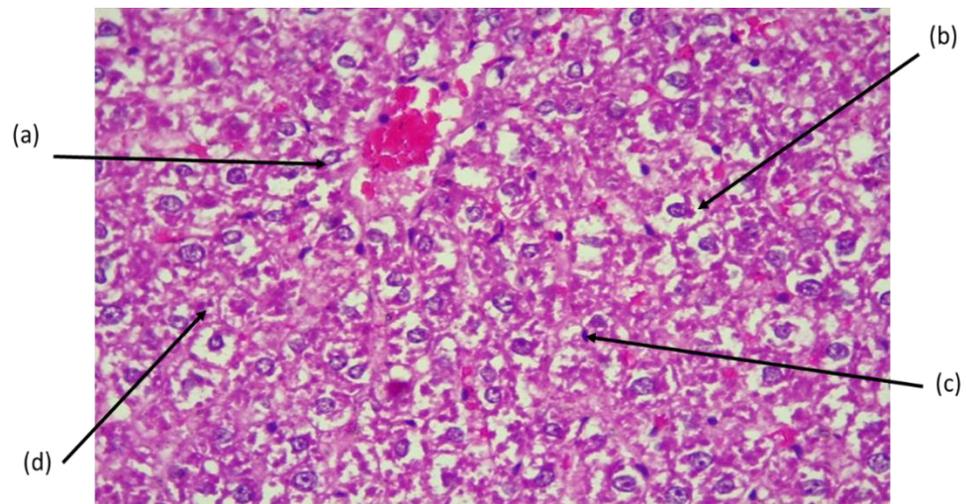


**Figura 2. Capacidad antioxidante según FRAP en ratas post tratamientos (n=30)**

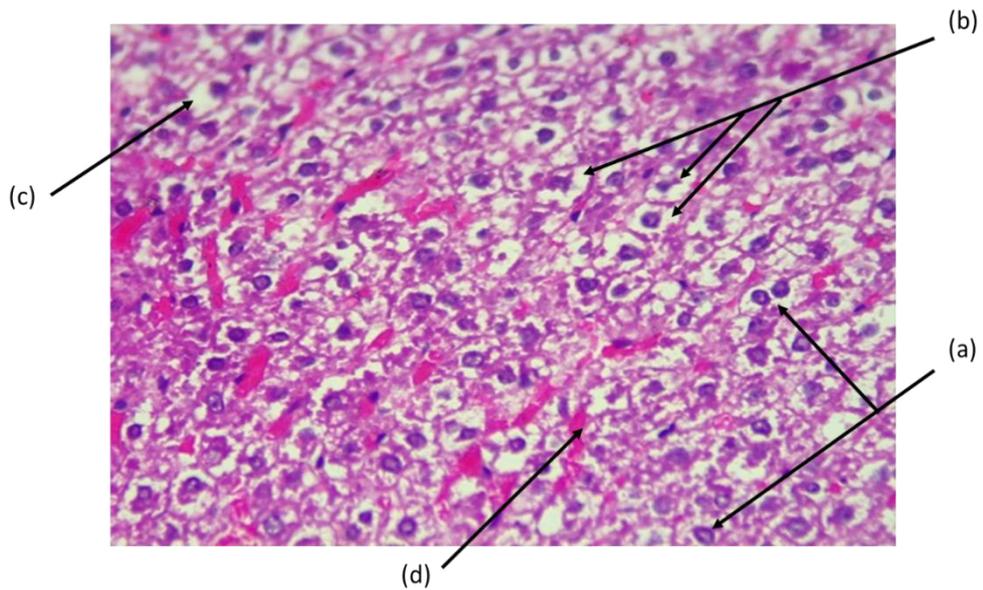
## Estudio Histológico: HÍGADO



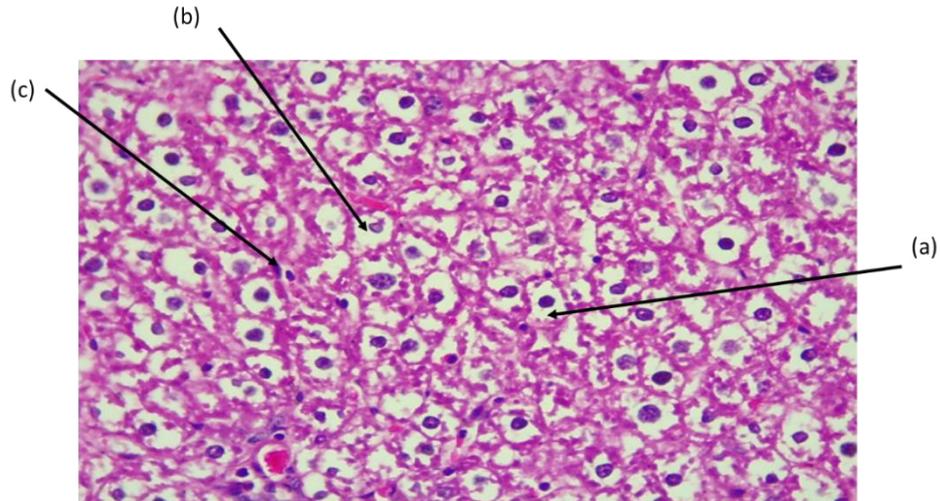
**Foto 1.** Hígado de rata Control Negativo (40X) col. HE: el corte permite observar distribución adecuada de las células hepáticas, las que muestran núcleo (a), citoplasma (b) y membrana citoplasmática (c) de caracteres normales. Se observan algunas células de kupffer (d), el resto de caracteres normales.



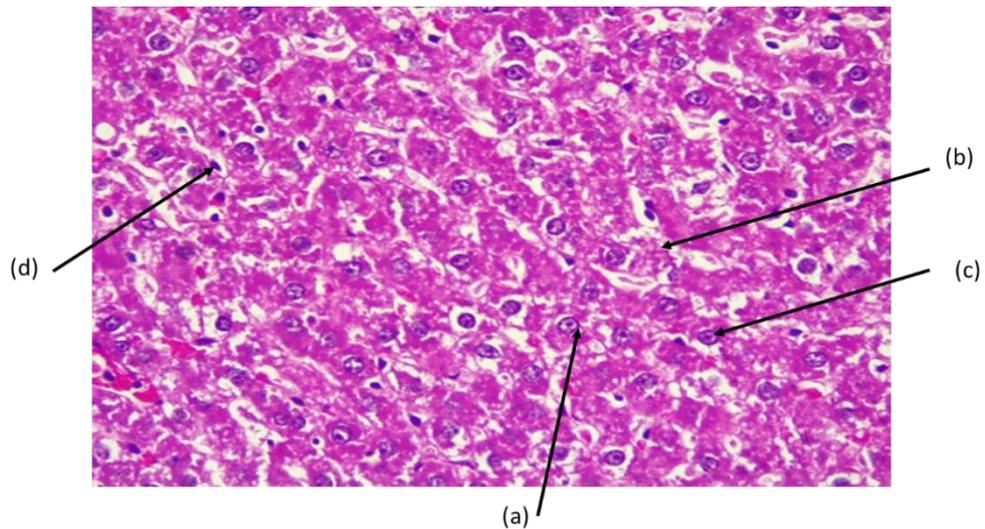
**Foto 2.** Hígado de rata Control Positivo (40X) col. HE: Distribución polar de los hepatocitos se ha perdido, algunas células hepáticas muestran núcleos sueltos (a), con halo/vacuola perinuclear (b), no se diferencian los sinusoides hepáticos, se observan una que otra célula de kupffer (c), algunas células hepáticas están totalmente destruidas, hepatocitos lisados (d). Se ha perdido la morfología normal del hepatocito.



**Foto 3.** Hígado de rata con Tratamiento Mezcla MV (40X) col. HE: Se observan núcleos sueltos (a), algunos con halo periférico a nivel nuclear (b), no se diferencia la membrana de los hepatocitos (c), no hay un ordenamiento adecuado de la estructura hepática. A nivel de sinusoides hay material hemático (d). Un desordenamiento total del parénquima hepático.

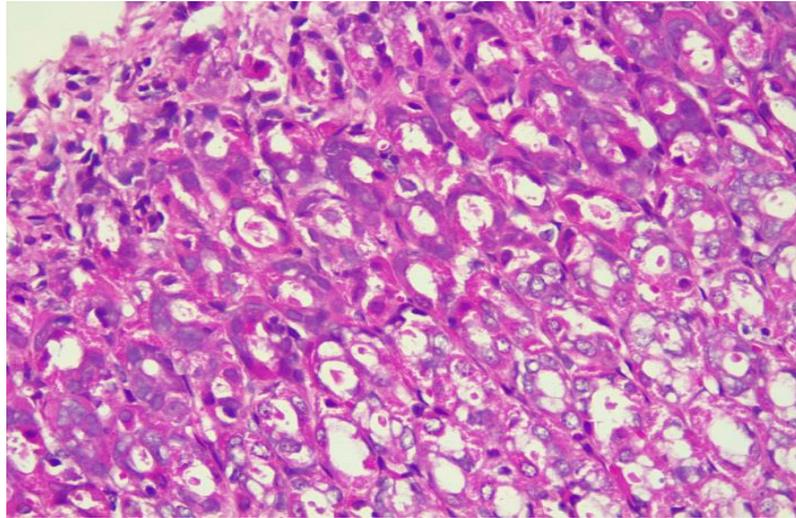


**Foto 4.** Hígado de rata con Tratamiento sulfato ferroso (40X) col. HE: Manifiesta pérdida de la distribución polar de los hepatocitos, los hepatocitos han perdido su membrana citoplasmática (a), hay un halo/vacuola perinuclear (b) que rodea a la mayoría de los hepatocitos. No se diferencian los espacios de Disse y se observan una que otra célula de kupffer (c).

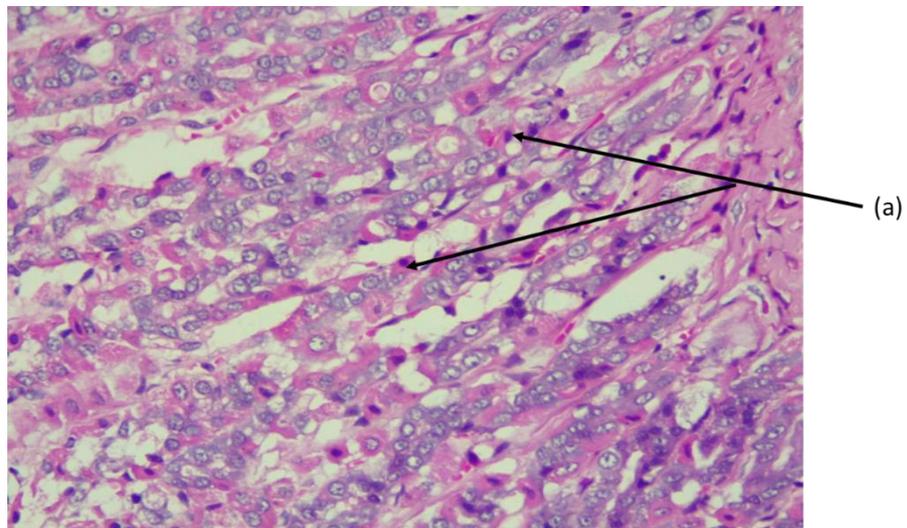


**Foto 5.** Hígado de rata hemínico (40X) col. HE: Algunas células hepáticas se muestran con núcleo, citoplasma y su membrana citoplasmática (a), otras todavía no han recuperado su membrana ni su citoplasma (b), se encuentran núcleos sueltos (c), se observan algunas células de kupffer (d). El 30 a 40% de las células hepáticas se mantienen dentro de su morfología adecuada, pero todavía hay un porcentaje donde no se reconocen los hepatocitos con su morfología normal, solamente hay restos nucleares.

