

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

UNIDAD DE POSGRADO

**“EFECTOS DE LA DEFICIENCIA AISLADA Y
SIMULTÁNEA DE HIERRO Y COBRE SOBRE
LA ACTIVIDAD DE LA CITOCROMO C
OXIDASA DEL MUSCULO ESQUELETICO
EN RATAS”**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Nutrición

AUTOR

Iannacone Silva, Eleana Pilar

ASESOR

Luzmila Troncoso Corzo

Lima – Perú

2014

Esta tesis se ejecutó en el “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

JURADO INFORMANTE

Dr. Emilio Guija Poma	(Presidente)
Dra. Mercedes Soberón Lozano	(Miembro)
Dra. Luzmila Troncoso Corzo	(Asesora)

JURADO EXAMINADOR

Dr. Emilio Guija Poma	(Presidente)
Dra. Mercedes Soberón Lozano	(Miembro)
Dra. Elydia Mujica Alban	(Miembro)
Dr. Sergio Ronceros Medrano	(Miembro)
Dra. Luzmila Troncoso Corzo	(Asesora)

AGRADECIMIENTOS

A mi Madre, **VIRGINIA SILVA JARA** por su colaboración económica directa en la implementación de esta investigación y en el cuidado de mi hija.

A mi Asesora de Tesis, Doctora **LUZMILA TRONCOSO CORZO** quien con mucha dedicación me ha enseñado, orientado y acompañado en todo momento.

A **LABORATORIOS ROCHE**, a través del Ingeniero **RICARDO FOSSA** quien ha contribuido en la implementación de la dieta de la presente investigación.

DEDICATORIA

A mis padres, FELIPE y VIRGINIA

A mi hija, ISABEL ANGELLA

A mis hermanos: Felipe, Katuska, Cristóbal (+), José, Marlene, Zulema y
Laura

ÍNDICE GENERAL

Jurado	iii
Agradecimientos	iv
Dedicatoria	v
Índice General	vi
Lista de Tablas y Figuras	vii
Resumen	ix
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Situación Problemática	1
1.2 Formulación del Problema	5
1.3 Justificación	5
1.4 Objetivos	11
CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO	12
2.1 Marco Filosófico o epistemológico de la investigación	12
2.2 Antecedentes de investigación	13
2.3 Bases Teóricas.....	16
CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA	44
CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
4.1. Resultados.....	50
4.2. Discusión	57
4.3. Hipótesis.....	64
4.4. Prueba de Hipótesis	64
CONCLUSIONES	65
RECOMENDACIONES.....	66
REFERENCIAS BILIOGRÁFICAS	67

LISTA DE TABLAS

TABLA N° 1: Medianas de la actividad enzimática de la citocromo c oxidasa de músculo esquelético de ratas según tipo de dieta.

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO N° 1: Medianas de actividad enzimática de la citocromo c oxidasa en músculo esquelético de ratas alimentadas con dieta control y deficiente de hierro.

GRÁFICO N° 2: Medianas de actividad enzimática de la citocromo c oxidasa en músculo esquelético de ratas alimentadas con dieta control y deficiente de cobre.

GRÁFICO N° 3: Medianas de actividad enzimática de la citocromo c oxidasa en músculo esquelético de ratas alimentadas con dieta control y deficiente de hierro y cobre.

GRÁFICO N° 4: Medianas de actividad enzimática de la citocromo c oxidasa en músculo esquelético de ratas alimentadas con dieta deficiente de hierro y deficiente de cobre.

GRÁFICO N° 5: Medianas de actividad enzimática de la citocromo c oxidasa en músculo esquelético de ratas alimentadas con dieta deficiente de hierro y dieta deficiente en hierro y cobre.

GRÁFICO N° 6: Medianas de actividad enzimática de la citocromo c oxidasa en músculo esquelético de ratas alimentadas con dieta de cobre y dieta deficiente de hierro y cobre.

GRÁFICO N° 7: Actividad enzimática y porcentaje de inhibición de la citocromo c oxidasa en músculo esquelético de ratas alimentadas con dietas control, deficiente en hierro, deficiente en cobre, y simultánea de hierro y cobre.

LISTA DE ESQUEMAS, FIGURAS y FOTOS

ESQUEMA N° 1: Metabolismo del hierro

ESQUEMA N° 2: Mecanismos potenciales por los cuales el cobre puede alterar la absorción intestinal de hierro

FIGURA N° 1: Modelo del monómero de la citocromo c oxidasa y el citocromo c, y sus centros redox, en el interior de la membrana mitocondrial.

FIGURA N° 2: El mecanismo de la reducción del dioxígeno en la citocromo c oxidasa.

FIGURA N° 3: Modelo de localización de los centros metálicos activos en la citocromo c oxidasa

FIGURA N° 4: Modelo esquemático de ligandos de los grupos prostéticos en la citocromo c oxidasa y las distancias entre los grupos heme y los átomos de cobre.

ANEXOS

DIETAS

DOSAJE DE HIERRO Y COBRE DE DIETA PARA RATAS POR GRUPOS

RESUMEN

El hierro y el Cobre son dos micronutrientes necesarios para la generación de energía en nuestro organismo y los encontramos como componentes estructurales y funcionales de la citocromo c oxidasa, ubicada en la membrana interna de la mitocondria, sitio de producción de adenosintrifosfato para la actividad del músculo esquelético. **Objetivo:** Demostrar que la deficiencia simultánea de hierro y cobre disminuye la actividad de la citocromo c oxidasa del músculo esquelético en ratas. **Diseño de investigación:** Analítico, Experimental, prospectivo de causa - efecto, transversal. **Metodología:** Se utilizaron ratas de la raza Holtzman, machos de 21 días de edad, destetadas, las cuales fueron distribuidas en forma aleatoria en 4 grupos de 7 animales cada uno según las características de la dieta: grupo control (valores de hierro y cobre, 50mg/kg de dieta y 6 mg/kg de dieta, respectivamente), grupo deficiente de hierro (valor de hierro fue de 6mg/kg de dieta), grupo deficiente de cobre (valor de cobre fue de 1 mg/kg de dieta) y grupo deficiente en hierro y cobre (valores de hierro y cobre, 6 mg/kg de dieta y 1mg/kg de dieta, respectivamente) por 8 semanas, al término de este período los animales, previo ayuno de 14 horas, fueron anestesiadas con cloroformo. La sangre se extrajo por punción cardíaca y se procedió a la extracción del músculo cuádriceps de la extremidad posterior para proceder al homogenizado y así obtener la fracción mitocondrial, y realizar la medición de la actividad de la citocromo c oxidasa, que fue estudiada midiendo la disminución en la densidad óptica a 550nm del citocromo c reducido a medida que es oxidado por la enzima siguiendo el método de Prohaska y Wells. **Análisis estadístico:** Se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis, luego para la comparación de medianas se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney, para el procesamiento de datos se usó el programa SPSS v. 12.0 **Resultados:** Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en la actividad de la citocromo c oxidasa de músculo esquelético de ratas entre los grupos con dieta control comparado con la dieta deficiente en cobre ($p = 0,006$), los grupos con dieta control comparado con la dieta con deficiencia simultánea de hierro y cobre ($p = 0,006$), los grupos con dieta deficiente en hierro comparado con la dieta deficiente de cobre ($p = 0,009$) y, los grupos con dieta deficiente de hierro comparado con la dieta con deficiencia simultánea de hierro y cobre ($p = 0,013$). **Conclusión:** La actividad de la citocromo c oxidasa disminuye significativamente en la deficiencia simultánea de hierro y cobre seguida de la deficiencia de cobre.

Palabras clave: hierro, cobre, citocromo c oxidasa, músculo esquelético.

SUMMARY

Iron and copper are two micronutrients necessary for the generation of energy in our body and are found as structural and functional components of cytochrome c oxidase, located in the inner membrane of mitochondria, adenosine triphosphate production site to active skeletal muscle. **Objective:** Demonstrate isolate and simultaneous iron and copper deficiency diets decrease cytochrome c oxidase activity in skeletal muscle of rats. **Research Design:** Analytical, experimental, transversal and prospective. **Methodology:** Male Holtzman rats, 21 days of age, were used and randomly assigned in 4 groups of 7 animals to a control diet (containing 50mg of iron/kg of diet and 6mg of copper/kg of diet), an iron-deficient diet (containing 6mg of iron/kg of diet), a copper-deficient diet (1mg of copper/kg of diet), or an iron and copper deficient diet (containing 6mg of iron/kg of diet and 1mg of copper/kg of diet), respectively. The rats were fed for eight weeks, after a 14 hours fast, were anesthetized with chloroform. The blood samples were taken by cardiac puncture, and quadriceps muscles were dissected out for measurement of cytochrome c oxidase activity. Muscle homogenates were prepared in order to isolate mitochondria by differential centrifugation and then the cytochrome c oxidase activity was assayed by measuring the decrease in optical density at 550 nm of reduced cytochrome c as it is oxidized by the enzyme following the method of Prohaska and Wells. **Statistical analysis:** The Kruskal-Wallis test was applied, then nonparametric Mann-Whitney test was used to compare medians. Program SPSS v 12.0 was used for data processing. **Results:** Statistically significant differences ($p < 0.05$) in the cytochrome c oxidase activity of skeletal muscle were found, between the control diet group compared with copper deficient diet group ($p = 0.006$), control diet group compared with simultaneous iron and copper deficiency diet ($p = 0.006$), iron deficient diet group compared with copper deficient diet group ($p = 0.009$), and iron deficient diet group compared with simultaneous iron and copper deficient diet group ($p = 0.013$). **Conclusion:** The cytochrome c oxidase activity decreased significantly in skeletal muscle of rats fed with simultaneous iron and copper deficient diet and copper-deficient diet.

Key words: Iron, Copper, Cytochrome c oxidase, skeletal muscle.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Situación Problemática

En casi todo el mundo, y en particular en América Latina, la prevalencia de desnutrición aguda muestra un continuado descenso, sin embargo la desnutrición crónica es altamente prevalente, caracterizada por baja talla, que afecta a millones de nuestros niños. A la vez se acumulan indicios de la elevada prevalencia de deficiencia de micronutrientes tales como el hierro, que afectan a niños desnutridos y a otros aparentemente sanos, configurando lo que se ha dado en llamar desnutrición oculta. De todas las deficiencias de micronutrientes, la de hierro ocupa un lugar preeminente por la cantidad de personas afectadas y por las consecuencias funcionales que produce.

La deficiencia de hierro afecta el desarrollo intelectual de los niños más pequeños, su inmunidad y su actividad física. En las embarazadas significa un riesgo para la madre y el niño. En los adultos puede afectar su resistencia al esfuerzo físico, su productividad laboral y por ende el sustento familiar. Las consecuencias de la deficiencia de hierro a nivel familiar se multiplican al afectar la educabilidad de los niños, hacerlos más proclives a padecer infecciones, a recibir inadecuado cuidado materno por parte de madres con limitaciones físicas y emocionales, y obstaculizar el progreso económico de la familia (O'Donnell, Viteri & Carmuega, 1971).

La deficiencia de cobre ha sido menos estudiada, pero sin embargo, se han delimitado efectos muy parecidos a la del hierro, ya que también produce anemia con las repercusiones clínicas ya mencionadas, retardo del crecimiento, neutropenia, pancitopenia, por lo tanto proclividad a las infecciones (Cohen, Keen, Hurley & Lönnnerdal, 1985) (Evans & Abraham, 1973)(Prohaska,1984).

El estado nutricional de la población peruana ha sido evaluado mediante indicadores antropométricos, bioquímicos y de consumo. Los principales problemas nutricionales en el Perú son el déficit de talla para la edad en menores de cinco años y la deficiencia de micronutrientes (hierro, vitamina A, yodo) que afecta a vastos sectores del país. La anemia por deficiencia de hierro es uno de los principales problemas nutricionales del país. La edad, sexo y el estado fisiológico (crecimiento rápido en los dos primeros años de vida, embarazo, lactancia, adolescencia) son sus más importantes determinantes. En 1975 la Encuesta Nacional del Poblador Peruano (ENPPE) mostró que en la Costa existía un alto porcentaje de madre nodrizas (64-75%) con anemia, mientras que en niños en edad preescolar y escolar los porcentajes fueron más bajos; 32-43% y 20-30%, respectivamente. Entre los años 1975 a 1996 se han realizado varios estudios que han documentado la anemia como problema nutricional en distintos grupos de población. Después de dos décadas, la alta prevalencia de anemia por deficiencia de hierro, ha sido corroborada en ENDES III (1996) en una muestra representativa a nivel nacional encontrándose que el 56% de niños menores de cinco años y 35% de mujeres en edad fértil presentan algún grado de anemia. En otras palabras 4 de cada 10 mujeres sufren algún grado de anemia, elevándose a 6 de cada 10 niños menores de cinco años. Esta situación es más alarmante en los menores de dos años donde 80% de los niños tienen anemia. Este problema afecta a todas las regiones del país. En 1997, un estudio del CENAN demostró que la prevalencia de anemia en niños menores de cinco años era 43.4% mientras que en las mujeres en edad fértil era del orden de 37.7% (Perfil Nutricional de País: Perú, 1999). Según ENDES Continua 2005, el 46% de niños menores de 5 años padece de anemia (20% anemia moderadas, 25% anemia leve y el 1% anemia severa), proporción que es menor en 4 puntos porcentuales a la observada en el año 2000. La anemia se presenta desde temprana edad: afecta al 69% de los niños de 6-9 meses y alcanza mayor frecuencia entre los niños de 10-11 meses de edad (83%), otros estudios reportaron 59% y 72%, respectivamente (Hicks et al, 2006). Posteriormente disminuye gradualmente hasta alcanzar un nivel de 28% entre los niños de 48-59 meses de edad. Casi 3 de cada 10 mujeres de 15 a 49 años de edad

padece de algún grado de anemia (29%), proporción que es siete puntos porcentuales menos a la observada en 1996 (36%) y tres puntos porcentuales menos que el 2000 (32%). Según el ENDES Continua 2005, la mayor parte de la anemia de mujeres en edad fértil es leve, pues apenas el 4% es afectado por anemia moderada y la anemia severa afecta a menos del uno por ciento de las mujeres. (ENDES Continua 2005. Instituto Nacional de Estadística e Informática) (Céspedes, Dávila, Fort, Ulloa, & Castro, 2006).

La anemia constituye uno de los problemas nutricionales de mayor prevalencia en nuestro país, las consecuencias clínicas están bien delimitadas: en los niños más pequeños afecta su desarrollo intelectual, su inmunidad y su actividad física. En los niños más grandes afecta su rendimiento académico. En las embarazadas significa un riesgo para la madre y el niño. En los adultos puede afectar su resistencia al esfuerzo físico, su productividad laboral y por ende su sustento familiar. La anemia nutricional tiene diferentes causas, siendo la deficiencia de hierro la más importante, sin descartar otras deficiencias como son la de cobre, la vitamina B12 y la vitamina B6.

El cobre también promueve la formación de glóbulos rojos normales. Ayuda a convertir el hierro a su forma férrica – el tipo más útil de hierro – y también ayuda a transportar hierro hacia y desde los tejidos. La deficiencia de cobre puede causar anemia y sobrecarga de hierro en los tejidos. De hecho, la anemia es una de las manifestaciones clínicas más comunes de deficiencia de cobre. La Organización Mundial de la Salud estima que el límite inferior del rango aceptable de ingesta oral diaria para el cobre es de 20 mg/kg de peso corporal para los adultos y cerca de 50 mg/kg de peso corporal para lactantes. Para un adulto saludable normal (que pesa entre 50 y 70 kg), esto equivale a 1,0 a 1,4 mg/día. (Acerca del Cobre: Principales usos del Cobre en la Salud)

En el estudio de Cordano (1998) en Perú, caracterizaron los signos clínicos clásicos de la deficiencia de Cobre en la década de 1960: hipocupremia,

ceruloplasmina baja, neutropenia; anemia (hipocromía con varios grados de anisocitosis), con la médula ósea que muestra signos de detención de la maduración de la serie mieloide; algunos vacuolización citoplasmática y en algunos casos los primeros cambios megaloblásticos; y lesiones óseas que incluyen la deformación de la metafisis con la formación de espolón, osteoporosis y fractura de huesos largos. Encontró que cuarenta y cuatro de los 62 recién nacidos admitidos en el Hospital Británico Américo en Lima, se estimaron deficientes en cobre con signos de deficiencia de cobre cuando se consume dieta baja en cobre como la que se basa en una fórmula de leche de vaca. El pico de incidencia estuvo entre los 7-9 meses de edad; bebés menores aparentemente estaban protegidos por sus almacenes prenatales de cobre. La mayoría de los bebés con deficiencia de cobre experimentaron remisiones espontáneas cuando eran cambiados a otras dietas con suplementos de minerales. Aquellos que permanecieron deficientes en cobre, fueron tratados prontamente con cobre, añadiendo 2,5 mg de cobre por día a la leche de vaca modificada. Aún en nuestro país se sigue utilizando la leche de vaca para alimentar a los lactantes.

En esta oportunidad se estudiará en forma comparativa los efectos de la deficiencia aislada y simultánea tanto del hierro como del cobre, sobre la actividad de la citocromo c oxidasa del músculo esquelético, enzima relacionada con la generación de energía. Energía química necesaria para la contracción muscular y por ende importante en el desempeño del trabajo físico de deportistas, atletas, agricultores, estibadores y trabajadores de construcción civil (O'Donnell et al. 1997). Además, importante en el desarrollo de la actividad espontánea (área motora gruesa) del niño en crecimiento (Shafer&Bunn, 1986).

1.2 Formulación del Problema

¿La deficiencia aislada y simultánea de hierro y cobre disminuye la actividad de la citocromo c oxidasa en el músculo esquelético en ratas?

1.3 Justificación

El hierro y el cobre son nutrientes esenciales para todos los organismos vivientes y el primero es el que posee la historia más larga y mejor descrita. En la composición química de los seres vivos intervienen los mismos elementos químicos que forman el soporte físico en que viven, sea éste la tierra o el agua. La materia orgánica que constituye una característica de aquellos ha surgido a lo largo de la evolución química, previa a la evolución biológica, en la que se han escogido solamente unos pocos elementos químicos, los más ligeros, de forma que el carbono, el hidrógeno, el oxígeno y el nitrógeno ya forman el 96% de la composición de la materia viva. Cuando con estos cuatro elementos mayoritarios se incluyen otros elementos como el fósforo, cloro, calcio, magnesio, sodio, azufre y potasio se tienen el 99.9% de la composición de los seres vivos. El 0.1% restante comprenden los elementos químicos que entran, pues, en muy pequeña concentración y que, no obstante, son totalmente necesarios para el desarrollo del proceso vital. Son los llamados elementos traza o microelementos, en su mayoría metales de transición (hierro, cobre, zinc, manganeso, molibdeno, cromo, cobalto), de los cuales el hierro es el de mayor concentración. El humano contiene aproximadamente 4 gr de hierro(O'Donnell et al. 1997) y 80 mg de cobre(Cohen et al. 1985).

Actualmente se conocen las manifestaciones físicas de la deficiencia franca de hierro como son la glositis, estomatitis angular, coiloniquia (uñas en cuchara), esclerótica azul, síndrome de Plummer-Wilson y anemia. Produce la alteración en el comportamiento denominada pica. Las manifestaciones fisiológicas de la deficiencia de hierro han sido notadas también en la función inmune, el desempeño cognitivo, el funcionamiento termorregulatorio, el metabolismo energético, el desempeño en el trabajo y en el ejercicio(Cohen et al. 1985).

Entre las consecuencias funcionales de la deficiencia de hierro en tejidos tenemos: la disminución en el contenido muscular de mioglobina, de la actividad de la citocromo c oxidasa y del transporte de electrones(Evans

&Abraham, 1973). Varias de las consecuencias más conocidas de la deficiencia que ocurre luego de la depleción de las reservas de hierro, son: la disminución de los siguientes parámetros: la concentración de hemoglobina, la concentración corpuscular media de hemoglobina, el tamaño y volumen de las células rojas nuevas, la concentración de mioglobina, y las cantidades de citocromos y proteínas ferro-sulfuradas. Estos últimos tienen como consecuencia la disminución de la capacidad aeróbica del músculo esquelético, lo que clínicamente se traduce en una menor capacidad para el trabajo, debilidad y fatiga (Prohaska, 1984).

La condición de elemento esencial del cobre en la nutrición se demostró claramente por vez primera cuando se observó que era necesario, junto con el hierro, para evitar el desarrollo de anemia en las ratas (Cohen et al. 1985). Con el descubrimiento de que la deficiencia nutricional daba lugar a una disminución de la actividad catalítica de la citocromo c oxidasa en el hígado de la rata comenzaron a conocerse las funciones catalíticas del cobre (Cohen et al. 1973).

Tanto el hierro como el cobre son necesarios para la actividad catalítica de la citocromo c oxidasa, que han sido estudiados por separado en varias investigaciones que se han realizado en músculo esquelético de ratas. Finch y colaboradores en 1976 demostraron que el contenido de la citocromo c oxidasa en ratas deficientes en hierro estaba disminuida en el músculo esquelético (Acerca del Cobre: Principales usos del Cobre en la Salud). Perkkio y colaboradores demostraron en 1985 que el contenido de citocromo c oxidasa de las fibras musculares rojas rápidas, rojas lentas y blancas rápidas estaba disminuido en ratas deficientes en hierro (Shafer & Bunn, 1986). Cartier y colaboradores demostraron una disminución en 50% de la actividad de la citocromo c oxidasa en los músculos de ratas deficientes en hierro (Planas, 1990). Prohaska en 1983 produjo disminución de la actividad de la citocromo c oxidasa en ratones deficientes en cobre tanto dietario como genéticamente (Dallman, 1993). Por lo tanto, se han realizado estudios científicos de los efectos de hierro y el cobre sobre la actividad enzimática en forma separada, y que corroboran que la deficiencia de cada uno de estos

elementos disminuyen la actividad de la citocromo c oxidasa en el músculo esquelético, que explicarían la disminución en la capacidad para el desarrollo del trabajo físico. Sin embargo, no se han visto los efectos de la deficiencia simultánea sobre su actividad, por lo que consideramos que es importante investigarlo, con los beneficios de un mejor entendimiento del comportamiento de la enzima y contribuir a la fisiopatología de la anemia.

Teniendo conocimiento que la anemia hipocrómica microcítica es producida no sólo por la deficiencia de hierro, sino también por otro micronutriente como es el cobre, y también la vitamina B6; que los resultados de Graham y Cordano (1976) apoyan el concepto de dos efectos de la deficiencia de cobre en el metabolismo del hierro en los seres humanos. La primera, que se producen temprano, es un efecto adverso en la movilización de hierro. La deficiencia de hierro no tratada que precede o se desarrolla simultáneamente con la deficiencia de cobre se caracteriza por hipocromía. El segundo efecto más tardío de la deficiencia de cobre sobre metabolismo del hierro se refiere a la eritropoyesis inadecuada, incluso en presencia de abundante reserva de hierro. Cuando las reservas de hierro estaban presentes, la anemia respondió rápidamente a la suplementación de cobre solo. Esto ha sido observado como ya se ha mencionado, en lactantes alimentados con leche de vaca. Como sabemos ésta contiene tan sólo 0,1 mg/L de cobre y 0,52 mg/L de hierro (Raunhardt & Bowley, 1996), no cubriendo los requerimientos del lactante. No sólo se tiene esta causa, sino que hay otros factores predisponentes a la deficiencia de cobre, siendo los principales bajo peso al nacer, lactancia materna ausente o muy abreviada, cuadros de diarrea aguda con deshidratación, la desnutrición. Todos estos antecedentes influyen médicamente ante la disminución de las reservas prenatales de cobre, aumento de las pérdidas intestinales, aporte dietético inadecuado y aumento probable de los requerimientos en el caso de la recuperación nutricional. Las manifestaciones clínicas conocidas de la deficiencia de cobre están relacionadas con déficit de los sistemas enzimáticos cuprodependientes: ceruloplasmina, lisiloxidasa, superoxidodismutasa, citocromo c oxidasa. Son principalmente, anemia hipocrómica, resistente a la terapia con hierro y que responde al dar cobre,

neutropenia, leucopenia y alteraciones óseas, que pueden llegar a fracturas patológicas. También podrían existir alteraciones vasculares, retardo del crecimiento, del desarrollo psicomotor, hepatoesplenomegalia, disminución de la pigmentación de la piel, episodios de apnea, hipotonía muscular. Por lo que se debe recomendar en este período la lactancia materna (Raunhardt & Bowley, 1996).

Tanto la deficiencia de hierro como la del cobre tienen en muchos casos repercusiones clínicas similares, como son la anemia microcítica e hipocrómica, proclividad a las infecciones, retardo del crecimiento, deficiencia de la citocromo c oxidasa que lleva a disminución de la capacidad aeróbica del músculo esquelético, con las consecuencias clínicas de debilidad y fatiga. El hierro como el cobre son componentes estructurales de la citocromo c oxidasa y de los cuales dependen sus propiedades catalíticas, relacionadas con la generación de energía, necesaria para las diferentes funciones de nuestro organismo y entre ellas, la contracción muscular, por lo tanto, la actividad física. Cuando hay deficiencia ya sea de hierro o de cobre, la actividad de la citocromo c oxidasa está disminuida, con las repercusiones clínicas de menor desempeño en el trabajo físico.

En el Perú el promedio de duración de la lactancia materna exclusiva es de aproximadamente 2 meses. Este promedio esconde marcadas diferencias regionales ya que la exclusividad de la lactancia es mayor en los sectores rurales de la sierra y menor en las ciudades: en Lima por ejemplo es de tan solo 0.54 meses (Santisteban, 2001). La ingesta adecuada de cobre debe ser de 200 µg diarios para los lactantes de 0 a 6 meses de edad y 220 µg entre los 7 y los 12 meses de edad, hasta 900 µg para los mayores de 18 años (Olivares, Castillo, Arredondo & Uauy, 2003).

La meta de las Naciones Unidas de disminuir a un tercio la prevalencia de la anemia no ha sido alcanzada. La anemia nutricional continúa siendo un problema común en muchos países del mundo, y su erradicación mediante intervenciones efectivas debe ser una prioridad a tener en cuenta. La deficiencia de hierro en edad temprana tiene un significativo efecto negativo

sobre el desarrollo físico e intelectual del niño. Ha habido una intensificación de esfuerzos en varios países y esto ha servido como motivación, en el sentido de que las intervenciones propuestas pueden dar resultados positivos y ser sostenibles. Se ha admitido, sin embargo, que no hay una solución fácil, e incluso las intervenciones efectivas han tenido sus retrocesos (Badham, Zimmermann & Kraemer, 2007)

Los beneficios económicos, al abordar cualquier deficiencia de micronutrientes, vienen tanto de la reducción de costos como del incremento en la productividad. Esto incluye menos mortalidad, reducción de costos en la atención de enfermedades, disminución de la morbilidad, mejora en la productividad y beneficios intergeneracionales a través de una mejor salud. En el caso de la anemia por deficiencia de hierro, la evaluación económica requiere la determinación de los costos por deficiencia de hierro en términos de dólares para determinar las consecuencias en una unidad de medición que es común para otras demandas de recursos públicos (tanto en intervenciones de salud, como en intervenciones fuera del escenario de la salud). Este esquema contrasta parcialmente con el cálculo de la efectividad de un programa en términos de incremento en la expectativa de vida, o años de vida ajustados por discapacidad (AVADs). En los países en vías de desarrollo, la deficiencia de hierro coexiste con carencias de micronutrientes e infecciones. Investigaciones recientes revelan que las carencias de cobre y zinc podrían ser un factor contribuyente en el incremento de infecciones.

A la luz de estos conocimientos, aún el Ministerio de Salud de Perú continuó dando sólo sulfato ferroso hasta hace un año, que se ha permitido usar multimicronutrientes (sprinkles) que contienen 5 ó 14 micronutrientes según su presentación. La anemia por deficiencia de cobre se trata con dosis diarias de 1 mg–2 mg de cobre en forma de sulfato de cobre en adultos y niños pequeños. Las dosis divididas de hasta 9 mg/día son seguras y tolerables en adultos (Badham, Zimmermann, & Kraemer, 2007). Si bien en los últimos años se ha mejorado la normatividad existente del Ministerio de Salud de Perú, que incluye la suplementación con sulfato ferroso para gestantes y niños. En la práctica se ha tenido dificultad para aplicar esta

estrategia de suplementación, por ello se observa una baja cobertura de niños suplementados en el país. Una de las razones es la poca aceptabilidad del sulfato ferroso. Según la norma del MINSA, los niños tienen que tomar tres frascos de sulfato en seis meses. Muchos niños después del primer frasco se resisten a tomar los siguientes, limitando el cumplimiento del esquema de suplementación. El uso de multimicronutrientes es una ventaja, sin embargo estos sobres no contienen cobre, sólo hierro, zinc, Vitamina A, vitamina C y ácido fólico (Unicef, 2009).

La presente investigación científica es un acontecimiento constructor y de enriquecimiento en los procesos y condición del ser humano, de tal manera que contribuirá al entendimiento de su fisiología a partir de dos micronutrientes muy importantes como son el hierro y el cobre en la función específica de la actividad de una enzima de la cadena transportadora de electrones como es la citocromo c oxidasa, complejo IV, que permite la generación de adenosintrifosfato, es decir energía.

1.4 Objetivos

OBJETIVO GENERAL

- Demostrar que la deficiencia aislada y simultánea de hierro y cobre disminuyen la actividad de la citocromo c oxidasa del músculo esquelético.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar la actividad de la citocromo c oxidasa de músculo esquelético en la deficiencia aislada de hierro.
2. Determinar la actividad de la citocromo c oxidasa de músculo esquelético en la deficiencia aislada de cobre.
3. Determinar la actividad de la citocromo c oxidasa del músculo esquelético en la deficiencia simultánea de hierro y cobre.

CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO

2.1 Marco Filosófico o epistemológico de la investigación

En nuestro pensamiento científico se ha demandado el cuestionamiento de un problema la comparación de las actividades de la citocromo c oxidasa tanto en deficiencias aisladas como simultáneas de los micronutrientes en mención. Se ha propuesto una metodología ordenada de acuerdo a investigaciones y hallazgos anteriores, teniendo en cuenta que se cumplan los requisitos que corresponden a la investigación científica. Se ha establecido la correlación correspondiente entre las variables del estudio, que nos han servido para establecer los objetivos, la metodología, realizar el análisis de los resultados y las contribuciones del presente trabajo.

Se han cuidado el establecimiento de las características de un trabajo de investigación en cuanto a su temporalidad, espacialidad, cantidad, cualidad, modalidad y utilidad. El presente trabajo se ha realizado en la instalaciones del Laboratorio de Bioquímica Clínica y Nutricional – Centro de Investigación Bioquímica y Nutrición – Facultad de Medicina – UNMSM, es actual, se ha tenido en cuenta el número de especímenes a estudiar, la rigurosidad de los procedimientos en esta investigación experimental y creemos que tiene utilidad para la vida cotidiana del ser humano.

2.2 Antecedentes de investigación

Lemberg & Barrett(1973) describieron que el cobre y el hierro son constituyentes esenciales de la citocromo c oxidasa. No sólo el cobre es un constituyente esencial de la oxidasa sino que juega un rol en la formación del hemo a, su grupo prostético. La deficiencia de citocromo c oxidasa debido a la carencia de cobre también ha sido encontrada en ratas y en la

Enfermedad de Wilson en el hombre. La deficiencia de hierro causa disminución del contenido de citocromo en la bacteria. La reducción del contenido de hierro del medio de crecimiento inhibió la síntesis de citocromos en el *P. fluorescens*, pero no el crecimiento.

Beutler, E. (1958) realizó un estudio para determinar la concentración de la citocromo c oxidasa en corazón y riñón de ratas con deficiencia de hierro, obtuvo evidencia que la citocromo c oxidasa disminuía aun cuando la hemoglobina no está grandemente disminuida.

Lemberg & Barrett (1973) reportaron en su libro que Fischer y Fink (1925) encontraron que cantidades trazas de cobre estimulaban la formación de porfirina en la levadura y que una consecuencia común de la deficiencia de hierro es la acumulación de coproporfirina o protoporfirina en bacterias. Se estableció la dependencia crítica de la actividad de la citocromo c oxidasa de la levadura y tejidos de mamíferos del contenido de Cobre del medio de crecimiento o la dieta, posteriormente confirmado en estudios en mitocondrias aisladas de hígados de ratas criadas con dietas deficientes de cobre. También reportaron que Keilin y Hartree (1938) llamaron la atención sobre la posibilidad de que el cobre fuera un componente esencial de la oxidasa y Graubard (1941) sobre las bases de la inhibición de la citocromo c oxidasa por los quelantes del cobre también propuso al cobre como un componente de la citocromo c oxidasa. Wainio (1961) anteriormente puso énfasis en el rol esencial del cobre en la citocromo c oxidasa, y su presencia en la apoproteína está ahora bien establecida. La deficiencia de cobre tiene un efecto indirecto sobre la biosíntesis del hemo *a* expresado en la ausencia o disminución de las bandas de absorción de la citocromo *aa3*, observada en levaduras y en mitocondria de hígado de ratas deficientes en cobre, o por análisis directo del hemo *a* en ratas y cerdos deficientes de cobre. Smith (1955) determinó la actividad de la citocromo c oxidasa mediante la tasa de oxidación del citocromo c reducido, el cambio en la densidad óptica fue leído en el espectrofotómetro.

Gubler, Cartwright & Wintrobe (1957), realizaron un estudio sobre la influencia de las deficiencias de hierro y cobre en el contenido de las enzimas en varios tejidos de la especie porcina, así como en el tamaño de varios órganos. Observaron que la deficiencia de cobre producía un incremento del citocromo c en los tejidos deficientes en citocromo c oxidasa, tal como el corazón. La actividad de la citocromo c oxidasa no fue influenciada por la deficiencia de hierro, pero se redujo notablemente en la deficiencia de cobre. El hierro total del tejido se redujo moderadamente y el hierro de la hemoglobina fue marcadamente reducida en la deficiencia de cobre. Hubo una marcada reducción en ambos compartimentos de hierro en la deficiencia de hierro. El Hierro total por kilo de cuerpo peso en los cerdos con deficiencia de cobre no fueron muy diferentes de la de deficiencia de hierro cerdos. En la deficiencia de hierro, por otra parte, un deterioro en la síntesis de todas las cromoproteínas hemina excepto citocromo c oxidasa fue demostrada. Aunque el complejo citocromo c oxidasa contiene hemina en su grupo prostético, la reducción en la actividad de la citocromo c oxidasa en la deficiencia de cobre no puede explicarse sobre esta base. No hubo una reducción en la actividad de la citocromo c oxidasa en la deficiencia de hierro y ninguno en la actividad de citocromo c en la deficiencia de cobre. Los presentes estudios apoyan la sugerencia de que la citocromo c oxidasa es dependiente de cobre para su actividad, pero la clarificación definitiva de este punto tendría que esperar la purificación adicional de la citocromo oxidasa.

Lemberg & Barrett (1973) reportaron en su libro que la citocromo c oxidasa en ratas deficientes en cobre varió de 18% en tejido esquelético, a 34% en mucosa intestinal, corazón 27% de lo normal. En la suplementación de la dieta con cobre, la actividad de la citocromo c oxidasa fue restaurada a la mucosa intestinal en 2-3 días y en hígado y músculo esquelético en 10-15 días pero más lentamente en el músculo cardíaco. La restauración de la actividad de la citocromo c oxidasa pareció estar relacionada a la tasa de síntesis del nuevo material mitocondrial que a la formación de nuevas células

Malmström (1990) en el artículo de revisión sobre la citocromo c oxidasa, así como Azzi & Müller (1990) y Capaldi (1990) describieron que la citocromo c oxidasa era una metaloenzima que contiene el hierro y cobre como componentes estructurales de su unidad funcional de los cuales dependen su actividad catalítica. Se acepta generalmente que la citocromo c oxidasa eucariótica contienen cuatro grupos prostéticos, los dos hemes A y a₃, y dos átomos de cobre (CU A y CU B). Los estudios espectroscópicos indican que el hemo está ligado por dos residuos de His, CUA por dos His y dos Cys, a₃ hemo por un His, y Cu B por tres His. Se han presentado pruebas de que hay tres átomos de Cu por dos hemes en citocromo c oxidasa, sobre la base de análisis de metales por plasma acoplado inductivamente por espectroscopia de emisión atómica

O'Donnell et al. 1997 encontraron que ratas deficientes en hierro tenían menor resistencia al ejercicio, hecho relacionado muy íntimamente con la actividad muscular. La deficiencia de hierro también afecta la capacidad laboral en agricultores, como se observó en el estudio de Viteri y Torun (1974) sobre la deficiencia de hierro y la baja productividad en mujeres cosechadoras de té, que mejoró con la suplementación de hierro.

Finch, Miller, Inamdar, Person, Seiler & Mackler (1976), demostraron que el contenido de la citocromo c oxidasa en ratas deficientes en hierro estaba significativamente disminuida en el músculo esquelético. Perkkio, Jansson, Henderson, Refino, Brooks, & Dallman (1985) demostraron que el contenido de citocromo c oxidasa de las fibras musculares rojas rápidas, rojas lentas y blancas rápidas estaba disminuido en ratas deficientes en hierro. Cartier et al (1986) demostraron una disminución en 50% de la actividad de la citocromo c oxidasa en los músculos de ratas deficientes en hierro.

Prohaska (1983) produjo disminución de la actividad de la citocromo c oxidasa en ratones que recibieron dietas deficientes en cobre en tejidos tales como el riñón, intestino e hígado. Dallman en 1967, realizó un estudio en ratas tratadas con un régimen carente de cobre hasta 2,5-3 meses de edad, las actividades de la citocromo c oxidasa expresada como porcentaje del

control fueron los siguientes: el músculo esquelético (cuadrado lumbar), 18%; corazón, 27%; hígado, 34%; y la mucosa intestinal, el 34%.

Se han realizado estudios científicos de los efectos de hierro y el cobre sobre la actividad enzimática en forma separada, y que corroboran que la deficiencia de cada uno de estos elementos disminuye la actividad de la citocromo c oxidasa en músculo esquelético, que explicarían la disminución en la capacidad para el desarrollo del trabajo físico. Sin embargo, no se han visto los efectos de la deficiencia simultánea sobre su actividad, por lo que consideramos que es importante investigarlo, con los beneficios de un mejor entendimiento del comportamiento de la enzima y contribuir a la fisiopatología de la anemia.

2.3 Bases Teóricas

El hierro y el cobre son nutrientes esenciales para todos los organismos vivos y el primero es el que posee la historia más larga y mejor descrita. En la composición química de los seres vivos intervienen los mismos elementos químicos que forman el soporte físico en que viven, sea éste la tierra o el agua. La materia orgánica que constituye una característica de aquellos ha surgido a lo largo de la evolución química, previa a la evolución biológica, en la que se han escogido solamente unos pocos elementos químicos, los más ligeros, de forma que el carbono, el hidrógeno, el oxígeno y el nitrógeno ya forman el 96% de la composición de la materia viva. Cuando con estos cuatro elementos mayoritarios se incluyen otros elementos como el fósforo, cloro, calcio, magnesio, sodio, azufre y potasio se tienen el 99.9% de la composición de los seres vivos. El 0.1% restante comprenden los elementos químicos que entran, pues, en muy pequeña concentración y que, no obstante, son totalmente necesarios para el desarrollo del proceso vital. Son los llamados elementos traza o microelementos, en su mayoría metales de transición (hierro, cobre, zinc, manganeso, molibdeno, cromo, cobalto), de los cuales el hierro es el de

mayor concentración. El humano contiene aproximadamente 4 gr de hierro y 80 mg de cobre.

Actualmente se conocen las manifestaciones físicas de la deficiencia franca de hierro como son la glositis, estomatitis angular, coiloniquia (uñas en cuchara), esclerótica azul, síndrome de Plummer-Wilson y anemia. Produce la alteración en el comportamiento denominada pica. Las manifestaciones fisiológicas de la deficiencia de hierro han sido notadas también en la función inmune, el desempeño cognitivo, el funcionamiento termorregulatorio, el metabolismo energético, el desempeño en el trabajo y en el ejercicio. Entre las consecuencias funcionales de la deficiencia de hierro en tejidos tenemos: la disminución en el contenido muscular de mioglobina, de la actividad de la citocromo c oxidasa y del transporte de electrones. Varias de las consecuencias más conocidas de la deficiencia que ocurre luego de la depleción de las reservas de hierro, son: la disminución de los siguientes parámetros: la concentración de hemoglobina, la concentración corpuscular media de hemoglobina, el tamaño y volumen de las células rojas nuevas, la concentración de mioglobina, y las cantidades de citocromos y proteínas ferro-sulfuradas. Estos últimos tienen como consecuencia la disminución de la capacidad aeróbica del músculo esquelético, lo que clínicamente se traduce en una menor capacidad para el trabajo, debilidad y fatiga.