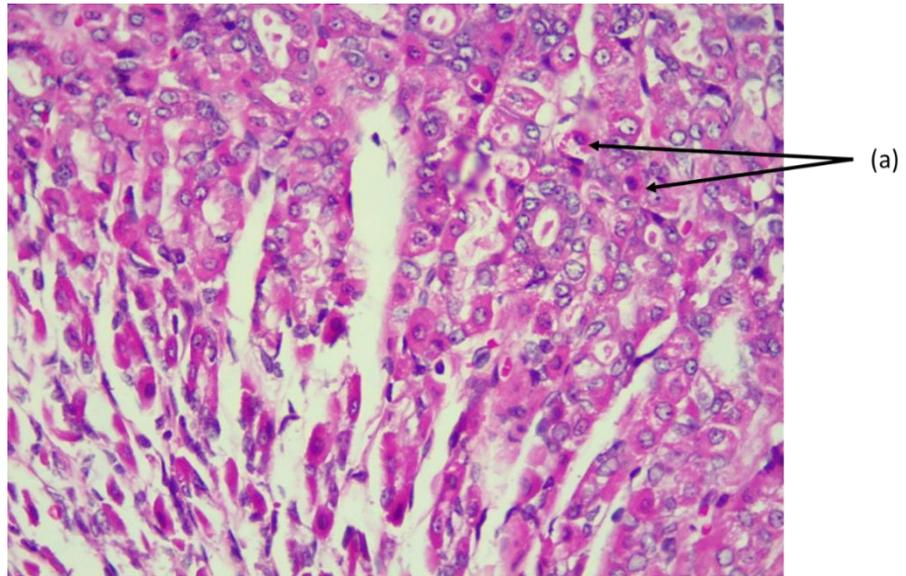
## Estudio Histológico: ESTÓMAGO



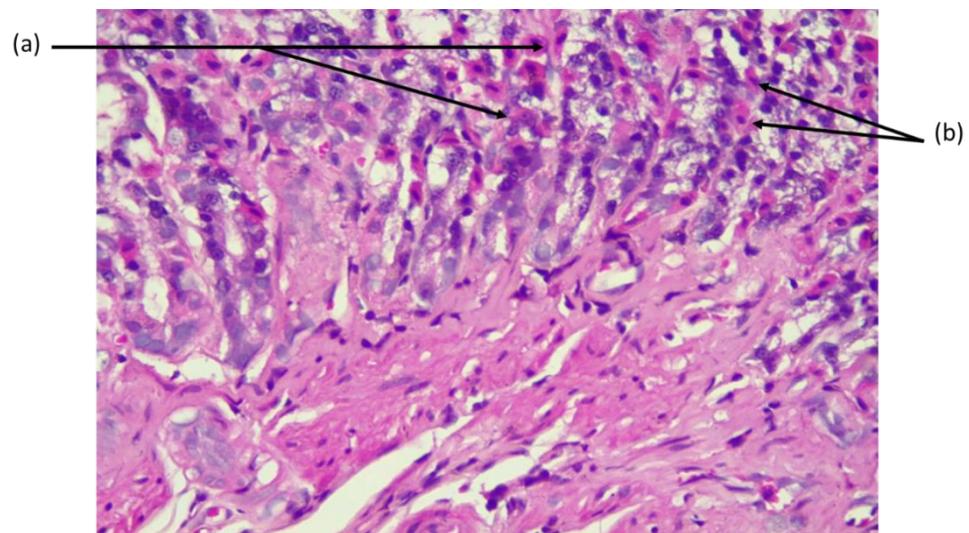
**Foto 6.** Estómago de rata Control Negativo (40X) col. HE: Mucosa no muestra alteraciones significativas y la submucosa de aspecto normal.



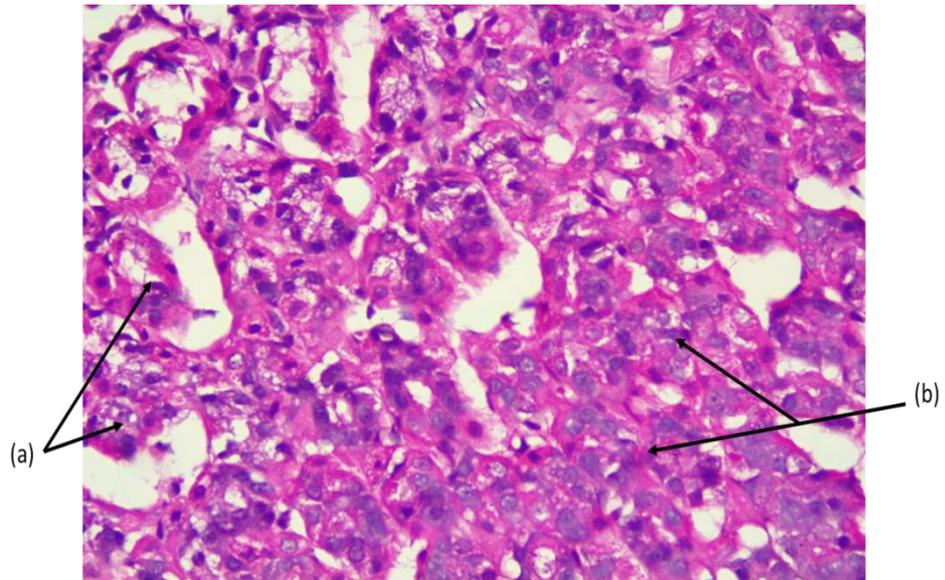
**Foto 7.** Estómago de rata Control Positivo (40X) col. HE: La mucosa no muestra cambios significativos, se aprecia algunas células eosinofílicas que se encuentran a nivel de las glándulas (a). No se observan otras alteraciones.



**Foto 8.** Estómago de rata con tratamiento Mezcla MV (40X) col. HE: El epitelio de la mucosa muestra células eosinofílicas(a), no se aprecia infiltrado inflamatorio de tipo agudo o crónico.

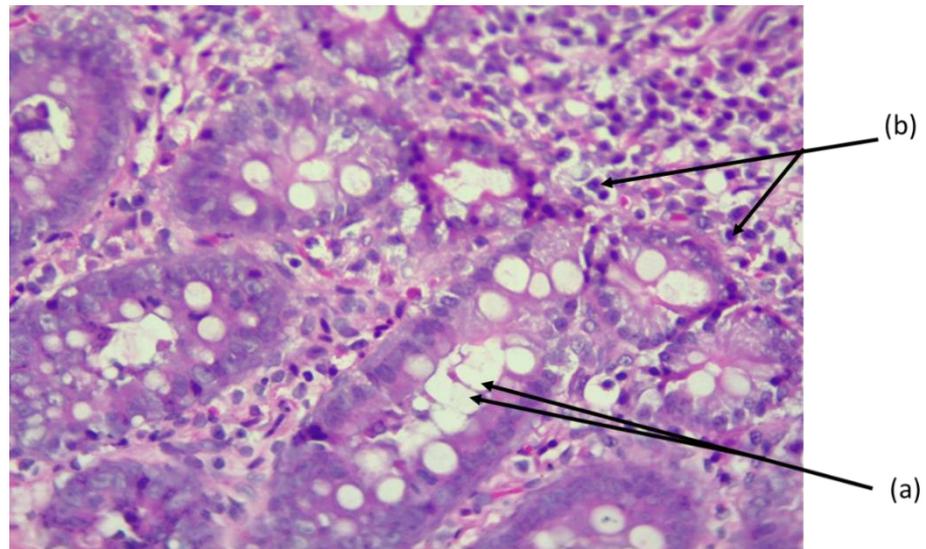


**Foto 9.** Estómago de rata con tratamiento Sulfato ferroso (40X) col. HE: El epitelio de la mucosa gástrica muestra células eosinofílicas (a); sin embargo, se observa algunas que cubren el epitelio muestran ligero borramiento (b). No se aprecia infiltrado inflamatorio. Se observa la submucosa y la muscular de aspecto normal.

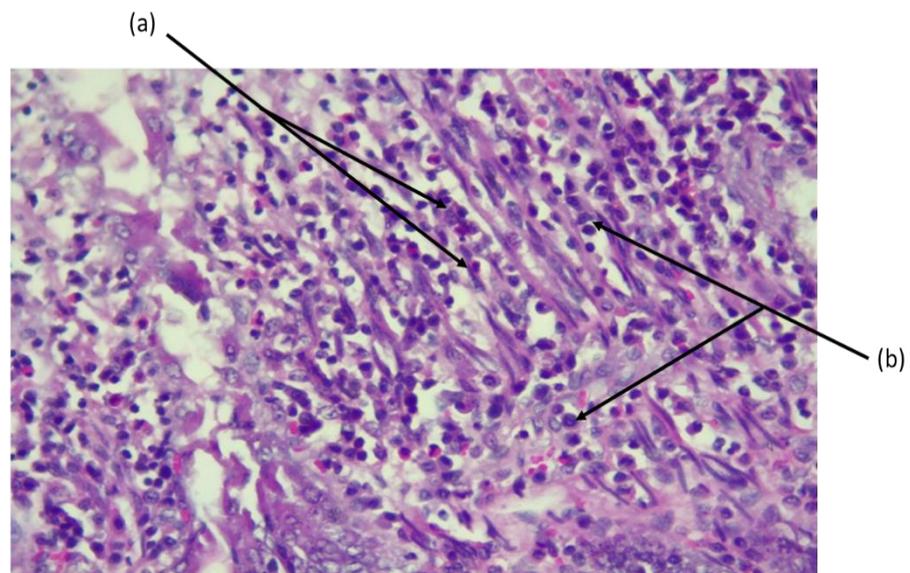


**Foto 10.** Estómago de rata con tratamiento Hemínico (40X) col. HE: Mucosa muestra el epitelio de aspecto tubular (a), con escasas células eosinofílicas. Sin embargo, panorámicamente la mucosa muestra caracteres normales en un área y en otra presenta cierto deterioro (b).

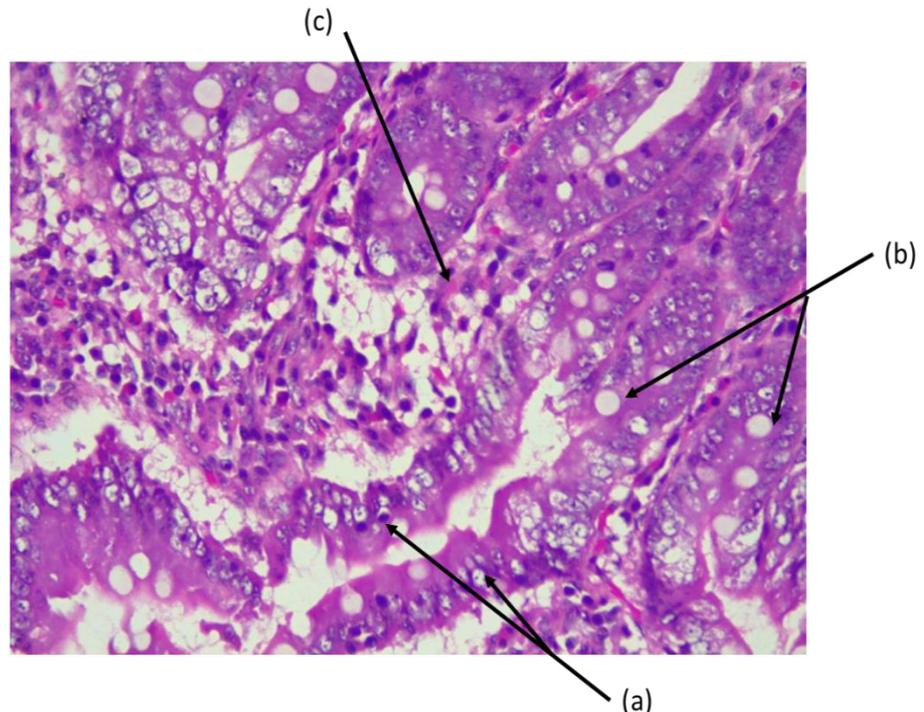
### Estudio Histológico: DUODENO



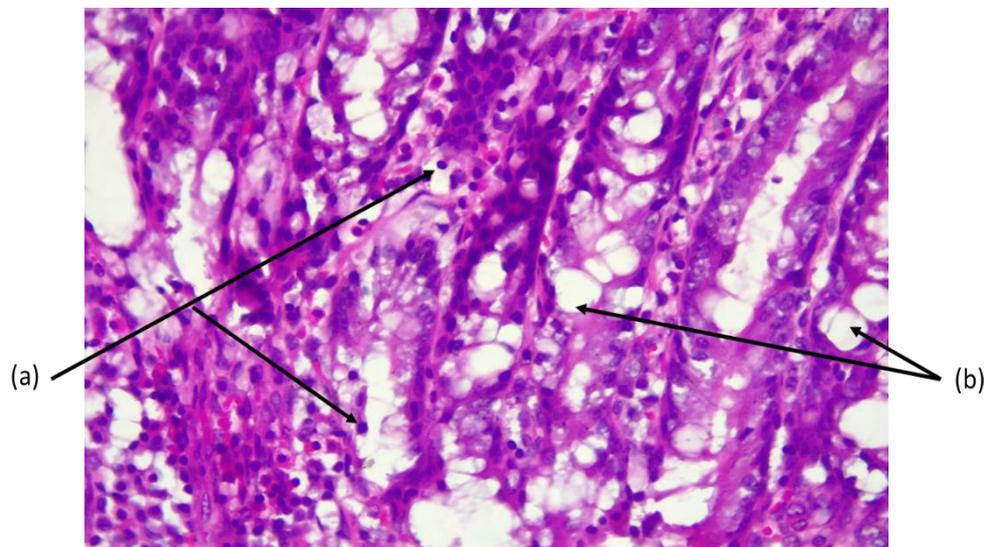
**Foto 11.** Duodeno de rata Control Negativo (40X) col. HE: El epitelio de la mucosa duodenal se muestra de aspecto normal con algunas formaciones vacuolares (a) a nivel de algunas células que recubren la mucosa. En los intersticios se encuentran células redondas en pequeñas cantidades (b).