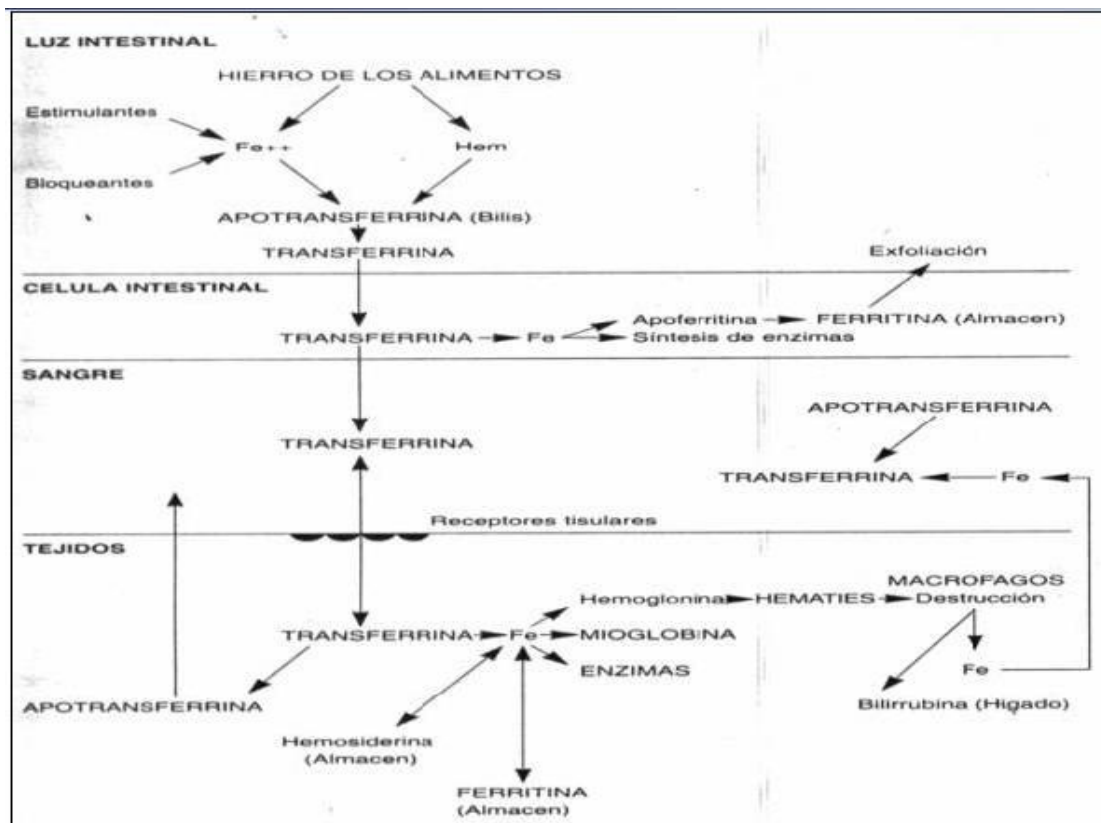
La condición de elemento esencial del cobre en la nutrición se demostró claramente por vez primera cuando se observó que era necesario, junto con el hierro, para evitar el desarrollo de anemia en las ratas. Con el descubrimiento de que la deficiencia nutricional daba lugar a una disminución de la actividad catalítica de la citocromo c oxidasa en el hígado de la rata comenzaron a conocerse las funciones catalíticas del cobre.

Es muy conocida la importancia de los minerales en las diferentes funciones celulares y de los tejidos. Estos minerales – como se ha mencionado, participan en las diferentes funciones celulares como son el crecimiento y reproducción, secreción y excreción, absorción, contractilidad, conductibilidad y respiración. Esta última, esencial para la vida y relacionada con la producción de energía, bióxido de carbono y agua. En ella están

implicados diferentes sustratos y enzimas de la cadena respiratoria (cadena de transporte de electrones), cuya enzima terminal es la citocromo c oxidasa, relacionada con el tercer sitio de producción de ATP y bomba de protones. La actividad de esta enzima está relacionada a sus componentes estructurales, dentro de los que figuran el hierro y el cobre, que como hemos mencionado son oligoelementos esenciales.

El proceso de absorción de hierro puede ser dividido en tres etapas: 1) Captación de hierro, 2) transporte intraenterocítico, y 3) almacenamiento y transporte extraenterocítico (Esquema N°1). Durante la fase intestinal de la digestión, el hierro se enlaza a sitios específicos de la membrana de la mucosa, es internalizado y es, luego, retenido en la célula de la mucosa o transportado a la membrana basolateral, donde se une a la transferrina plasmática. El proceso de absorción de hierro está controlado por factores intraluminales, mucosales y somáticos. Una multitud de factores intraluminales afectan la cantidad de hierro disponible para absorción, bien sea como inhibidores o promotores. Factores mucosales incluyen la extensión de la superficie de la mucosa y la motilidad intestinal. Los factores somáticos que influyen en la absorción de hierro incluyen la eritropoyesis y la hipoxia.

ESQUEMA N° 1: METABOLISMO DEL HIERRO



Dallman, P. Hierro. (1993). **Conocimientos Actuales sobre Nutrición.** (Sexta edición), International LifeSciencesInstitute ILSI Press. Organización Panamericana de la Salud. Publicación científica N° 532. 277-288.

El hierro no se absorbe en la boca, el esófago o el estómago. Sin embargo, el estómago que secreta ácido clorhídrico, ayuda a remover el hierro enlazado a la proteína por medio de la desnaturalización protéica y a solubilizar el hierro, reduciéndolo del estado férrico al ferroso. La reducción del hierro férrico es necesaria, dado que la mayoría del hierro en la dieta se encuentra en la relativamente insoluble forma férrica que es escasamente absorbida. Las células de los conductos pancreáticos secretan bicarbonato, el cual, al aumentar el pH del lumen tiene el potencial de disminuir la absorción de hierro. Este efecto es contrabalanceado por las proteasas pancreáticas que liberan hierro no-hemo del contenido intestinal.

La mayor parte de la absorción de hierro tiene lugar en el duodeno y el yeyuno superior. Los factores que aumentan el tránsito intestinal a través de estas áreas disminuyen la absorción de hierro. Una multitud de factores

dietéticos afectan la absorción de hierro durante esta fase de la digestión. El hierro hemo parece estar afectado solamente por proteínas vegetales, que facilitan su absorción, y calcio que la inhibe. En contraste con el hierro hemo, un gran número de factores afectan la absorción del hierro no-hemo. Los factores intraluminales extrínsecos que disminuyen la absorción de hierro incluyen el salvado, la hemicelulosa, la celulosa, la pectina, el ácido fítico, que se encuentra en el trigo y los productos de soya, y los compuestos polifenólicos. La absorción de hierro también resulta alterada por interacciones con otros iones metálicos o minerales. Generalmente, cantidades muy altas de cationes divalentes en la dieta inhiben la absorción de hierro.

La ruta completa de la absorción del hierro es mayormente desconocida, sin embargo se pueden dar algunos alcances: a concentraciones fisiológicas, la entrada de hierro está mediada por una serie de receptores y proteínas enlazadoras. A concentraciones más altas, el hierro pareciera ser absorbido pasivamente vía una ruta paracelular. Durante la fase intestinal de la digestión, el hierro está presente en la luz como hierro hemo o como quelados de hierro no-hemo. El hierro hemo es directamente tomado por el enterocito y, después de la acción enzimática, es procesado en una forma análoga al hierro no-hemo. El hierro no-hemo es transferido a proteínas enlazadoras en la luz. En la superficie luminal del enterocito existen transportadores específicos para el hierro no-hemo. El hierro no-hemo es transportado al interior del enterocito donde es enlazado a una (o diferentes) proteína fijadora de hierro. Este hierro es transferido a la ferritina o transportado a la superficie basolateral del enterocito. Dada la observación de una absorción aumentada de hierro cuando existen depósitos bajos de hierro, y una absorción disminuida cuando hay altas reservas del mineral, es tentador especular que existe una regulación genética de ambos, los receptores y las proteínas fijadoras. Esta regulación pareciera ser ejercida a través de la membrana basolateral en una forma que se corresponde con las reservas corporales totales de hierro. Este hierro intraenterocítico es luego, o bien perdido cuando la célula es descamada, o enlazado a transferrina en la circulación.

El hierro hemo es soluble en medio alcalino, por lo tanto no son necesarias proteínas enlazadoras para su absorción luminal. Transportadores específicos para hemo existen en la superficie del enterocito de ratas; sin embargo, las ratas no absorben el hierro hemo tan eficientemente como los humanos. Luego de unirse al receptor, la molécula hemo es internalizada. Después de entrar a la célula, el hemo es degradado a hierro, monóxido de carbono y bilirrubina IXa por la enzima hemooxigenasa. Esta enzima no es inducida por la administración oral de hemoglobina (una fuente de hemo), pero sí por la deficiencia de hierro. Su distribución en el intestino es idéntica a la de las áreas de máxima absorción de hierro hemo. Se piensa que el hierro que es liberado del hemo por la hemooxigenasa, entra al pool común de hierro intracelular del enterocito.

El hierro férrico que ha sido liberado por las proteasas gástricas y pancreáticas es rápidamente oxidado a la forma ferrosa en un medio alcalino, y se volvería insoluble y biológicamente indisponible si no fuera por la presencia de moléculas enlazadoras de hierro intraluminal. Originalmente se propuso que el enterocito, o alguna otra entidad gastrointestinal tal como el estómago o el hígado, sintetizaban transferrina, y que esa transferrina era arrojada hacia la luz intestinal para secuestrar hierro. Esta transferrina, repleta con hierro dietético, era, luego absorbida por el enterocito. La proteína transferrina ha sido detectada dentro de células de la mucosa duodenal, sin embargo, la mayoría de investigadores no han podido detectar RNAm para transferrina en estas células. La mayoría de estudios no han logrado detectar receptores de transferrina en los enterocitos.

La mayoría de las dietas occidentales contienen una mezcla de hierro hemo (que se encuentra exclusivamente en los tejidos de los animales) y hierro no-hemo (que se encuentra extensamente en los cereales y verduras, sino también en la carne). El hierro Hemo representa aproximadamente el 5-10% de la ingesta diaria de Fe en los países industrializados, mientras que en las dietas vegetarianas y en los países en desarrollo la ingesta de hierro hemo es insignificante. La principal forma de Fe en todas las dietas es hierro no

heme. Tanto hierro heme- y no heme son absorbidos en el duodeno (la región proximal del intestino delgado), a través de mecanismos independientes. Los procesos implicados en la captación de hemo no se entienden claramente, pero se piensa que es absorbida intacta a través de un transportador de membrana no determinado. En el interior del enterocito el hierro contenido en el anillo de la hemoporfirina se escinde por la acción de la hemooxigenasa y entra en un fondo común junto con el hierro no-hemo. El hierro no hemo de la dieta está ampliamente presente en su forma menos soluble y no absorbible Fe^{3+} y debe por lo tanto ser reducido a Fe^{2+} antes de que sea biodisponible. Esta reducción se consigue mediante las acciones tanto, por agentes reductores de la dieta (por ejemplo, ácido ascórbico) y la actividad reductora endógena del intestino en la forma de una reductasa férrica duodenal recientemente caracterizada, el citocromo b que reside en la membrana apical de los enterocitos duodenales. El Fe^{2+} generado por estos mecanismos reductores puede ser transportado en la célula por transportador divalente de metales 1 (DMT1), que también está presente en la membrana luminal de los enterocitos duodenales. La captación de Fe^{2+} por este transportador es impulsado por un gradiente de H^+ dirigido hacia el interior. En esta etapa hay dos destinos para el hierro absorbido de la dieta. Si las reservas corporales son adecuadas, el Fe puede ser re-oxidado a Fe^{3+} y almacenado en los enterocitos como ferritina. El Fe almacenado como ferritina se pierde en el lumen intestinal cuando los enterocitos se desprenden en la punta de las vellosidades y puede salir del cuerpo en las heces. Si hay un requerimiento metabólico para el Fe, participará el almacén lábil intracelular y será procesado por un transportador externo de la célula a través de una proteína de exportación de la membrana basolateral conocida como variable IREG1, ferroportina 1 o MTP1. El Fe^{2+} al dejar el enterocito es inmediatamente oxidado a Fe^{3+} por una ferrioxidasa hephaestin, y se carga en la transferrina para su transporte en la sangre. Cada molécula de transferrina tiene la capacidad para llevar dos Fe^{3+} (Sharp, 2004).

El transporte del hierro absorbido a través del enterocito puede que envuelva una proteína similar a la transferrina. Un candidato para estas proteínas

similar a la transferrina es la mobilferrina, una proteína citosólica aislada en mucosa duodenal de rata y humano que puede enlazar hierro. Esta proteína es un homólogo de calreticulina, que también puede enlazar calcio, cobre y zinc. Las propiedades de mobilferrina de enlazar múltiples iones metálicos han sido sugeridas como la explicación para las interacciones en la absorción de estos elementos.

Un buen estado nutricional de hierro aumenta la cantidad de hierro retenida por el enterocito, el hierro que no es transferido al plasma se almacén en la ferritina de las células de la mucosa intestinal y se pierde cuando el enterocito se muere y es, consecuentemente descamado. La menor concentración de RNAm para ferritina en el duodeno de individuos con deficiencia de hierro, y los niveles más altos en sobrecarga de hierro secundaria apoyan el papel de la ferritina de la mucosa como un regulador principal de la absorción de hierro.

Estudios recientes han revelado que la hephaestin exhibe actividad marcada de ferrioxidasa. No está claro si esta actividad de ferrioxidasa representa el principal o el único modo de acción de la hephaestin en la modulación de la absorción de Fe. Las predicciones iniciales son que la hephaestina podría interactuar con el IREG1 en la membrana basolateral para oxidar el Fe, dejando los enterocitos para cargarse en la transferrina. Sin embargo, estudios inmunohistoquímicos recientes han arrojado algunas dudas en esta hipótesis, demostrando que la hephaestin está localizada en gran medida dentro de las estructuras intracelulares (Sharp, 2004).

El hierro absorbido es cedido, e inmediatamente fijado por la transferrina, en la superficie basolateral del enterocito. Se ha propuesto que la ceruloplasmina es la proteína responsable de la oxidación del hierro, necesaria para su enlace a la transferrina en la membrana basolateral. La evidencia para la implicación de la ceruloplasmina en este proceso es mayormente circunstancial. La deficiencia de cobre produce acumulación de hierro en la mucosa y el hígado, disminución en el transporte de hierro a

tejidos periféricos y anemia. La explicación clásica para este tipo de anemia ha sido la falta de actividad ferroxidasa I (ceruloplasmina).

La regulación de la absorción de hierro involucra factores somáticos que señalan al enterocito de la necesidad de absorber hierro. Es claro, entonces, que el estado nutricional de hierro de un individuo está inversamente relacionado con la cantidad de hierro absorbido. Investigaciones recientes han mostrado que la deficiencia de hierro es el inductor somático más potente de la absorción tanto de hierro hemo como de no-hemo. El mecanismo o los mecanismos para esta inducción son mayormente desconocidos. Un posible factor contribuyente es la hemooxigenasa intestinal, que es activada por la deficiencia somática de hierro.

El péptido hepcidina se une a la ferroportina en las membranas de los enterocitos, macrófagos y hepatocitos. El complejo es internalizado y degradado y esto resulta en la disminución de la exportación del hierro a la circulación, y así tenemos un menor nivel de hierro plasmático. La producción de hepcidina está aumentada en la sobrecarga de hierro y disminuida con la deficiencia de hierro. Las proteínas hepáticas como la proteína de la hemocromatosis humana (HFE), el receptor 2 de la transferrina (TfR2), la hemojuvelina (HJV) y la proteína morfogenética del hueso (BPN) son reguladores necesarios para la activación de la síntesis de hepcidina. La proteína reguladora de hierro (IRP) puede unirse a los elementos de respuesta de hierro (IRE) del RNAm de la ferritina y el RNAm de la transferrina y regular la síntesis de la proteína (Borch-Johnsen, Hauge, Hauge & Thorstensen, 2009).

La hemoglobina y la ferritina sérica tienen, aparentemente, papeles limitados en señalar al enterocito acerca de la necesidad de absorber hierro. Se ha sugerido que la ferrotransferrina plasmática internalizada posiblemente permita al enterocito monitorear el estado nutricional de hierro corporal y así, regular absorción de hierro. La exposición a bajas cantidades de ferrotransferrina plasmática señalaría al enterocito para regular

positivamente la entrada de hierro al cuerpo. Los receptores de transferrina sólo se encuentran en la superficie basolateral de los enterocitos. La cantidad de transferrina y de RNAm para transferrina en el enterocito aumenta durante la deficiencia de hierro y disminuye con sobrecarga secundaria de hierro.

El hierro libre, además de oxidarse al estado férrico insoluble en un medio ambiente en oxígeno, tal como el que se da en condiciones fisiológicas, es una sustancia extremadamente tóxica, capaz de catalizar numerosas reacciones nocivas. Cuantitativamente, la molécula más importante en el transporte de hierro es la transferrina. No sólo es responsable de llevar hierro desde la superficie basolateral del enterocito a los tejidos periféricos sino, también, de la redistribución de hierro a los diferentes compartimentos corporales, y de proteger al hierro de la filtración glomerular.

La concentración de hierro en el cuerpo es aproximadamente de 30 a 40 mg/Kg de peso corporal, que varía según la edad y sexo del individuo, y de los órganos y tejidos específicos. Cerca del 85-90% del hierro no almacenado se encuentra en la masa eritroidea. La concentración del depósito corporal de hierro varía de 0 a 15 mg/Kg peso corporal, dependiendo del sexo y el estado nutricional de hierro del individuo. La distribución de este hierro almacenado no es uniforme dado que el hígado contiene cerca del 60% de la ferritina corporal. El 40% se encuentra en tejido muscular y células del sistema reticuloendotelial. Normalmente, 95% del hierro almacenado en tejido hepático se encuentre en los hepatocitos como ferritina. La hemosiderina constituye el restante 5% y se encuentra predominantemente en remanentes lisosomales de las células de Kupffer. Sin embargo, en la sobrecarga de hierro, la masa de hemosiderina en el hígado se acumula a 10 veces la tasa acumulación de la ferritina.

Se ha propuesto que la ceruloplasmina es necesaria para la oxidación del hierro derivado de ferritina y para su posterior adhesión a transferrina. Ratas con deficiencia de cobre acumulan hierro hepático en forma de ferritina. La perfusión de estos animales con sangre que contiene ceruloplasmina

produce una transferencia inmediata del hierro fijado en la ferritina a la transferrina.

Cuando el contenido promedio de hierro en la ferritina se aproxima a los 4000 átomos por molécula en los tejidos que almacenan hierro, la ferritina es degradada por proteasas lisosomales para formar hemosiderina, una proteína almacena el hierro que es insoluble. Mediante este proceso, la cubierta proteica de la ferritina es parcialmente degradada de forma tal que tanto como el 40% de la masa de la hemosiderina está formada por hierro. La descripción del tipo de hierro que está almacenada como hemosiderina depende del origen y las condiciones en que fue obtenida la hemosiderina, e incluyen óxido férrico amorfo, ferridrita, y gotita. Estas formas de hierro son menos reactivas químicamente cuando se las compara a las que se encuentran en la ferritina, y puede que estén menos disponibles para su movilización.

El recambio de hierro está mediado principalmente por la destrucción de eritrocitos senescentes por parte del sistema reticuloendotelial. Los eritrocitos, que contienen cerca del 80% del hierro funcional corporal, tienen una vida media de 120 días en humanos. Al final de su vida funcional, son reconocidos como senescentes por los cambios en la estructura de su membrana y son catabolizados en sitios extravasculares por las células de Kupffer y por macrófagos del bazo. Luego de la fagocitosis, las cadenas de globina de la molécula de hemoglobina resultan desnaturalizadas, liberando el grupo hemo. El hemo libre intracelular es finalmente degradado por la hemooxigenasa, liberando hierro. Cerca del 85% del hierro proveniente de la degradación de hemoglobina es liberado al cuerpo en la forma de hierro unido a la transferrina o ferritina. Un 0,66% del contenido total de hierro es reciclado cada día de esta manera. La degradación de mioglobina y de enzimas contenedoras de hierro aportan contribuciones más pequeñas al recambio de hierro en plasma.

La baja solubilidad del hierro impide que la excreción sea un mecanismo importante en el mantenimiento de la homeostasis de hierro. Así, en

contraste con la mayoría de los minerales traza, cuya homeostasis es mantenida por medio de la excreción, el mecanismo primario para mantener la homeostasis del hierro corporal total es la regulación de la cantidad de hierro absorbida, de manera que se aproxime a las pérdidas. Las pérdidas de hierro varían considerablemente con el sexo del individuo. En varones, las pérdidas totales de hierro corporal han sido calculadas en 1 mg/día y la ruta predominante de pérdida es a través del tracto gastrointestinal, y llega a 0,6 mg/día en varones adultos. Las pérdidas fecales de hierro provienen de los enterocitos que han sido mudados, de eritrocitos extravasados, y de productos biliares de la degradación del hemo que son pobremente absorbidos. Las pérdidas urogenitales e integumentales en varones adultos han sido estimadas en más de 0,1 mg/día y 0,3 mg/día respectivamente.

El movimiento del oxígeno desde el medio hasta las oxidasas terminales es una de las funciones claves de hierro, en la cual, el dioxígeno es enlazado al anillo de porfirina de las moléculas que contienen hierro, bien sea como parte del grupo prostético de la hemoglobina en los eritrocitos, o del facilitador de la difusión del oxígeno en los tejidos, la mioglobina.

Los citocromos contienen hemo como sitio activo, con el anillo Fe-porfirina actuando para reducir el hierro ferroso a férrico con la aceptación de electrones. Las proteínas que contienen hierro-azufre también actúan como transportadoras de electrones vía la acción del hierro enlazado a 2 ó 4 átomos de azufre y la cisteína de las cadenas laterales. Las 40 diferentes proteínas que constituyen la cadena respiratoria contienen 6 diferentes hemoproteínas, 6 centros Fe-S, 2 centros de Cu, y también ubiquinona para conectar el NADH al oxígeno (O'Donnell et al. 1997).

El papel del hierro en el cuerpo está confinado casi exclusivamente al proceso de la respiración celular. Los grupos de hierro-porfirina (grupos hem) son componentes esenciales de la hemoglobina, mioglobina, los citocromos –entre ellos la citocromo c oxidasa, y las enzimas catalasa y peroxidasa. El resto del hierro en el cuerpo (hierro no hem) está casi enlazado en su totalidad a las proteínas. Estas formas incluyen sistemas de

almacenamiento y transporte del mineral, y de flavoproteínas (por ejemplo, NADH deshidrogenasa y succinato deshidrogenasa) y proteínas hierro-azufre de la cadena respiratoria.

En la deficiencia de hierro, existen tres estadios de depleción de hierro. El primer estadio, supone sólo una disminución de los depósitos de hierro (medidos por la disminución de ferritina sérica) sin pérdida de componentes férricos esenciales. Este estadio no se asocia con consecuencias fisiológicas adversas, sino que representa una situación de vulnerabilidad. El riesgo de desarrollo de anemia es bajo debido a la capacidad del organismo para aumentar la absorción de hierro cuando disminuyen sus depósitos del metal. El segundo estadio se caracteriza por cambios bioquímicos que reflejan la falta de hierro suficiente para la producción normal de hemoglobina y de otros compuestos esenciales de hierro y se manifiesta por una disminución de los niveles de saturación de la transferrina y por el aumento de la concentración de protoporfirina eritrocitaria. Como la concentración de hemoglobina no cae aún por debajo del umbral que se considera indicador de anemia, este estadio es considerado como una deficiencia de hierro sin anemia.

El tercer estadio, es la anemia ferropénica franca, que se origina cuando la producción de hemoglobina ha descendido lo suficiente como para dar lugar a una reducción de su concentración (y a menudo del volumen corpuscular medio) (Dallman, 1993).

En la deficiencia de hierro se afecta el desarrollo intelectual, la inmunidad, la actividad física, la resistencia al esfuerzo físico y la productividad laboral (O'Donnell et al. 1997).

Los experimentos en ratas muestran que la deficiencia de hierro produce, además de la anemia, una importante alteración de la producción oxidativa de energía celular en el músculo esquelético (McLane, Fell, McKay, Winder, Brown & Holloszy, 1981). (Davies, Donovan, Refino, Brooks, Packer & Dallman, 1984). Las anemias por deficiencia de hierro son del tipo

microcítica hipocrómica. En experiencias hechas con ratas a las que se les produjo una deficiencia de hierro, se encontró que los valores de citocromo c estaban reducidos aun en ausencia de anemia. Esto sugiere que algunos de los síntomas de la anemia pueden deberse a una menor actividad de las enzimas intracelulares más bien que los valores bajos de hemoglobina.

El contenido de cobre en el organismo humano varía entre 50 y 120 mg. En casi todas las especies, las mayores concentraciones corresponden al hígado, al que sigue de cerca el encéfalo. El hígado humano contiene aproximadamente 15% del cobre orgánico y el encéfalo, aproximadamente 10%. Otros órganos contienen concentraciones menores (16-32 mmol/g de peso fresco), aunque el contenido total del músculo es de casi 40% del total. Parece que el hígado y el bazo actúan como órganos de depósito de cobre y que sus concentraciones en el feto y el lactante son mucho mayores que en el adulto.

El cobre se absorbe en todos los segmentos del tubo digestivo desde el estómago hasta el colon, pero el duodeno es el lugar principal. No se aclaró cuál es el mecanismo exacto de esta absorción, pero en cualquier caso está regulada a nivel de la mucosa intestinal. Se prestó mucha atención a nivel molecular a la metalotioneína, una proteína inducible de bajo peso molecular que posee una elevada afinidad por varios iones minerales. La metalotioneína parece actuar como un regulador más negativo que positivo en la absorción del cobre, pero la mayoría del cobre que se encuentra en el citosol de las células de la mucosa se halla asociado a proteínas de alto peso molecular.

Existen varios factores dietéticos que influyen negativamente sobre la biodisponibilidad del cobre, en especial el zinc, el tiomolibdato, el ácido ascórbico y la fructosa. De todas las interacciones con metales, la de mayor importancia práctica quizás sea el efecto antagónico del zinc sobre la biodisponibilidad del cobre. El exceso de zinc en la dieta agrava los signos de un bajo estado nutricional en cobre. Incluso los aportes diarios recomendados de zinc provocan un aumento de la excreción fecal de cobre

en el hombre adaptado a una baja ingesta de aquel, e inducen un balance negativo de este. La elevada ingesta de ácido ascórbico reduce la biodisponibilidad del cobre y agrava los signos de deficiencia en las especies aviares, dificulta la absorción del cobre en los segmentos intestinales de rata y disminuye las concentraciones de cobre en sangre e hígado de cobayos. El ascorbato no solo afecta la absorción intestinal del cobre, sino también su utilización. Tanto la fructosa como el ácido ascórbico son compuesto fuertemente reductores y pueden convertir el cobre a su estado cuproso, con lo que se impediría su absorción y su utilización.

El Cu liberado del enterocito viaja en la sangre portal, ligado principalmente a la albúmina y la histidina, hacia el hígado. El cobre recién adquirido se dirige rápidamente hacia un número de enzimas Cobre-dependientes a través de la acción de varias proteínas chaperonas intracelulares. Tres de estas chaperonas han sido bien caracterizadas y se conoce que distribuyen el cobre a distintos compartimentos celulares. La chaperona para la superóxidodismutasa 1 entrega cobre para su incorporación en la superóxidodismutasa dependiente de Cu-Zn citoplasmática, un componente esencial de la red de protección antioxidante celular. La ciclooxigenasa 17 transporta Cu específicamente a la mitocondria para su inserción en la enzima integral de membrana, citocromo c oxidasa. En el hígado, una proporción importante 'nueva' de Cu es cargado en la ceruloplasmina (a través de un homólogo humano ATX1 / ATP7B dependiente de proceso) antes de su liberación en la circulación sistémica. Curiosamente, mientras la ceruloplasmina unida al cobre representa alrededor del 95% del total del cobre sérico, parece ser que la ceruloplasmina no es la proteína transportadora de cobre (de la misma manera que la transferrina transporta el hierro) empleada para la entrega de Cu a los tejidos para efectos metabólicos, desde que los pacientes aceruloplasminanémicos (que tienen bajos niveles o ausencia de ceruloplasmina sérica) tienen un contenido tisular de Cu normal (Miyajima et al. 1987; Harris et al. 1998) (Sharp, 2004).

A diferencia del hierro, no hay un almacén fisiológico de cobre y por lo tanto, los niveles corporales son mantenidos por el equilibrio de la absorción de la

dieta, distribución y utilización, con la excreción biliar del exceso de Cu. El hígado es el principal órgano involucrado en la redistribución de Cu a varios tejidos para su incorporación en los cupro-proteínas y enzimas. Además, el hígado también controla la excreción del exceso de Cu en la bilis (Sharp, 2004).

El cobre recién absorbido se une sobre todo a la albúmina sérica. Casi todo este cobre es captado por el hígado y convertido en ceruloplasmina que, a su vez, es liberada hacia la sangre, en la que constituye normalmente 90% de la reserva plasmática del metal. El cobre está fuertemente unido a la ceruloplasmina, mientras que su enlace con la albúmina y con algunos aminoácidos como la histidina es débil. Weis y Linder encontraron evidencia de otra proteína transportadora de cobre a la que denominaron transcupreína. Esta proteína cedería el cobre al hígado, que salía de nuevo como ceruloplasmina.

La ceruloplasmina transporta el cobre desde el hígado hacia el resto de los tejidos donde se sintetizan cuproenzimas como la citocromo c oxidasa, la superóxidodismutasa y la lisil oxidasa. Sin embargo, no se conoce el mecanismo por el que el cobre de la ceruloplasmina pasa a las células. La ceruloplasmina podría penetrar en la célula intacta o bien el Cu^+ podría ser reducido y transferido a una proteína intracelular. Si la ceruloplasmina actúa como donante directo de cobre, deberán existir receptores adecuados en la superficie de las membranas celulares.

Las anemias resultantes de la deficiencia de cobre o hierro tienen características hematológicas notablemente similares, que conduce a la sugerencia de que existe una vía común en la etiología de estas enfermedades. En una primera etapa, se sugirió que el factor común en la progresión de la enfermedad es un proceso catalítico Cu-dependiente. La búsqueda de actividad enzimática sérica estimulada por cobre ha conducido en última instancia, al aislamiento de una proteína con actividad oxidasa multicobre en el suero denominada ceruloplasmina. Se ha demostrado posteriormente que la ceruloplasmina actúa como una ferrioxidasa,

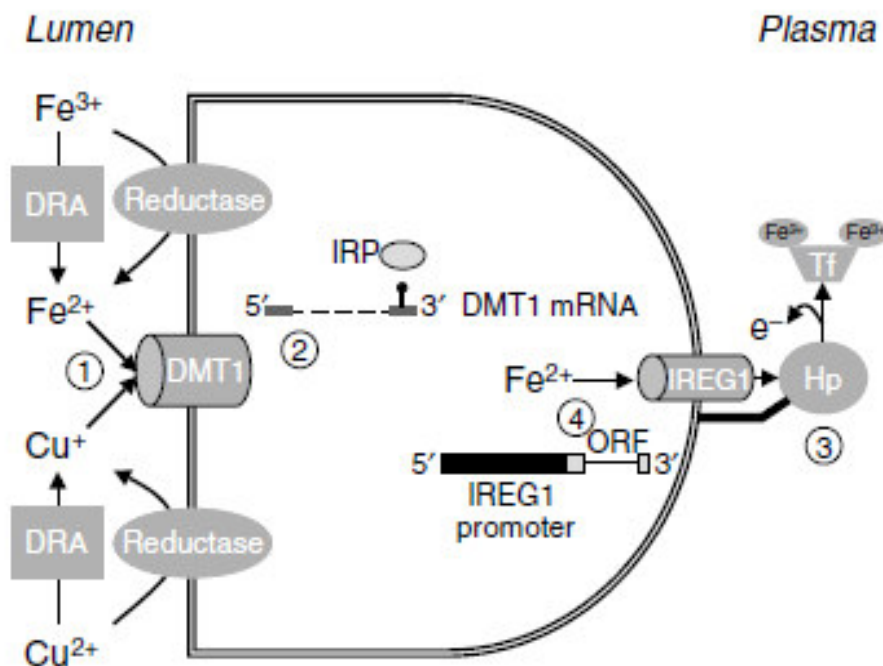
convirtiendo Fe^{2+} a Fe^{3+} , y que incrementa la tasa de carga de hierro a la transferrina. Además, la adición de ceruloplasmina (y apo-transferrina) para preparaciones de hígado perfundidos marcadamente estimula la salida de hierro, lo que sugiere que la ceruloplasmina es un factor crucial para la movilización de hierro del almacén corporal para su utilización metabólica. Más recientemente, el papel clave de la ceruloplasmina en metabolismo del hierro se ha confirmado en estudios sobre pacientes humanos y ratones que muestran la producción ininterrumpida de ceruloplasmina (Sharp, Paul. (2004). 14). El cobre se excreta fundamentalmente por el tubo digestivo y menos de 3% del ingerido aparece en la orina. La bilis contribuye con la mayor proporción al cobre endógeno fecal (O'Donnell et al. 1997).

Nuevas evidencias sugieren que hephaestin no es el único nivel en el que la absorción intestinal de hierro puede ser regulada por el estado del cobre. En ratas con deficiencia de cobre hay una disminución en los niveles de proteína ferritina en enterocitos que conduce a un menor contenido de hierro no hemo en la mucosa. Además, en células Caco-2, un modelo bien establecido de células epiteliales intestinales polarizadas, la inducción de la deficiencia de cobre estimula la captación de hierro a través de la membrana apical. Este hallazgo está en contraste con los de anteriores estudios con animales, que muestran ningún efecto de deficiencia de cobre en el paso de absorción en la absorción de hierro. Curiosamente, cuando la deficiencia de hierro es inducida en Células Caco-2 se incrementa la absorción de cobre y, además, cuando estas células están expuestas a altos niveles de cobre la absorción de hierro se reduce marcadamente, lo que sugiere que la absorción de estos dos metales puede estar estrechamente relacionada. Estudios posteriores han demostrado que existe una competencia directa en la absorción de cobre y hierro a través de la membrana apical. De la evidencia disponible, por lo tanto, parece razonable sugerir que el cobre y hierro de la dieta utilizan una vía común en la captación para entrar en las células epiteliales intestinales. Sin embargo, la naturaleza de este mecanismo de captación común es objeto de cierto debate. Dos posibles mecanismos de transporte de Cu se han identificado en las células intestinales, Ctr1 humana y DMT1, pero los papeles relativos de estas dos proteínas de transporte sobretodo en

el transporte global de cobre no están claras. La absorción y la excreción de cobre están estrechamente reguladas para mantener un contenido de cobre corporal relativamente constante (Sharp, 2004).

En últimos trabajos se destaca la existencia de una competencia entre cobre y hierro para el transporte a través de DMT1. Además, otros estudios que utilizaron la tecnología antisentido para disminuir la expresión de DMT1 endógena en células Caco-2 revelan una disminución concomitante de la captación de hierro y cobre. Si el DMT1 es un transportador de cobre relevante fisiológicamente podría predecirse que su expresión debería ser modificada por la carga de cobre de la dieta. En ratas deficientes de cobre no hay ningún cambio en la expresión de DMT1. Sin embargo, cuando las células Caco-2 son expuestas a niveles altos de cobre, la proteína DMT1 y la expresión del ARNm están notablemente reducidas. Curiosamente, en estos estudios, los efectos del cobre en la expresión del DMT1 se restringen a isoformas que contienen el elemento de Fe-sensible (IRE). Este patrón de expresión es idéntico al observado tras el tratamiento de estas células con Fe (Yamaji et al. 2002), añadiendo peso a la hipótesis de que DMT1 es el principal transportador intestinal tanto para cobre y hierro y, por otra parte, sugiere que la regulación DMT1 por estos metales puede ocurrir a través de un mecanismo común(Sharp, 2004) (Arredondo et al.2003) (Núñez, Olivares & ,2003). Ver Esquema No. 2.

ESQUEMA Nº 2: MECANISMOS POTENCIALES POR LOS CUALES EL COBRE PUEDE ALTERAR LA ABSORCIÓN INTESTINAL DE HIERRO



Hay varios mecanismos potenciales por los cuales el cobre pueden alterar la absorción intestinal de hierro. (1) Los datos recientes sugieren que el cobre y el hierro compiten por la absorción en los enterocitos del duodeno a través del transportador de metal divalente (DMT1). (2) El cobre regula específicamente la expresión del elemento sensible de hierro (IRE) que contienen la isoforma de DMT1, posiblemente mediante la modulación de la actividad mediante la unión al ARN de la proteína citosólica reguladora de hierro (IRP). (3) La salida de hierro de los enterocitos depende de la presencia de hephaestin, un homóloga a la ceruloplasmina que actúa como una multicobreferrioxidasa para facilitar la carga de hierro en la transferrina. (4) la exposición de cobre aumenta la expresión del ARN y la proteína transportadora de salida IREG1 con un aumento concomitante en la exportación de hierro de la célula. La regulación del IREG1 puede ocurrir a nivel del promotor IREG1 a través de interacciones con un factor de transcripción dependiente de cobre aún sin caracterizar. Tf, transferrina; Hp, hephaestin; DRA, agentes reductores de la dieta; ORF, fragmento de lectura abierto. Sharp, Paul. (2004). **The molecular basis of copper and iron interactions.** Proceedings of the Nutrition Society, 63, 563–569.

El cobre desempeña también un papel fundamental en el metabolismo del hierro y, por tanto, en la síntesis de la hemoglobina. En los estados carenciales, el hierro sérico tiende a ser bajo mientras aumentan sus niveles en el hígado y en la mucosa intestinal. Estos datos sugieren fallas en la movilización del hierro. Frieden y Hsieh propusieron que la ferroxidasa circulante (ceruloplasmina), baja en las deficiencias dietéticas y genéticas de cobre, sería el factor limitante de la oxidación del ión ferroso para su transporte por la transferrina (Dallman, 1993) (Sharp, 2004). (Arredondo et al. 2003) (Barisani & Conte, 2002) (Anderson, Frazer, McKie, Wilkins & Vulpe, 2002) (Morgan & Oates, 2002) (Wessling-Resnick, 2006).

El cobre es un constituyente esencial de varias proteínas, metaloenzimas y algunos pigmentos que ocurren en la naturaleza. Es esencial para la síntesis de hemoglobina, para la formación normal del hueso y para el mantenimiento de la mielina en el sistema nervioso. El cobre se encuentra en dos enzimas claves del metabolismo aerobio: la citocromo c oxidasa, que es responsable de la mayor parte (probablemente más del 90%) del oxígeno consumido por la vida en este planeta; y la superóxidodismutasa. La ceruloplasmina, una cuproproteína plasmática, tiene un peso molecular aproximado de 151,000 y contienen 0.34% de cobre o cerca de 8 átomos de cobre por mol. Se cree que funciona como una ferroxidasa durante el metabolismo del hierro. Por lo menos 80% del cobre de los eritrocitos se encuentra como superóxidodismutasa (eritrocupreína). El cobre en el plasma se encuentra en dos formas principales, una firmemente unida y otra laxamente unida. El cobre firmemente unido, que comprende 80-95% del cobre total del plasma, consiste de ceruloplasmina. El cobre laxamente unido se conoce como cobre de "reacción directa" porque reacciona libremente con los reactivos que forman complejos con él (ejemplo la ditizona y el dietilditiocarbamato) y está laxamente unido a las proteínas, probablemente a la seralbúmina. El cobre unido a la albúmina puede representar el cobre en tránsito.

Dentro de los signos de deficiencia de cobre tenemos la hipocupremia, la anemia hipocrómica microcítica, leucopenia y neutropenia. Aunque en la

deficiencia de cobre existe una importante reducción de la actividad de la citocromo c oxidasa, no está claro si dicha actividad supone una limitación al metabolismo. La deficiencia de cobre afecta de manera adversa la forma y función de las mitocondrias. También en la deficiencia de cobre se encontró incremento significativo de algunos elementos, entre ellos el hierro comparados al control (Olubunni, 2005).

La anemia fue el primer signo de deficiencia de cobre que se describió. Además de lo ya descrito, existen pruebas de que su deficiencia acorta la vida media de los hematíes, lo que podría depender de una afectación de las membranas plasmáticas debida a la acumulación de radicales libres ante una escasa actividad de superóxidodismutasa. La fragilidad osmótica disminuye en la deficiencia de cobre y se produce un aumento de la concentración del malondialdehído derivado de los fosfolípidos en las membranas. También aumenta la viscosidad de los hematíes, lo que sugiere la existencia de uniones cruzadas entre los componentes de la membrana. En otro laboratorio se encontró una mayor concentración de una proteína de 170 Kda en la membrana de los eritrocitos de las ratas deficitarias en cobre. Esta gran proteína citoesquelética puede proceder de uniones cruzadas con otras proteínas, debidas a su vez a la presencia de radicales libres de oxígeno. Este proceso podría justificar la menor supervivencia de los hematíes.

El metabolismo de hierro y cobre están estrechamente ligados. Observaciones iniciales fueron hechas en 1927, donde las sales de hierro fallaron para curar la anemia en las ratas, mientras que la administración de cobre en la comida restauró los niveles de hemoglobina. Desde entonces, varios estudios han confirmado la relación. El mecanismo involucrado probablemente está relacionado a la expresión y niveles disminuidos de la ceruloplasmina y la hephaestina, las cuales son oxidasas multicobres requeridas para la salida de hierro (Andersen, Gambling, Holtrop & McArdle, 2007).

En la deficiencia de cobre, la absorción de hierro por las células de la mucosa al parecer no está afectada, pero la liberación de hierro al interior del plasma sí está alterada. La síntesis de ceruloplasmina y, por lo tanto, el movimiento del hierro de las reservas de ferritina al plasma están disminuidos y aparece la hipoferremia. Como consecuencia, la síntesis de hem se deprime y aparece anemia en todas las especies vivientes cuando la deficiencia es intensa y prolongada. Los animales de experimentación con una alimentación deficiente en cobre pierden peso y fallecen mostrando una anemia hipocrómica microcítica intensa que no es la causa de la muerte, ya que una anemia por deficiencia de hierro de iguales proporciones no es mortal. Esto señala que el cobre tiene otras funciones en el cuerpo además de su papel en el metabolismo de los eritrocitos (Cohen et al. 1985) (Dallman, 1993). Estas funciones adicionales están relacionadas con la actividad de las enzimas que contienen cobre como la citocromo c oxidasa y la aminooxidasa. Una baja actividad de citocromo c oxidasa y de aminooxidasa en los corderos deficientes de cobre, al parecer es la lesión metabólica primaria que origina ataxia neonatal. La disminución en la síntesis endógena de ATP resulta de la depresión del metabolismo aerobio que conduce a una inhibición de la síntesis de fosfolípidos requerida para la formación de mielina. Los trastornos cardiovasculares y óseos que surgen en la deficiencia de cobre pueden ser atribuibles a la reducción de la actividad de la amino oxidasas (Dallman, 1993).