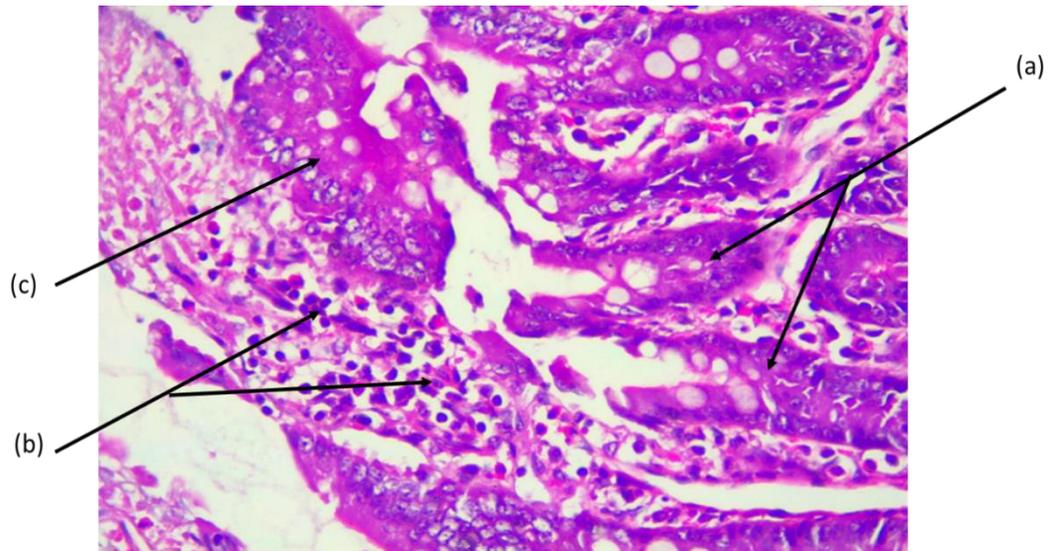
**Foto 12.** Duodeno de rata Control Positivo (40X) col. HE: El epitelio de la mucosa duodenal muestra pérdida de su morfología (a) con un desordenamiento del epitelio, se observa homogenizada con algunos núcleos sueltos (b).



**Foto 13.** Duodeno de rata con tratamiento Mezcla MV (40X) col. HE. La mucosa duodenal muestra aspecto tubular que se diferencia con claridad (a), algunas células que tapizan el epitelio con vacuolas (b) y células eosinofílicas (c) a nivel del parénquima.

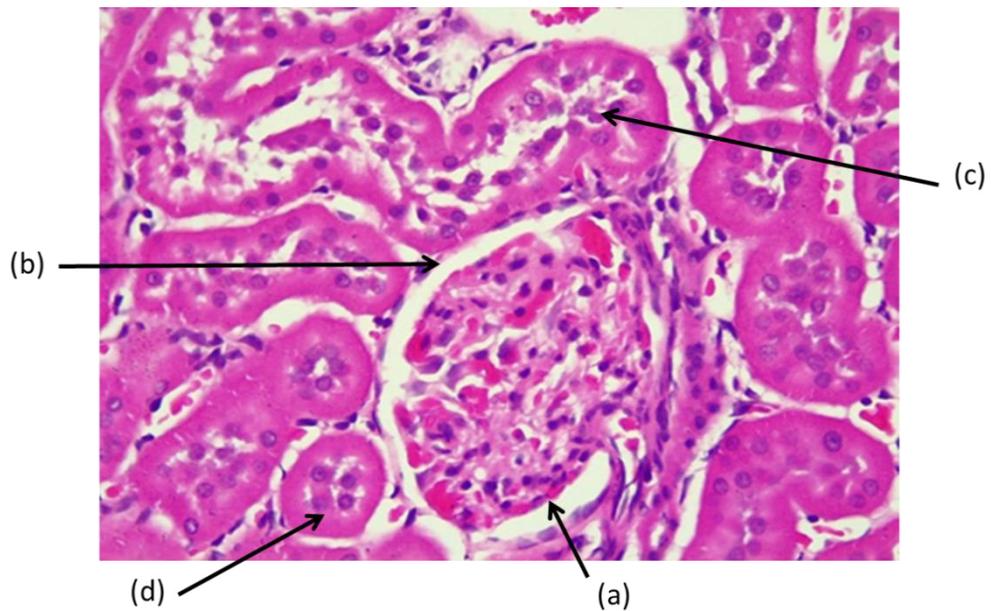


**Foto 14.** Duodeno de rata con tratamiento Sulfato ferroso (40X) col. HE. Mucosa duodenal se muestra ligeramente homogenizada, no se diferencia el aspecto tubular del epitelio mucoso. Se observa epitelio mucoso con núcleos sueltos (a), y en otras áreas se pueden apreciar algunas vacuolas (b) que forman parte del epitelio.

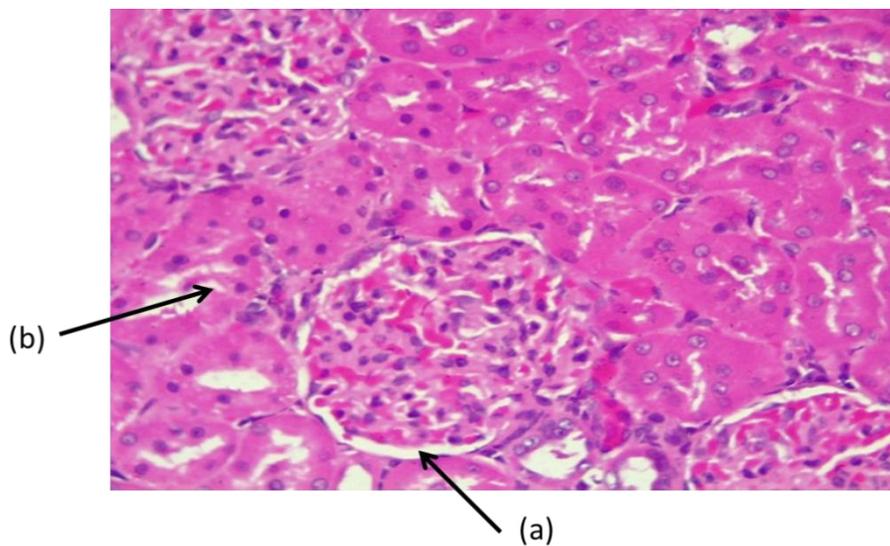


**Foto 15.** Duodeno de rata con tratamiento Hemínico (40X) col. HE. El epitelio duodenal muestra mucosa de caracteres normales (a); sin embargo, en otra área se observa infiltrado a células redondas (b). En otras áreas del epitelio se observa que ha perdido su morfología (c).

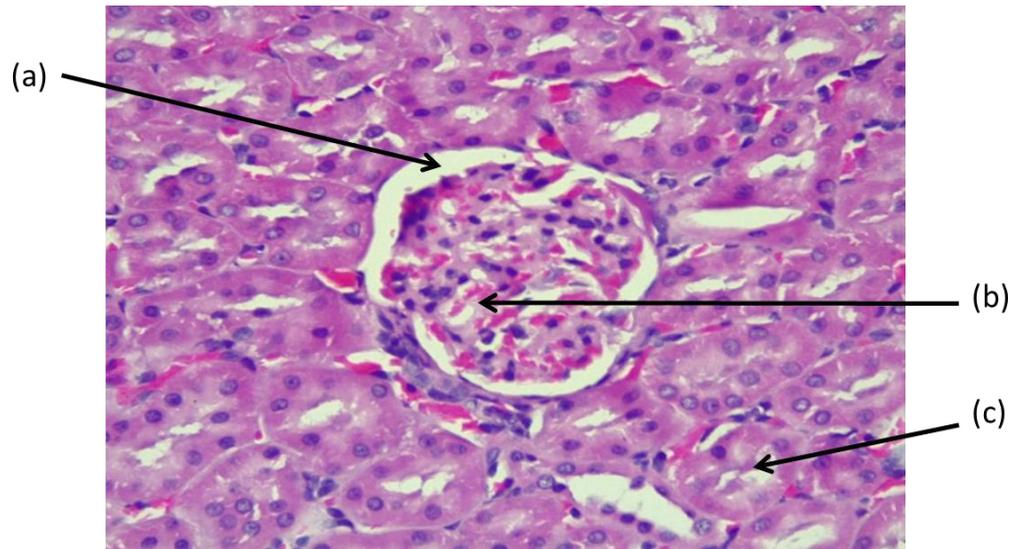
### Estudio Histológico: RIÑÓN



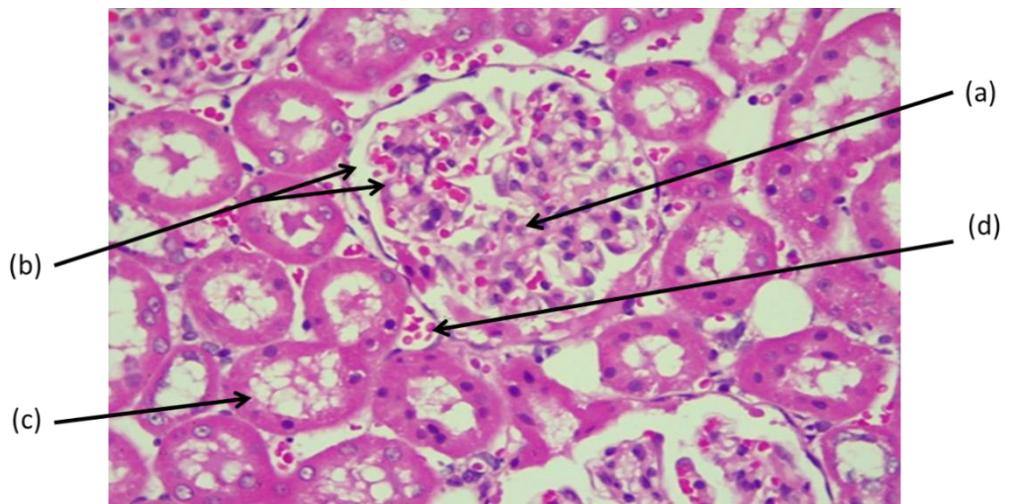
**Foto 16.** Riñón de rata Control Negativo (40X) col. HE: Se aprecia el glomérulo con características normales, tanto en la cápsula visceral (a) como la capa parietal (b) de aspecto normal. Los túbulos contorneado proximal (c) y contorneado distal (d) dentro de caracteres normales.



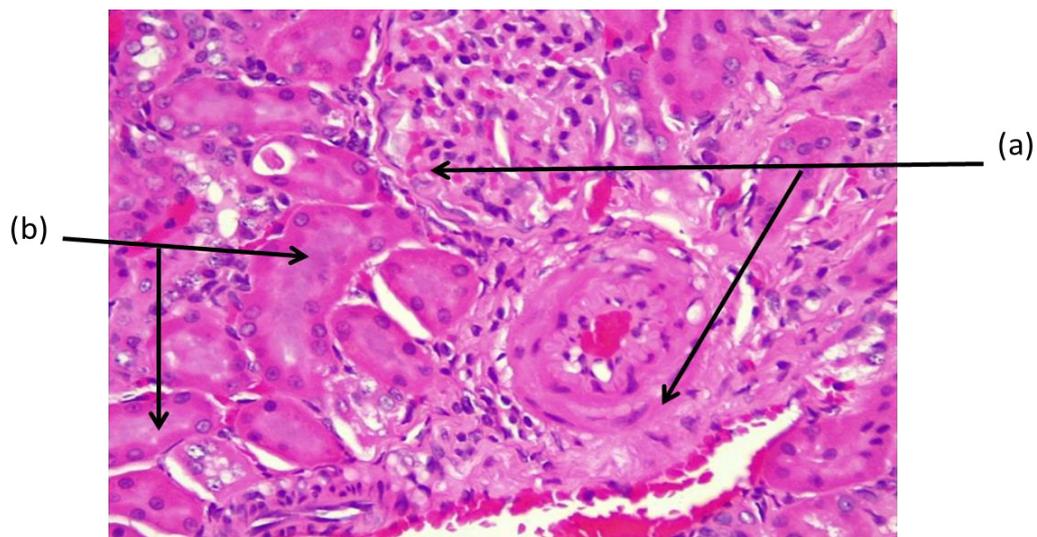
**Foto 17.** Riñón de rata Control Positivo (40X) col. HE: Corte en 40 aumentos, muestra ligera disminución del espacio de Bowman (a) y compromiso tanto de la membrana visceral como parietal; asimismo se puede observar en algunos túbulos sobre todo en el contorneado proximal desprendimiento de sus cilios (b).



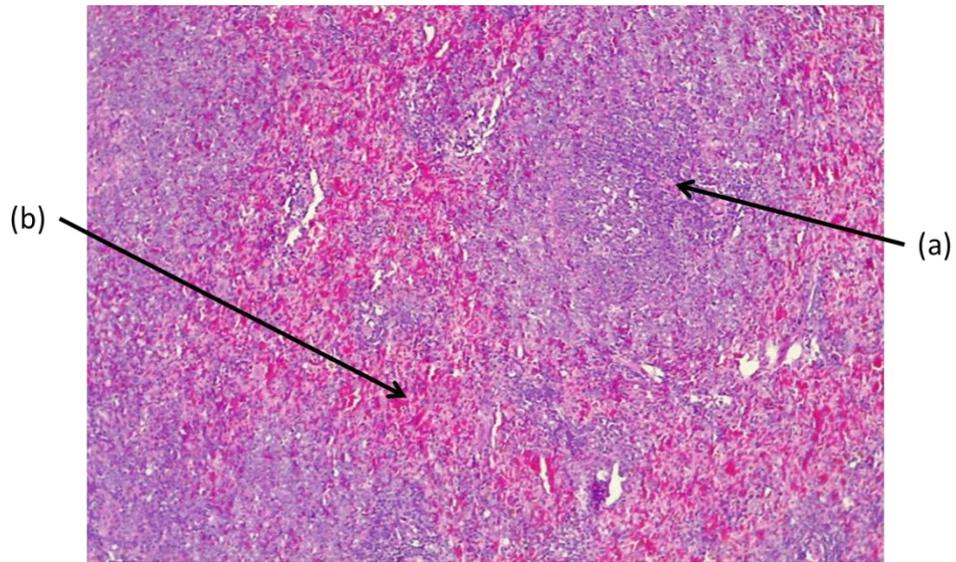
**Foto 18.** Riñón de rata con tratamiento Mezcla MV (40x) col. HE. El glomérulo muestra ensanchamiento del espacio de Bowman (a), ligera congestión (b). Los túbulis contorneados proximales mantienen su estructura; en algunos túbulis se observa desprendimiento de su epitelio (c), las demás células con caracteres normales.