En el reporte de la Comisión en Enzimas de 1961, de la Unión de Bioquímica, los citocromos son definidos como hemoproteínas cuya principal función biológica es el transporte de hidrogeno y/o electrones en virtud del cambio de valencia reversible de su hierro hemínico.

La citocromo c oxidasa es una metaloenzima debido a que contiene una cantidad de hierro y cobre que es retenida durante la purificación por ser parte de su estructura misma, también conocida como citocromo aa3, o EC 1.9.3.1. de la nomenclatura internacional, la cual forma la oxidasa terminal de los organismos superiores, animales y plantas, y también de las levaduras, algas y algunas bacterias. Es una enzima de la cadena

respiratoria, sitio III de la formación de ATP y se encuentra en la membrana interna de la mitocondria (Tyler, 1998) (Perfil Nutricional de País: Perú, 1999). La citocromo c oxidasa es un complejo heterooligomérico de aproximadamente 200 KDa, compuesto por 13 subunidades estructurales codificadas tanto por genes mitocondriales y nucleares. Las 3 unidades codificadas mitocondrialmente Cox1, Cox2 y Cox3 constituyen el centro estructural y catalítico de la enzima que incorpora todos los cofactores redox activos. El resto de las subunidades más jóvenes que están asociadas con la superficie del complejo central son codificadas por el genoma nuclear e importada dentro de la mitocondria, y éstas incluyen polipéptidos pequeños que son requeridos para la estabilidad, ensamblaje y regulación de la actividad catalítica de la holoenzima. El heme a y el heme a₃ – Cu B heterobimetálico está localizado en el interior de la Cox1, mientras el Cu A se encuentra en la Cox2, los dos iones Cu I y Cu II del centro Cu A están coordinados por dos puentes de cisteínas. El centro Cu A sirve como aceptor primario de los canales de electrones a través de la cadena respiratoria. Los electrones donados por el citocromo c son rápidamente distribuidos entre el centro Cu A y el heme a, y luego continua al sitio catalítico compuesto de un heme a₃ y un ion Cu B acoplado electrónicamente. Esto asegura la reducción de este sitio catalítico como un prerrequisito para la unión del dioxígeno y la subsecuente formación de agua (Stiburek, Hansikova, Tesarova & Cerna, 2006).

La citocromo c oxidasa es una hemoproteína ampliamente distribuida en muchos tejidos vegetales y animales, cuyo significado biológico trasciende a aquella de la hemoglobina, debido a que es el componente terminal de la cadena de los transportadores respiratorios que se encuentran en las mitocondrias y resulta, por lo tanto, responsable de la reacción por la cual los electrones que provienen de la oxidación de las moléculas del sustrato por las deshidrogenasas son transferidos a su aceptor final, el oxígeno. Se considera que es idéntica a la enzima respiratoria de Warburg por lo que también se la denominó citocromo a₃. Estudios más recientes han demostrado que éste y el citocromo a están combinados con la misma proteína y el complejo se conoce como citocromo aa₃. Contiene dos

moléculas de hem A, teniendo cada una un átomo de Fe, que oscila entre Fe^{3+} y Fe^{2+} durante la oxidación y reducción. También se encuentran presentes dos átomos de Cu que están asociados con la actividad de la citocromo c oxidasa y la reacción de los electrones con el oxígeno molecular (Céspedes, Dávila, Fort, Ulloa, & Castro, 2006) (Stryer, 1986).

Aún hoy en día, muchos bioquímicos mantienen que el rol principal de los citocromos es el de transportador de electrones al oxígeno molecular en la cadena respiratoria. Esto está estrechamente entrelazado con la conversión del adenosindifosfato (ADP) más el fosfato inorgánico al adenosintrifosfato (ATP) en el proceso de fosforilación oxidativa, primeramente debido a que la energía de esta conversión últimamente proviene de la energía de oxidación en la cadena respiratoria y en dos de los tres puntos de fosforilación los citocromos están involucrados; secundariamente la tasa del pasaje de electrones a través de la cadena respiratoria es acelerada grandemente por la presencia de ADP ("control respiratorio") y es el estado de oxidación variable de los citocromos que es alterado fuertemente por su presencia. La fosforilación oxidativa está íntimamente ligada con el proceso de migración del protón y la captación de cationes en los tejidos y la mitocondria. Este proceso a su vez está íntimamente ligado con la mitocondria, su estructura y sus membranas. Los citocromos deben tener cientos de millones de años que lo que se creía previamente y deben haber tenido esencial catálisis antes del tiempo de los procesos fotosintéticos que dieron a la atmósfera de la tierra suficiente oxígeno molecular para hacer posible la respiración celular (Lemberg & Barrett, 1973).

En la secuencia de la transferencia electrónica del citocromo c al O_2 , via los centros redox de la citocromo c oxidasa (Figura N°1); es conocido que los electrones de la citocromo c primero reducen la citocromo a y Cu A, pero no se conoce cuál de estos dos centros es el aceptor de electrón primario. En experimentos con reducción anaeróbica del complejo cianuro de la oxidasa por el citocromo c, se encontró que el citocromo a y Cu A fueron reducidos sincrónicamente y que más de un electrón podría entrar a la oxidasa rápidamente (Malmström, 1990).

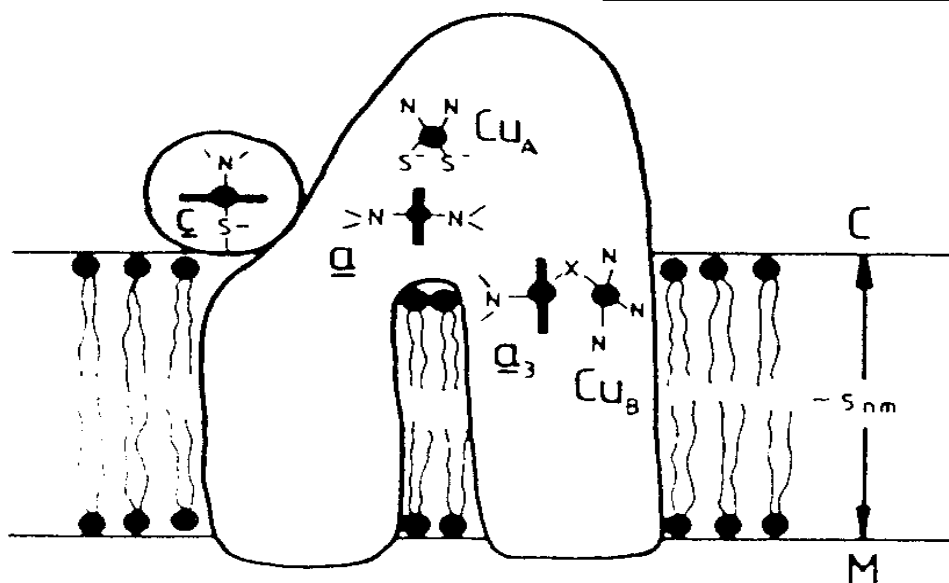


FIGURA N° 1: MODELO DEL MONOMERO DE LA CITOCROMO C OXIDASA Y EL CITOCROMO C, Y SU CENTROS REDOX, EN EL INTERIOR DE LA MEMBRANA MITOCONDRIAL.Malmström, G. (1990). **Cytochrome oxidase: Some Unsolved Problems and Controversial Issues.** Archives Biochemistry and Biophysics. Vol. 280, N°2, August 1, pp.233-241,

De los dos aceptores primarios, los electrones son transferidos intramolecularmente a sitio del citocromo a₃-Cu_B bimetálico, que es el centro reductor del dioxígeno (Figura N°2). Con la oxidasa en reposo esta transferencia electrónica es también lenta para ser parte del recambio de la enzima, mientras que la tasa ha sido reportado ser idéntica con la tasa de recambio en la enzima pulsada (Davies, Donovan, Refino, Brooks, Packer, & Dallman, 1984). Existen tres cobres, uno cerca al centro B, el segundo en la subunidad 1(I), y el tercero en la subunidad 3(II) (27) (Figura N°3).

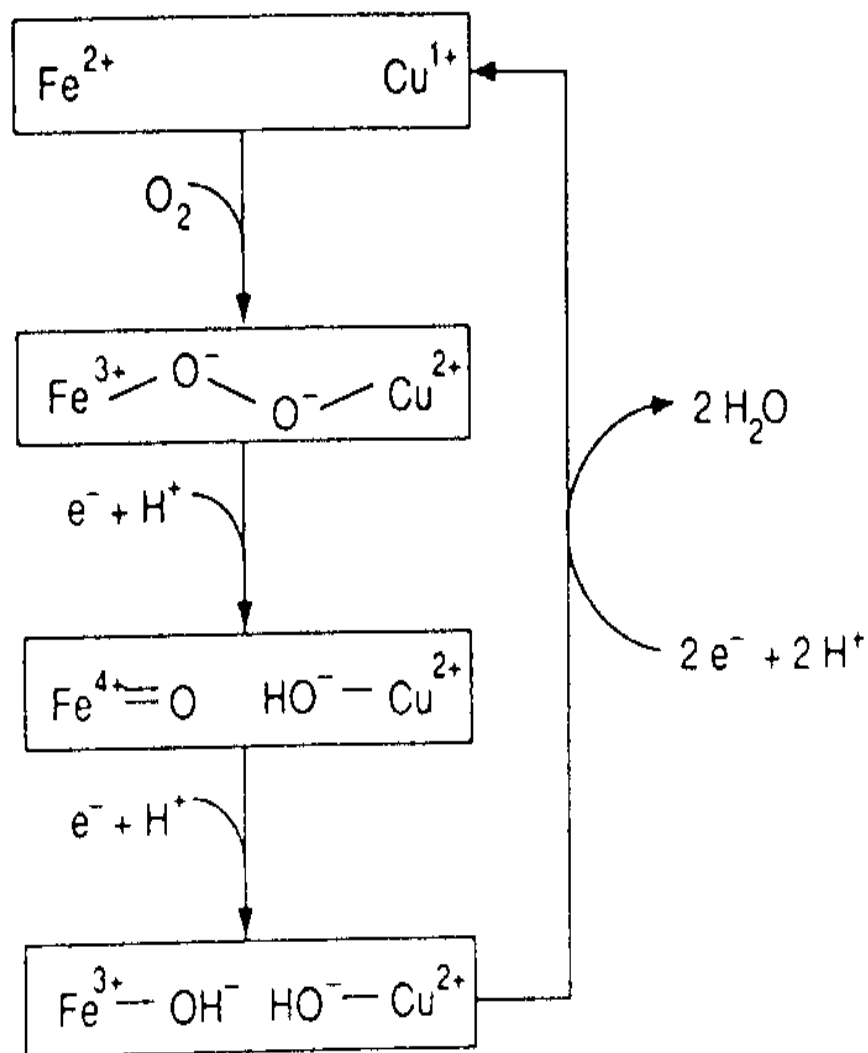


FIGURA N° 2: EL MECANISMO DE LA REDUCCIÓN DEL DIOXIGENO EN LA CITOCROMO C OXIDASA. Malmström, G. (1990). Cytochrome oxidase: Some Unsolved Problems and Controversial Issues. Arch. Biochemistry and Biophysics. Vol. 280, N°2, August 1, pp.233-241

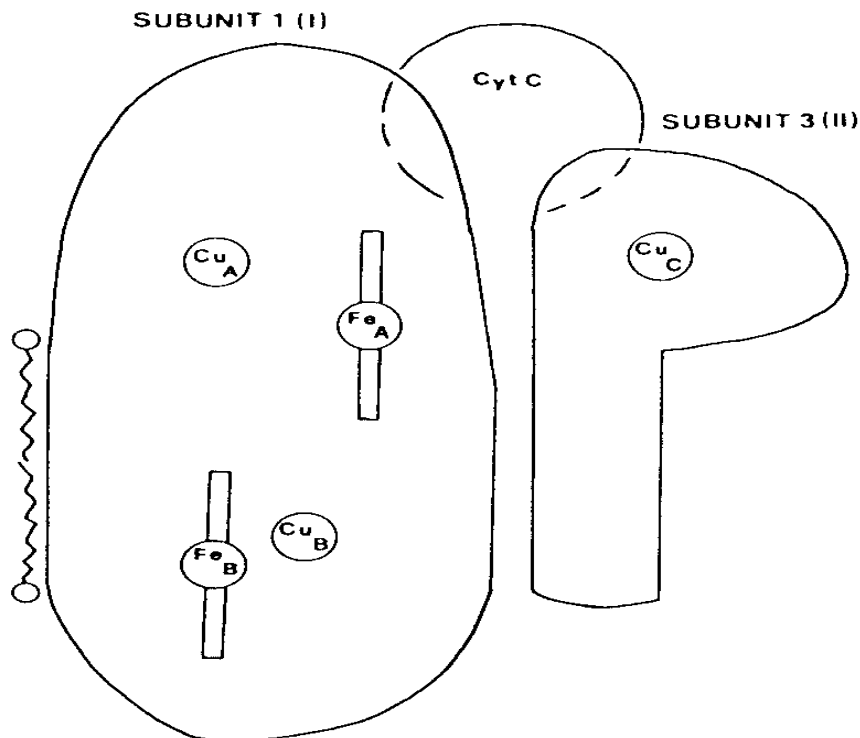


FIGURA N° 3: MODELO DE LOCALIZACIÓN DE LOS CENTROS METÁLICOS ACTIVOS EN LA CITOCROMO C OXIDASA. A. Azzi y M. Müller. (1990). Cytochrome C Oxidases: Polypeptide Composition, Role Of Subunits, and Location of Active Metal Centers. Arch. Biochemistry and Biophysics. Vol. 280, N°2, August 1, pp. 242-251.

Es generalmente aceptado que la citocromo c oxidasa eucariótica contiene cuatro grupos prostéticos, los dos hemes a y a₃, y dos átomos de cobre (etiquetados como CuA y CuB). Los estudios espectroscópicos indican que el heme a es ligado por dos residuos His, el CuA por dos His y dos Cys, el heme a₃ y el CuB son también unidos por un ligando compartido que ha sido identificado como un sulfuro que contiene un residuo, un μ peroxy, o un ion Cl (Anderson et al. 2002) (Figura N°4).

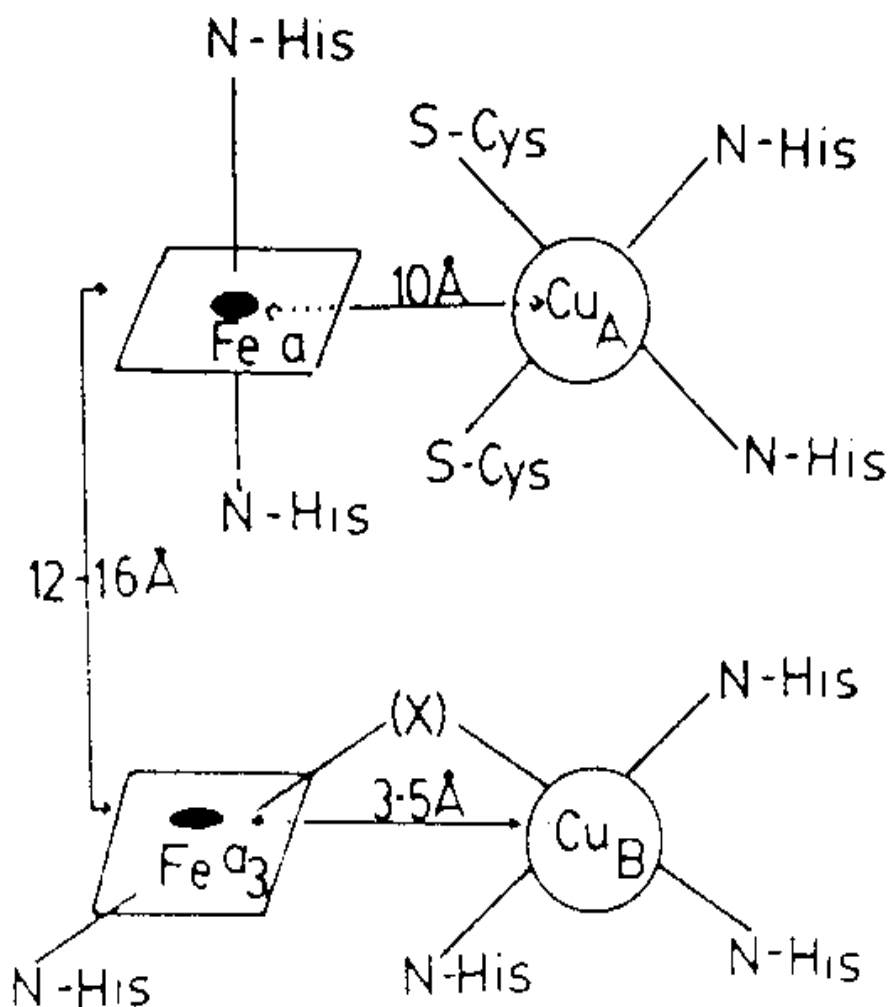


FIGURA N° 4: MODELO ESQUEMÁTICO DE LIGANDOS DE LOS GRUPOS PROSTÉTICOS EN LA CITOCROMO C OXIDASA Y LAS DISTANCIAS ENTRE LOS GRUPOS HEME Y LOS ÁTOMOS DE COBRE. Capaldi, R. (1990). Structure and Assembly of Cytochrome c Oxidase. Arch. Biochemistry and Biophysics. Vol. 280. N° 2. August 1, pp.252-262.

CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA

TIPO DE ESTUDIO: Analítico, Experimental, Transversal y Prospectivo.

MATERIALES

PRODUCTOS DE LA DIETA

Sulfato Ferroso Monohidratado (Roche), Sulfato Ferroso Monohidratado (Roche), Sulfato de Cobre Monohidratado (Roche), Sulfato de Zinc Monohidratado (Roche), Sulfato de Magnesio (Roche), Oxido de Magnesio (Roche), Oxido de Manganeso (Roche), Fosfato Dibasico de Calcio (Roche), Iodato de Calcio (Roche), Selenito de Sodio (Roche), Cloruro de Sodio (Riedel de Haën), Cloruro de potasio (Scharlau), Tiamina (Roche), Riboflavina (Roche), Acido Nicotínico (Roche), Pantotenato de Calcio (Roche), Piridoxina (Roche), Biotina (Roche), Acido Fólico (Roche), Cianocobalamina (Roche), Vitamina A (Roche), Vitamina D (Roche), Vitamina E (Roche), Vitamina k (Roche), Caseína (Sigma), Metionina (Merck), Sucrosa(Icnbiomedicals), Aceite de maíz (A-1), Bitartrato de colina (Roche), Fécula de Maíz (Duryea).

PRODUCTOS QUÍMICOS

Cloroformo (Merck), Sephadex G-25 (Sigma), Hidrosulfito de Sodio (Fluka), Citocromo C (Sigma), Cloruro de Sodio (Riedel de Haën), Cloruro de Potasio (Scharlau), Cloruro de Calcio (Panreac), Cloruro de Magnesio sextahidratado (Scharlau), Fosfato de Potasio dihidratado (Riedel de Haën), Fosfato de Sodio dihidratado (Riedel de Haën), Bicarbonato de Sodio (Scharlau), Azida de Sodio (Carlo Erba), Acido etilendinitrolatetraacetico sal disódicadihidrato EDTA (Merck), Sacarosa , Tris (Merck), Carbonato de sodio, Hidróxido de Sodio (Merck), Sulfato de Cobre Pentahidratado (Merck), Tartrato de Sodio, Fosfomolibodtungstico Reactivo Folin-Ciocalteau (Merck), Albúmina, Tween.

MÉTODOS

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizaron 28 ratas Holtzman, machos, de 21 días de edad, cuyos pesos estuvieron comprendidos entre 30-76 gr, destetadas, las que fueron criadas de acuerdo a la Guía para instalaciones y cuidado de animales de laboratorio de la Oficina Sanitaria de la Organización Panamericana de la Salud (Requerimientos de nutrientes de las ratas de laboratorio, 2000) (Guía para instalaciones y cuidado de animales de laboratorio, 1968), distribuidas de manera aleatoria en 4 grupos de 7 animales cada uno. Las ratas se colocaron en jaulas metabólicas individuales de acero inoxidable, en un ambiente de temperatura constante, ventilación adecuada, con facilidad de acceso a alimentos y agua, identificadas con números y letras, con ciclos alternados de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Una semana antes de iniciar propiamente el experimento, las ratas sólo recibieron una dieta normocalórica y normoproteica y agua "ad libitum", según recomendaciones del American Institute of Nutrition (Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Committee on standards for nutritional studies, 1977). Posteriormente, las ratas fueron alimentadas con dietas diferentes:

Grupo control (A)

Se utilizaron 7 ratas que fueron alimentadas por 8 semanas con agua destilada a libre demanda y una dieta normocalórica, normoproteica, sin fibra, con valores normales de vitaminas y minerales. Cuyos valores de hierro y cobre fueron 50 mg/Kg de dieta y 6 mg/Kg de dieta, respectivamente (Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Committee on standards for nutritional studies, 1977).

Grupos Experimentales (B)

Grupo B₁(Dieta deficiente en hierro)

Constituido por 7 ratas que fueron alimentadas por 8 semanas con agua destilada a libre demanda y una dieta normocalórica, normoproteica, sin fibra, con valores normales de vitaminas y minerales, a excepción del hierro, cuyos valor fue de 6 mg/Kg de dieta (Perkkiö et al.1985) (Henderson, Dallman, & Brooks, 1986) (Willis et al. 1987).

Grupo B₂(Dieta deficiente en cobre)

Constituido por 7 ratas que serán alimentadas por 8 semanas con agua destilada a libre demanda y una dieta normocalórica, normoproteica, sin fibra, con valores normales de vitaminas y minerales, a excepción del cobre, cuyos valor fue de 1 mg/Kg de dieta (Cohen et al. 1985) (Jalili, Medeiros, & Wildman, 1996).

Grupo B₃(Dieta deficiente en hierro y cobre)

Constituido por 7 ratas que serán alimentadas por 8 semanas con agua destilada a libre demanda y una dieta normocalórica, normoproteica, sin fibra, con valores normales de vitaminas y minerales, a excepción del hierro y cobre, cuyos valores fueron de 6 mg/Kg de dieta y de 1 mg/Kg de dieta, respectivamente.

Al término del período experimental los animales, previo ayuno de 14 horas, fueron anestesiados con cloroformo por inhalación. La sangre se extrajo por punción cardíaca. Posteriormente se extrajo el corazón y el músculo esquelético cuádriceps de las extremidad posterior derecha, para proceder al homogenizado, y realizar el estudio de la actividad de la citocromo c oxidasa (Jalili et al. 1996).

RECOLECCION DE LA INFORMACIÓN

Se realizó a través de las determinaciones bioquímicas en la sangre, en el plasma sanguíneo y en los homogenizados del músculo esquelético.

Los resultados se anotaron en una ficha de recolección elaborada para la presente investigación.

TECNICAS UTILIZADAS

DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS Y HEMATOLÓGICAS EN SANGRE TOTAL

Hemoglobina Citometría de flujo e Impedancia eléctrica. Equipo Sysmex 3000 (Laboratorios Roe).

Hematocrito Citometría de flujo e Impedancia eléctrica. Equipo Sysmex 3000 (Laboratorios Roe)

DETERMINACIONES DE MINERALES EN LA DIETA

Hierro: Espectrofotometría de absorción atómica. (CICOTOX-UNMSM)

Cobre: Espectrofotometría de absorción atómica. (CICOTOX-UNMSM)

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Músculo esquelético: Posteriormente a la separación y extracción del cuádriceps, se pesó aproximadamente 1.2 gr del músculo el cual fue cortado y lavado 3 veces con una solución de tampón Tris-HCl 10mM con sacarosa

0.3 M – EDTA 2mM a pH 7.4 en una relación de 1/10 (p/v) por 10 minutos cada vez, luego se realizaron dos lavados por 10 minutos cada vez, con una solución KCl 175 mM Tris-HCl 10mM 2mM de EDTA pH 7.4, en una relación 1/10, con esta misma solución y utilizando un homogenizador Potter-Elvehjem de vidrio inmerso en agua helada, se procedió al homogenizado. Luego se colocó en una centrífuga refrigerada marca Sorba II RC-2B con Rotor SS-34 y se centrifugó a 3500 rpm (1478 g) durante 10 minutos, luego se colocó 0.9 mL de sobrenadante en viales, se congelaron y descongelaron por tres veces. Posteriormente, se añadió 0.1 mL de Tween 20 al 10% para hacer una solución final de 1% y se deja reposar por 20 minutos y luego se determinó la actividad de la citocromo c oxidasa (EC 1.9.3.1) (Ohira, Cartier, Chen, & Holloszy, 1987).

MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA CITOCROMO C OXIDASA

El citocromo c se preparó disolviendo 39 mg de citocromo c (Bovine heart, Sigma diagnostics) en 1.0 ml de tampón fosfato a pH 7.0. Se añadió un exceso de hidrosulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) para tornar el citocromo c de la forma oxidada al estado reducido. Se utilizó una columna de sephadex G-25 (1.5 x 27 cm) para separar el hidrosulfito de sodio de la forma reducida del citocromo c.

Para determinar la actividad de la citocromo c oxidasa se utilizó 1mL de tampón fosfato 0.2M-EDTA 1mM pH 6.0, 0,4 mL de citocromo c reducido, 0.1 mL de Agua destilada y 0.02 mL del sobrenadante del músculo esquelético. La actividad de la citocromo c oxidasa se determinó midiendo la disminución de la densidad óptica a 550 nm en un espectrofotómetro; del citocromo c reducido, a medida que es oxidado por la citocromo c oxidasa. Una unidad de actividad de citocromo c oxidasa se define como la conversión de $1\mu\text{mol}$ de citocromo c reducido a la forma oxidada por minuto. Los resultados se expresaron como unidades por microgramo de proteína (Prohaska & Wells, 1974).

DETERMINACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE LOWRY

La determinación de proteína se realizó utilizando el método de Lowry y colaboradores (Lowry, O., Rosebrough, N., Lewis Farr, A. & Randall, R. (1951). 41). Se prepararon reactivos A, B y C. Para el reactivo A, se pesó 2 gr de Carbonato de sodio al 2% que se disolvió en 100 mL de Hidróxido de sodio 0.1N. El reactivo B se preparó pesando 100 mgr de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) al 0.5% en 10 mL de agua destilada y 200 mg de tartrato de sodio ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) al 1% en 10 mL de agua destilada. El reactivo C, se preparó con 100 mL de reactivo A y 2mL de reactivo B. Luego se preparó reactivo de Folin-Ciocalteau, diluyendo un volumen de reactivo de Folin en un volumen de agua.

Se colocó 0.1 mL del homogenizado tratado con tween 20 al 10% de músculo esquelético, 5 mL de Reactivo C, se deja reposar por 10 minutos a temperatura ambiente, después se agregó 0.5 mL de reactivo de Folin, se mezcló, se dejó reposar por 30 minutos, y se leyó en el espectrofotómetro a 750 nm. Se prepararon tubos de Standard de albúmina - cuya concentración es de 1 mg/mL, a 0.1 mL, 0.2 mL, 0.3 mL, 0.4 mL y 0.6 mL volúmenes de Standard.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Estadísticas Descriptivas: Se calcularon las medianas ya que la distribución de los resultados no fue normal (Prueba de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk).

Estadísticas Inferenciales: Debido a que la muestra no tuvo una distribución normal se procedió con la Prueba de Kruskal-Wallis, con un valor de $p < 0.05$. Para la comparación de pares de medianas se aplicó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. Para el procesamiento se usó el programa estadístico SPSS versión 12.0.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 RESULTADOS

Se obtuvieron las medianas de las actividades enzimáticas de la Citocromo c oxidasa del músculo esquelético por grupo: de las ratas alimentadas con dieta control (Grupo A) fue de 0,264 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína, de las ratas alimentadas con dieta deficiente en hierro (Grupo B1) fue de 0,239 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína, de las ratas alimentadas con dieta deficiente en cobre (Grupo B2) fue de 0,059 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína y de las ratas alimentadas con dieta deficiente en hierro y cobre (Grupo B3) fue de 0,049 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína (Tabla N° 1). Se han realizado dos tipos de comparaciones entre las medianas: el grupo control (Grupo A) con los grupos de ratas alimentadas con dietas deficientes (Grupos B1, B2 y B3) y comparaciones entre los grupos alimentados con dietas deficientes.

TABLA N° 1: MEDIANAS DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA CITOCROMO C OXIDASA DE MÚSCULO ESQUELÉTICO EN RATAS SEGÚN TIPO DE DIETA.

TIPO DE DIETA (GRUPO)	MEDIANAS DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (μ moles/min/mg de proteína)	Valor p en relación al control
Dieta Control (A)	0,264	
Dieta deficiente en Hierro (B1)	0,239	0,654
Dieta deficiente en Cobre (B2)	0,059	0,006
Dieta deficiente en Hierro y Cobre (B3)	0,049	0,006

En las comparaciones de medianas de la actividad de la citocromo c oxidasa del músculo esquelético del grupo control con las ratas alimentadas con dietas deficientes: no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las medianas de la actividad de la citocromo c oxidasa del músculo esquelético en ratas del grupo A y el grupo B1 (0,264 μ moles/min/mg de proteína y 0,239 μ moles/min/mg de proteína, respectivamente; $p=0.654$)(Gráfico N°1), más si hubieron diferencias significativas entre las medianas de la actividad de la citocromo c oxidasa del músculo esquelético en ratas del grupo A y el grupo B2 (0,264 μ moles/min/mg de proteína y 0,059 μ moles/min/mg de proteína, respectivamente; p 0,006) (Gráfico N°2), así como también hubieron diferencias estadísticamente significativas entre las medianas de la actividad de la citocromo c oxidasa del músculo esquelético del grupo A y el grupo B3 (0,264 μ moles/min/mg de proteína y 0,049 μ moles/min/mg de proteína respectivamente; p 0,006) (Gráfico N° 3).

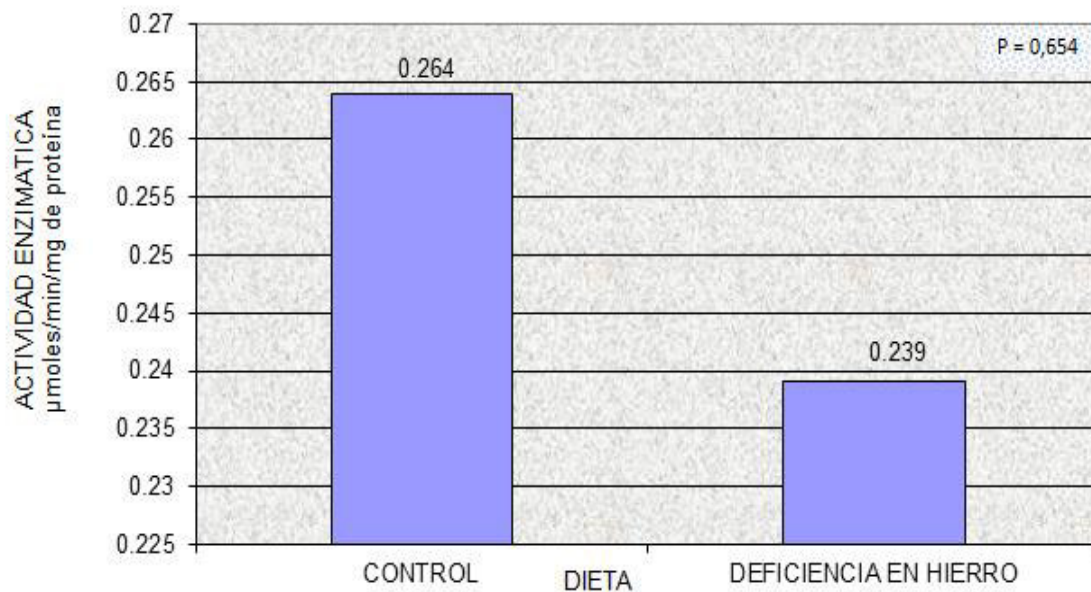


GRÁFICO N° 1: MEDIANAS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA CITOCROMO C OXIDASA EN MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATAS ALIMENTADAS CON DIETA CONTROL Y DEFICIENTE DE HIERRO.

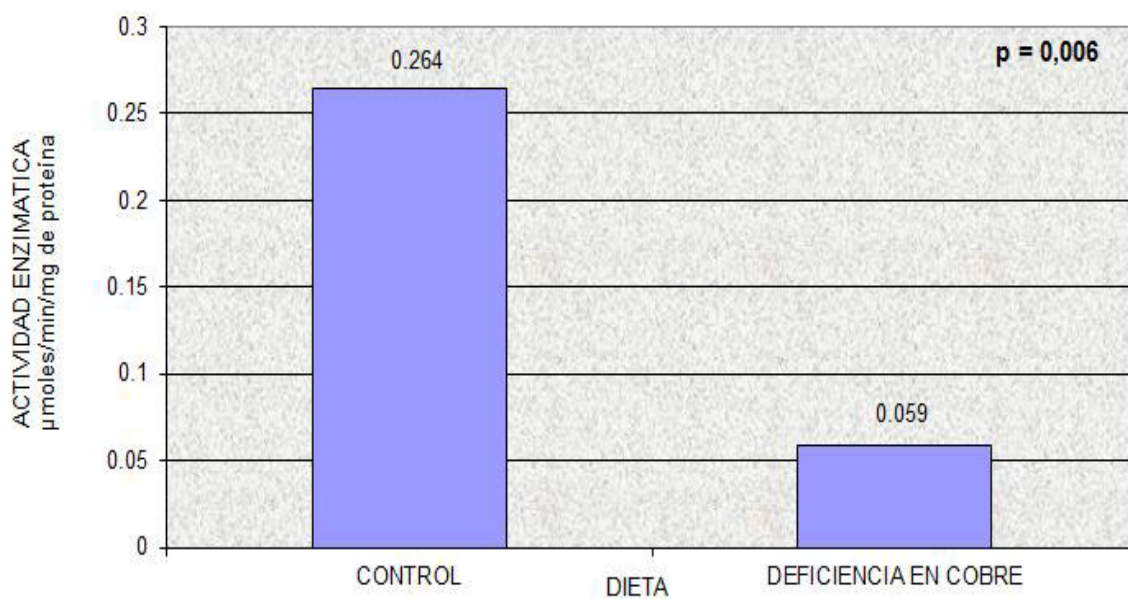


GRÁFICO N° 2: MEDIANAS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA CITOCROMO C OXIDASA EN MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATAS ALIMENTADAS CON DIETA CONTROL Y DEFICIENTE DE COBRE.]

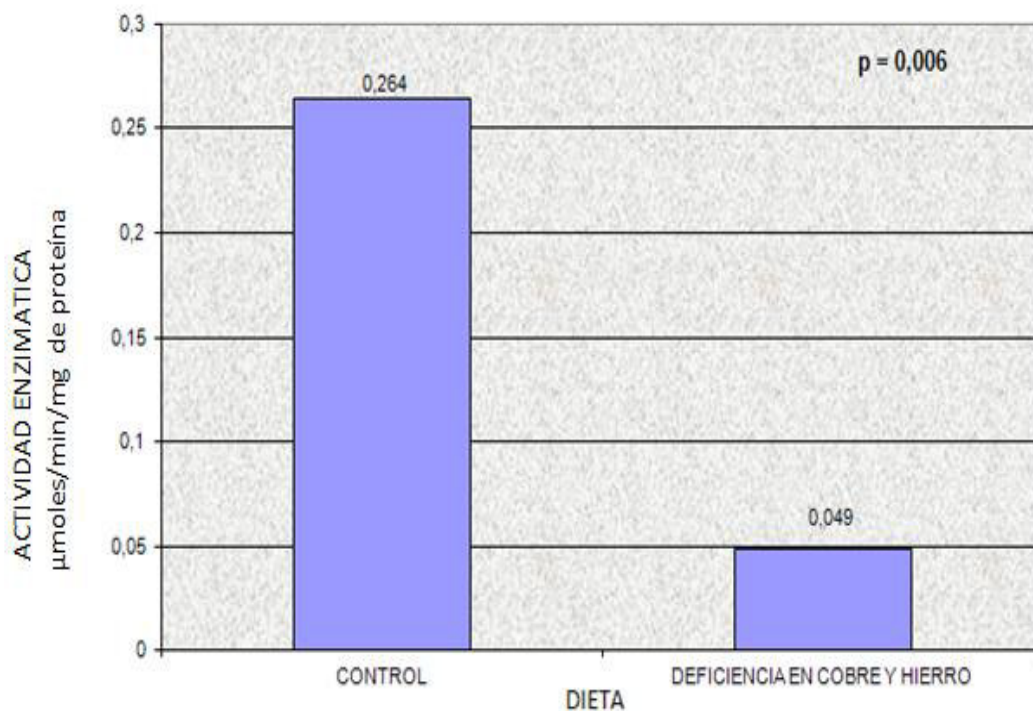


GRÁFICO Nº 3: MEDIANAS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA CITOCROMO C OXIDASA EN MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATAS ALIMENTADAS CON DIETA CONTROL Y DEFICIENTE DE HIERRO Y COBRE.

En las comparaciones entre las medianas de la actividad de la citocromo c oxidasa del músculo esquelético en ratas alimentadas con dietas deficientes, tenemos: se han encontrado diferencias significativas entre las medianas de la actividad de la citocromo c oxidasa del músculo esquelético en ratas del Grupo B1 y el Grupo B2 (0,239 μmoles/min/mg de proteína y 0,059 μmoles/min/mg de proteína, respectivamente; $p = 0,009$) (Gráfico Nº 4) y también se encontraron diferencias significativas entre las medianas de la actividad de la citocromo c oxidasa del músculo esquelético en ratas Grupo B1 y el Grupo B3 (0,239 μmoles/min/mg de proteína y 0,049 μmoles/min/mg de proteína, respectivamente; $p = 0,013$) (Gráfico Nº5). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las medianas de la actividad de la citocromo c oxidasa del músculo esquelético en ratas del Grupo B2 y el Grupo B3 (0,059 μmoles/min/mg de proteína y 0,049 μmoles/min/mg de proteína respectivamente; $p = 0,653$) (Gráfico Nº6).

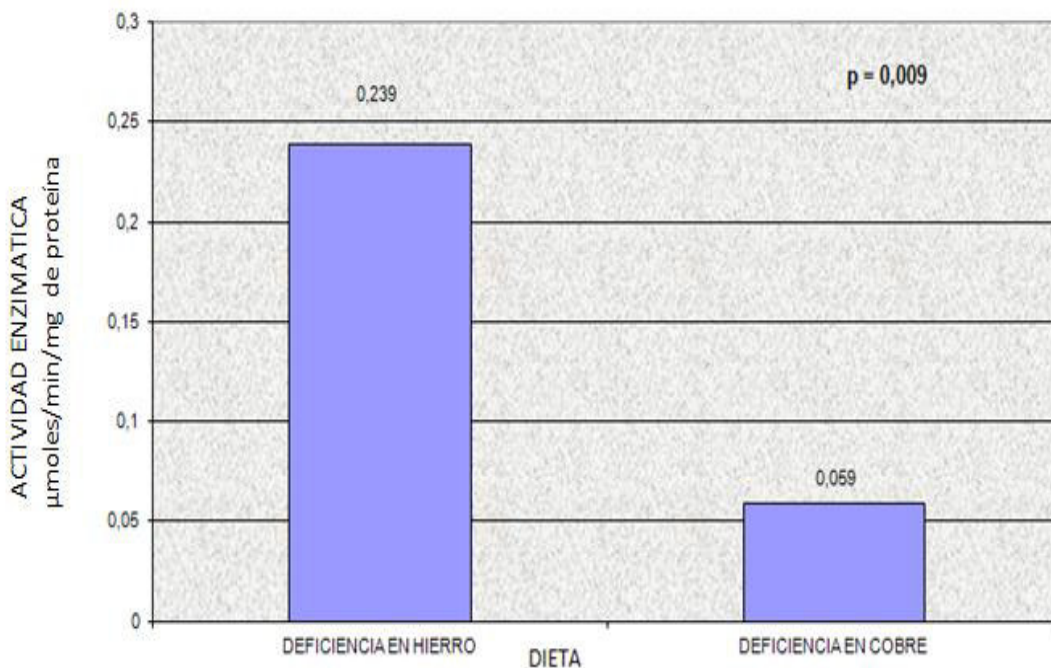


GRÁFICO Nº 4: MEDIANAS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA CITOCROMO C OXIDASA EN MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATAS ALIMENTADAS CON DIETA DEFICIENTE DE HIERRO Y DEFICIENTE EN COBRE.