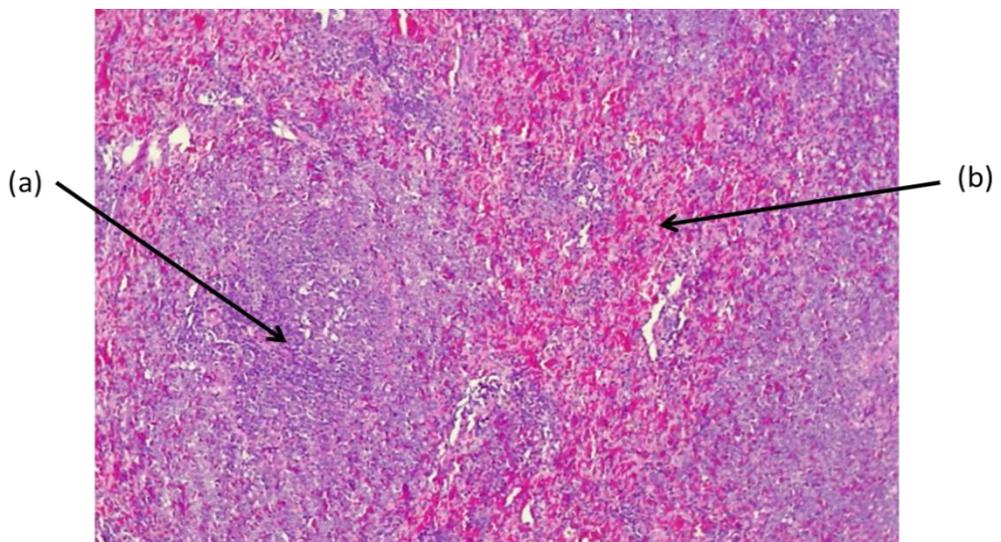
**Foto 19.** Riñón de rata con tratamiento Sulfato ferroso (40x) col. HE. Muestra glomérulo comprometido, se ha perdido la distribución adecuada del pelotón glomerular (a). Alteración de capa visceral y parietal del glomérulo (b). En contorneados proximales se aprecia desprendimiento del epitelio tubular (c). En el intersticio, entre túbulis y túbulis se observa material hemático (d), así como circundante al glomérulo.



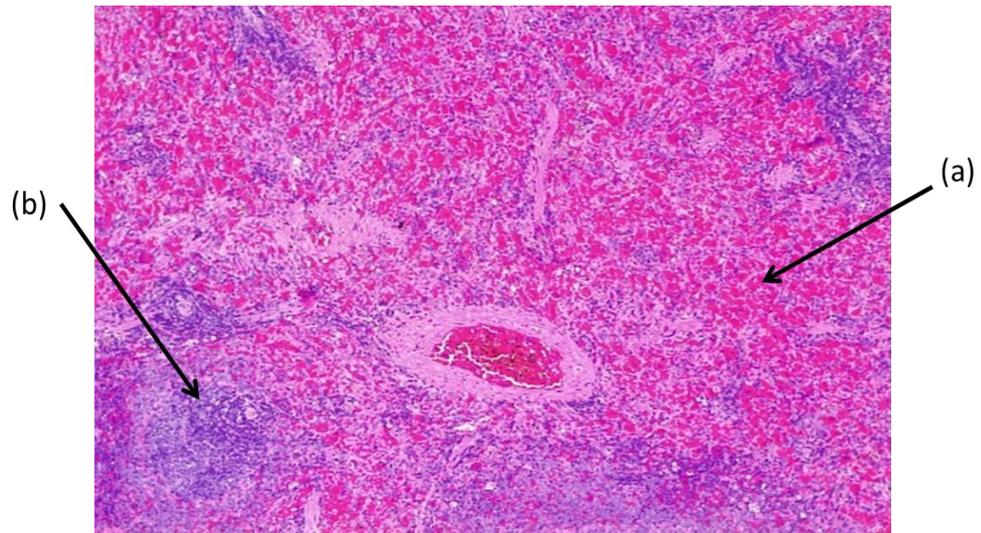
**Foto 20.** Riñón de rata con tratamiento Hemínico (40x) col. HE. Parénquima renal muestra al glomérulo cuyo espacio de Bowman ha disminuido totalmente (a). La membrana del glomérulo tanto parietal como visceral se ha unido. A nivel de los túbulis se aprecia desprendimiento del epitelio tubular, ocasionando que el lumen de los túbulis se encuentre totalmente obstruidos (b).

**Estudio Histológico: BAZO**

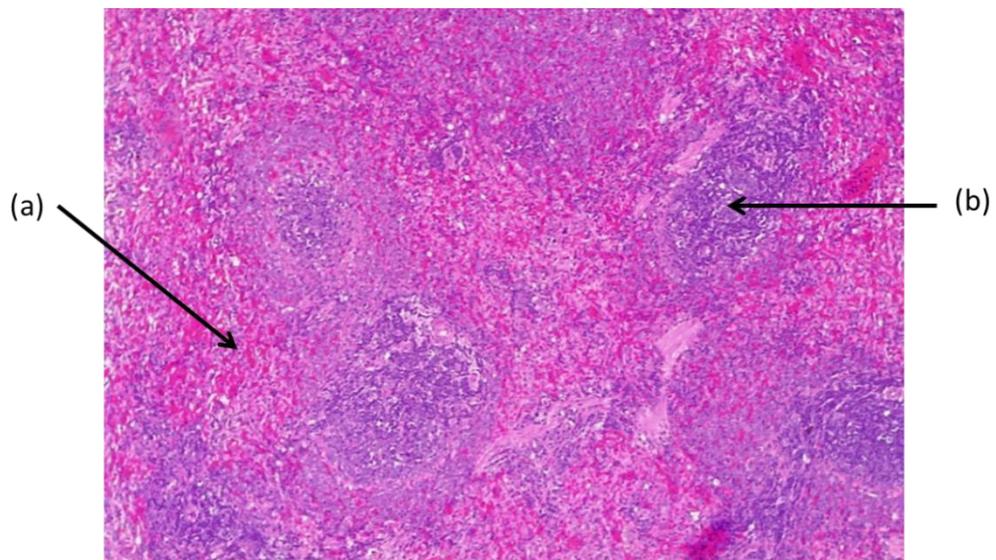
**Foto 21.** Bazo de rata Control Negativo (20X) col. HE: se aprecian folículos linfoides (a) que se diferencian bien; sin embargo, parte del estroma del bazo se observa con material hemorrágico (b).



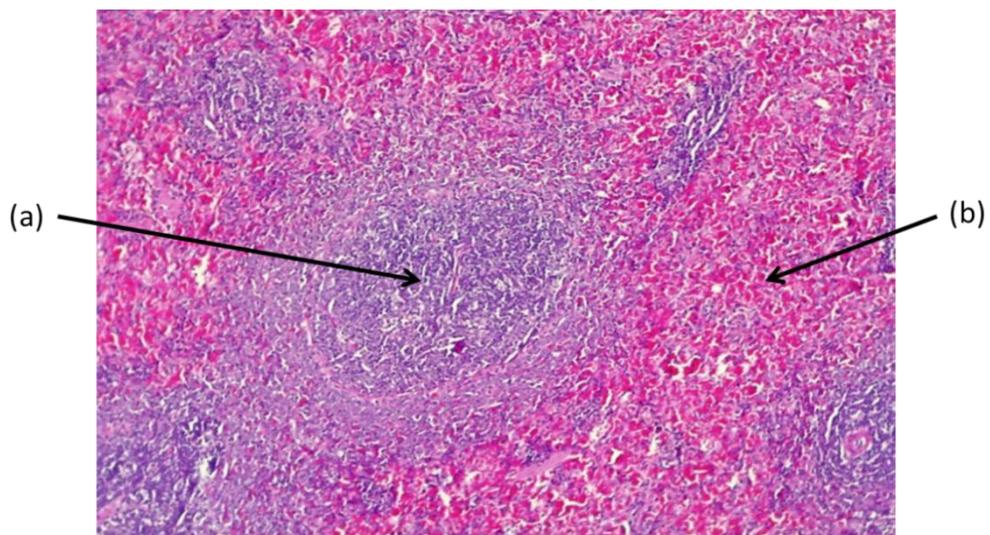
**Foto 22.** Bazo de rata Control Positivo (20X) col. HE: el parénquima esplénico muestra folículos linfoides (a) y se aprecia abundante material hemorrágico a nivel del parénquima (b). Se diferencia los linfocitos y folículos.



**Foto 23.** Bazo de rata con tratamiento Mezcla MV (20x) col. HE. Muestra un parénquima con hemorragia (a), discretamente se distingue una que otra estructura linfoidea del bazo (b), asimismo se aprecia un bazo arterial con un coágulo en su lumen.

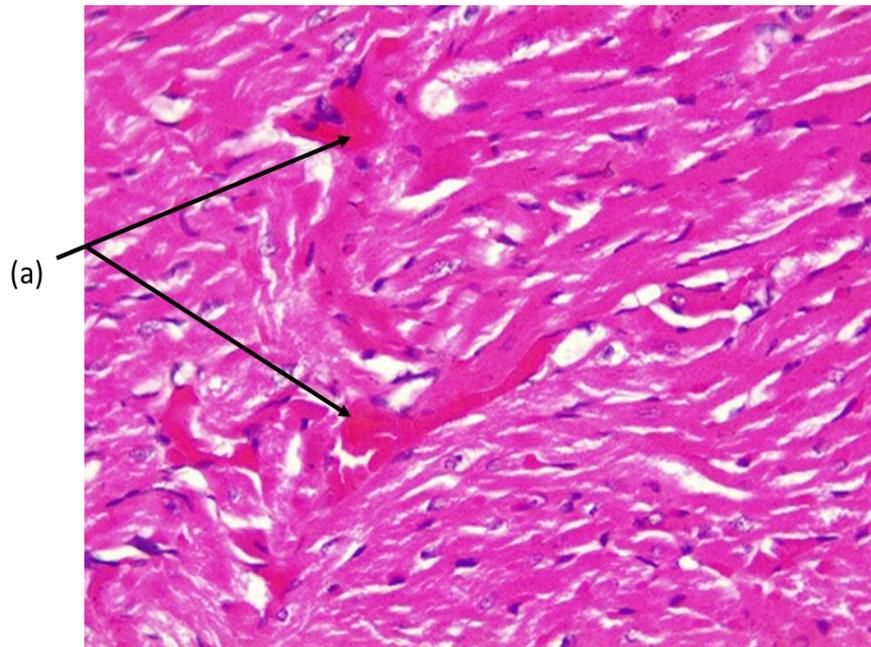


**Foto 24.** Bazo de rata con tratamiento Sulfato ferroso (20x) col. HE. Muestra parénquima con abundante material hemático (a) que circunda a algunos folículos linfoides, las células que componen los folículos linfoides (b) se mantiene aparentemente en estado normal.

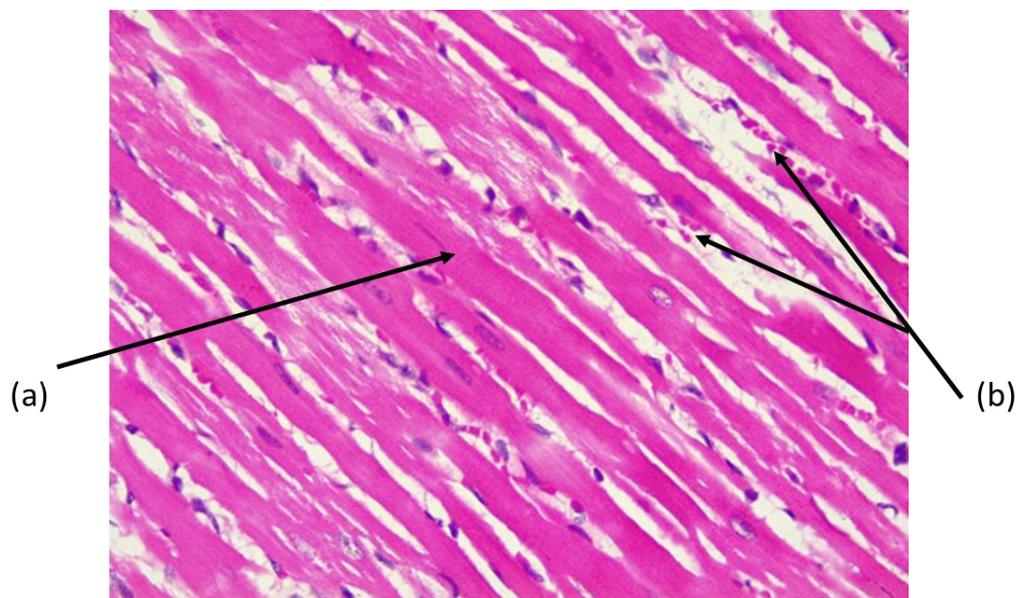


**Foto 25.** Bazo de rata con tratamiento Hemínico (20x) col. HE. Muestra presencia de folículos linfoides que se diferencian bien (a); sin embargo, estos están rodeados por abundante material hemorrágico (b).