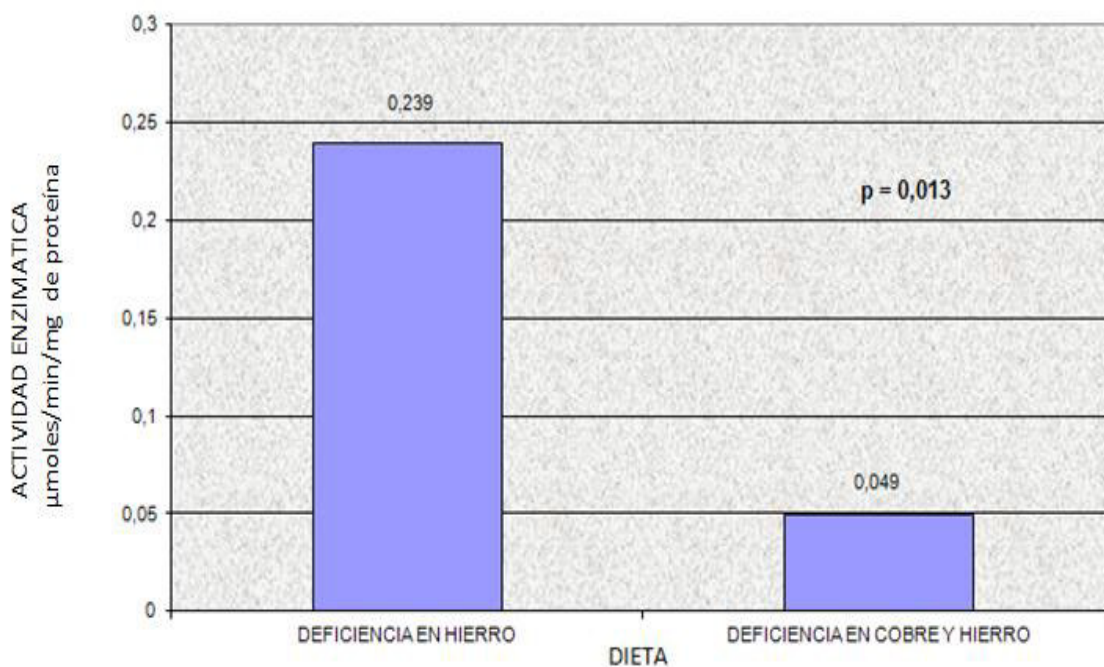


GRÁFICO Nº 5: MEDIANAS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA CITOCROMO C OXIDASA EN MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATAS ALIMENTADAS CON DIETA DEFICIENTE DE HIERRO Y DEFICIENTE DE HIERRO Y COBRE.

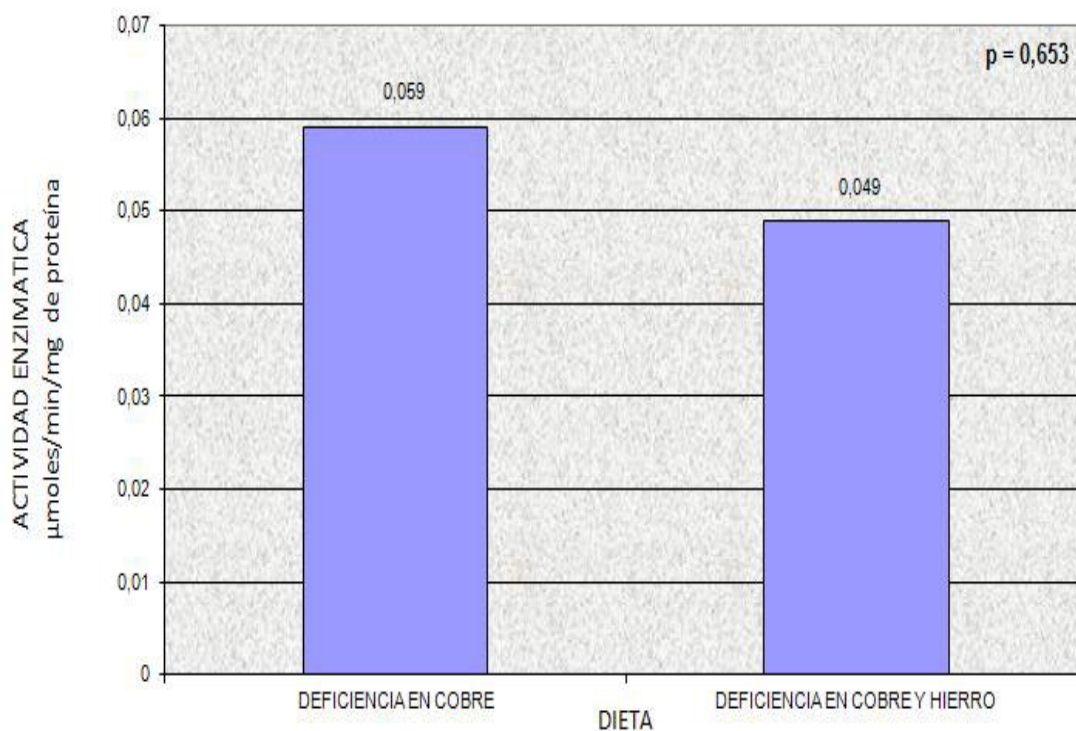


GRÁFICO N° 6: MEDIANAS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA CITOCROMO C OXIDASA EN MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATAS ALIMENTADAS CON DIETA DEFICIENTE DE COBRE Y DEFICIENTE DE HIERRO Y COBRE.

En cuanto al análisis de los indicadores bioquímicos y hematológicos (Hemoglobina y Hematocrito), se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de Hemoglobina (Grupo A= 15 gr/dl, Grupo B1= 13,83 gr/dl) y Hematocrito (Grupo A=47,6%, Grupo B1=43,53%) de ratas del Grupo A y el Grupo B1 ($p = 0,029$) y entre los valores de Hemoglobina (Grupo A= 15 gr/dl, Grupo B3= 13,5 gr/dl) y Hematocrito (Grupo A=47,6%, Grupo B3=43,48%) de ratas del Grupo A y B3 ($p=0,029$).

En el Gráfico N° 7 se representan las diferencias porcentuales en relación al control de las medianas de la actividad de la citocromo c oxidasa del músculo esquelético en ratas: 9,5% (Grupo B1), 77,7% (Grupo B2) y 81,4% (Grupo B3) respectivamente.

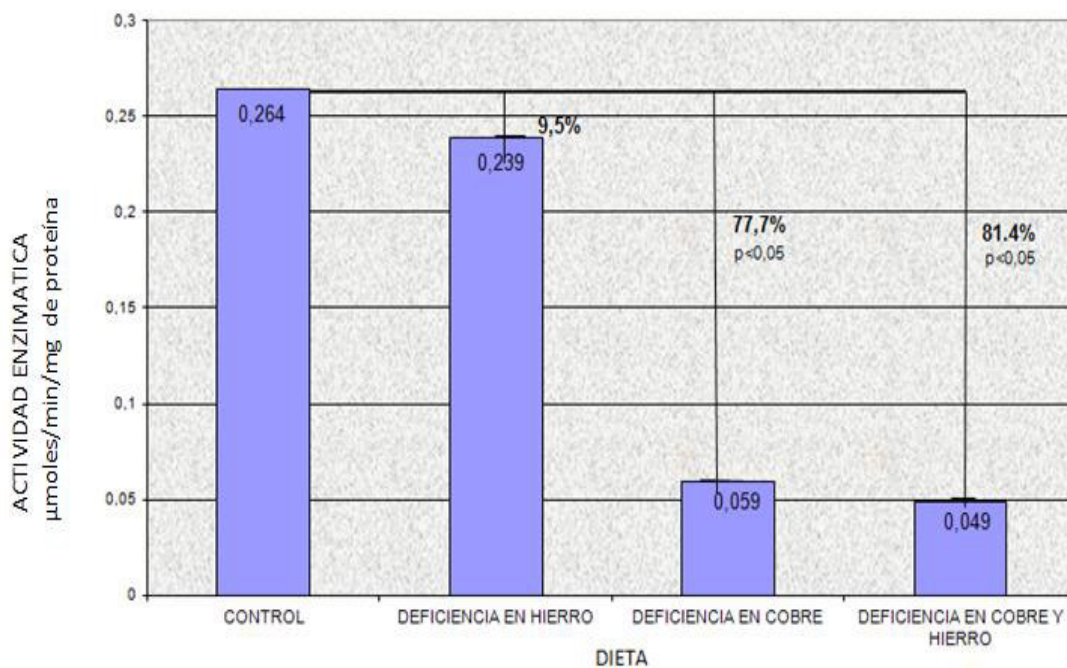


GRÁFICO N° 7: ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LA CITOCROMO C OXIDASA EN MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATAS ALIMENTADAS CON DIETAS CONTROL, DEFICIENTE EN HIERRO, DEFICIENTE EN COBRE, Y SIMULTÁNEA DE HIERRO Y COBRE.

4.2 DISCUSIÓN

La citocromo c oxidasa, metaloenzima, involucrada en la generación de energía para el funcionamiento celular, tiene en su composición micronutrientes muy importantes en el transporte de electrones como son el Hierro y el Cobre. En la presente investigación, se ha estudiado la actividad de esta enzima en el músculo esquelético en ratas, en diferentes condiciones: deficiencias aisladas de hierro y cobre y deficiencia simultánea de ambos minerales.

Se han realizado estudios aislados de los efectos de la dieta con deficiencia en hierro y la dieta con deficiencia en cobre, sobre la citocromo c oxidasa en músculo esquelético, pero ninguno en forma comparativa ni tampoco con dietas con deficiencia simultánea de ambos micronutrientes, lo que motivó nuestro estudio.

Se ha demostrado en nuestro estudio que al disminuir la ingesta de micronutrientes como el hierro y el cobre se produce una menor actividad de la citocromo c oxidasa del músculo esquelético en ratas, aunque en diferente magnitud, como nos señalan las medianas y las diferencias en sus porcentajes en relación al control.

La menor actividad de la citocromo c oxidasa del músculo esquelético en ratas alimentadas con dieta deficiente en hierro en relación al control no es estadísticamente significativa en el presente estudio ($p = 0,654$) pero representa 9,5% menos con respecto al control, lo que contrasta con los

estudios de Cartier et al. (1986) en los que se encontró una disminución del 50% en el mismo órgano en ratas. En otro estudio realizado en hígado de ratas (Stangl, G. & Kirchgesshey, M. (1998), la restricción moderada de hierro a ratas machos jóvenes estuvo asociada con alteraciones marcadas en el estado del hierro, sin embargo la citocromo c oxidasa permaneció inalterada, lo que es análogo con nuestro estudio, aunque en otro órgano. Se ha encontrado (Rodríguez-Matas, M. C., Lisbona, F., Gómez-Ayala, A. E., López-Aliaga & Campos, M. S. (1998). que el período crítico en el desarrollo de la deficiencia nutricional de hierro ocurre después de los 30 a 40 días sin suplementación de hierro. En este tiempo el organismo es incapaz de mantener niveles de hemoglobina sin dañar los grupos enzimáticos dependiente de hierro los cuales son esenciales para la vida. En nuestro estudio se ha utilizado 8 semanas, es decir 56 días, tiempo suficiente para producir deficiencia de hierro, lo que se corrobora con las diferencias estadísticamente significativas de la Hemoglobina y Hematocrito en las ratas alimentadas con dieta deficiente en hierro. Sin embargo, la actividad de la citocromo c oxidasa no se ha visto afectada significativamente. Rodríguez-Matas et al. (1998) estudiaron la influencia de la deficiencia nutricional de hierro sobre el metabolismo del Cobre y explicaron que podría haber aumento de la absorción de este último en esta condición (Rodríguez-Matas, M. C., Lisbona, F., Gómez-Ayala, A. E., López-Aliaga & Campos, M. S. (1998), y esto podría ser importante en la conservación de la actividad de esta enzima, ya que en nuestro estudio se ha encontrado que no hay diferencias significativas entre el grupo de ratas alimentadas con dieta control y el grupo alimentadas con dieta deficiente de hierro.

Los microminerales en general tienen un espectro muy pequeño para evitar condiciones que lleven a funciones anormales. Un ligero aumento o deficiencia de uno de ellos podría jugar un rol más decisivo en crear un desbalance entre otros minerales, los cuales podrían llevar a cambios patogénicos. Parece estar claro que las similitudes químicas en la estructura entre los iones participantes podría ser la raíz de las interacciones de los microminerales. Dentro de los mecanismos de interrelación en la categoría de microminerales es la variación del estado redox de un ion metal, que

cambia el estado de valencia para que el segundo pueda acoplarse a una membrana de valencia específica o proteína de transporte plasmática. Las interacciones entre el hierro y el cobre ocurren mayormente en la fase de absorción del metabolismo. El incremento de ingestas de hierro tiene poco o ningún efecto sobre la absorción de cobre. Además, la interrelación del cobre con el hierro no siempre resulta antagonista. Algunas veces los dos metales están interactuando en el desarrollo de una función o la ejecución de movimiento o transporte. Estudios demuestran que las ratas alimentadas con dietas deficientes de hierro o cobre por 35 días llegan a los niveles bajos esperados de estos minerales en el suero sanguíneo e hígado. La deficiencia de hierro causa una caída de 90% del hierro sérico y cerca de un 80% en el hierro hepático. En la deficiencia de cobre, hubo un gran aumento en el hierro hepático y la disminución del hierro sérico (Sharp, 2004), lo que podría explicar la disminución significativa de la actividad de la citocromo c oxidasa en nuestro estudio en esta condición y más cuando la deficiencia fue simultánea en hierro y cobre, no habiendo diferencias significativas entre estos grupos. En contraste, en otro estudio el cobre hepático mostró un incremento modesto cuando la dieta fue deficiente en hierro sugiriendo que la homeostasis del cobre en el hígado es débilmente dependiente del estado del hierro del animal. La elevación del hierro hepático en dietas deficientes de cobre, demuestra que el cobre es necesario para movilizar el hierro desde su lugar de almacenamiento en el hígado a las células periféricas (Harris, 2014).

Al respecto del cobre, las menores actividades de la citocromo c oxidasa del músculo esquelético en ratas alimentadas con dieta deficiente en cobre y con dieta deficiente simultáneamente en cobre y hierro, mostraron diferencias estadísticamente significativas en relación al grupo control. Lo que nos confirma la importancia del cobre en la actividad de la citocromo c oxidasa, que fue estudiado en forma aislada por Dallman y Loskutoff en 1967 en la que encontraron una disminución del 18% de la actividad de la citocromo c oxidasa en músculo esquelético en ratas (Lemberg&Barrett, 1973), pero no se menciona la cantidad de cobre en la dieta ni por cuánto tiempo las ratas fueron alimentadas, mientras que en nuestro estudio se

encontró una disminución del 77,7%, un resultado muy diferente y altamente significativo. En otros estudios (Prohaska, 1983)(Prohaska, 1991). también se encontró que la actividad de la Citocromo c oxidasa estuvo disminuida en todos los tejidos examinados en ratones. En este estudio ellos consiguieron que las ratas deficientes en cobre estuvieran anémicas, 5 semanas después del tratamiento, lo que en la presente investigación no se corroboró ya que no hubieron diferencias significativas con el grupo control, y a pesar de ello, la actividad de la Citocromo c oxidasa de músculo esquelético estuvo disminuida, se recalca entonces que la función enzimática se encuentra disminuida en la deficiencia de cobre antes de causar anemia en las ratas.

Un comentario merecido es que en otro estudio (Dallman, 1967), se encontró que en ratas con un régimen deficiente de cobre hasta los 2.5 – 3 meses de edad, las actividades de la citocromo c oxidasa disminuyó en el músculo esquelético (quadratuslumborum) en un 18% y que retornó a los valores del control después de los 10-15 días de tratamiento con acetato cúprico.

Debemos resaltar que no hay ningún estudio anterior en el que se comparen los efectos de las deficiencias aisladas y simultáneas de hierro y cobre sobre la actividad de la Citocromo c oxidasa del músculo esquelético en relación al control y observar que efectivamente en todos los casos disminuye, 9,5% en la deficiencia de hierro, 77,7% en la deficiencia de cobre y 81.4% en la deficiencia de hierro y cobre, pero que sólo es significativo en los últimos dos casos. Explicar por qué la dieta deficiente en hierro no afecta significativamente la actividad de la citocromo c oxidasa del músculo esquelético en ratas, nos aproxima a hechos demostrados en dietas deficientes de hierro, como el mencionado líneas arriba que produciría el aumento de absorción de cobre (Rodríguez-Matas, Lisbona, Gómez-Ayala, López-Aliaga & Campos,1998) el segundo hecho de que la ceruloplasmina (ferroxidasa circulante) actúe como factor en la oxidación del ión ferroso para su transporte por la transferrina—es decir para su distribución a otros tejidos y, el otro hecho del efecto positivo del cobre sobre la biosíntesis del hem a. Dicho de otro modo, tendríamos que la deficiencia de cobre tiene un efecto negativo sobre la biosíntesis del hem a, expresado en la ausencia o

disminución de las bandas de absorción del citocromo aa3 y además por falta de ceruloplasmina no habría movilización del hierro de los tejidos (Lemberg & Barrett, 1973), por lo tanto la disminución de cobre podría haber contribuido aún más a la disminución de la actividad de la citocromo c oxidasa del músculo esquelético en nuestro estudio.

En la disminución de cobre, (Cordano, 1998) se sostiene el concepto de dos efectos de la deficiencia de cobre sobre el metabolismo del hierro, el primero tiene un efecto adverso sobre la absorción (pérdida de la ferroxidasa) y movilización del hierro, lo que explicaría la disminución significativa de la actividad de la citocromo c oxidasa tanto en la deficiencia aislada de cobre como en la deficiencia simultánea de hierro y cobre, no ocurriendo diferencias significativas entre estos dos grupos, lo que indica que no hay efectos sumativos, y el segundo es el efecto tardío sobre el metabolismo del hierro que se relaciona con una eritropoyesis inadecuada que, sin embargo, en nuestro estudio no se pudo corroborar debido a que no hubieron diferencias significativas de la Hemoglobina y Hematocrito con el grupo control, sin embargo los valores obtenidos fueron menores al grupo control. En otro estudio, la absorción de hierro por las células de la mucosa intestinal al parecer no está afectada pero la liberación de hierro al interior del plasma sí podría estar alterada, según algunos estudios en los que se encontraron que la disminución de la ceruloplasmina disminuye el movimiento de hierro de las reservas de ferritina al plasma y por lo tanto la síntesis del hem se deprime, sin embargo en el presente estudio los valores de hemoglobina en los grupos de ratas alimentadas con dieta deficiente en cobre no presentaron diferencias significativas con el control.

También hay diferencias significativas de la actividad de la citocromo c oxidasa del músculo esquelético en ratas alimentadas con dieta deficiente en hierro comparada con las alimentadas con dieta deficiente en hierro y cobre (79,5% menor) y por último entre los últimos dos grupos alimentados con dieta deficiente en cobre y con dieta con deficiencia simultánea, si bien la de este último grupo su actividad es menor, ésta no es estadísticamente significativa, es decir la dieta deficiente en hierro no afecta significativamente la actividad de la citocromo c oxidasa.

En el presente estudio, también hemos analizado estadísticamente en forma comparativa los datos de laboratorio, confirmándose la deficiencia de hierro con la disminución significativa de Hemoglobina y Hematocrito en relación al control, que no se correlaciona con el porcentaje de disminución de la actividad de la citocromo c oxidasa de músculo esquelético en relación al control, que no es significativa en el grupo de ratas alimentadas con dieta deficiente en hierro. En contraste con los hallazgos del 1958 en el que Beutler y Blaisdell obtuvieron evidencia que la Citocromo c oxidasa estaba disminuía en tejidos animales con deficiencia de hierro aún cuando la hemoglobina no estaba grandemente disminuía (Lemberg&Barrett, 1973).

A pesar que los datos de estudios anteriores demuestran que la deficiencia de cobre afecta la síntesis del hem, por lo que debería haber anemia, en nuestro estudio no hubieron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de hemoglobina y hematocrito de ratas alimentadas con dieta deficiente en cobre en relación al control, pero la actividad de la citocromo c oxidasa que también contiene grupos hem está marcadamente disminuía.

La relación íntima entre el hierro y el cobre en la nutrición humana ha sido reconocida por muchos años. El enlace mejor caracterizado está provisto por la ceruloplasmina, una proteína de multiunión al cobre que actúa como ferroxidasa sérica y es esencial para la movilización del hierro del almacén tisular. La disminución del cobre ha demostrado que reduce la producción de la holo-ceruloplasmina y empeora la actividad de ferroxidasa, conduciendo, en numerosos casos, a la disminución de la liberación del hierro y la generación de anemia, y que mejora en respuesta a la suplementación dietética de cobre pero no de hierro. La absorción del hierro de la dieta también requiere de la presencia de una multicobreferroxidasa. Hefaestina, un homólogo de la ceruloplasmina, trabaja en conjunto con el transportador IREG1 para permitir la salida de hierro de los enterocitos para cargarse a la transferrina. El rol esencial de la hefaestina en este proceso ha sido reconocido en los estudios de ratones con anemia ligada al sexo, en los cuales la salida de hierro está desmejorada marcadamente como resultado de una mutación en el gen de la hefaestina, teniendo una versión trunca o no funcional de la proteína. Hay evidencia emergente de que un

número de otros componentes de las vía de transporte del hierro intestinal son también sensibles al cobre. El transportador metálico divalente 1 (DMT1), el transportador de hierro localizado en la membrana apical de los enterocitos es también un transportador fisiológicamente importante de cobre, sugiriendo que estos dos metales pueden competir con cada cual para la entrada dentro de los enterocitos duodenales. Además, la expresión de tanto DMT1 y el transportador basolateral de hierro IREG1 pueden ser regulados por cobre, sugiriendo que la relación Fe-Cu puede ser más compleja que lo que se pensaba inicialmente (Sharp, 2004).