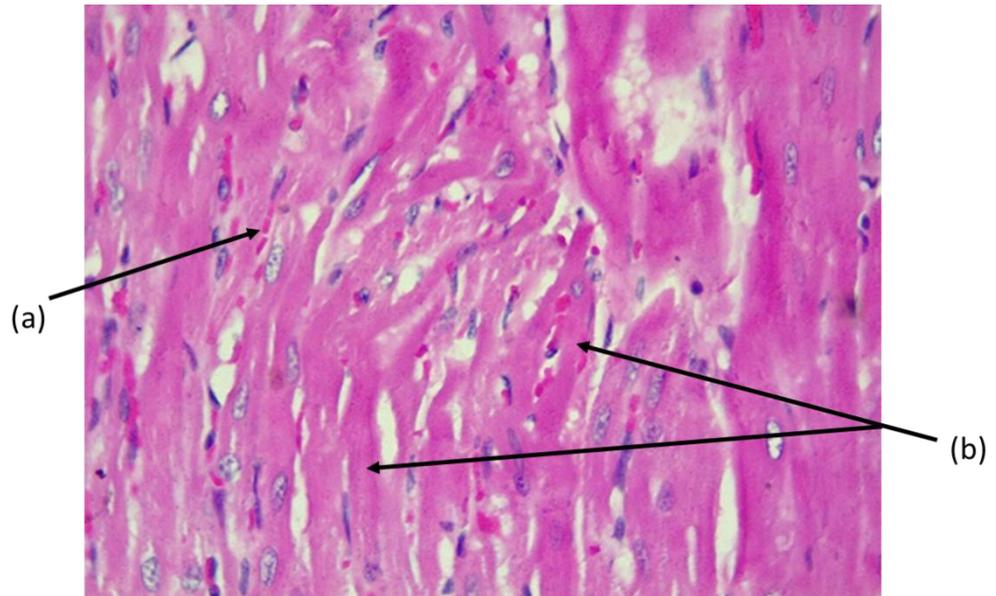
## Estudio Histológico: CORAZÓN



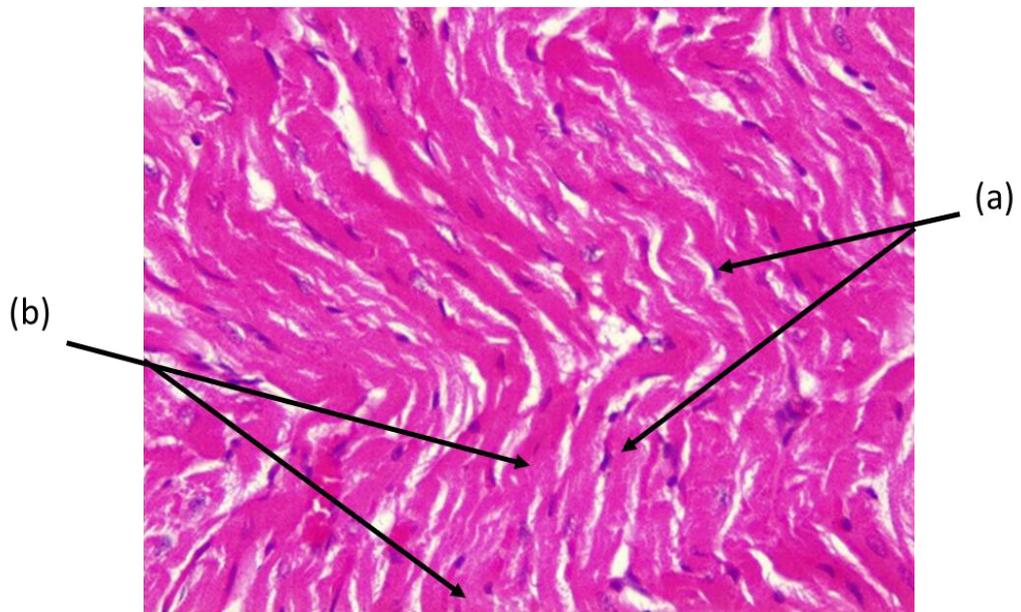
**Foto 26.** Corazón de rata Control Negativo (40X) col. HE: Los cortes a nivel de musculatura cardiaca muestran la estructura dentro de caracteres normales, con dos o tres áreas focales de hemorragia.



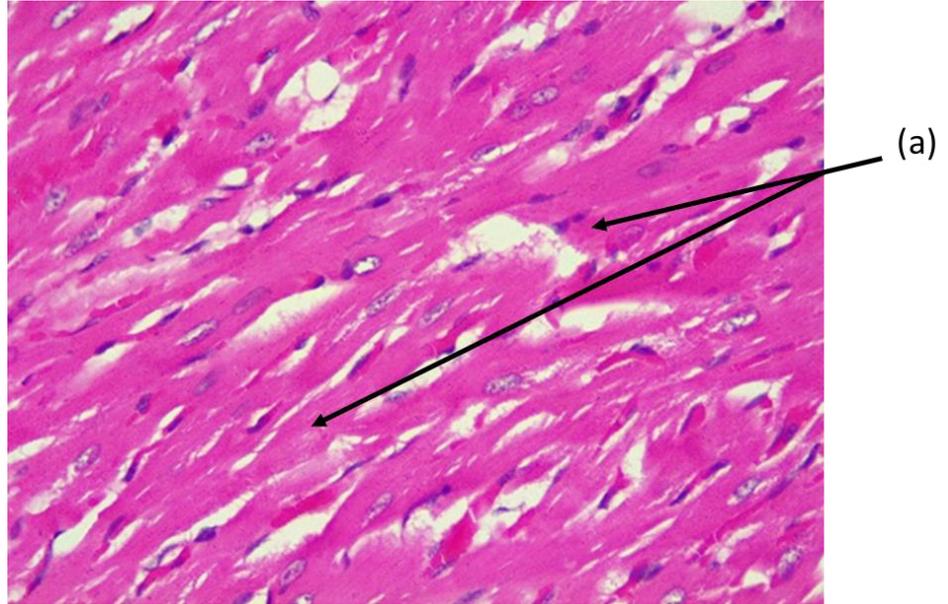
**Foto 27.** Corazón de rata Control Positivo (40X) col. HE: Los cortes muestran fascículos musculares (a) ligeramente homogenizados, no observándose las estriaciones transversales(b), a nivel del intersticio entre fascículo y fascículo muscular se observa escaso material hemático.



**Foto 28.** Corazón de rata con tratamiento Mezcla MV (40X) col. HE: Los fascículos musculares muestran material hemático a nivel del intersticio (a), las estriaciones transversales (b) no se visualizan bien.

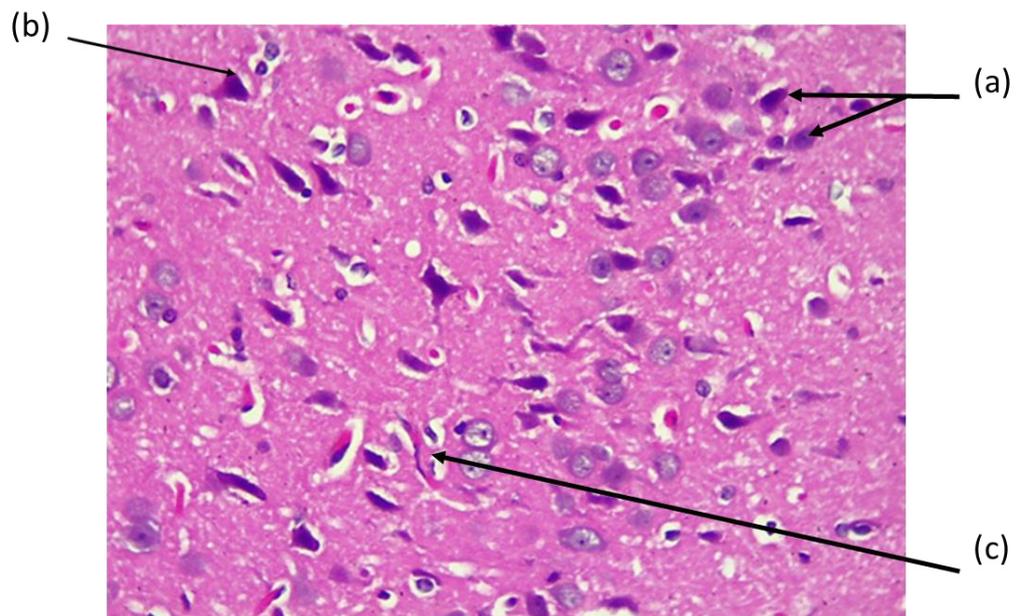


**Foto 29.** Corazón de rata con tratamiento: Sulfato ferroso (40X) col. HE. Los cortes muestran estructura muscular de aspecto normal con núcleos (a). Hay pérdida de fasciculaciones musculares (b).

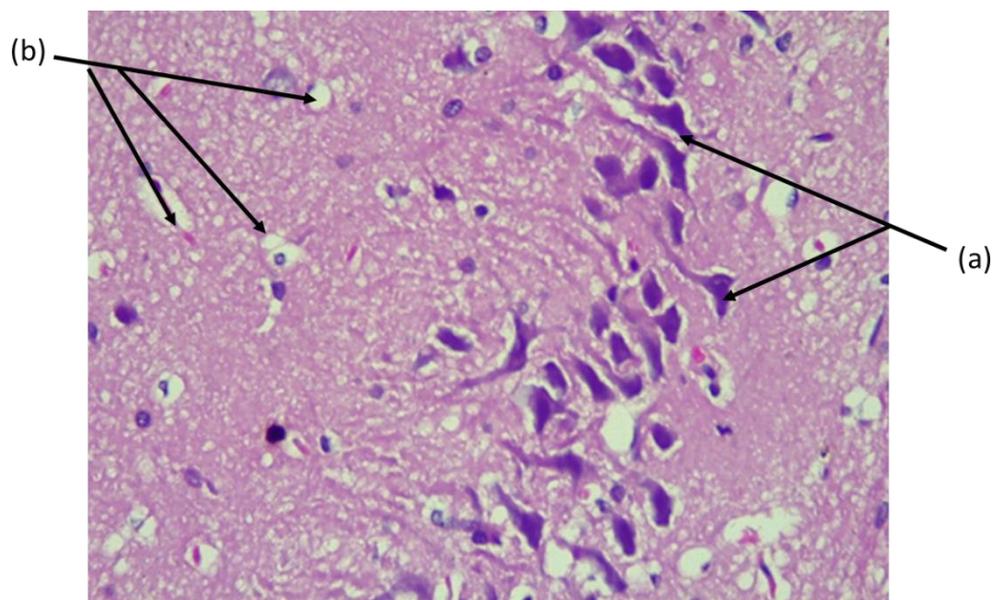


**Foto 30.** Corazón de rata con tratamiento: Hemínico (40X) col. HE: La estructura muscular del corazón muestra los fascículos homogenizados (a) núcleos periféricos.

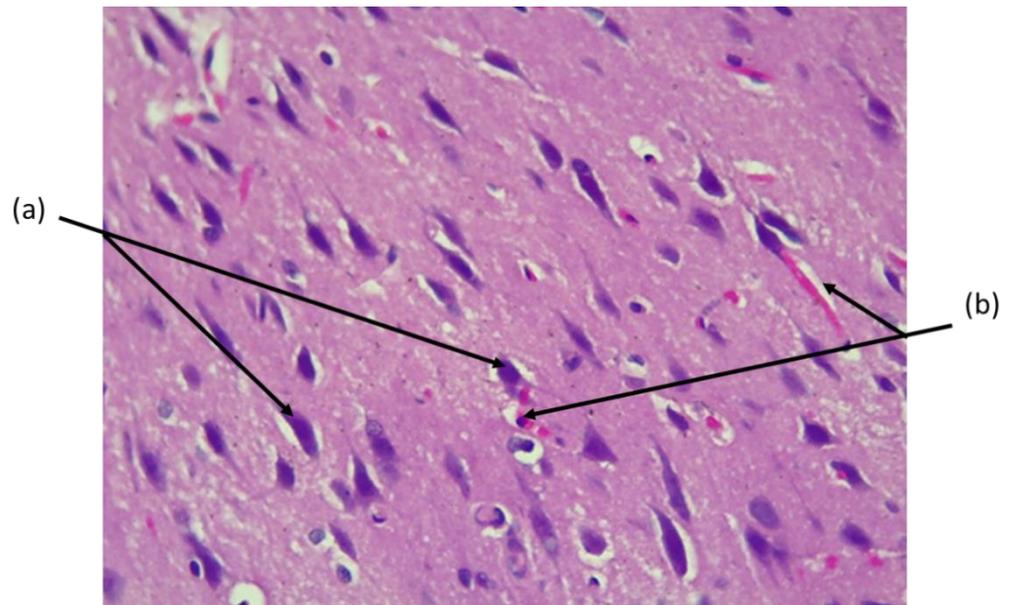
### Estudio Histológico: CEREBRO



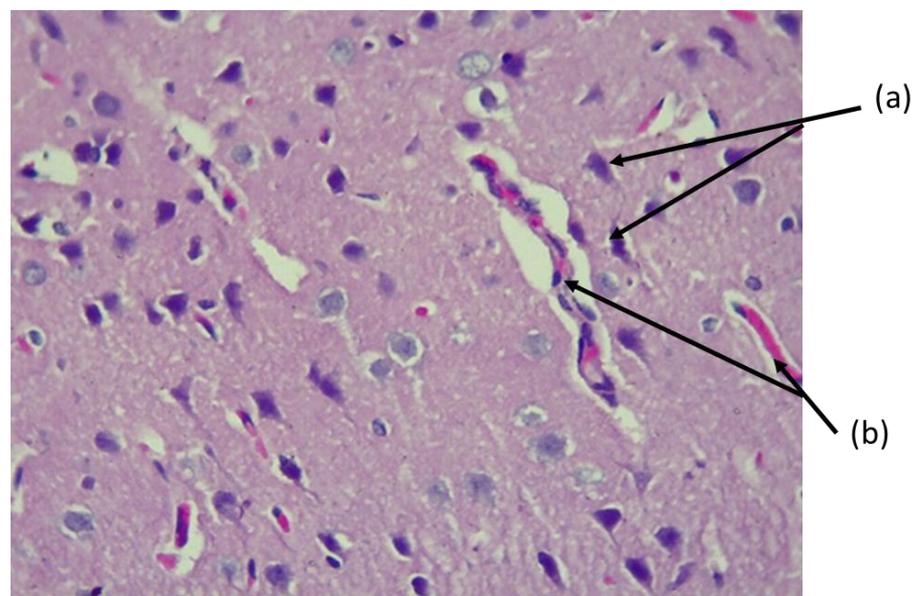
**Foto 31.** Cerebro de rata Control Negativo (40X) col. HE: Parénquima cerebral dentro de límites normales con células de la oligodendroglia (a), algunas células de Purkinje (b) y algunos vasos sanguíneos (c).



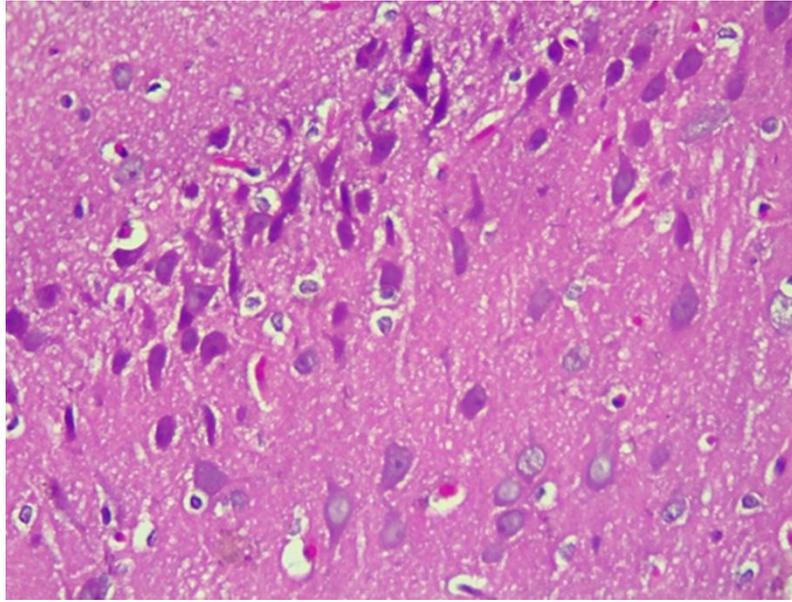
**Foto 32.** Cerebro de rata Control Positivo (40X) col. HE: Tejido cerebral muestra área columnar con células de Purkinje (a) algunas de ellas con vacuolas perinucleares, estroma del tejido nervioso muestra pequeñas vacuolas (b).



**Foto 33.** Cerebro de rata con tratamiento Mezcla MV (40X) col. HE: Parénquima cerebral con células dentro de límites normales(a), uno que otro con halo perinuclear (b), algunos vasos.



**Foto 34.** Cerebro de rata con tratamiento Sulfato ferroso (40X) col. HE. Parénquima con algunas células de Purkinje(a) con escaso halo perinuclear, el parénquima neuronal dentro de lo normal, algunas estructuras vasculares (b).



**Foto 35.** Cerebro de rata con tratamiento Hemínico (40X) col. HE: Parénquima cerebral normal.

## CONCLUSIONES

1. Los tres tratamientos de hierro iónico y no iónico recuperaron la concentración de hemoglobina a valores normales, similares al control negativo. El grupo que recibió la Mezcla MV alcanzó la más alta concentración de hemoglobina.
2. A su vez, se evidenció que los tratamientos con hierro iónico afectaron la capacidad antioxidante en suero, encontrándose mejores resultados en el grupo tratado con hierro no iónico (hemínico).
3. Se hallaron cambios histopatológicos principalmente en los cortes de hígado, duodeno y riñón, observándose mayores alteraciones en la morfología celular en el grupo tratado con sulfato ferroso. Así mismo, se pudo apreciar daño en el grupo control positivo, lo cual comprueba que la sola condición de anemia afecta la estructura celular y por ende, su normal funcionamiento.

## RECOMENDACIONES

1. Realización de investigaciones para tratamiento antianémico con la combinación de hierro iónico y no iónico (hemínico) a bajas concentraciones, para reducir los efectos adversos del hierro iónico y rescatar los beneficios del hierro hemínico.
2. Promoción del consumo de alimentos de origen animal, fuentes de hierro hemínico, para prevenir la deficiencia de hierro, especialmente en etapas de mayor requerimiento, gestación e infancia, y evitar las consecuencias que ocasiona la anemia.

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Abdel-Reheim, M.A., Shehata, B.A. y Abo-Saif, A.A. (2017). Hepatoprotective Effect of Diosmin on Iron-induced Liver Damage. *International Journal of Pharmacology*, 13, 529-540. DOI <https://scialert.net/abstract/?doi=ijp.2017.529.540>

Alcázar, L. (diciembre, 2012). *Impacto Económico de la Anemia en el Perú*. Lima: GRADE; Acción contra el Hambre. Recuperado de [http://www.grade.org.pe/upload/publicaciones/archivo/download/pubs/LIBROGRADE\\_ANEMIA.pdf](http://www.grade.org.pe/upload/publicaciones/archivo/download/pubs/LIBROGRADE_ANEMIA.pdf)

Alfárez, M. J. M., Díaz, J., Hijano, S., Nestares, T., Rivas, E., Moreno, J., Campos, M. S. y López, I. (marzo, 2014). Valoración del estrés oxidativo en el tratamiento de la anemia con distinta cantidad y calidad de hierro. *Nutrición clínica y dietética hospitalaria*, 34 suplemento 1, 79. Recuperado de <http://revista.nutricion.org/PDF/IXCONGRESO2014.pdf>

Aparco, J.P. y Huamán-Espino, L. (noviembre, 2017). Barreras y facilitadores a la suplementación con micronutrientes en polvo. Percepciones maternas y dinámica de los servicios de salud. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 34(4), 590-600. DOI: 10.17843/rpmesp.2017.344.3164

Apolinario, M., Herrada, K. y Nole, J. (1998). *Influencia de la fortificación con hierro hemínico, en el nivel de hematocrito en niños de 7 meses a 3 años del establecimiento penitenciario - mujeres - Chorrillos 1997* (Tesis para obtención del grado de Licenciatura en Enfermería) Universidad Peruana Cayetano Heredia. Recuperado de <http://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/es/lil-309543>

Arroyo-Laguna, J. (2017). Hacia un Perú sin anemia. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 34(4), 586-7. DOI: 10.17843/rpmesp.2017.344.3279

Avello, M. y Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción)*, (494), 161-172. Recuperado de <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-04622006000200010>

Baltazar, R. y Tarmeño, Y. (1998). *Influencia de las galletas fortificadas en los niveles basales de hemoglobina en adolescentes varones de 12 a 16 años: Barrios Altos en los meses de febrero-marzo 1997* (Tesis para obtención del grado de Licenciatura en Enfermería) Universidad Peruana Cayetano Heredia. Recuperado de <http://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/es/lil-309521>

Cabrera, J. y García, C. (2014). Aportes del Ferrical® a los requerimientos nutricionales diarios de minerales en la población cubana sana. *Revista*

*Cubana de Farmacia*, 48(4), 709-717. Recuperado de <http://scielo.sld.cu/pdf/far/v48n4/far18414.pdf>.

Cáceres, L. (2016). *Efectos histomorfológicos en la mandíbula de ratas albinas sometidas a dieta deficiente en proteína y diferentes concentraciones de hierro*. (Tesis para optar el grado académico de doctor en Ciencias de la Salud). Recuperado del repositorio UNMSM [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/4839/C%C3%A1ceres\\_gl.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/4839/C%C3%A1ceres_gl.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Cardozo de Martínez, C., y Mrad de Osorio, A. (2008). Ética en investigación con animales: Una actitud responsable y respetuosa del investigador con rigor y calidad científica. *Revista Latinoamericana de Bioética*, 8 (2), 46-71. Recuperado de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=127012550006>

Centro Nacional de Alimentación y Nutrición (junio, 2016). Ensayo comunitario para mejorar la adherencia a la suplementación con micronutrientes en niños de 6 a 35 meses de edad de la Dirección Regional de Salud Dirección de Salud Puno, Tacna, Loreto y Lima Este. Perú: Instituto Nacional de Salud. Recuperado de [http://www.portal.ins.gob.pe/en/component/rsfiles/preview?path=cenan%252FPrevencion%2Bde%2BRiesgo%2Bpor%2Bdanos%2Bnutricionales%252FReportes%2Be%2BInformes%252FEnsayo\\_Comunitario.pdf](http://www.portal.ins.gob.pe/en/component/rsfiles/preview?path=cenan%252FPrevencion%2Bde%2BRiesgo%2Bpor%2Bdanos%2Bnutricionales%252FReportes%2Be%2BInformes%252FEnsayo_Comunitario.pdf)

Centro Nacional de Alimentación y Nutrición (2017). *Tablas peruanas de composición de alimentos*. (10° ed.). Lima: Ministerio de Salud. Recuperado de <https://repositorio.ins.gob.pe/bitstream/handle/INS/1034/tablas-peruanas-2017.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Corrales, L. y Muñoz, M. (2012). Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nova*, 10(18), 213-225. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v10n18/v10n18a08.pdf>

Díaz, J., Alférez, M. J. M., Hijano, S., Nestares, T., Rivas, E., Campos, M. S. y López, I. (marzo, 2014). Efecto de la calidad y cantidad de hierro sobre el daño oxidativo al material Genético en la ferropenia. *Nutrición clínica y dietética hospitalaria*, 34 suplemento 1, 79. Recuperado de <http://revista.nutricion.org/PDF/IXCONGRESO2014.pdf>

Donato, H., Rapetti, M., Morán, L. y Cavo, M. (2007). Hidróxido férrico polimaltosado contra sulfato ferroso en el tratamiento de la anemia ferropénica: estudio prospectivo aleatorizado. *Archivos Argentinos de Pediatría*, 105(6), 491-497. Recuperado de <https://www.sap.org.ar/docs/publicaciones/archivosarg/2007/v105n6a04.pdf>

Gaitán, D., Olivares, M., Arredondo, M. y Pizarro, F. (agosto, 2006). Biodisponibilidad de hierro en humanos. *Revista Chilena de Nutrición*, 33(2), 142-148. DOI <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182006000200003>

- García, Y., García-Pérez, Á., Ángeles-Campos, S., Carmona-Castro, A. y Cárdenas-Vázquez, R. (2013). Evaluación de dieta purificada para la obtención de biomodelo de ratas anémicas. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 32(3), 312-320. Recuperado de <http://scielo.sld.cu/pdf/ibi/v32n3/ibi07313.pdf>
- García, Y., González, R., Menéndez, R., González, M. y Bourg, V. (2008). Efecto de la suplementación con una formulación deshidratada de hierro hemínico + hierro iónico en ratas. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*, 18(2), 204-212. Recuperado de <http://web.b.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=3&sid=900bc938-5047-4c38-82ea-15e6ee05238a%40sessionmgr103>
- García, Y., Morejón, A. y Bourg, V. (2015). Efecto oxidativo de la anemia ferropénica severa en ratas Wistar machos recién destetadas. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 34(1). Recuperado de <http://scielo.sld.cu/pdf/ibi/v34n1/ibi05115.pdf>
- González, R., García, Y., Espinosa, G., Carmona, A. y Cárdenas, R. (diciembre, 2011). Efecto antianémico y daño gastrointestinal en ratas suplementadas con diferentes formas de hierro. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*, 21(2), 186-196. Recuperado de <http://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=49482>

González-Torres, M., Betancourt-Rule, M. y Ortiz-Muñiz, R. (2000). Daño Oxidativo y Antioxidantes. *Bioquímica*, 25(1), 3-9. Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/576/57611797001.pdf>

Guija, E., Troncoso-Corzo, L., Enciso, J., Palomino, F., Núñez, M., Oliveira, G. y Fukusaki, A. (2011). Efecto hepatoprotector del extracto hidroalcohólico de *Petroselinum sativum* (perejil) sobre la expresión de Cox-2 y activación del Nk-B hepáticos, generados por la administración de sulfato ferroso y vitamina C en ratas. *Anales de la Facultad de Medicina*, 72 suplemento 1. Recuperado de <http://www.redalyc.org/html/379/37922983002/index.html>

Guillén, G. (2014). *Adherencia y factores asociados a la suplementación de hierro en gestantes anémicas en el Hospital Santa Rosa, Pueblo Libre* (Tesis para optar el Título Profesional de Licenciada en Nutrición). Recuperado del repositorio UNMSM [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/3615/Guillen\\_qg.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/3615/Guillen_qg.pdf?sequence=1&isAllowed=y).