La confluencia del hierro y el cobre es de especial significación. Un defecto en el gen de la ceruloplasmina en humanos y una dieta deficiente en cobre en animales, ambas resultan en una gran retención de hierro en el hígado, un indicador de falla para movilizar el hierro hacia la sangre (Thomas & Oates, 2003). Estas observaciones tienen gran significado cuando es una realidad que la deficiencia de hierro es pandémica y en algunos casos resistente a sólo a las sales de hierro como factor corrector.

La evidencia experimental disponible sugiere que hay una estrecha relación entre las funciones metabólicas de Cu y Fe en el hombre, siendo el cobre esencial en el metabolismo del hierro (O'Dell, 1989). Hay problemas de salud pública claros asociados con desequilibrios en el aporte nutricional de Fe, ya que la anemia por deficiencia de Fe es el trastorno nutricional más común, que afecta hasta a dos mil millones de la población en todo el mundo. Por el contrario, hay poca evidencia de problemas mayores de salud asociados con la deficiencia de Cu dietético o por sobrecarga. La mayoría de los casos recientes de deficiencia de cobre se han asociado con desnutrición crónica, y de vez en cuando la deficiencia de Cu se ha visto en los bebés alimentados con la dieta de leche de vaca. Más importante desde una perspectiva de salud pública son cambios marginales en el estado de Cu.

A primera vista parece que este tipo de relación es poco probable, ya que el hierro en la dieta (aproximadamente 10 mg / d) de lejos excede la ingesta de cobre ($\leq 1,6$ mg / d). Sin embargo, en un estudio más minucioso, el cobre es mucho más biodisponible que el hierro (70% para el cobre v 10% para el

hierro), la absorción de estos metales es esencialmente la misma, es decir, 1mg/d. Dada la evidencia de estudios celulares y moleculares que indican que el Fe y Cu emplean el mismo mecanismo de transporte para acceder a los enterocitos, es decir DMT1, es posible prever que los aumentos en la ingesta dietética de Fe o Cu, tal vez acoplado a la presencia o ausencia de otros factores de la dieta que alteren su biodisponibilidad, podría tener un impacto importante en la absorción del otro metal (Sharp, 2004).

4.3 HIPÓTESIS

H: La deficiencia aislada y simultánea de hierro y cobre disminuye la actividad de la citocromo c oxidasa en el músculo esquelético en ratas.

h_1 : La deficiencia aislada de hierro disminuye la actividad de la citocromo c oxidasa en el músculo esquelético en ratas.

h_2 : La deficiencia aislada de cobre disminuye la actividad de la citocromo c oxidasa en el músculo esquelético en ratas.

h_3 : La deficiencia simultánea de hierro y cobre disminuye la actividad de la citocromo c oxidasa en el músculo esquelético en ratas.

4.4 PRUEBAS DE HIPÓTESIS

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en la actividad de la citocromo c oxidasa de músculo esquelético de ratas entre los grupos con dieta control comparado con la dieta deficiente en cobre ($p = 0,006$), los grupos con dieta control comparado con la dieta con deficiencia simultánea de hierro y cobre ($p = 0,006$), los grupos con dieta deficiente en hierro comparado con la dieta deficiente de cobre ($p = 0,009$) y, los grupos con dieta deficiente de hierro comparado con la dieta con deficiencia simultánea de hierro y cobre ($p = 0,013$).

CONCLUSIONES

1. Se ha demostrado que la actividad de la citocromo c oxidasa del músculo esquelético en ratas alimentadas con dieta deficiente simultánea de hierro y cobre es menor que en las ratas alimentadas con dieta con deficiencia aislada de hierro y el control.
2. Se ha establecido que la actividad de la citocromo c oxidasa del músculo esquelético en ratas alimentadas con dieta deficiente en cobre es menor que en las ratas alimentadas con dieta deficiente en hierro y el control.
3. Se ha establecido que la actividad de la citocromo c oxidasa del músculo esquelético en ratas alimentadas con dieta deficiente en hierro es menor que el control, pero la diferencia no es estadísticamente significativa.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda que en la práctica, se ingiera alimentos que sean fuentes no sólo de hierro sino también de cobre, para evitar no sólo la anemia sino eventos fisiopatológicos, como los que se derivan de este estudio, en relación a la menor actividad de la citocromo c oxidasa en dietas deficientes de cobre y en la deficientes simultánea de hierro y cobre.
- Se recomienda, entonces, mayor ingesta de alimentos de origen animal, como: carnes rojas sobretudo de cordero, pato y cerdo, en las vísceras (hígado, corazón, cerebro) y, de origen vegetal como: frutos secos (almendras, nueces, pasas, avellanas, pepas de girasol), legumbres (garbanzos, frijoles, lentejas, habas), cereales integrales (arroz, trigo, cebada) y proteínas vegetales como la soya.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acerca del Cobre: Principales usos del Cobre en la Salud. Recuperado de <http://procobre.org/es/wp-content/plugins/download-monitor/download.php?id=16>

Andersen, H., Gambling, L., Holtrop, G. & McArdle, H. (2007). Effect of dietary copper deficiency on iron metabolism in the pregnant rat. *British Journal of Nutrition*. 97:239-246

Anderson, G. J., Frazer, D. M., McKie, A. T., Wilkins, S. J. & Vulpe, C. D. (2002). The expression and regulation of the iron transport molecules hephaestin and IREG1: implications for the control of iron export from the small intestine. *Cell Biochemistry Biophysics*, 36 (2-3):137-46.

Arredondo, M., Muñoz, P., Mura, C. V. & Núñez, M. T. (2003). DMT1, a physiologically relevant apical Cu^{1+} transporter of intestinal cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, Vol. 284no. C1525-C1530.

Azzi, A. & Müller, M. (1990). Cytochrome c oxidases: Polypeptide composition, role of subunits, and location of active metal centers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 280(2): 242-251.

Badham, J. Zimmermann, M. & Kraemer, K. (2007). Guía sobre anemia nutricional. Basilea: Sight and Life. <http://www.sightandlife.org>

Barisani, D. & Conte, D. (2002). Transferrin receptor 1 (TfR1) and putative stimulator of Fe transport (SFT) expression in iron deficiency and overload: an overview. *Blood Cells Molecular Disease*, 29(3):498-505.

Beutler, E. (1959). Iron Enzymes in Iron Deficiency. IV. Cytochrome oxidase in rata kidney and heart. *Acta Haemtologica* 21:371-377. DOI: 10.1159/000205714

Borch-Johnsen, B., Hagve, T. A., Hauge, A. & Thorstensen (2009). Regulation of the iron metabolism. *Tidsskr Nor Laegeforen*. Apr 39:129(9):858-62. Doi: 10.4045/tidsskr.08.0083.

Capaldi, R. (1990). Structure and assembly of cytochrome c oxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 280(2): 252-262.

Cartier, L. J., Ohira, Y., Chen, M., Cuddihes, R. & Holloszy, J. (1986). Perturbation of mitochondrial composition in muscle by iron deficiency. *Journal of Biological Chemistry*, 261: 29: 13827-13832.

Céspedes, R., Dávila, E., Fort, A., Ulloa, L. & Castro, Z. (Setiembre 2006). Perú: Encuesta Demográfica y de Salud Familiar. ENDES Continua 2004-2005. INEI Informe principal. Dirección Técnica de Demografía e Indicadores Sociales. Dirección Nacional de Censos y Encuestas. USAID (Agencia de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional). Programa Measure DHS + ORC Macro (Asistencia Técnica). 145-160.

Cohen, N., Keen, C., Hurley, L. & Lönnnerdal, B. (1985). Determinants of copper deficiency anemia in rats. *Journal of Nutrition*, 115, 710-725.

Cohen, N., Keen, C., Lönnnerdal, B. & Hurley, L. (1985). Effects of varying dietary iron on the expression of copper deficiency in the growing rat: anemia, ferroxidase I y II, tissue trace elements, ascorbic acid and xanthine dehydrogenase. *Journal of Nutrition*, 115, 633-649.

Cordano, A. (1998). Clinical manifestations of nutritional copper deficiency in infants and children. *American Journal of Clinical Nutrition*, 67 (suppl): 1012S

Dallman, P. R. (1967). Cytochrome oxidase repair during treatment of copper deficiency: relation to mitochondrial turnover. *Journal of Clinical Investigation*. Nov; 46(11): 1819-27.

Dallman, P. Hierro. (1993). *Conocimientos Actuales sobre Nutrición*. (Sexta edición), International LifeSciencesInstitute ILSI Press. Organización Panamericana de la Salud. Publicación científica N° 532. 277-288.

Davies, K., Donovan, C., Refino, C., Brooks, G., Packer, L. & Dallman, P. (1984). Distinguishing effects of anemia and muscle iron deficiency on exercise bioenergetics in the rat. *American Journal of Physiology*, 246: E535-E543.

Evans, J. L. & Abraham, P. A. (1973). Anemia, iron storage and ceruloplasmine in copper nutrition in the growing rat. *Journal of Nutrition*, 103, 196-201.

Finch, C. A., Miller, L. R., Inamdar, A. R., Person, R., Seiler, K. & Mackler, B. (1976). Iron Deficiency in the rat: Physiological and Biochemical studies of muscle dysfunction. *Journal of Clinical Investigation*, 58: 447-453.

Garrick, M. D., Núñez, M. T., Olivares, M. & Harris E. D. (2003). Parallels and contrasts between iron and copper metabolism. *Biomaterials*, 16(1):1-8.

Graham GG, Cordano A. (1976). Copper deficiency in human subjects. In: Prasad AS, Oberleas D, eds. *Trace elements in human health and disease*. Vol I. Zinc and copper. New York: Academic Press, :363–72.

Gubler, C., Cartwright, G. & Wintrobe (1957). Studies on Copper Metabolism. Enzyme activities and iron metabolism in copper and iron deficiencies. The Journal of Biological Chemistry 224: 533-546.

Guía para instalaciones y cuidado de animales de laboratorio. (1968). (7-18). Organización Panamericana de la Salud. Washington: Comité del Instituto de Recursos Animales de Laboratorio.

Harris, E. D. Minerals in Food: Nutrition, Metabolism, Bioactivity. Destech Publications, Inc, 8/1/2014 - 378 páginas. Recuperado de [http://books.google.com.pe/books?id=bYCgAgAAQBAJ&dq=O%C2%B4Dell+BL.+Mineral+interactions+relevant+to+nutrient+requirements.+J+Nutr+1989+%3B+119+\(Suppl\):+1832-1838.&hl=es&source](http://books.google.com.pe/books?id=bYCgAgAAQBAJ&dq=O%C2%B4Dell+BL.+Mineral+interactions+relevant+to+nutrient+requirements.+J+Nutr+1989+%3B+119+(Suppl):+1832-1838.&hl=es&source)

Hart, E. B., Steenbock, H., Waddell, J. & Elvehjem, C.A. (1928). Iron in nutrition. VII. Copper as a supplement to iron for hemoglobin building in the rat. Journal Biology Chem., 77: 797-812.

Henderson, S., Dallman, P. & Brooks, G. (1986). Glucose turnover and oxidation are increased in the iron deficient anemic rat. American Journal of Physiology, 250 (Endocrinol. Metab. 13): E414-E421.

Hicks, P., Zavaleta, N., Chen, Z., Abrams, S. & Lönnerdal, B. (2006). Iron deficiency, but not anemia, upregulates iron absorption in breast-fed Peruvian Infants. The Journal of Nutrition 136:2435 – 2438.

Jalili, T., Medeiros, D. & Wildman, R. (1996). Aspects of cardiomyopathy are exacerbated by elevated dietary fat in copper restricted rats. Journal of Nutrition, 126: 807-816.

Leeson, T & Leeson, R. (1976). Histología. (Segunda Edición, pp. 54-61). México, Editorial Interamericana, S.A.

Lemberg, R. & Barrett, J. (1973). *Cytochromes*. (1-470). London: Academic Press Inc. LTD.

Lowry, O., Rosebrough, N., Lewis Farr, A. & Randall, R. (1951). Protein Measurement with the folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*, Nov.193: 265-275.

Malmström, B. (1990). Cytochrome oxidase: Some unsolved problems and controversial Issues. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 280(2): 233-241.

McLane, J. A., Fell, R. D., McKay, R. H., Winder, W. W., Brown, E. B. & Holloszy, J. O. (1981). Physiological and biochemical effects of iron deficiency on rat skeletal muscle function. *American Journal of Physiology*, 241: C47-C54.

Morgan, E. H. & Oates, P. S. (2002). Mechanisms and regulation of intestinal iron absorption. *Blood Cells Molecular Disease*, Nov-Dec,29(3):384-99.

O'Dell, B. (1989). Mineral Interactions Relevant to Nutrient Requirements. *Journal of Nutrition* 119: 1832 – 1838.

O'Donnell, A., Viteri, F. & Carmuega, E. (1997). Deficiencia de Hierro. Desnutrición Oculta en América Latina. Centro de Estudios sobre Nutrición Infantil. Centro Asociado de la Facultad de Medicina de la Universidad del Salvador.

Ohira, Y., Cartier, L. J., Chen, M. & Holloszy, J. (1987). Induction of an increase in mitochondrial matrix enzymes in muscle of iron deficient rats. *American Journal of Physiology*, 253 (Cell Physiology 22): C639-C644.

Olivares, M., Castillo, C., Arredondo, M. & Uauy, R. Cobre y Zinc en Nutrición humana.

http://www.uco.es/master_nutricion/nb/Gil%20Hernandez/Cu%20Zn.pdf

Olubunmi, A. (2005). Micronutrient changes in some tissues of copper deficient rats. *Pakistan Journal of Nutrition* 4(2):123-125.

Perfil Nutricional de País: Perú. (1999). Instituto de Investigación Nutricional. Centro Nacional de Alimentación y Nutrición. Lima, 1-50.

Perkkiö, M., Jansson, L., Henderson, S., Refino, C., Brooks, G. & Dallman, P. (1985). Work performance in the iron deficient rat: improved endurance with exercise training. *American Journal of Physiology*, 249 (Endocrinology Metabolism 12) E302-E311.

Planas, J. (1990). El hierro: metal precioso para los seres vivos. *Mundo Científico*, Vol. 3. Nº 78: 30-35.

Prohaska y Wells, J. (1974). Copper deficiency in the developing rat brain: A possible model for Menkes' steely-hair disease. *Journal of Neurochemistry*, 23; 91-98. DOI: 10.1111/j.1471-4159-1974.tb06920x.

Prohaska, J. (1983). Changes in tissue growth, concentrations of copper, iron, cytochrome oxidase and superoxide dismutase subsequent to dietary or genetic copper deficiency in mice. *Journal of Nutrition*, 113:2148-2158.

Prohaska, J. (1984). Repletion of copper deficient mice and brindled mice with copper or iron. *Journal of Nutrition*, 114, 422-430.

Prohaska, J. R. (1991). Changes in Copper, Zn-SOD, Cytochrome c oxidase, glutathione peroxidase and glutathione transferase activities in copper-deficient mice and rats. *Journal of Nutrition*, Mar; 121(3): 355-63.

Puentes, R., Uauy, R. & Castillo, C. Déficit de cobre en el lactante.

<http://www.scielo.cl/pdf/rcp/v53n1-6/art18.pdf>

Raunhardt, O. y Bowley, A. (1996). Mandatory Food Enrichment. Suplemento a la cartainformativaNutriview 1.

http://www.dsm.com/content/dam/dsm/nip/en_US/documents/leche.pdf

Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Committee on standards for nutritional studies.(1977). Journal of Nutrition, 107: 1340-1348.

Requerimientos de nutrientes de las ratas de laboratorio. (2000).Lima: Universidad Nacional Agraria.

Rodríguez-Matas, M. C., Lisbona, F., Gómez-Ayala, A. E., López-Aliaga & Campos, M. S. (1998). Influence of nutritional iron deficiency development on some aspects of iron, copper and zinc metabolism. LaboratoryAnimals, Jul; 32(3): 298-306.

Santisteban, J. (2,001). Alimentación del lactante. Teleformación en salud EHAS. Lima, Editores:Dr. J. Peinado, Sr. V. Roque.

<http://www.upch.edu.pe/ehas/pediatria/nutricion/Clase%202.htm>

Shafer, A. &Bunn, F. (1986). Anemia por deficiencia y por carga de hierro. En Harrison(Décima edición, Sexta edición en español. Vol Nº 4. 2582 - 2589). México, Libros McGraw-Hill.

Sharp, Paul. (2004). Themolecular basis of copper and iron interactions. Proceedings of theNutritionSociety, 63, 563–569.

Smith, L. (1955). Reactions of cytochromes a y a3: studies of oxidation and reduction of the pigments in a purified preparation. The Journal of Biological Chemistry, 215:833-846

Stangl, G. &Kirchgesshey, M. (1998). Effect of different degrees of moderate iron deficiency on the activities of tricarboxylic acid cycle enzymes, and the cytochrome oxidase, and the iron, copper, and zinc concentrations in rat tissues. EuropeanJournal of Nutrition, Sep; 37(3):260-8.

Stiburek, L., Hansikova, H., Tesarova., M. &Cerna, L. (2006). Biogenesis of Eukaryotic Cytochrome c oxidase. *Physiological Research* 55(suppl.2):S27-S41.

Stryer, L. (1986). *Bioquímica*(Segundaedición) (283-306). Barcelona:EditorialReverté, S.A. Universidad Standford.

Thomas, Carla y Oates, Phillip. (2003). Copper deficiency increases iron absorption in the rata. *American Journal Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* 285:G789-G795.

Tyler, D. (1998). *Metabolismo del agua y Minerales*. En Martin, D., Rodwell, V. & Mayes, P. (Ed.), *Bioquímica de Harper*(14^º edición) (pp. 644 – 648). México:Editorial Manual Moderno.

Unicef, (2009). *Nota técnica sobre Suplementación con micronutrientes*

Wessling-Resnick, M. (2006). Iron Imports. III. Transfer of iron from the mucosa into circulation. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*,290: G1–G6.

Willis, W., Brooks, G., Henderson, S. &Dallma, P. (1987). Effects of iron deficiency and training on mitochondrial enzymes in skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, 62(6): 2442-2446.

ANEXOS

COMPOSICION DE LA DIETA				
CLASE DE DIETA/cantidad de nutriente para cada kilo de dieta				
NUTRIENTE	NORMAL	DEFICIENTE DE HIERRO	DEFICIENTE DE COBRE	DEFICIENTE DE HIERRO Y COBRE
MINERALES				
(mgr)				
SO4Fe	165	0	165	0
SO4Cu	15.3	15.3	1	1
SO4Zn	83.33	83.33	83.33	83.33
SO4Mg	1018.9	1175.6	1041.9	1186.1
OMg54%	544.8	486.1	536.1	482.2
OMn	87.1	87.1	87.1	87.1
CaHPO4.2H2O				
(gr) phosbic	20.39	20.39	20.39	20.39
Ca(IO3)2.H2O	0.31	0.31	0.31	0.31
Na2SeO3	0.22	0.22	0.22	0.22
Cloruro de Sodio	1560	1560	1560	1560
Cloruro de Potasio				
VITAMINAS (mgr)				
B1	6.5	6.5	6.5	6.5
B2	7.5	7.5	7.5	7.5
B3 (ac. Nicotínico)	30	30	30	30
B5	17	17	17	17
B6	8.5	8.5	8.5	8.5
B8	10	10	10	10
B9	2.5	2.5	2.5	2.5
B12	1	1	1	1
A	5.3	5.3	5.3	5.3
D	20	20	20	20
E	100	100	100	100
K	0.12	0.12	0.12	0.12
MACRONUTRIENTES (gr)				
CASEINA	200	200	200	200
METIONINA	2	2	2	2
SUCROSA	400	400	400	400
ACEITE DE MAIZ	50	50	50	50
BITARTRATO DE COLINA	2	2	2	2
FECULA DE MAIZ	160	160	160	160

DOSAJE DE HIERRO Y COBRE DE DIETA PARA RATAS POR GRUPOS

(mg por 100 gr de dieta)

TIPOS DE DIETA	Valor obtenido de Hierro	% con respecto al valor normal de la dieta	Valor obtenido de Cobre	% con respecto al valor normal de la dieta
NORMAL	5.61	100.00	1	100.00
DEFICIENTE DE HIERRO	1.477	26.32	1.3	130.00
DEFICIENTE DE COBRE	5.36	95.54	0.083	8.30
DEFICIENTE DE HIERRO Y COBRE	1.477	26.32	0.083	8.30

CICOTOX (UNMSM)