Iannacone, E. (2014). *Efectos de la deficiencia aislada y Simultánea de hierro y cobre sobre la actividad del citocromo c oxidasa del musculo esquelético en ratas* (Tesis para optar el Grado Académico de Magíster en Nutrición). Recuperado del repositorio [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/3838/Iannacone\\_s\\_e.pdf?sequence=3&isAllowed=y](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/3838/Iannacone_s_e.pdf?sequence=3&isAllowed=y).

Instituto Nacional de Estadística e Informática (enero, 2013). Perú: Indicadores de Resultados de los Programas Estratégicos, 2000 – 2012. Encuesta Demográfica y de Salud Familiar. Lima: Autor. Recuperado de <https://proyectos.inei.gob.pe/endes/ppr.asp>.

Instituto Nacional de Estadística e Informática (2018). Encuesta Demográfica y de Salud Familiar. Lima: Autor. Recuperado de [https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones\\_digitales/Est/Lib1656/index1.html](https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones_digitales/Est/Lib1656/index1.html).

Llanllaya, L. y Melendez, E. (2013). Efecto del consumo de Cochayuyo (*Chondracanthus chamissoi*) sobre los niveles plasmáticos de hierro en *Rattus norvegicus* con anemia ferropénica inducida. *Revista Especializada en Nutrición*, 7(1), 1182-11970.

Mahan, L.K. y Escott-Stump, S. (2009). *Krause's Food & the Nutrition Care Process*. [Krause Alimentos y el Proceso de cuidado de la Nutrición] (12<sup>o</sup> ed.). Barcelona: Elsevier.

Raymond, J. (2017). *Krause's Food & the Nutrition Care Process*. [Krause Alimentos y el Proceso de cuidado de la Nutrición] (14<sup>o</sup> ed.). Barcelona: Elsevier.

Mayor-Oxilia, R. (2010). Estrés Oxidativo y Sistema de Defensa Antioxidante. *Revista del Instituto de Medicina Tropical*, 5(2), 23-29. Recuperado de <http://scielo.iics.una.py/pdf/imt/v5n2/v5n2a05.pdf>

Ministerio de Salud (2013). Procedimiento para la Determinación de la Hemoglobina mediante Hemoglobinómetro portátil. Perú: Autor. Recuperado de <http://repositorio.ins.gob.pe/bitstream/handle/INS/226/CENAN-0068.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Ministerio de Salud (setiembre, 2014). Directiva Sanitaria que establece la suplementación con Multimicronutrientes y hierro para la prevención de anemia en niñas y niños menores de 36 meses. Perú: Autor. Recuperado de [http://www.minsa.gob.pe/portada/especiales/2015/nutriwawa/directivas/001D\\_S\\_Suplem\\_MultiMicro.pdf](http://www.minsa.gob.pe/portada/especiales/2015/nutriwawa/directivas/001D_S_Suplem_MultiMicro.pdf).

Ministerio de Salud (enero, 2015). Guía de práctica clínica para el diagnóstico y tratamiento de la anemia por deficiencia de hierro en niñas, niños y adolescentes en establecimiento de salud del primer nivel de atención. Perú: Autor. Recuperado de <https://es.scribd.com/document/253727094/Guia-de-Practica-Clinica-para-el-Diagnostico-y-Tratamiento-de-la-Anemia-2015>.

Ministerio de Salud (2016a). Directiva Sanitaria para la prevención de anemia mediante la suplementación con micronutrientes y hierro en niñas y niños

menores de 36 meses. Perú: Autor. Recuperado de <http://bvs.minsa.gob.pe/local/MINSA/3931.pdf>.

Ministerio de Salud (2016b). Informe Técnico SEMTS-DAUS- Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas. Perú: Autor. Recuperado de [http://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoad/UpLoaded/PDF/ESEMOTS/11\\_Evaluacion/13\\_Informes\\_Anemia\\_Parasitosis/INFORME\\_POLIMALTOSA.pdf](http://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoad/UpLoaded/PDF/ESEMOTS/11_Evaluacion/13_Informes_Anemia_Parasitosis/INFORME_POLIMALTOSA.pdf).

Ministerio de Salud (abril, 2017a). Norma Técnica de Salud para el Manejo Terapéutico y Preventivo de la Anemia en niños, adolescentes, mujeres gestantes y puérperas. Perú: Autor. Recuperado de <http://bvs.minsa.gob.pe/local/MINSA/4190.pdf>.

Ministerio de Salud (abril, 2017b). Plan Nacional para la Reducción y Control de la Anemia Materno Infantil y la Desnutrición Crónica Infantil en el Perú: 2017-2021. Perú: Autor. Recuperado de: <http://bvs.minsa.gob.pe/local/MINSA/4189.pdf>

Munayco, C., Gambirazio, C., Suárez, L. y Arias, L. (2009). *Estudio de adherencia a la suplementación con hierro durante la gestación en las direcciones de salud de Apurímac y Ayacucho*. Lima: Ministerio de Salud. Recuperado de: [bvs.minsa.gob.pe/local/minsa/1233\\_OGE156.pdf](http://bvs.minsa.gob.pe/local/minsa/1233_OGE156.pdf)

National Academies Press (1995). *Requerimientos de nutrientes de los animales de laboratorio* (4<sup>o</sup> ed.). Washington: Autor. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK231925/table/ttt00002/?report=objectonly>

Olivares, M. y Walter, T. (2004). Causas y consecuencias de la deficiencia de hierro. *Revista de Nutrição*, 17(1), 05-14. Recuperado de <https://dx.doi.org/10.1590/S1415-52732004000100001>

Organización Mundial de la Salud (2011). Concentraciones de hemoglobina para diagnosticar la anemia y evaluar su gravedad. Ginebra: Autor. Recuperado de <http://www.who.int/vmnis/indicators/haemoglobin/es/>

Organización Mundial de la Salud (2012). Directriz: Uso de micronutrientes en polvo para la fortificación domiciliar de los alimentos consumidos por lactantes y niños de 6 a 23 meses de edad. Ginebra: Autor. Recuperado de [http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/guidelines/guideline\\_mnp\\_infants\\_children/es/](http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/guidelines/guideline_mnp_infants_children/es/)

Ortiz-Alva, E. y Román-Vargas, M. (2013). Efecto del decócto de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. en los niveles hematológicos de *Rattus norvegicus* var *albina* Un modelo experimental de anemia ferropénica. *Sagasteguiana* 1(1), 57-66. Recuperado de <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/REVSAGAS/article/view/1782/1738>

Peñuela, O. (2005). Hemoglobina: una molécula modelo para el investigador. *Colombia Médica*, 36(3), 215-225. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=28336313>

Palomo, I., Pereira, J. y Palma, J. (2005). *HEMATOLOGÍA Fisiopatología y Diagnóstico*. Chile: Universidad de Talca. Recuperado de <http://editorial.otalca.cl/docs/ebook/hematologia.pdf>

Román, Y., Rodríguez, Y., Gutiérrez, E., Aparco, J.P., Gómez-Sánchez, I., y Fiestas, F. (mayo, 2015). Anemia en la población infantil del Perú: aspectos clave para su afronte. Lima: Instituto Nacional de Salud. Recuperado de [http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/4/jer/evidencias/ANEMIA%20FINAL\\_v.03mayo2015.pdf](http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/4/jer/evidencias/ANEMIA%20FINAL_v.03mayo2015.pdf)

Sermini, C., Acevedo, M. y Arredondo, M. (2017). Biomarcadores del metabolismo y nutrición de hierro. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 34(4), 690-8. DOI:10.17843/rpmesp.2017.344.3182

Szollosi, R. y Varga, I. (2002). Total antioxidant power in some species of Labiatae (Adaptation of FRAP method). *Acta Biológica Szegadiensis*, 46(3-4), 125-127. Recuperado de <https://www2.sci.u-szeged.hu/ABS/2002/Acta%20HPb/s2/32-szool.pdf>

- Tillán, J., Rodríguez, J., Gómez, J.M., Pardo, Z. y Agüero, S. (2004). Actividad antianémica de la *Cassia grandis* L. *Revista Cubana de Farmacia*, 38(3). Recuperado de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75152004000300009](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152004000300009)
- Tostado-Madrid, T., Benítez-Ruiz, I., Pinzón-Navarro, A., Bautista-Silva, M. y Ramírez-Mayans, J. (2015) Actualidades de las características del hierro y su uso en pediatría. *Acta Pediátrica de México*, 36, 189-200. Recuperado de <http://www.scielo.org.mx/pdf/apm/v36n3/v36n3a8.pdf>
- Toxqui, L., De Piero, A., Courtois, V., Bastida, S., Sánchez-Muniz, F. J. y Vaquero, M.<sup>ª</sup>P. (2010). Deficiencia y sobrecarga de hierro; implicaciones en el estado oxidativo y la salud cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 25(3), 350-365. DOI:10.3305/nh.2010.25.3.4583
- Trompetero, A. (2014). *Comportamiento de los indicadores de la eritropoyesis y el estado del hierro en población universitaria colombiana a diferentes alturas*. (Tesis para optar el Grado Académico de Magíster en Fisiología). Recuperado del [https://www.researchgate.net/publication/282644752\\_Comportamiento\\_de\\_los\\_indicadores\\_de\\_la\\_eritropoyesis\\_y\\_el\\_estado\\_del\\_hierro\\_en\\_poblacion\\_universitaria\\_colombiana\\_a\\_diferentes\\_alturas](https://www.researchgate.net/publication/282644752_Comportamiento_de_los_indicadores_de_la_eritropoyesis_y_el_estado_del_hierro_en_poblacion_universitaria_colombiana_a_diferentes_alturas).

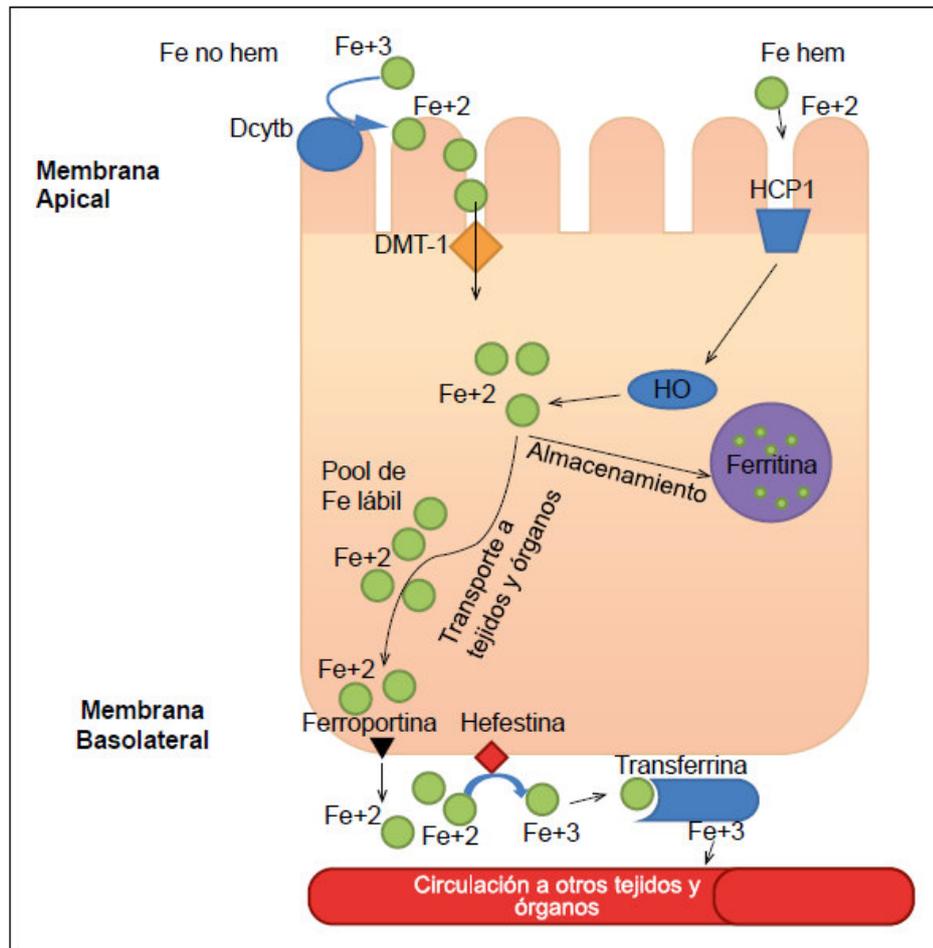
Troncoso, L. y Guija, E. (2007). Efecto antioxidante y hepatoprotector del *Petroselinum sativum* (perejil) en ratas, con intoxicación hepática inducida por paracetamol. *Anales de la Facultad de Medicina*, 68(4), 333-343. Recuperado de <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/anales/article/view/1199/1005>

Troncoso-Corzo, L., Guija, E., Palomino, F., Núñez, M., Oliveira, G., Soberon, M. y Flores, J. (2012). Daño pulmonar generado por sulfato ferroso y vitamina C en embriones de ratas y crías, y regeneración pos necrótica por *Petroselinum sativum* (perejil). *Anales de la Facultad de Medicina*, 73. DOI: <http://dx.doi.org/10.15381/anales.v73i1.2168>

Urquidi, C., Mejía, H. y Vera, C. (2007). Adherencia al tratamiento de la anemia con fumarato ferroso microencapsulado. *Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría*, 46 (1), 3-11. Recuperado de <http://www.scielo.org.bo/pdf/rbp/v46n1/v46n1a02.pdf>

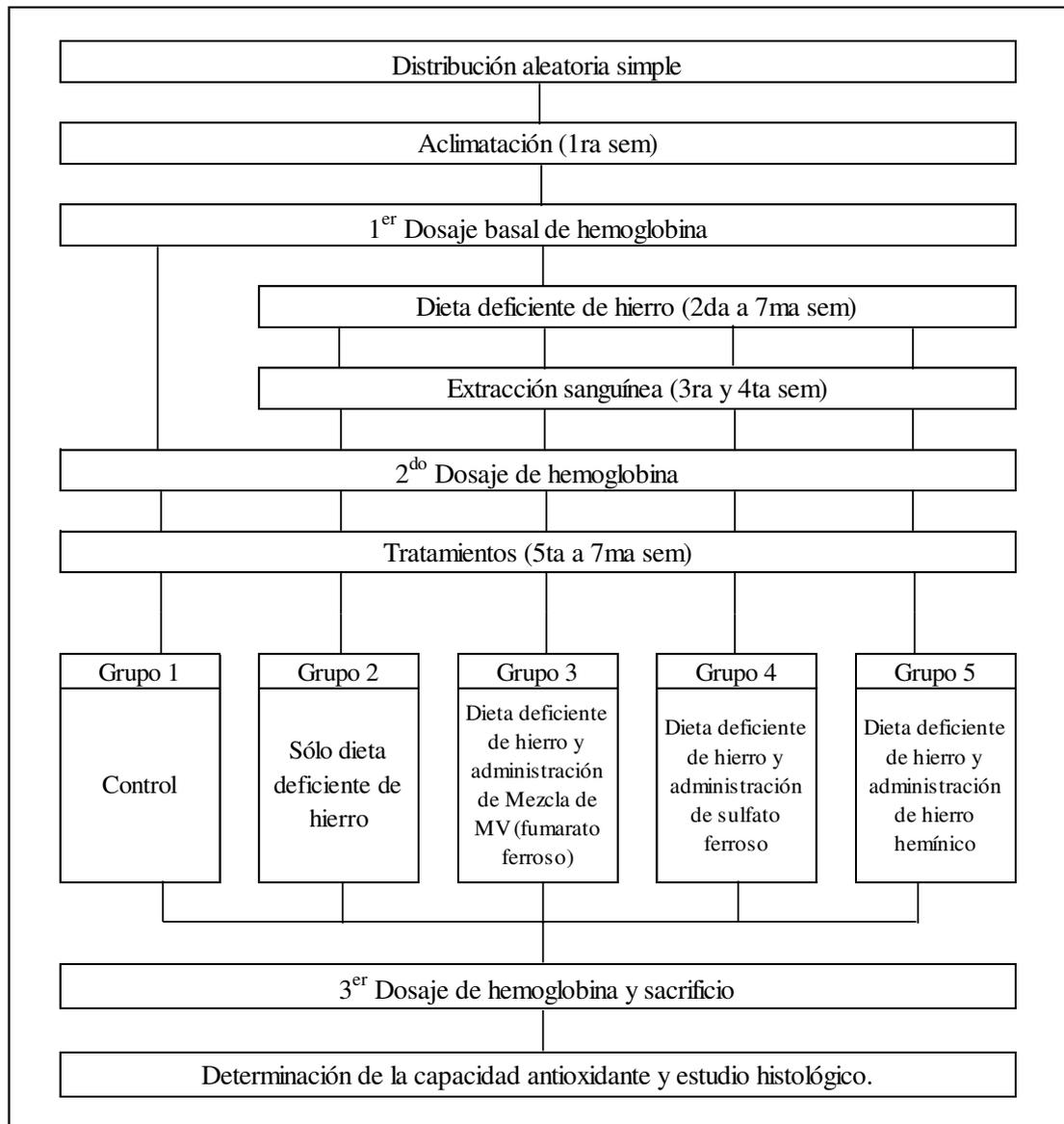
World Health Organization (2015). The global prevalence of anaemia in 2011 [Prevalencia global de anemia en el 2011]. Geneva: Author. Recuperado de [http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/global\\_prevalence\\_anaemia\\_2011/en/](http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/global_prevalence_anaemia_2011/en/)

## ANEXO 1



**Absorción de hierro hemínico y no hemínico desde la membrana apical del enterocito, su internalización y transporte a la membrana basolateral.** Recuperado de “Biomarcadores del metabolismo y nutrición de hierro”, por Sermini, C., Acevedo, M. & Arredondo, M., 2017, *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 34(4), p. 692. Copyright Instituto Nacional de Salud (Perú).

## ANEXO 2

**Cuadro A: Diseño experimental**

### ANEXO 3

#### Prueba de normalidad: Concentración de Hemoglobina

Grupos	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Control Negativo	.197	6	.200*	.946	6	.710
Control Positivo	.183	6	.200*	.931	6	.587
Mezcla MV	.191	6	.200*	.949	6	.729
Sulfato ferroso	.173	6	.200*	.973	6	.914
Hierro Hemínico	.246	6	.200*	.919	6	.497

<sup>a</sup> Corrección de significación de Lilliefors

#### Prueba de homogeneidad de varianzas

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
1.163	4	25	.351

Variable: Hemoglobina

#### Análisis de Varianza ANOVA de la Concentración de Hemoglobina

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	44.919	4	11.230	6.309	.001
Dentro de grupos	44.500	25	1.780		
Total	89.419	29			

## ANEXO 4

**Comparaciones Múltiples: Procedimiento post hoc: HSD TUKEY**

Variable Dependiente: Hemoglobina

Tukey HSD

(I) Factor	(J) Factor	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Control Negativo	Control Positivo	2.9000	.7703	.007	.638	5.162
	Mezcla MV	-.6333	.7703	.921	-2.896	1.629
	Sulfato ferroso	.0667	.7703	1.000	-2.196	2.329
	Hierro Hemínico	.7833	.7703	.845	-1.479	3.046
Control Positivo	Control Negativo	-2.9000	.7703	.007	-5.162	-.638
	Mezcla MV	-3.5333	.7703	.001	-5.796	-1.271
	Sulfato ferroso	-2.8333	.7703	.009	-5.096	-.571
	Hierro Hemínico	-2.1167	.7703	.075	-4.379	.146
Mezcla MV	Control Negativo	.6333	.7703	.921	-1.629	2.896
	Control Positivo	3.5333	.7703	.001	1.271	5.796
	Sulfato ferroso	.7000	.7703	.891	-1.562	2.962
	Hierro Hemínico	1.4167	.7703	.375	-.846	3.679
Sulfato ferroso	Control Negativo	-.0667	.7703	1.000	-2.329	2.196
	Control Positivo	2.8333	.7703	.009	.571	5.096
	Mezcla MV	-.7000	.7703	.891	-2.962	1.562
	Hierro Hemínico	.7167	.7703	.882	-1.546	2.979
Hierro Hemínico	Control Negativo	-.7833	.7703	.845	-3.046	1.479
	Control Positivo	2.1167	.7703	.075	-.146	4.379
	Mezcla MV	-1.4167	.7703	.375	-3.679	.846
	Sulfato ferroso	-.7167	.7703	.882	-2.979	1.546

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

## ANEXO 5

## Prueba de normalidad: Capacidad antioxidante

Grupo	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Control Negativo	.253	6	.200	.862	6	.196
Control Positivo	.272	6	.189	.878	6	.261
Mezcla MV	.314	6	.065	.881	6	.272
Sulfato ferroso	.220	6	.200	.931	6	.589
Hierro Hemínico	.287	6	.133	.836	6	.121

<sup>a</sup> Corrección de significación de Lilliefors

## Prueba de homogeneidad de varianzas

Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
15.093	4	25	.000

Capacidad antioxidante

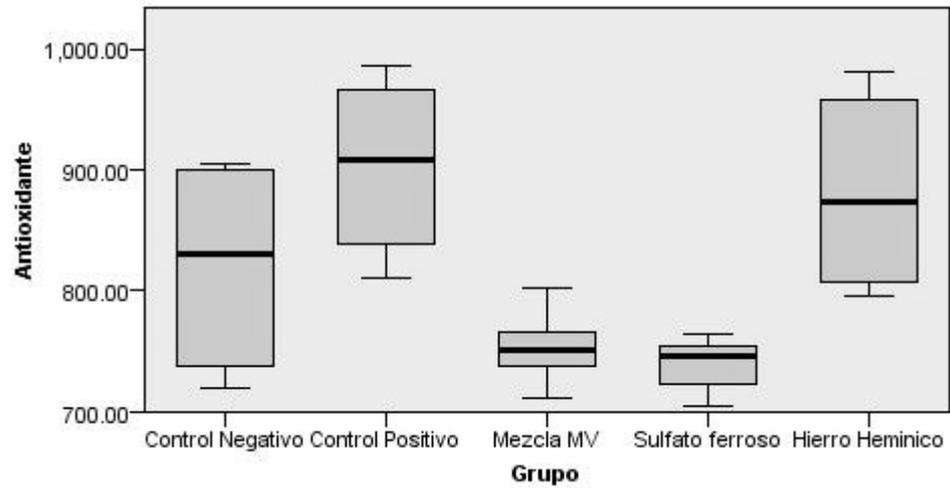
## Prueba no paramétrica

## Resumen de contrastes de hipótesis

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
<b>1</b>	The distribution of Antioxidante is the same across categories of Grupo.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	.002	Reject the null hypothesis.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es 0,05.

## ANEXO 6



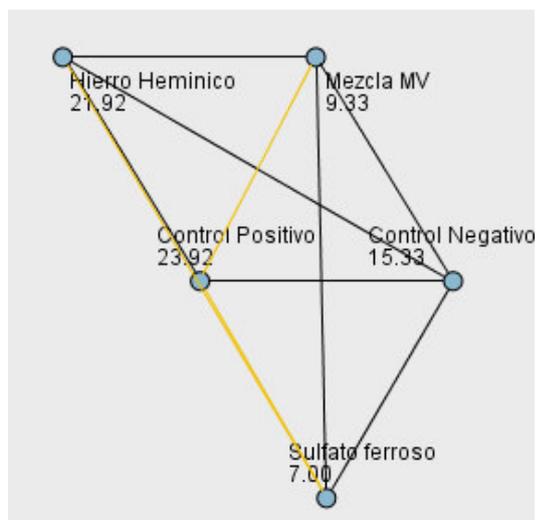
## Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes

<b>Total N</b>	30
<b>Test Statistic</b>	17.216
<b>Degrees of Freedom</b>	4
<b>Asymptotic Sig. (2-sided test)</b>	.002

Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.

## ANEXO 7

## Comparaciones por pareja de grupos



Cada nodo muestra el rango promedio de muestra de grupo

Sample1-Sample2	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	Adj.Sig.
Sulfato ferroso-Mezcla MV	2.333	5.082	.459	.646	1.000
Sulfato ferroso-Control Negativo	8.333	5.082	1.640	.101	1.000
Sulfato ferroso-Hierro Heminico	-14.917	5.082	-2.935	.003	.033
Sulfato ferroso-Control Positivo	16.917	5.082	3.329	.001	.009
Mezcla MV-Control Negativo	6.000	5.082	1.181	.238	1.000
Mezcla MV-Hierro Heminico	-12.583	5.082	-2.476	.013	.133
Mezcla MV-Control Positivo	14.583	5.082	2.870	.004	.041
Control Negativo-Hierro Heminico	-6.583	5.082	-1.295	.195	1.000
Control Negativo-Control Positivo	-8.583	5.082	-1.689	.091	.912
Hierro Heminico-Control Positivo	2.000	5.082	.394	.694	1.000

Cada fila prueba la hipótesis nula de que las distribuciones de la muestra 1 y la muestra 2 son iguales. Se muestran las significaciones asintóticas (pruebas bilaterales). El nivel de significación es 0,05